



Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii*, un piézophile extrême par une approche multi -"omics"

Grégoire Michoud

► To cite this version:

Grégoire Michoud. Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii*, un piézophile extrême par une approche multi -"omics". Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2014. Français. NNT : 2014BRES0078 . tel-02146980

HAL Id: tel-02146980

<https://theses.hal.science/tel-02146980>

Submitted on 4 Jun 2019

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

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



université de bretagne
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

Mention : MICROBIOLOGIE

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

Grégoire Michoud

Préparée à l'Institut Universitaire Européen
de la Mer, au sein du laboratoire de
Microbiologie des Environnements Extrêmes

Etude des effets des
hautes pressions
hydrostatiques sur
Pyrococcus yayanosii, un
piézophile extrême par une
approche multi-«omics»

Thèse soutenue le Lundi 7 Juillet 2014

devant le jury composé de :

Jacques OBERTO

RAPPORTEUR

Chargé de recherche, Université Paris Sud 11

Long-Fei WU

RAPPORTEUR

Directeur de recherche, Aix-Marseille Université

Philippe OGER

EXAMINATEUR

Chargé de recherche, ENS de Lyon

Vianney PICHEREAU

PRESIDENT

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Mohamed JEBBAR

DIRECTEUR DE THESE

Professeur, Université de Bretagne Occidentale

La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne.
La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi.
Ici, nous avons réuni théorie et pratique :
Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !

Albert Einstein

Combien sot, en effet, est le voyageur qui,
remarquant d'agréables prairies sur son chemin,
oublie d'aller où il voulait

Anonyme

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres du jury, Jacques Oberto, Long-Fei Wu, Philippe Oger, Vianney Pichereau et Mohamed Jebbar d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Je remercie Mohamed Jebbar, mon directeur de thèse de m'avoir encadré pendant cette thèse. Merci de m'avoir poussé à donner le meilleur de moi-même, en me laissant organiser mon travail comme je le souhaitais et en ayant toujours des idées qui permettait d'approfondir le sujet. Tu as fortement contribué à mon envie de poursuivre dans cette voie.

Je remercie Pauline Vannier de m'avoir appris la base de la culture des *Thermococcales*, ainsi que la culture sous pressions, on aura bien galéré avec ces incubateurs mais on s'en est sorti finalement !!

Merci à Mickael d'avoir entretenu et surtout réparé ces fameux incubateurs pressions sur lesquels j'aurai passé un certains temps... Merci aussi pour m'avoir donné un bon coup de main dans mes différentes manipulations notamment protéiques.

Je voudrais remercier Stéphane, Stéphanie, Morgane, Alexandre, Nadège et Myriam sans qui le labo ne tournerait pas et qui tentent de contrôler la tendance au désordre inhérente aux stagiaires et doctorants. Un remerciement tout particulier à Stéphane pour son expertise notamment sur la culture de micro-organismes et pour avoir repris le flambeau du développement du bioréacteur.

Merci à Yann Moalic et Lois Maignien pour leur expertise en bio-info et pour les discussions qui m'ont permis de mieux appréhender la partie analyse de cette thèse. Je remercie aussi les chercheurs du laboratoire, Karine Alain, Claire Geslin, Gwenaëlle Le Blay,

Frédérique Duthoit et, Marc Le Romancer. Un salut particulier à Odile Vandenabeele-Trambouze, dont la jovialité dès le matin manque au laboratoire, en espérant que tu iras mieux très vite.

Mes remerciements à la partie grenobloise de l'ANR Living Deep soit Bruno Franzetti, Vincent Marty et Judith Peters pour avoir tenter de m'expliquer les bases de la diffusion neutronique malgré mes lacunes importantes dans ce domaine.

Je remercie aussi la composante ifremer du laboratoire, notamment la directrice Anne Godfroy, les chercheurs Didier Flament, Ghislaine Henneke, Laurent Toffin, Marie-Anne Cambon-Bonavita ainsi que les thésards, Simon Le Bloa, Gaelle Hogrel, Sandrine Bessete. Un de mes regrets aura de ne pas avoir plus interagit avec vous.

Je voudrais aussi remercier Jean-Luc Ferat et Guy-Franck Richard, mes anciens encadrants de stage de M1 et M2 qui ont façonné mon envie de faire de la microbiologie et de la génomique. Un salut à Jacques Daniel (oui je sais ...) pour ces discussions sur le métier de chercheur.

Je souhaite remercier tout particulièrement les stagiaires et surtout doctorants du laboratoire, qui ont rendu cette thèse si agréables. Tout d'abord Julien, avec qui j'ai sympathisé dès le premier jour dans le bureau des stagiaires, et qui avait toujours la petite blague au bon moment. Merci de m'avoir fait découvrir Brest, enfin surtout les bars, ainsi que le whisky, je n'oublierais pas de sitôt ces discussions politiques avec Joonas et Fred jusqu'au bout de la nuit. Je remercie aussi Fred avec qui nous avons des discussions sur la bioinfo et qui n'avait pas son pareil pour lancer des sujets de philosophie dès le matin, je n'aurai qu'un petit reproche, c'est que tu sois un peu trop centriste pour moi. . . Je pense aussi à Joonas, le finlandais volant qui avait entre autre une belle culture cinématographique et un bon coup de bouteille (de bière évidemment). Merci à Matthieu (avec deux T!) pour ses jeux de mots, son sens lyrique et sa bonne humeur. Merci aussi aux filles du bureau Coraline et Cécile d'apporter un peu de fraîcheur et légèreté dans ce bureau très masculin. Ne t'inquiètes pas Cécile, ça va aller!! Je pense aussi aux stagiaires et post-docs notamment Samuel, Axel, Kevin, Sophia, Tiphaine et Gwendoline.

Je remercie mes parents et mes frères pour ces petites discussions Skype du dimanche soir plus ou moins stables et plus ou moins compréhensibles lorsque le nombre de participants augmentaient. Je les remercie aussi pour ces voyages à quelques milliers de km qui étaient sans pareil pour se changer les idées. Je remercie aussi la partie bretonne de la famille Le Den que j'ai en quelque sorte redécouvert avec cette thèse à Brest. Un remerciement tout particulier à mes grands-parents qui m'ont souvent accueilli le dimanche pour des déjeuners parfois un peu arrosé et qui ont ainsi combattu ma tendance

à l'isolement avec plus ou moins de succès, il faut bien le dire dire. J'espère que vous aller vous remettre très vite.

Finalement, je voudrais remercier toutes les personne que j'ai oubliées, notamment mes anciens collègues du M2 et les gens que j'ai côtoyé dans les différents laboratoires par lequel je suis passé.

TABLE DES MATIÈRES

I	Introduction	1
I.1	Les sources hydrothermales	1
I.2	La pression hydrostatique	5
I.3	La piézophilie	6
I.4	Les micro-organismes piézophiles	8
I.5	Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « fondamentaux »	13
I.5.1	La membrane cellulaire	13
I.5.2	Les protéines	16
I.5.3	Le biais de codons	17
I.5.4	Les acides nucléiques	19
I.6	Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »	20
I.6.1	La mobilité	22
I.6.2	La membrane : transport, respiration, protéines	27
I.6.3	Induction d'une réponse générale de stress à la pression hydrostatique	33
I.7	Les <i>Thermococcales</i>	36
I.7.1	Réplication, transcription, traduction	37
I.7.2	Le métabolisme énergétique	43
I.7.3	Les voies de biosynthèse	49
I.7.4	Les transporteurs	53
I.7.5	La mobilité	55
I.7.6	L'immunité cellulaire : les CRISPR	57
I.8	Contexte et objectifs	58
II	Matériel et méthodes	63
II.1	Culture de <i>Thermococcales</i>	63
II.1.1	Milieu de culture	63
II.1.2	Culture en condition anaérobie	64

II.1.3	Culture sous pression hydrostatique	64
II.1.4	Cinétique de croissances	64
II.1.5	Observation en microscopie électronique à transmission	65
II.2	Acides nucléiques	66
II.2.1	Extraction d'ADN génomique	66
II.2.2	Amplification par PCR	66
II.2.3	Extraction d'ARN total	67
II.2.4	Purification de l'ARN et vérification	68
II.2.5	RT-PCR	68
II.2.6	Migration sur gel	69
II.2.7	Amorces utilisées	69
II.2.8	Puces à ADN	70
II.3	Protéines	71
II.3.1	Extraction de protéines par la méthode de LEE	71
II.3.2	Dosage des protéines	72
II.3.3	Migration SDS-PAGE	72
II.3.4	Analyses en LC-MS/MS « de novo »	73
II.4	Analyse et comparaison génomique	74
II.4.1	Analyse des gènes régulés par la pression hydrostatique	74
III	Comparaison de génomes	77
III.1	Analyses phylogéniques	77
III.2	Physiologie	81
III.3	Génomique	81
III.4	CRISPR et CRISPRcas	98
III.5	Transporteurs	102
III.6	Métabolisme de l'hydrogène et du formate	103
III.7	Conclusions	106
IV	Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH	109
IV.1	Résultats généraux	109
IV.2	Analyse de <i>P. furiosus</i>	118
IV.2.1	Mobilité	118
IV.2.2	Transport	121
IV.2.3	Traduction	123
IV.3	Analyse de <i>P. yamanosii</i>	124
IV.3.1	Chimiotactisme	124
IV.3.2	Tranports	125
IV.3.3	Traduction	127
IV.3.4	Respiration et métabolisme énergétique	129
IV.3.5	CRISPR-cas	134
IV.3.6	ARN non codants	138
IV.3.7	Régulation diverses	140

V	Discussion générale et conclusion	145
VI	Annexes	155
VI.1	MICHOUD et JEBBAR (2014)	155
VI.2	PETERS <i>et al.</i> (2014)	190
VI.3	THIEL <i>et al.</i> (2014)	203
	Bibliographie	213

TABLE DES FIGURES

I.1	Coupe schématique de la biosphère profonde	2
I.2	Localisation des sources hydrothermales	4
I.3	Croissance de souches piézosensibles, piézotolérantes, piézophiles et piézo- philes strictes	8
I.4	Adaptation des lipides archéens aux conditions environnementales chez <i>M.</i> <i>jannaschii</i>	15
I.5	Structure des appareils de mobilité bactériennes et archéennes	23
I.6	Schéma simplifié de la voie du chimiotactisme chez les <i>Bacteria</i> et le phylum archéen des <i>Euryarchaeota</i>	25
I.7	Représentation schématique du système ToxR/S chez <i>P. profundum</i> SS9	29
I.8	Système respiratoire aérobie	32
I.9	Modèle de transcription chez les <i>Thermococcales</i>	39
I.10	Voie de la glycolyse	44
I.11	Modèle d'action des hydrogénases chez <i>P. furiosus</i>	48
I.12	Cluster responsable du métabolisme du formate	50
I.13	Transporteur ABC archéen	54
I.14	Modèle de transport de sucres chez les <i>Thermococcales</i>	56
I.15	Mécanisme d'action simplifié du système CRISPR-Cas.	59
III.1	Arbre phylogénique des <i>Thermococcales</i> séquencées.	78
III.2	Calcul de la signature génomique entre <i>Thermococcales</i>	80
III.3	Analyse DotPlot entre les 4 <i>Pyrococcus</i> étudiées	84
III.4	Alignement d'un îlot génomique de <i>P. yayanosii</i> avec <i>T. barophilus</i>	85
III.5	Diagramme de Venn représentant les protéines orthologues chez 4 <i>Pyrococ-</i> <i>cus</i>	89
III.6	Alignement d'un cluster de <i>P. yayanosii</i> avec le plasmide de <i>Thermococcus</i> sp 26-2	90
III.7	Heatmap représentant la proportion d'enzymes présentes par pathway chez les <i>Pyrococcus</i>	92

Table des figures

III.8	Corrélation entre le nombre d'enzymes par espèces de <i>Thermococcales</i> pour une voie métabolique en fonction de la profondeur d'origine de celles-ci . . .	95
III.9	Heatmap représentant la proportion de gènes hautement exprimés par catégorie arCOG	99
III.10	Alignement des clusters de protéines associées aux CRISPR.	101
III.11	Nombre de domaines transmembranaires par transporteur.	104
III.12	Alignement de clusters du métabolisme du formate.	105
IV.1	Courbes de croissance	110
IV.2	Résumé des régulations de gènes et protéines chez <i>P. furiosus</i> et <i>P. yayanosii</i>	112
IV.3	Régulations transcriptionnelles et traductionnelles dans les mêmes conditions de pression	114
IV.4	Représentation graphique des données transcriptomique et protéomique chez <i>P. yayanosii</i> et <i>P. furiosus</i>	115
IV.5	Regroupement des catégories GO régulées chez <i>P. furiosus</i>	116
IV.6	Régulation de l'archaellum chez <i>P. furiosus</i>	121
IV.7	Observation en MET de cellules de <i>P. furiosus</i> à 0,1 et 45 MPa	122
IV.8	Régulation des protéines ribosomales de <i>P. furiosus</i>	124
IV.9	Régulation du chimiotactisme chez <i>P. yayanosii</i>	126
IV.10	Régulation des protéines ribosomales de <i>P. yayanosii</i>	128
IV.11	Régulation du cluster du formate et des hydrogénase de <i>P. yayanosii</i>	133
IV.12	Représentation schématique du rôle des différents clusters dans la production d'ions H^+ chez <i>P. yayanosii</i>	134
IV.13	Cluster des CRISPR et gènes <i>cas</i> régulés chez <i>P. yayanosii</i>	135
IV.14	Alignement d'un cluster de gènes <i>cas</i> régulé chez <i>P. yayanosii</i>	136
IV.15	Régulation d'un îlot génomique de <i>P. yayanosii</i>	143
VI.1	Schéma du spectromètre IN13	192

LISTE DES TABLEAUX

I.1	Exemple de piézophiles décrits	12
I.2	Effets de la pression sur les fonctions cellulaires	23
I.3	Principaux composés impliqués dans la réplication chez les trois domaines du vivant	38
I.4	Voies prédites de biosynthèses d'acides aminés chez les <i>Thermococcales</i> .	52
II.1	Amorces archaea de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S	69
II.2	Amorces de <i>P. yayanosii</i>	69
II.3	Amorces de <i>P. furiosus</i>	70
II.4	Outils informatiques utilisés	74
III.1	Résumé de la physiologie des <i>Thermococcales</i> séquencées	79
III.2	Caractéristiques physiologiques de 4 <i>Pyrococcus</i>	82
III.3	Caractéristiques génomiques principales des <i>Pyrococcus</i> séquencées	83
III.4	Ilots génomiques prédits chez 4 <i>Pyrococcus</i>	86
III.5	Description des catégories arCOGs	88
III.6	Corrélation entre la profondeur d'origine et le nombre d'enzyme par pa- thway KEGG	97
III.7	Gènes impliqués dans le métabolisme de l'hydrogène	105
IV.1	Résumé des enrichissements GO et KEGG	118
IV.2	Validations par qRT-PCR des données de puces	119
IV.3	Récapitulatif de la régulation de la voie de biosynthèse des ARNt chez <i>P. yayanosii</i>	130
IV.4	Régulation des ARNnc de <i>P. yayanosii</i>	140
VI.1	Inventaire non exhaustif de techniques utilisées pour l'étude sous hautes pressions de protéines	191

- cas*** CRISPR-associated.
- 2PG** glyceraldehyde-2P.
- 3PG** glyceraldehyde-3P.
- 5-FOA** 5-Fluoroorotic acid.
- aaARNt** ARNt anticodon.
- ABC** ATP-binding cassette.
- ADN** acide désoxyribonucléique.
- AICAR** 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide.
- AIR** 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole.
- ARN** acide ribonucléique.
- ARNm** ARN messenger.
- ARNnc** ARN non codant.
- ARNr** ARN ribosomique.
- ARNt** ARN de transfert.
- ARNti** ARN de transfert inverse.
- ATP** adénosine-5'-triphosphate.
- bps** bodies per second.
- BRE** B recognition element.
- CAI** codon adaptation index.
- CAIR** 5'-phosphoribosyl-4-carboxy-5-aminoimidazole.
- cDPG** cyclic 2,3-diphosphoglycerate.
- CRISPRs** clustered regularly interspaced short palindromic repeats.
- CSP** cold shock proteins.
- CUT** carbohydrate uptake transporters.

Abréviations

DEPC diéthyl pyrocarbonate.

DTT dithiothréitol.

EDTA acide éthylène diamine tétraacétique.

FAICAR 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide.

FBA fructose-1,6-bisphosphate aldolase.

FC fold change.

FDR false discovery rate.

GAP glyceraldehyde 3-phosphate.

GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase.

GAPOR glyceraldehyde-3-phosphate ferrédoxine oxydoréductase.

GLK glucokinase.

HgcC "high GC"-C.

HPH hautes pressions hydrostatiques.

HPS 3-hexulose-6-phosphate synthase.

HSP heat shock proteins.

HTH helix-turn-helix.

IF facteurs d'initiation.

ILL Institut Laue Langevin.

IMP inosine monophosphate.

LC-MS/MS chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

Mbh membrane-bound hydrogenase.

Mbx membrane-bound oxydoreductase.

MCM minichromosome maintenance.

MCP membrane cofactor protein.

MET microscopie électronique à transmission.

MFS major facilitator superfamily.

MPa mégapascal.

PAPPSO Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest.

PC phosphatidylcholines.

PCR polymerase chain reaction.

PE phosphatidylethanolamines.

PEP phosphoenolpyruvate.

PFA paraformaldéhyde.

PFK phosphofructokinase.
PG phosphatidylglycerols.
PGK 3-phosphoglycerate kinase.
PGM phosphoglycerate mutase.
PGP 2,3 biphosphoglycerate.
PHI 6-phospho-3-hexuloisomerase.
PYK pyruvate kinase.

RNAP ARN Polymérase.
ROS reactive oxygen species.
RT-PCR reverse transcriptase PCR.

SAICAR phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide.
SAM S-adenosyl methionine.
SDS dodécylsulfate de sodium.
siARN small interfering ARN.
SOR superoxyde réductase.
SRV blast score ratio value.
SscA secondary structure conserved A.

TBP TATA-Binding protein.
TF facteurs de transcription.
TIM triosephosphate isomerase.

I.1. Les sources hydrothermales

L'année 1977 a consisté en un tournant important dans l'étude des micro-organismes se développant dans des conditions qualifiées d'« extrêmes ». Avec tout d'abord la découverte au large des îles Galápagos des premières sources hydrothermales (LONS DALE, 1977; CORLISS *et al.*, 1979) ainsi que la description par WOESE et FOX du troisième domaine du vivant, soit les archées ou Archaea (WOESE et FOX, 1977).

L'étude bibliographique présentée ici se focalisera plus particulièrement sur ces deux aspects. Une estimation de la biomasse marine suggère que le nombre de cellules présentes à une profondeur de plus de 200 m serait d'environ $6,5 \times 10^{28}$ cellules (MATTES *et al.*, 2013). On y distingue différents habitats présentant un nombre plus ou moins important de micro-organismes, notamment dans le fond des océans, les sources hydrothermales, les sédiments de sub-surface et les zones d'émissions de fluides froids (Figure I.1 page suivante). Les limites physico-chimiques de la vie sont actuellement situées dans ces environnements notamment en terme de hautes températures et de hautes pressions hydrostatiques (HPH). Le record de la vie à haute température serait détenu par l'espèce

I. Introduction

Methanopyrus kandleri à 122 °C sous HPH (20 mégapascal (MPa)) (TAKAI *et al.*, 2008). Le record de la vie sous HPH par contre est détenu par l'espèce *Pyrococcus yayanosii* CH1 à 130-150 MPa (ZENG *et al.*, 2009). Cela situerait la limite géographique inférieure de la biosphère profonde à environ 4 km sous le plancher océanique ou l'écorce terrestre (OGER et JEBBAR, 2010).

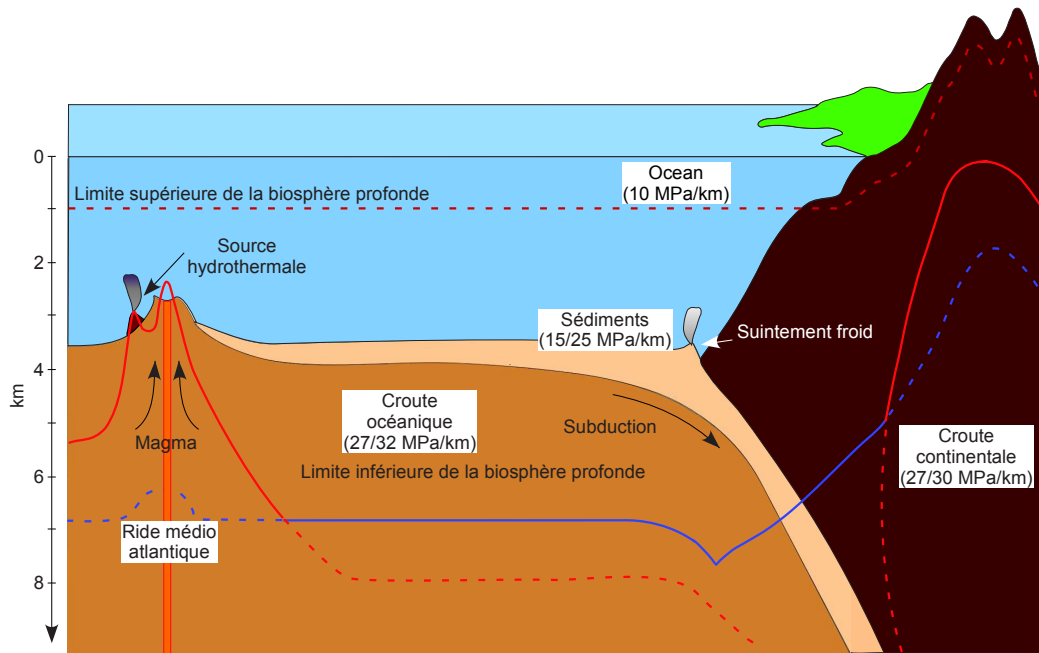


FIGURE I.1.: Coupe transversale schématique décrivant la biosphère profonde, adapté de OGER et JEBBAR (2010). La limite supérieure de la biosphère profonde se situerait à 1 000 m de profondeur alors que la limite inférieure se situerait à environ 4 km sous le sédiment. La ligne rouge correspond à la limite actuelle de la vie d'un point de vue de la température alors que la ligne bleue décrit celle-ci au niveau des limites de la pression hydrostatique. Les environnements où l'on retrouve le plus de micro-organismes sont les sources hydrothermales, les zones d'émissions de fluides froids, les sédiments de sub-surface et le fond de l'océan.

La fosse des Mariannes dans l'océan pacifique représente l'endroit le plus profond des océans et sa profondeur est estimée à 11 034 m (JANNASCH et TAYLOR, 1984; ABE et HORIKOSHI, 2001). Ce sont typiquement des environnements oligotrophes, où seul 1% du carbone produit à la surface par photosynthèse se retrouve au fond de l'océan. Il

est soit dissous soit accrochés à des particules minérales (neige carbonique). Ils sont aussi caractérisés par une température moyenne de l'ordre de 3-4 °C, et par l'absence de lumière solaire. La pression dans l'océan augmente typiquement de 10 MPa/km et dès 1975, des micro-organismes psychrophiles ont été isolés de ces environnements et cultivés au laboratoire (MORITA, 1975).

Les sédiments de sub-surface ou continentaux sont des environnements plus variés avec des différences de température et de composition chimique. Le gradient de température des sédiments est de l'ordre de 25-30 °C par km. Ils sont aussi caractérisés par une absence de lumière et une rareté de l'oxygène. La composition de ceux-ci notamment en termes de sources d'énergie est assez pauvre. Néanmoins, la présence de procaryotes stimulerait la formation d'H₂ lorsque les températures sont importantes par réduction des sulfates, acétogénèse, production de CO₂ et méthanogénèse (PARKES *et al.*, 2011). Un point intéressant est le fait la plupart des études effectuées sur ces sédiments n'a permis pour l'instant que d'isoler que très peu de micro-organismes cultivables. Actuellement la limite de la vie se situerait à 1 626 m de profondeur déterminée par des analyses moléculaires (ROUSSEL *et al.*, 2008), bien qu'un autre article publié dans le laboratoire situerait la limite de la vie dans le sédiment à 60 °C et 1 922 m (CIOBANU *et al.*, 2014). Néanmoins, le fait que la profondeur record pour l'isolement et la caractérisation d'un microorganisme dans les sédiments soit seulement de 500 m dans le sédiment (*Desulfovibrio profundus* (BALE *et al.*, 1997)), pose la question quand à la capacité des micro-organismes à se diviser à des profondeurs supérieures. La pression augmente d'ailleurs plus fortement dans le sédiment (25-30 MPa/km) que dans l'océan (10 MPa/km).

Les sources hydrothermales sont caractérisées par leur proximité avec des dorsales océaniques. On compte actuellement environ 580 sites (Figure I.2 page suivante), où sont retrouvées des sources hydrothermales (BEAULIEU, 2010). Ce sont des émissions de fluides chauds provenant de la subsurface créées par l'infiltration d'eau de mer dans des

I. Introduction

infractuosités rocheuses. Au contact du magma volcanique, cette eau se réchauffe et se charge à la fois en gaz dissous (H_2S , CO_2 , H_2 , et CH_4 ...) ainsi qu'en métaux et autres composés chimiques (soufre, cadmium, barium, sulfate...)(JANNASCH et MOTTTL, 1985). En jaillissant à la surface du plancher océanique, l'eau enrichie possède une température comprise entre 100 et 400 °C, est riche en nutriments et rencontre l'eau de mer oligotrophe dont la température est en moyenne de 3 °C. Le différentiel de température entraine le dépôt de matière minérale et de l'oxydation importante au niveau de la zone d'échappement du fluide ce qui constitue les sources hydrothermales et forment les cheminées ou fumeurs.

Distribution globale des Sources Hydrothermales

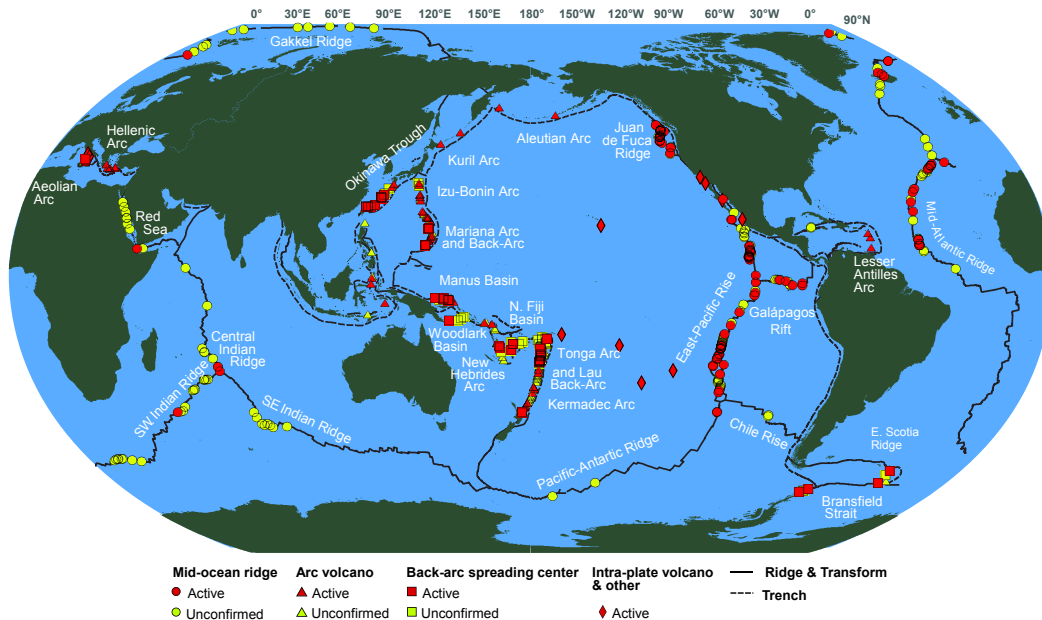


FIGURE I.2.: Figure adaptée de la base de données « InterRidge Vents Database » présentant la distribution globale des sources hydrothermales connues (BEAULIEU, 2010)

Ces sources hydrothermales sont considérées comme des oasis de vie où prospère une faune abondante telle des crevettes (*Rimicaris exoculata*), des bivalves (*Calyptogenia*), des vers (*Alvinella* et *Paralvinella*) ainsi qu'une diversité importante de micro-organismes (VAN DOVER *et al.*, 2001; HOWE, 2009). Les micro-organismes qui nous intéressent

plus particulièrement ici sont des organismes se développant à proximité immédiate de ces sources, ce qui implique qu'ils sont soumis à un gradient important de températures fluctuant entre 2-3 °C dans l'eau de mer et jusqu'à 400 °C dans les fluides hydrothermaux. Ces micro-organismes sont souvent capables de réaliser la chimiosynthèse, c'est à dire la transformation de matières carbonées en matières organiques, qui sera alors consommée par d'autre micro-organismes et les organismes eucaryotes décrits précédemment. L'absence d'oxygène est caractéristique des fluides des sources hydrothermales notamment lorsque la température est supérieure à 50 °C. Cela implique que chez les organismes anaérobies, l'oxygène est remplacé par des éléments tels le NO_3^- , le soufre élémentaire, le CO_2 et le SO_4^{2-} en guise d'accepteur d'électrons (JANNASCH et MOTTTL, 1985). Les sources hydrothermales se trouvent à des profondeurs moyennes de 2 500 m avec un maximum à environ 5 000 m de profondeur dans la fosse des caimans (CONNELLY *et al.*, 2012). Ces fortes pressions et températures ajoutés à la présence de nombreux organismes eucaryotes ou procaryotes pose la question des mécanismes que développent ces organismes afin de résister à ces conditions qualifiées d'extrêmes.

I.2. La pression hydrostatique

La pression hydrostatique est une pression qu'exerce l'eau sur une surface donnée. Elle augmente typiquement dans les océans de 0,1 MPa tous les 10 m, ce qui implique que la pression à 2 500 m sera de 25 MPa. La pression hydrostatique est une force se mesurant avec 3 unités principales, l'atmosphère (atm), le bar (bar) et le Pascal (Pa). L'atmosphère et le bar sont quasiment identiques ($1 \text{ atm} = 1,013\,25 \text{ bar}$), alors que 1 Pa est égal à 10^{-5} bar . Dans cette thèse, j'emploierai essentiellement le pascal ou plutôt le mégapascal (MPa) qui est l'unité de référence internationale.

Les effets des HPH ont été décrits physiquement par LE CHATELIER en 1884. Il décrit l'influence de différents facteurs physiques sur un système tel sa température, son volume

I. Introduction

et sa pression. Lorsqu'il est soumis à l'un de ces facteurs, il aura tendance à minimiser les effets du dit facteur en jouant sur l'un ou plusieurs autres facteurs. Dans ce cas-là, une augmentation de la pression hydrostatique favorisera la réduction de son volume. Le changement de volume (ΔV) qui est la différence entre le volume final et le volume initial du système est entre autre décrit par l'équation I.1 tirée de BALNY *et al.* (2002).

$$\Delta V = \Delta V^0 + \Delta\alpha(T - T_0) - \Delta\beta(P - P_0) \quad (\text{I.1})$$

Dans cette équation, ΔV^0 , $\Delta\alpha$, $\Delta\beta$, P et T sont respectivement la variation de volume en conditions standard, le facteur de dilatation thermique, le facteur de compressibilité, la pression et la température. Lorsque la température est constante, seul la pression et le volume sont intégrés dans la réaction. Le facteur de compressibilité joue ainsi un rôle important, notamment car le volume des biomolécules (*e.g.* protéines, lipides...) peut varier de façon importante. De la même manière, différentes expériences ont montré que si une réaction générant une diminution de volume était soumise à des HPH, son activité serait fortement augmentée (SMELLER, 2002).

I.3. La piézophilie

Bien que la culture de micro-organismes issus des environnements profonds n'est démarrée que dans les années 1950, on considère que leur étude a débutée en 1884, année où CERTES a obtenu les premiers échantillons de sédiments et d'eau dont on a confirmé qu'ils contenaient des bactéries (CERTES, 1884). ZOBELL *et al.* dans les années 1950, et à partir des années 1980, JANNASCH *et al.* (1984,1985) et YAYANOS *et al.* (1981,1995) ont contribué fortement à la culture des micro-organismes des environnements profonds (colonne d'eau principalement), notamment grâce au développement d'appareillages adaptés. La piézophilie est la capacité d'un organisme à croître sous

pression hydrostatique (YAYANOS, 1995). Le mot piézophile, anciennement barophile, provient du grec « piezo » pour presser et « phile » pour aimer. La piézophilie ou barophilie a été décrite la première fois par ZOBELL et JOHNSON en 1949. Les organismes barophiles sont alors considérés comme des organismes dont le taux de croissance est plus élevée sous pression hydrostatique qu'à pression atmosphérique. Actuellement, 4 catégories de micro-organismes réagissant différemment en fonction de la pression hydrostatique sont distinguées (Figure I.3 page suivante). Les micro-organismes se développant de façon optimale à des pressions hydrostatiques supérieures à la pression atmosphérique sont nommés piézophiles. Les micro-organismes qui se développent de façon optimale à pression atmosphérique (0,1 MPa) et résistent à des pressions élevées sont considérés comme étant piézotolérants. On les distingue des micro-organismes piézosensibles car ces derniers ne résistent pas aussi bien aux HPH. Déterminer la limite entre un organisme piézosensible et piézotolérant est encore contesté. Dans leur revue en 2001, ABE et HORIKOSHI considèrent que la différence entre les deux types de micro-organismes est déterminée par le taux de croissance à 50 MPa. Les micro-organismes piézotolérants conservent un taux de croissance à 50 MPa supérieur à 30% de leur taux de croissance dans des conditions optimales (ABE et HORIKOSHI, 2001). Enfin une dernière catégorie de micro-organismes croît de manière optimale à forte pression hydrostatique mais ne se développe pas à pression atmosphérique. Le premier de ces micro-organismes est une bactérie de la classe des *Gammaproteobacteria*, *Colwellia* MT41 qui a été isolée en 1981 par YAYANOS *et al.* (YAYANOS *et al.*, 1981). Ils sont considérés comme piézophiles stricts (OGER et JEBBAR, 2010; ZENG *et al.*, 2009).

L'estimation de la biomasse de cette biosphère profonde comme décrit plus haut fait l'objet de nombreux débats. Malgré cela, un nombre important de cellules procaryotiques se développent dans des conditions de pressions hydrostatiques élevées (supérieures à 10 MPa). Cela pose la question des mécanismes que développent ces micro-organismes pour

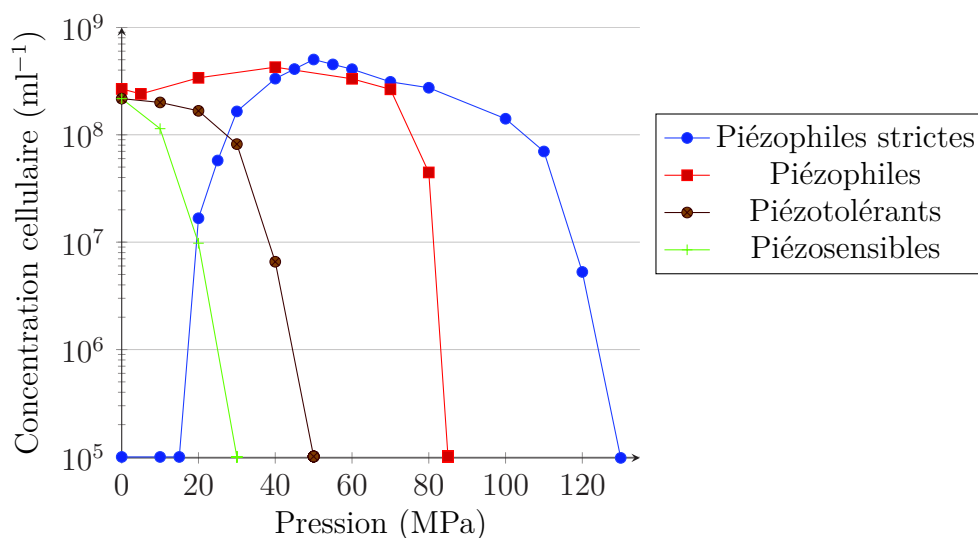


FIGURE I.3.: Graphique décrivant les concentrations cellulaires atteintes sur des cultures en phase stationnaire de différentes souches piézosensibles, piézotolérantes, piézophiles et piézophiles strictes. Inspiré de ZENG *et al.* (2009).

résister à ces HPH. Par ailleurs, l'effet de la pression hydrostatique est notamment utilisé dans le cadre de l'industrie agroalimentaire en tant que méthode de stérilisation. Dans cette dernière, les HPH sont utilisées pour stériliser toutes sorte d'aliments (Légumes, œuf, lait, sauces, etc...) à des pressions très élevées de l'ordre de 900 MPa (MATSER *et al.*, 2004).

I.4. Les micro-organismes piézophiles

Un certain nombre de micro-organismes piézophiles appartenant à la fois aux domaines *Bacteria* et *Archaea* ont été décrits (Tableau I.1 page 12). La plupart de ces micro-organismes sont des psychrophiles ayant été isolés au fond de la mer dans des conditions oligotrophes, ou dans des « bois coulés » qui sont des environnements hétérotrophes. Ce sont en grande majorité des *Gammaproteobacteria*. Les quelques organismes thermophiles ou hyperthermophiles piézophiles font majoritairement partie de l'ordre archéen des *Thermococcales* ou des bactéries *Thermotogales* (ELOE *et al.*, 2011).

L'isolement et la caractérisation des piézophiles est entre autres, rendue compliquée par le fait que leur culture nécessite des incubateurs hautes pressions qui sont des appareils coûteux et pas toujours disponibles sur le marché car il faut souvent fabriquer des prototypes. L'isolement des ces micro-organismes s'effectue à l'aide de navires de recherches océanographiques équipés de robots autonomes et téléopérés à distance ou de sous-marins habités, qui vont prélever des échantillons d'eau ou de sédiments dans un site déterminé tels une source hydrothermale, une émission de fluide froid ou un site géologique spécifique. Les prélèvements se font souvent à des profondeurs supérieures à 3 000 m. La remontée de ces échantillons s'effectue en plusieurs heures et la conservation sous pression de ces échantillons est très compliquée. Une fois remontés à bord du navire de recherche océanographique, les échantillons sont répartis dans des milieux artificiels et dans le meilleur des cas conservés sous pression dans des incubateurs spécifiques. Il est actuellement considéré que l'on ne cultive qu'à peine 1 % voir beaucoup moins des espèces de micro-organismes existantes (VARTOUKIAN *et al.*, 2010), bien que cette limite soit assez arbitraire (GEST, 2008).

Une fois que les échantillons conservés sous pressions sont ramenés au laboratoire, la présence de micro-organismes est déterminée par observation en microscopie optique et électronique. Afin d'isoler la ou les souches qui se développent dans ces conditions, des expériences de dilutions/extinctions sont effectuées jusqu'à n'obtenir qu'un clone pur. Après s'être assuré que le clone est pur, l'acide désoxyribonucléique (ADN) est extrait et l'ARN ribosomique (ARNr) 16S est séquencé pour classer le micro-organisme et lui attribuer une position phylogénétique dans l'arbre du vivant. Parallèlement, des cultures de nouveaux isolats sont réalisées dans des conditions physico-chimiques variables en utilisant des gammes de pH, de température, de salinité, de pression hydrostatique, avec différentes sources de carbone, en déterminant aussi la résistance à différents antibio-

Isolat	T _{opt} (°C)	P _{opt} (MPa)	Isolement	Profondeur d'isolement	Référence
<i>Bacteria</i>					
<i>Gammaproteobacteria</i>					
<i>Colwelliaceae</i>					
<i>Colwellia piezophila</i> Y223G	10	60	Fosse du Japon	6 278 m	NOGI <i>et al.</i> (2004)
<i>Colwellia</i> MT41	8	103	Fosse des Mariannes	10 476 m	YAYANOS (1986)
<i>Moritellaceae</i>					
<i>Moritella abyssi</i> 2693	10	30	Sédiment atlantique	2 815 m	XU <i>et al.</i> (2003a)
<i>Moritella japonica</i> DSK1	15	50	Fosse du Japon	6 356 m	KATO <i>et al.</i> (1995)
<i>Moritella profunda</i> 2674	6	30	Sédiment atlantique	2 815 m	XU <i>et al.</i> (2003a)
<i>Moritella yayanosi</i> DB21MT-5	10	80	Fosse des Mariannes	10 898 m	KATO <i>et al.</i> (1998)
<i>Moritella</i> sp. PE36	10	30	Amphipod	3 584 m	YAYANOS (1986)
<i>Vibrionaceae</i>					
<i>Photobacterium profundum</i> DSJ4	15	28	Sulu Trough	2 551 m	DELONG et YAYANOS (1986)
<i>Photobacterium profundum</i> SS9	10	10	Fosse Ryukyu	5 110 m	NOGI <i>et al.</i> (1998)
<i>Psychromonadaceae</i>					
<i>Psychromonas hadalis</i>	6	60	Fosse du Japon	7 542 m	NOGI <i>et al.</i> (2007)
<i>Psychromonas kaikoe</i>	10	50	Fosse du Japon	7 434 m	NOGI <i>et al.</i> (2002)
<i>Psychromonas profunda</i>	10	25	Sédiment atlantique	2 770 m	XU <i>et al.</i> (2003b)
<i>Psychromonas</i> sp. CNPT3	12	52	Amphipod	5 800 m	YAYANOS (1986)
<i>Shewanellaceae</i>					
<i>Shewanella benthica</i> DB21MT-2	10	70	Fosse des Mariannes	10 898 m	KATO <i>et al.</i> (1998)
<i>Shewanella benthica</i> DB5501	15	60	Baie de Suruga	2 485 m	KATO <i>et al.</i> (1995)

Isolat	T _{opt} (°C)	P _{opt} (MPa)	Isolement	Profondeur d'isolement	Référence
<i>Shewanella benthica</i> DB6101	10	50	Fosse Ryukyu	5 110 m	KATO <i>et al.</i> (1995)
<i>Shewanella benthica</i> DB6705	15	60	Fosse du Japon	6 356 m	KATO <i>et al.</i> (1995)
<i>Shewanella benthica</i> F1A	8	30	Océan atlantique		WIRSEN <i>et al.</i> (1986)
<i>Shewanella Benthica</i> KT99	2	98	Fosse de Kermadec	9 856 m	LAURO <i>et al.</i> (2007)
<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	15	20	Sédiment de l'océan Pacifique	1 900 m	XIAO <i>et al.</i> (2007)
<i>Shewanella violacea</i> DSS12	10	30	Fosse Ryukyu	5 110 m	KATO <i>et al.</i> (1995)
<i>Bacilli</i>					
<i>Carnobacterium</i> AT12	20	15	Fosse des Aléoutiennes	2 500 m	LAURO <i>et al.</i> (2007)
<i>Carnobacterium</i> AT7	20	20	Fosse des Aléoutiennes	2 500 m	LAURO <i>et al.</i> (2007)
<i>Actinobacteria</i>					
<i>Dermacoccus abyssi</i> MT1.1	28	40	Fosse des Mariannes	10 898 m	PATHOM AREE <i>et al.</i> (2006)
<i>Deltaproteobacteria</i>					
<i>Desulfovibrio hydrothermalis</i> AM13T	35	26	Dorsale Est-Pacifique	2 600 m	ALAZARD <i>et al.</i> (2003)
<i>Desulfovibrio piezophilus</i>	30	10	Mer Méditerranée	1 700 m	KHELAIFIA <i>et al.</i> (2011)
<i>Desulfovibrio profundus</i>	25	15	Sédiment Mer Japon	900 m	BALE <i>et al.</i> (1997)
<i>Thermotogae</i>					
<i>Marinitoga piezophila</i> KA3	65	40	Dorsale Est-Pacifique	2 630 m	ALAIN <i>et al.</i> (2002)
<i>Archaea</i>					
<i>Methanococci</i>					
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	86	75	Dorsale Est-Pacifique	2 610 m	JONES <i>et al.</i> (1983)
<i>Methanopyri</i>					
<i>Methanopyrus kandleri</i> 116	105	20	Dorsale Centrale-Indienne	2 450 m	TAKAI <i>et al.</i> (2008)

Isolat	T _{opt} (°C)	P _{opt} (MPa)	Isolement	Profondeur d'isolement	Référence
<i>Thermococci</i>					
<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1	98	52	Dorsale Médio-Atlantique	4 100 m	ZENG <i>et al.</i> (2009)
<i>Pyrococcys abyssi</i> GE5	100	20	Bassin Fidjien	2 000 m	ERAUSO <i>et al.</i> (1993)
<i>Thermococcus barophilus</i> MP	85	40	Dorsale Médio-Atlantique	3 550 m	MARTEINSSON <i>et al.</i> (1999)

TABLEAU I.1.: Liste non exhaustive de micro-organismes piézotolérants et piézophiles marins isolés et décrits dans la littérature, inspiré de ELOE *et al.* (2011)

tiques. Ceci afin de caractériser la souche et de déterminer s'il s'agit d'une nouvelle espèce.

I.5. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « fondamentaux »

Les premières recherches concernant l'effet de la pression hydrostatique sur des micro-organismes ont consisté à déterminer les limites de la vie d'organismes modèles tel la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les recherches ont ensuite tenté de voir si la pression avait des effets sur les composés cellulaires « fondamentaux » que sont les lipides, les protéines et les acides nucléiques.

I.5.1. La membrane cellulaire

Les membranes cellulaires sont parmi les composés cellulaires, les plus affectés par les effets des HPH. Les forces principales qui maintiennent les membranes lipidiques sont les forces hydrophobes entre les queues des lipides ainsi que des forces hydrophiles entre l'eau et les têtes polaires. Les membranes ne sont pas composées uniquement de lipides, mais aussi d'une quantité importante de protéines membranaires. Suivant leur fluidité, deux états de la membrane cellulaire sont distingués. Dans des conditions physiologiques, la membrane est relativement fluide, organisée et « liquide ». Lorsque la température augmente ou que les pressions hydrostatiques diminuent par rapport aux conditions physiologiques, le mouvement des lipides augmente et cela peut désorganiser la membrane. Dans le cas contraire, lorsque la température diminue et que la pression hydrostatique augmente, le mouvement lipidique diminue ce qui entraîne une rigidification de la membrane et un état de transition liquide/gel. Il est à noter que ces transitions ne sont pas immédiates et que peut perdurer dans la membrane des mélanges de phases liquide/gel

I. Introduction

(OGER et CARIO, 2013). Les effets de la pression sur les membranes ont beaucoup été étudiés chez les organismes modèles bactériens et eucaryotes *E. coli*, *Photobacterium profundum* SS9 et *Saccharomyces cerevisiae*. Chez ces organismes, on observe des effets de changements de compositions lipidiques à l'intérieur de la membrane en fonction de différents stress physiologiques tels, la température, le pH et la pression hydrostatique. Cette adaptation a été nommée adaptation homéovisqueuse (SINENSKY, 1974). Les cellules bactériennes et eucaryotes disposent de plusieurs moyens d'adapter la membrane, notamment en modifiant le nombre d'insaturations en *cis* dans les chaînes lipidiques. Les membranes peuvent aussi augmenter ou diminuer la proportion d'acides gras, ainsi que la longueur des chaînes d'hydrocarbures et modifier la proportion des différentes têtes polaires (OGER et CARIO, 2013). *P. profundum* SS9, une bactérie psychrophile et piézophile (Tableau I.1 page 12), lorsqu'elle se trouve dans des conditions de HPH et basses températures, a tendance à accumuler des phosphatidylcholines (PC) et des phosphatidylglycerols (PG) à la place de phosphatidylethanolamines (PE) en guise de têtes polaires, ce qui entraîne un shift important au niveau de la transition liquide/gel de la membrane. Cela suggère que l'adaptation aux HPH chez cette bactérie passe notamment par un transfert de lipides saturés vers des lipides insaturés (YANO *et al.*, 1998).

Les effets de la pression hydrostatique sur les membranes ont été aussi étudiés chez les archées. Une revue récente de OGER et CARIO en 2013 répertorie les études effectuées au niveau de l'adaptation des membranes chez ces micro-organismes. Un faisceau d'indices montre ainsi que l'on observe aussi des adaptations homéovisqueuses chez les archées. Les principales adaptations membranaires en réponse à des stress physiologiques sont entre autres l'incorporation d'anneaux cyclopentanes dans les chaînes isoprénoides ou la modification de la proportion du rapport entre les lipides diether et tetraether (Figure I.4 page suivante), contrairement aux autres domaines du vivant qui jouent essentiellement sur la longueur et la saturation des chaînes lipidiques (OGER et CARIO,

2013). Un exemple intéressant est le cas de *M. jannaschii* (Tableau I.1 page 12), une archée méthanogène, thermophile et piézophile, qui lorsqu'il y a des variations de pression adapte sa composition lipidique au niveau du rapport lipides diether/tetraether et au niveau de la composition des principaux lipides archéens (Macrocyclic archaeol) (KANESHIRO et CLARK, 1995).

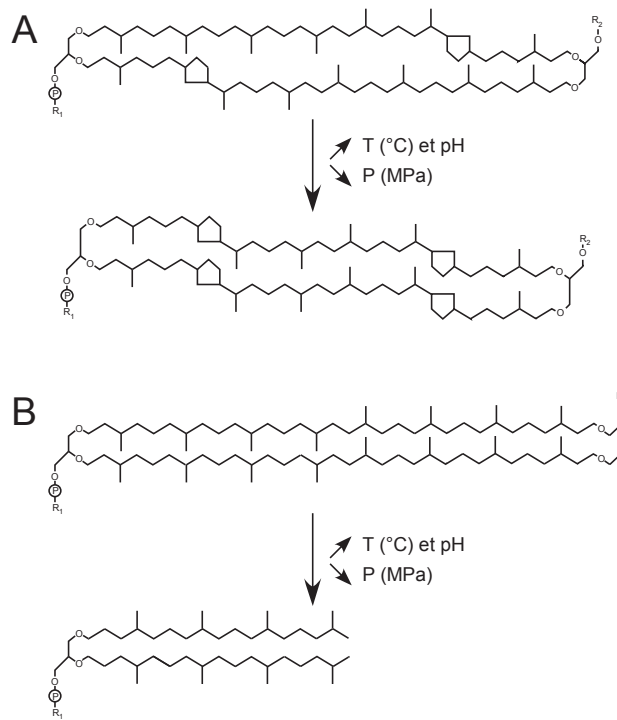


FIGURE I.4.: Adaption des lipides archéens aux conditions environnementales chez *M. jannaschii*. Lorsque la température et le pH augmentent et que la pression hydrostatique diminue, la cellule tend à accumuler des anneaux cyclopentanes dans les chaînes isoprenoid des lipides (A). De même dans les mêmes conditions, le rapport lipides tetraether/diether tend à baisser (B). Tiré de OGER et CARIO (2013)

Les effets des HPH, ont été observés sur les membranes, à la fois sur des organismes piézophiles et piézosensibles et sont importants. Néanmoins, il faut distinguer les effets de la température et du pH des effets des HPH. En effet, dans des sources hydrothermales, la pression hydrostatique est bien moins susceptible de varier que les deux autres paramètres physiologiques. Les gradients de températures et pH sont ainsi bien plus

I. Introduction

importants entre le fluide hydrothermal et l'eau de mer que la profondeur. Néanmoins, la découverte de sources hydrothermales à 4960 m en 2010, a montré que le flux de la source était encore perceptible à 1100 m au dessus du champ hydrothermal (CONNELLY *et al.*, 2012).

De plus, chez les archées, l'état de l'art est bien moins avancé que chez les deux autres domaines du vivant, où les études ont été effectuées chez des organismes modèles se développant peu ou prou dans des conditions similaires (mésophiles à pression atmosphérique). Un autre problème majeur afin de comparer les effets de paramètres physiologiques sur les membranes est la condition physiologique des organismes. Il a été prouvé qu'entre des conditions où les micro-organismes sont en phase exponentielle de croissance où en phase stationnaire, la résistance aux HPH variait de façon importante (MAÑAS et MACKEY, 2004). Cette variation est notamment due au fait que la fluidité membranaire est très importante lors de la phase exponentielle, car elle contribue aux échanges avec l'extérieur. En phase stationnaire au contraire, la cellule est en état de ralentissement métabolique et est moins dépendante de la fluidité de la membrane.

I.5.2. Les protéines

La pression hydrostatique a un effet important sur le volume « disponible » (Section I.2 page 5). Dans le cas des protéines, une diminution de volume jouera sur l'encombrement et l'hydratation. Il a été montré que la formation des liaisons hydrophobes entraînait une augmentation de volume suivant la nature des ions impliqués dans celles-ci. Cela contrairement aux liaisons hydrogènes, où l'espace entre les deux atomes d'hydrogène liés est très faible (MOZHAEV *et al.*, 1996). Les protéines ayant donc une quantité importante d'interactions hydrophobes seront plus déstabilisées lors d'une augmentation de la pression hydrostatique que celles ayant majoritairement des liaisons hydrogènes. Néanmoins, la plupart des protéines étudiées ne seront pas dénaturées à des pressions

hydrostatiques (0-110 MPa) où plusieurs micro-organismes sont capables de se diviser et de croître, mais plutôt à des pressions pouvant avoisiner les 300 MPa (PERRETT et ZHOU, 2002). L'activité de certaines protéines a été étudiée lorsque celles-ci étaient placées sous pression. Une protéase par exemple de l'archée piézophile et méthanogène *M. jannaschii*, accroît ainsi fortement la vitesse de la réaction qu'elle catalyse lorsqu'elle est placée à 50 MPa et 125 °C (MICHELS et CLARK, 1997). Une étude sur une peptidase dodécamérique de *Pyrococcus horikoshii* a montrée qu'elle restait stable à 300 MPa et 25 ou 90 °C, et que son activité était maximale à 180 MPa lorsqu'elle était placée à 50 °C (ROSENBAUM *et al.*, 2012). *P. horikoshii* ne se développant que jusqu'à 40 MPa (ZENG *et al.*, 2009), cela confirme le fait que les effets visibles des HPH sur les structures protéiques se font à des pressions très importantes et souvent au delà des conditions physiologiques de vie du micro-organismes.

I.5.3. Le biais de codons

La pression semble aussi avoir un effet sur le biais de codons. Celui-ci désigne l'utilisation préférentielle d'un des triplets de nucléotides ou codons possibles pour coder un acide aminé par le fait d'une pression de sélection tels la pression ou la température (MACGREGOR, 2002). Le biais de codons est calculé en comparant deux ou plusieurs espèces afin de déterminer si les différences observées d'un point de vue physiologique par exemple, peuvent en partie expliquer le fait que la souche en question utilise plus un codon à la place d'un autre. La difficulté principale consistant au fait que ce biais de codons peut être dû à un nombre très important de raisons, tel le GC%, le taux de recombinaison, la stabilité de l'ARN, sa position dans le gène, le niveau d'expression ainsi que la longueur du gène. Il peut aussi être dû à d'autres paramètres tels environnementaux qui nous intéressent dans ce cas-là, ainsi que la taille de la population microbienne (BEHURA et SEVERSON, 2013).

I. Introduction

D'un point de vue environnemental, le biais de codons n'est pas utilisé de manière directe, les études se concentrent plus sur la substitution des acides aminés entre deux espèces. Cette substitution peut alors être soit causée par un biais de codons, ou par les paramètres physico-chimiques des acides aminés (taille, pH...). Ces substitutions d'acides aminés ont été utilisées en premier lieu pour comparer des espèces thermophiles ou non (HANEY *et al.*, 1999). Dans le cas de la pression, deux études majeures ont été réalisées en comparant des espèces piézophiles ou non (DI GIULIO, 2005; CAMPANARO *et al.*, 2008). DI GIULIO a comparé les protéines de deux *Thermococcales* (Section I.7 page 36), *Pyrococcus abyssi* (Tableau I.1 page 12) et *P. furiosus*, *P. furiosus* est piézosensible alors que *P. abyssi* est piézophile. L'un des avantages lorsque l'on compare ces deux espèces est le fait que leur GC% soit proche (41 et 45 %) diminuant le risque de biais de ce côté. L'auteur en étudiant 141 protéines orthologues soit environ 60 000 acides aminés observe que les acides aminés les plus « piézophiles » sont des acides aminés tels l'arginine, la serine et la valine alors que les moins piézophiles sont la tyrosine et la glutamine. Il en conclut que les acides aminés petits et polaires seraient favorisés par la haute pression hydrostatique, ce qui impliquerait que la substitution d'acide aminé serait bien impactée par la pression (DI GIULIO, 2005). Ces résultats ont été confirmés en comparant *P. furiosus* et *P. yayanosii*, respectivement piézosensibles et piézophiles obligatoires, bien que la différence de GC % entre les deux souches soit importante (10 %)(Tableau I.1 page 12)(DI GIULIO, 2013). En 2008, CAMPANARO *et al.* ont effectué le même type d'étude que DI GIULIO en analysant non pas les propriétés piézophiles des acides aminés, mais en déterminant quelle était la fonction des gènes dans lesquels les substitutions des acides aminés étaient les plus importantes. Ils ont comparé dans ce cas là *P. profundum* SS9 et *Shewanella benthica* KT99 (Tableau I.1 page 12) à leurs homologues non piézophiles. En compartimentant les gènes positivement sélectionnés chez les deux espèces piézophiles, les auteurs observent que les gènes « piézophiles »

I.5. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « fondamentaux »

sont impliqués dans diverses fonctions tels le transport de solutés, la translocation de protéines, la synthèse d'ADN ainsi que la mobilité flagellaire. Leurs résultats montrent qu'en particulier les gènes impliqués dans le transport sont fortement sélectionnés sous pression ce qui est en accord avec les observations ayant eu lieu dans des conditions expérimentales (Section I.6) (CAMPANARO *et al.*, 2008). Néanmoins des doutes subsistent sur la pertinence de ces études en raison notamment des différences de GC% existant entre les souches comparées (*e.g* 10% entre *P. yayanosii* et *P. furiosus*). Les substitutions d'acides aminés seraient alors plus dues aux différences de GC% entre les codons qu'aux conditions physiologiques dans lesquels les espèces sont retrouvées. Par ailleurs, le modèle actuel de substitutions de codons suppose que quand les changements sont neutres, l'abondance des acides aminés est uniquement due aux mutations. Dans ce cas-là, le nombre de mutations dans un sens ou dans l'autre est théoriquement identique. Lorsque les conditions de sélection (*e.g.* température, pression, pH...) ont un effet sur le biais de codons, l'équilibre des mutations se fera plus dans un sens ou dans l'autre. Néanmoins, il existerait un décalage dans le temps entre l'application de ces conditions de sélection et les biais de mutations au sein du code génétique. Dans ce cas-là, plus les espèces ont divergé récemment et plus il est possible d'observer des biais de codons dues aux mutations aléatoires sans rapport avec les conditions de sélection existant entre les espèces, ce qui complique l'analyse des biais de codons (HURST *et al.*, 2006).

I.5.4. Les acides nucléiques

L'effet de la pression sur les acides nucléiques, spécialement les liaisons doubles brins, montre qu'une augmentation de la pression hydrostatique entraîne une stabilisation de ces liaisons (MACGREGOR, 1998). Cela s'explique par le fait que ce sont des liaisons hydrogènes qui sont responsables de l'appariement des brins d'ADN. Leur formation entraîne une diminution de volume et une stabilisation sous HPH (Section I.5.2).

I. Introduction

Néanmoins, l'étude de l'interaction ADN/protéines, qui est nécessaire pour tout ce qui concerne, la réplication, et la transcription montre que celle-ci est affectée par les HPH (MACGREGOR, 2002). Ces interactions sont souvent créées par des liaisons hydrophobes et ioniques qui entraînent une augmentation de volume, ce qui les rend sensibles à la forte pression. Une étude de ERIJMAN et CLEGG en 1995 étudie ainsi la dissociation d'une ARN Polymérase (RNAP) d'*E. coli* en présence ou absence d'acides nucléiques, ils ont montré qu'à 120 MPa, 50 % de la protéine s'est dissociée et qu'un retour à pression atmosphérique entraîne la reformation de la liaison ADN/protéine (ERIJMAN et CLEGG, 1995). Ces résultats montrent un effet de la pression sur ces interactions ADN/protéines, mais sont à mettre en perspective, car *E. coli* ne se divise plus entre 20 et 50 MPa *in vitro* et que la transcription est inhibée à 70 MPa (YAYANOS et POLLARD, 1969; OGER et JEBBAR, 2010)(Tableau I.2 page 23). Cela suppose que les interactions ADN/protéines ne sont pas les principaux mécanismes responsables de sensibilité ou résistance aux HPH.

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

Comme nous l'avons vu précédemment, les HPH ont des effets visibles sur les composants cellulaires « fondamentaux » (lipides, protéines et acides nucléiques) (Sections I.5.1 à I.5.4 pages 13–19). Néanmoins la grande majorité des effets observés se situent à des pressions hydrostatiques actuellement incompatibles avec le développement de la vie. L'organisme qui détient le record de résistance à la pression est *P. yayanosii* qui résiste « seulement » à des pressions supérieures à 120 MPa (ZENG *et al.*, 2009). Il est à noter que malgré les effets décrits ci-dessus se produisent à des pressions très importantes, il paraît possible d'envisager qu'ils se produisent aussi à des pressions plus faibles en

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

imaginant que des états intermédiaires peuvent exister, un exemple étant la rigidité de la membrane. L'accumulation de ces petits effets jouerait alors un rôle dans l'adaptation à la pression. Les études se déroulant à très haute pression telle celles de BOWMAN *et al.* et MAÑAS et MACKEY peuvent donc constituer des pistes intéressantes pour l'étude de l'adaptation à la pression dans des conditions physiologiques malgré le fait que les cellules dans ces études soient exposées à des pressions très élevées (100-200 MPa) pendant des temps courts (dizaines de minutes) (MAÑAS et MACKEY, 2004; BOWMAN *et al.*, 2008).

Une des questions importantes qui se pose alors, est comment agit précisément la pression hydrostatique sur la cellule. Se pose ainsi plusieurs interrogations, notamment quels sont les mécanismes mis en œuvre par les micro-organismes piézophiles pour résister à ces pressions. Est-ce que les effets de celles-ci sont comparables aux stress dus à la température ? La cellule entre-t-elle en condition de survie ou adapte-t-elle juste ces composés cellulaires en provoquant un shift des fonctions métaboliques, ou en réorientant ces flux métaboliques ?

Ce genre d'étude a été essentiellement effectué soit sur des organismes piézophiles et psychrophiles tels ceux décrits dans le tableau I.1 page 12, typiquement *S. benthica* et *P. profundum* (VEZZI *et al.*, 2005). Les études ont aussi été réalisées sur des micro-organismes dont la pression optimale de 10 MPa est sans comparaison avec les deux espèces décrites ci-dessus et qui ne se développe plus à 30 MPa comme les *Desulfovibrio* (KHELAIFIA *et al.*, 2011). Les micro-organismes modèles *E. coli* et *S. cerevisiae* qui sont non piézophiles et mésophiles ont aussi été étudiés pour leur sensibilité à la pression hydrostatique (ABE et HORIKOSHI, 2001). Il est aussi possible de distinguer des études où la pression est utilisée comme moyen de stérilisation contre des pathogènes, ces micro-organismes sont alors soumis à des conditions de pression très élevées pendant des temps courts (BOWMAN *et al.*, 2008). Enfin, une thèse effectuée au laboratoire

I. Introduction

de Microbiologie des Environnements Extrêmes par Pauline VANNIER en 2012 a étudié les effets des HPH sur deux *Thermococcales* (Section I.7 page 36), *Thermococcus kodakarensis* et *Thermococcus barophilus* deux hyperthermophiles qui sont respectivement piézosensibles et piézophiles (Tableau I.1 page 12). Les expériences effectuées sur ces modèles et qui sont décrit ci-après montrent des effets importants sur la mobilité cellulaire, la respiration ainsi que les mécanismes de stress tels les chaperones. Un des problèmes majeurs concernant l'étude de la pression est le fait que dans beaucoup de cas, les expériences ont été effectuées à des pressions où la cellule n'est plus en mesure de se diviser. Cela concerne principalement les micro-organismes piézosensibles, rendant difficiles la comparaison avec des micro-organismes piézophiles.

I.6.1. La mobilité

Le micro-organisme piézosensible le plus étudié est la bactérie modèle *E. coli*. C'est une bactérie mésophile trouvée dans l'intestin de mammifères qui peut être pathogène et qui se développe de façon optimale à 37 °C. Différentes études sur l'effet de la pression hydrostatique concernant cette bactérie ont montré que les premières fonctions touchées par la pression hydrostatique sont la mobilité, les transports de substrat, l'assimilation de certains acides aminés, la division cellulaire, des perturbations de fonctions cellulaires importantes (transcription, traduction) et enfin la viabilité (BARTLETT, 2002; OGER et JEBBAR, 2010). Le tableau I.2 page ci-contre présente ainsi ces effets et les pressions auxquels ils ont lieu chez *E. coli*.

La mobilité est l'une des fonctions cellulaires les plus sensibles aux HPH et notamment chez *E. coli* (MEGANATHAN et MARQUIS, 1973). Les micro-organismes se déplacent à l'aide de structures appelées respectivement flagellum et archaellum chez les bactéries et les archées. Cette structure diffère entre ces deux domaines, où l'archaellum ressemble plus à un pili de type IV qu'à un flagelle (JARRELL et ALBERS, 2012)(Figure I.5).

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

Fonctions cellulaire	<i>E. coli</i> Pression (MPa)
Mobilité	10
Transport de substrat	26
Division cellulaires	20 - 50
Croissance	50
Réplication	50
Transcription	60
Traduction	77
Mort	200

TABLEAU I.2.: Ce tableau présente les effets des hautes pressions hydrostatiques sur les fonctions cellulaires chez l'organisme modèle mésophile et piézosensible, *E. coli* (Inspiré de BARTLETT (2002); OGER et JEBBAR (2010))

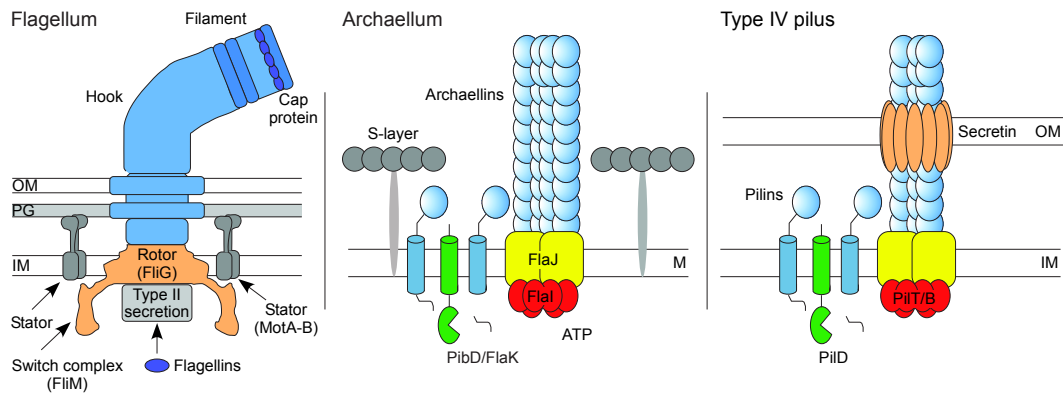


FIGURE I.5.: Structure flagellaires bactériennes (flagelles) et archéennes (archaeellum), tiré de JARRELL et ALBERS (2012) et WADHAMS et ARMITAGE (2004)

I. Introduction

Le flagelle fait partie intégrante de la membrane plasmique et la pression ayant un effet sur la fluidité membranaire comme décrit ci-dessus, cela pourrait expliquer la perte de mobilité rapide. Chez les bactéries le flagelle est directement lié à un complexe protéique à deux composants participant au chimiotactisme (SARKAR *et al.*, 2010). Le chimiotactisme est un système de réponse à un gradient chimique. Celui-ci permet aux micro-organismes de se déplacer vers des substances attractives et de s'éloigner d'autres substances répulsives qui leur sont nuisibles voir toxiques. Bien que des différences importantes existent entre différents organismes, le mécanisme général du chimiotactisme est conservée entre le domaine des *Bacteria* et une partie du domaine des *Archaea* soit le phylum *Euryarchaeota* (SZURMANT et ORDAL, 2004; SCHLESNER *et al.*, 2009). Typiquement, l'arrivée d'un composant chimique au niveau de protéines réceptrices membrane cofactor protein (MCP) entraîne l'autophosphorylation d'une histidine kinase (CheA). Le phosphate de CheA est ainsi le substrat du régulateur CheY qui catalyse son transfert. La protéine CheY-P interagit avec la structure flagellaire. Cette interaction cause un changement de la direction ou de la vitesse de rotation du flagelle (Figure I.6 page suivante). Lorsque la concentration en ligand diminue, la déphosphorylation de CheY-P est accélérée par CheZ. Lors de l'activation du MCP, CheA phosphoryle aussi la méthylesterase CheB. Celle-ci est alors en compétition avec une méthyltransferase CheR afin de contrôler le degré de méthylation de certains glutamates sur les protéines MCP. Cela réinitialise les récepteurs et leur permet de s'adapter à leur environnement présent (WADHAMS et ARMITAGE, 2004). Les archées possèdent aussi deux phosphates CheC et CheD. CheC serait aussi impliquée dans la phosphorylation de CheY et jouerait ainsi un rôle dans la relation avec la structure flagellaire. CheD est une D-amidase qui serait aussi impliquée dans la relation CheY/CheC/CheZ.

Chez *E. coli*, la rotation dans un sens anti-horaire entraîne le regroupement de flagelles et le déplacement en ligne droite de la bactérie. Au contraire, si les flagelles tournent en

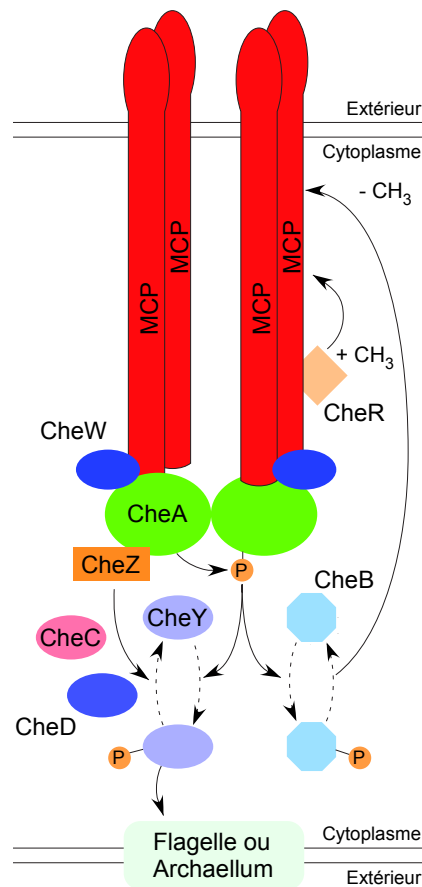


FIGURE I.6.: Schéma simplifié de la voie du chimiotactisme chez les *Bacteria* et le phylum archéen des *Euryarchaeota*, tiré de WADHAMS et ARMITAGE (2004)

I. Introduction

sens horaire, la bactérie s'arrête et change de direction (SARKAR *et al.*, 2010). Lorsqu'elle est soumise à de fortes pressions, la rotation des flagelles s'effectue dans un sens horaire. L'effet est le même que si la concentration de CheY-P était élevée. L'hydratation du complexe contrôlant la rotation du flagelle semble en cause, en effet, l'augmentation de la pression à un effet direct sur l'hydratation au niveau moléculaire. Cette hydratation aurait le même effet que la fixation de CheY-P sur ce complexe protéique (NISHIYAMA *et al.*, 2013).

La mobilité cellulaire est aussi un facteur sensible à la pression chez les micro-organismes piezotolérants et piezophiles. Parmi ceux-ci, *P. profundum* SS9 est la bactérie piézophile qui a été la plus étudiée au regard de ses mécanismes moléculaires de résistance et d'adaptation à la pression hydrostatique (BARTLETT, 2002). Cette souche piézophile et psychrophile (Tableau I.1 page 12) possède plusieurs caractéristiques lui permettant de s'adapter aux HPH. Du point de vue de la mobilité, deux clusters codant pour des gènes de mobilité flagellaire ont été identifiés chez *P. profundum* SS9, un cluster codant pour des flagelles polaires et un codant pour des flagelles latéraux (CAMPANARO *et al.*, 2005; VEZZI *et al.*, 2005). Les flagelles polaires seraient principalement responsables de la nage alors que les flagelles latéraux permettraient à la cellule de ramper sur une surface. Ces dernières sont sur-exprimées en conditions de hautes pressions et hautes viscosités indiquant une adaptation aux hautes pressions (ELOE *et al.*, 2008) et aux environnements oligotrophes. Dans ces environnements où la quantité de carbone organique est faible, les micro-organismes ont la nécessité de pouvoir s'attacher à des particules ou des animaux, comme un amphipode où *P. profundum* SS9 a été isolé (NOGI *et al.*, 1998). *Shewanella piezotolerans* WP3, un organisme psychotolérant et piezotolérant (Tableau I.1 page 12), possède aussi comme *P. profundum* SS9 deux types de flagelles, polaires et latéraux ayant sans doute la même fonction que celles de *P. profundum* SS9. Néanmoins, contrairement à cette dernière, les deux systèmes flagellaires sont exprimés différemment

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

en fonction de la température et de la pression. Les gènes codants pour le système flagellaire latéral sont sur-exprimés à basse température (4 °C vs 20 °C) et sous-exprimés à haute pression, alors que le système polaire est réprimé à basse température et fortement sur-exprimé à haute pression (20 MPa versus 0.1 MPa) (WANG *et al.*, 2008). Au vu de ces résultats, les micro-organismes piézophiles et piézotolerants malgré le fait qu'ils ne possèdent pas le même mécanisme de régulation, semblent avoir développé des stratégies de mobilité leur permettant de s'adapter à leur environnement (pression, température, nature du milieu...).

I.6.2. La membrane : transport, respiration, protéines

Le transport de substrat au travers des membranes cellulaires est aussi un mécanisme très sensible à la pression chez les micro-organismes. Chez *S. cerevisiae*, les HPH rend la cellule auxotrophe au tryptophane. Le transporteur du tryptophane serait ainsi sensible à l'augmentation de la pression à cause des changements dans la fluidité de celle-ci (Section I.5.1 page 13) (ABE et HORIKOSHI, 2000). En effet, le tryptophane est le plus gros acide aminé existant, notamment à cause de son cycle aromatique (204 g/mol). C'est un acide aminé essentiel pour la levure, impliquant l'arrêt de la croissance lorsqu'il ne peut plus entrer dans celle-ci à cause de l'augmentation de la pression hydrostatique. La cellule compenserait donc ces effets en augmentant le nombre de transporteurs afin de pallier à la baisse d'efficacité de ceux-ci. Les effets de la haute pression sur les membranes ont été confirmés par une étude transcriptionnelle à 30 MPa, où les gènes impliqués dans la biosynthèse et la formation des structures membranaires sont induits (IWAHASHI *et al.*, 2005). Pour appuyer ces remarques, des comparaisons transcriptomiques chez *P. profundum* SS9 à 0,1 MPa par rapport à 28 MPa, la pression optimale (VEZZI *et al.*, 2005), ont montré que les transporteurs étaient l'une des catégories les plus influencées par la pression. Ceux-ci sont principalement sur-exprimés à 0,1 MPa par rapport à 28

I. Introduction

MPa. L'une des hypothèses pour expliquer cet état de fait est la très grande adaptation de ceux-ci à 28 MPa, d'où une baisse d'efficacité à basse pression. Néanmoins, il est difficile de généraliser sur ce point, en effet certains transporteurs sont eux sur-exprimés à 28 MPa et la cellule possède dans d'autres cas, plusieurs copies du même transporteur qui sont régulées différemment en fonction de la pression (CAMPANARO *et al.*, 2005). Chez *Desulfovibrio piezophilus*, une bactérie sulfato-réductrice, mésophile et piézophile (KHELAIFIA *et al.*, 2011), le transport d'acides aminés et de différents solutés sont des processus très affectés par la pression hydrostatique, malgré le fait que seulement 40 protéines soient sur ou sous-exprimées, ce qui rend difficile de tirer des conclusions sur la nature précise de celles-ci tel le type de transporteur. Néanmoins, des protéines impliquées dans le transport et le métabolisme de la glutamine sont sur-exprimées à haute pression confirmant les effets de la pression sur les transporteurs comme observé précédemment sur *P. profundum* SS9 (PRADEL *et al.*, 2013).

Une étude transcriptomique effectuée par VANNIER en 2012 sur deux *Thermococcales*, *T. kodakarensis* et *T. barophilus* respectivement piézosensible et piézophile a montré que *T. kodakarensis* en conditions de stress hydrostatique sur-exprimait un certain nombre de gènes impliqués dans l'efflux de molécules par l'intermédiaire de transporteurs. De même le métabolisme et le transport d'acides aminés est inhibé à pression supraoptimale pour les deux espèces, suggérant un effet de la pression sur la synthèse de certains acides aminés notamment aromatiques (Tryptophane, phénylalanine, tyrosine...).

Certaines protéines membranaires dont l'expression varie fortement en fonction de la pression ont aussi été étudiées chez *P. profundum* SS9, tels les protéines ToxR/S et OmpL/OmpH (WELCH et BARTLETT, 1996, 1998). Le cas des protéines ToxR/S est particulièrement intéressant, notamment car chez *Vibrio cholerae*, elles contrôlent l'expression de plus de 150 gènes (BINA *et al.*, 2003). ToxR est une protéine membranaire qui se lie sous une forme dimérique directement aux gènes qu'elle contrôle via un domaine

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

de liaison à l'ADN cytoplasmique. La pression hydrostatique diminue la quantité de ToxR présent et affecterait sa structure directement ou indirectement par le biais de la composition lipidique de la membrane, par exemple. Une étude suggère que ToxR régulerait l'activité des protéines OmpL/OmpH. Ces dernières sont des protéines de la membrane externe cellulaire, agissant comme des porines. De façon intéressante, OmpH est exprimée préférentiellement à haute pression alors que c'est l'inverse pour OmpL (WELCH et BARTLETT, 1996). La fonction de la protéine OmpH serait de servir de transporteur de nutriments dans un environnement pauvre comme l'océan profond, d'où sa sur-expression sous HPH. A basse pression, le système ToxR/S serait actif et activerait le gène *ompL* et réprimerait le gène *ompH* (Figure I.7). Sous HPH, le complexe ToxR/S serait sous forme de monomère ce qui lèverait la répression du gène *ompH* et n'activerait plus le gène *ompL* (Figure I.7). Le système ToxR/S serait ainsi le premier senseur de pression décrit (OGER et JEBBAR, 2010), un brevet a d'ailleurs été déposé sur ce système confirmant le potentiel intérêt industriel (PARSONS et HEAL, 2002).

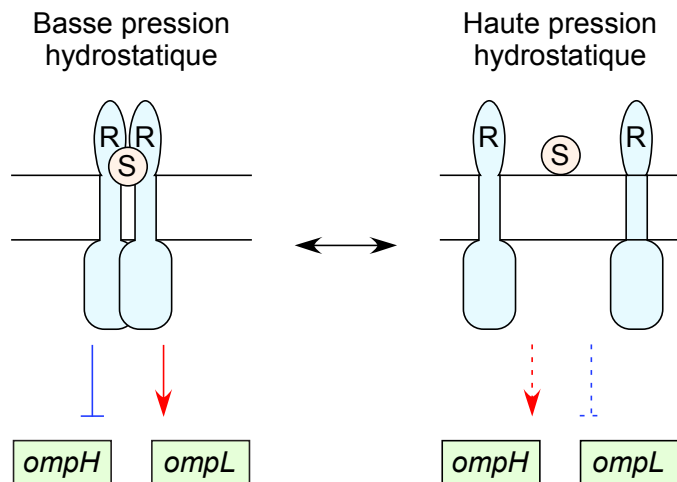


FIGURE I.7.: Représentation schématique du système ToxR/S chez *P. profundum* SS9, inspiré de PARSONS et HEAL (2002)

La respiration est un système membranaire aussi affectée par les hautes pressions, notamment chez *Shewanella benthica* et *P. profundum* SS9. Les *Shewanella* sont des

I. Introduction

bactéries à Gram négatif, piézotolérantes, piézophiles ou voire piézophiles obligatoires, aérobies et anaérobies facultatives faisant partie de la classe des *Gammaproteobacteria* (MACDONELL et COLWELL, 1985). *S. benthica* et *S. violacea* DSS12 ont été particulièrement étudiées au niveau des mécanismes moléculaires d'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques (KATO et QURESHI, 1999; NAKASONE *et al.*, 2002). *S. benthica* a la particularité d'adapter son système respiratoire en fonction de la pression hydrostatique (YAMADA *et al.*, 2000) au niveau des cytochromes. *S. benthica* possède ainsi deux systèmes de respiration, un actif à basse pression et l'autre à haute pression. Dans la première condition, trois principaux complexes enzymatiques sont présents, une NADH-déshydrogénase, un complexe nommé *bc1* et une cytochrome c oxydase. Ce modèle de respiration serait celui naturellement présent chez un grand nombre de bactéries mésophiles (UNDEN et BONGAERTS, 1997). Dans ce modèle, la NADH-déshydrogénase oxyde le NADH en NAD, et les deux électrons créés sont transférés au complexe *bc1* par l'intermédiaire d'une quinone Q. Le transfert par le complexe *bc1* d'électrons vers un cytochrome lié à la membrane (c-551) entraînerait la formation d'un gradient de protons au travers de la membrane. Le cytochrome transfère ensuite les électrons vers la cytochrome c oxydase. Cette dernière réduit l'oxygène et crée un gradient de protons du cytoplasme vers l'espace périplasmique (KATO et QURESHI, 1999)(Figure I.8 page 32). Au contraire, à haute pression, le complexe *bc1* et la cytochrome c oxydase sont sous-exprimés alors qu'une quinol oxydase est sur-exprimée (QURESHI *et al.*, 1998; TAMEGAI *et al.*, 1998). Dans ce cas là, les électrons provenant de la NADH-déshydrogénase sont transférés par la quinone Q à la quinol oxydase qui possède la même fonction que le cytochrome c (KATO et QURESHI, 1999)(Figure I.8 page 32). Chez *P. profundum* SS9, l'analyse du système de respiration montre aussi une adaptation aux hautes pressions, où l'activité oxydase est plus tolérante aux très hautes pressions quand les cellules sont cultivées à haute pression que lorsqu'elles sont cultivées à basse pression. Néanmoins contrairement au système de

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

respiration chez *S. violacea*, le niveau d'expression des gènes codant pour les différents groupes d'enzymes ne varie pas sous hautes pressions (TAMEGAI *et al.*, 2011), suggérant des mécanismes d'adaptation différents entre les deux espèces. Plusieurs hypothèses existent quand à l'adaptation des cytochromes oxydases, notamment la modification de la fluidité membranaire sous haute pression (Section I.5.1 page 13) qui aurait ainsi un effet direct sur les oxydases transmembranaires. *P. profundum* SS9 modifiant l'expression d'un grand nombre de gènes lorsqu'elle est cultivée sous hautes pressions (VEZZI *et al.*, 2005), la sur-expression de certains de ces gènes auraient un effet indirect sur l'activité des cytochromes oxydases. De même que pour certaines protéines transmembranaires, les cytochromes oxydases pourraient ainsi s'adapter aux modifications de la membrane lorsque la cellule est placée sous haute pression. Les protéines impliquées dans la réduction des sulfates, éléments clefs dans la respiration anaérobie chez *D. piezophilus* (QmoA, HynA-1, and AprA) sont aussi différenciellement exprimés en fonction de la pression hydrostatique, l'oxydoréductase QmoA est sous-exprimée à basse pression alors que l'hydrogénase HynA-1 et l'adenylylsulfate reductase AprA sont sur-exprimées dans les mêmes conditions confirmant l'adaptation métabolique de la respiration observée chez *S. benthica* (PRADEL *et al.*, 2013). L'étude sur l'archée *T. barophilus* confirme aussi ces résultats, en effet certains transporteurs impliqués dans la respiration anaérobie (quinone et hydrogénases) sont sur-exprimés à très haute pression chez *T. barophilus*, alors que le métabolisme des acides aminés, notamment aromatiques est inhibé (VANNIER, 2012). Ces résultats suggèrent que la modulation des systèmes respiratoires chez les micro-organismes piézophiles est un mécanisme général d'adaptation aux variations de pressions hydrostatiques.

L'adaptation du pH cellulaire passe essentiellement par les membranes et transporteurs d'ions. Les HPH ont ainsi un effet important sur le pH cellulaire chez la levure *S. cerevisiae*. Cette souche mésophile et piézotolérante est capable de se développer jusqu'à

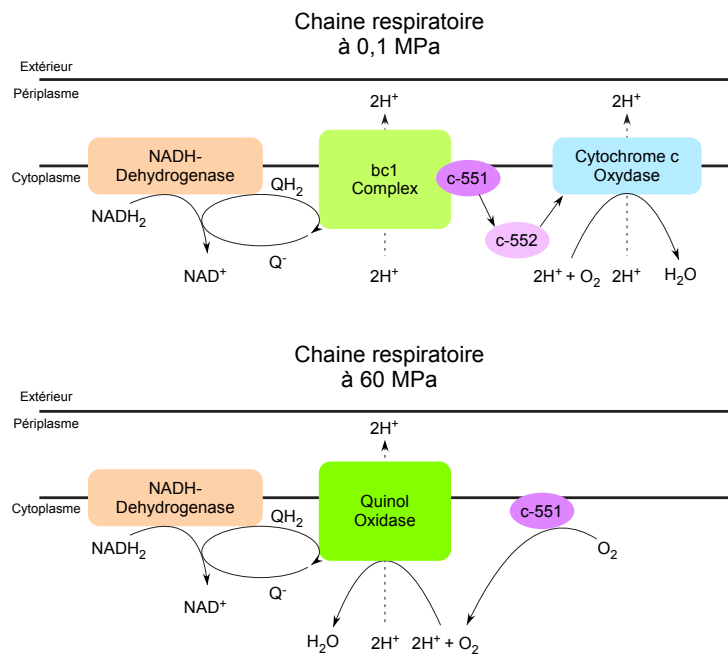


FIGURE I.8.: Adaptation du système de respiration aérobie en fonction de la pression (0,1 et 60 MPa) chez *Shewanella benthica*. Q^- , quinone ; QH_2 , quinol ; c-551, cytochrome c-551 ; c-552, cytochrome c-552. Tiré de KATO et QURESHI (1999) et OGER et JEBBAR (2010).

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

50 MPa, même si elle commence à exprimer des gènes de stress à partir de 30 MPa (IWAHASHI *et al.*, 2005; ABE et HORIKOSHI, 2000). Au dessus de 100 MPa, les composants maintenant la structure de la cellule (actine, microtubules) sont désorganisés entraînant la mort cellulaire (KOBORI *et al.*, 1995). La stabilisation du pH à l'intérieur de la cellule est essentiel pour le bon fonctionnement enzymatique. Une augmentation de la pression à 40-60 MPa baisse le pH intracellulaire d'environ 0,3 unités, ce qui a entre autres pour conséquence de réduire l'activité des enzymes de la glycolyse (ABE et HORIKOSHI, 1998). *S. cerevisiae* possède une vacuole plus acide que le cytoplasme et une vacuolar H^+ -ATPase membranaire qui a pour fonction de maintenir son pH proche de la neutralité dans le cytoplasme. Cette vacuole séquestrerait les ions H^+ stabilisant ainsi le pH cytoplasmique (ABE et HORIKOSHI, 1997). L'acidification de la cellule sous hautes pressions est due à un shift dans l'équilibre des réactions chimiques cellulaires, notamment au niveau de la glycolyse et de la production de CO_2 (ABE et HORIKOSHI, 1997, 1998). L'expression de cette ATPase ne changeant pas sous pression, le mécanisme de régulation du pH sous HPH n'est pas encore très bien compris (ABE, 1998).

I.6.3. Induction d'une réponse générale de stress à la pression hydrostatique

De nombreux effets de la pression hydrostatique ont été observés chez des organismes piézosensibles, notamment des marqueurs de stress. Un certain nombre d'études ont ainsi été effectuées à des pressions léthales pendant des temps relativement courts. Ces études permettent ainsi de déterminer quels sont les mécanismes que mettent les cellules en action afin de lutter contre ces effets.

Chez *E. coli* la pression hydrostatique a aussi un effet morphologique sur les cellules ce qui peut aussi expliquer le fait que les cellules ne soient plus capables de se diviser à haute pression. Lorsqu'elle est soumise à des pressions de 40-50 MPa la cellule ne se divise plus

I. Introduction

tout en maintenant la réplication de son ADN. Ainsi une seule cellule, sous forme de filaments va alors posséder plusieurs nucléoles (ZOBELL et COBET, 1964). La pression a aussi un effet sur les gènes impliqués dans l'activité cellulaire, notamment au niveau de la transcription et de la traduction. Chez *E. coli* et *Listeria monocytogenes*, un grand nombre de ces gènes sont surexprimés en conditions de stress (ISHII *et al.*, 2005; BOWMAN *et al.*, 2008). Ce dernier est un pathogène mésophile humain retrouvé dans les produits alimentaires. La pression ayant des effets notamment sur la dissociation des couples ARN/ribosomes (GROSS *et al.*, 1993), les cellules réagiraient en augmentant la quantité de protéines disponibles afin de maintenir l'activité cellulaire malgré l'efficacité moindre des complexes acides nucléiques/protéines par ex. *T. kodakarensis*, une *Thermococcale* piézosensible augmente ainsi la quantité de protéines ribosomales sous HPH (VANNIER, 2012), suggérant éventuellement des problèmes de stabilité de structures quaternaires des ribosomes sous haute pression hydrostatique.

Il est à signaler que les effets de la pression sur les cellules sont à la fois dépendants du type de milieu et des souches utilisées (MARQUIS, 1976; ISHII *et al.*, 2004; KAWARAI *et al.*, 2004). L'effet nature du milieu de culture peut être expliqué par le fait que dans un milieu riche, les micro-organismes se divisent de façon plus rapide et n'ont donc pas le temps de mettre en place les mécanismes d'adaptation à la pression hydrostatique. Dans le cas de l'absence de division, cela peut s'expliquer par le fait que FtsZ, la protéine responsable de la division cellulaire bactérienne chez *E. coli*, est dépolymérisée par l'action de la protéine SulA, un inhibiteur de la division cellulaire, et de la protéase Lon, une heat shock proteins (HSP), suite à la constriction de la cellule sous HPH (AERTSEN *et al.*, 2005). Cet effet de la pression sur la division cellulaire a aussi été observée chez *L. monocytogenes* où les gènes responsables de celle-ci sont surexprimés en conditions de haute pression (BOWMAN *et al.*, 2008).

I.6. Effets de la pression hydrostatique sur les composés cellulaires « complexes »

L. monocytogenes, quand il est placé en condition de stress très haute pression (300 MPa) pendant un temps court, voit ces gènes impliqués dans la mobilité et le chimio-tactisme surexprimés (BOWMAN *et al.*, 2008). L'expression de ces gènes pouvant correspondre à un état général de stress de la cellule ceci afin de contrer les dommages à la fluidité de la membrane qui inhiberait la mobilité.

La très haute pression ayant aussi bien chez *E. coli* que chez *L. monocytogenes* des effets importants sur les gènes codants pour la biosynthèse de la paroi, notamment le peptidoglycane ainsi que les dommages aux membranes. Par ailleurs, le lien entre division cellulaire et haute pression est confirmé par une étude de MAÑAS et MACKEY (2004) qui ont montré que les effets des HPH sont plus élevés pendant la phase exponentielle de croissance que pendant la phase stationnaire (MAÑAS et MACKEY, 2004).

Chez ces micro-organismes piézosensibles, certains gènes activés en cas de haute pression sont souvent aussi impliqués dans la réponse aux stress (chaud, froid, osmotique) prouvant ainsi que la pression agit vraiment comme un stress pour la cellule (WELCH *et al.*, 1993; AERTSEN *et al.*, 2005; ISHII *et al.*, 2005). La plupart de ces gènes codent pour des HSP et des cold shock proteins (CSP) tel *dnaK*, *grpE* et *hns* chez *E. coli* (ISHII *et al.*, 2005).

De même que pour *E. coli*, des gènes spécifiques à la résistance aux stress environnementaux sont activés chez *S. cerevisiae* à des pressions inférieures à 50 MPa. Parmi ces gènes, des HSP sont sur et sous exprimées, notamment HSP31 qui à des pressions non létales jouerait un rôle dans le traitement des protéines mal repliées, notamment membranaires (MIURA *et al.*, 2006), de même est-ce le cas pour TK2303 chez *T. kodakarensis*, une chaperonne surexprimée en condition de stress qui aurait sensiblement la même action (VANNIER, 2012).

De manière intéressante et prouvant que *P. profundum* SS9 est un organisme piezophile, des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (*mutT*, *recN*, *uvrA* et *uvrD*) sont

I. Introduction

sur-exprimés à 0,1 MPa par rapport à 28 MPa, la pression optimale (VEZZI *et al.*, 2005). Il est possible que cette réponse soit préventive et donc due au fait que la cellule à 0,1 MPa est exposée à d'autres type de stress que la pression, comme la présence d'UV, auquel les bactéries des grandes profondeurs sont très sensibles (YAYANOS et CHASTAIN, 1999). *P. profundum* SS9 ne possède notamment pas de gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN induit par les UV comme le gène codant pour la deoxyribodipyrimidine photo-lyase (CAMPANARO *et al.*, 2008).

I.7. Les *Thermococcales*

La recherche des effets des HPH sur les micro-organismes s'est comme nous l'avons vu précédemment principalement focalisée sur des organismes mésophiles piézosensibles ou piézotolérants et psychrophiles piézophiles marins. Néanmoins, très peu d'études ont été effectuées sur des micro-organismes se développant dans des sources hydrothermales, excepté celle par VANNIER (2012) sur deux *Thermococcus*, *T. barophilus* et *T. kodakarensis* (VANNIER, 2012). Dans cette étude, des analyses transcriptomiques sur une souche piézophile et une souche piézosensible ont été effectuées.

Parmi les micro-organismes se développant dans les sources hydrothermales on trouve l'ordre des *Thermococcales*. Ce sont des archées anaérobies, hétérotrophes, neutrophiles, soufres réducteurs et hyperthermophiles. Les *Thermococcales* sont composées des genres *Pyrococcus*, *Thermococcus* et *Palaeococcus* (PRIEUR *et al.*, 2004). Depuis leurs découvertes en 1986 par FIALA et STETTER avec l'isolement de *Pyrococcus furiosus*, les génomes de 16 espèces ont été séquencés et annotés.

Les *Thermococcales* sont des organismes hétérotrophes et donc capables d'assimiler une grande variété de composés organiques. De même, ils sont capables d'assimiler un grand nombre de polymères tels des poly- et oligosaccharides (polyols, chitine, sucrose, glucose, maltose, amidon...) et des peptides (caséine, acides organiques, casamino acids...)

(BIRRIEN *et al.*, 2011). Les *Thermococcales* nécessitent donc différentes enzymes capables de dégrader ces différents substrats comme des protéases et des enzymes dégradant les polymères de sucres. Ces enzymes étant capables de résister à des températures proches de 100 °C, elles présentent de potentielles applications industrielles et pharmaceutiques. De nombreuses études de structures et fonctionnalités ont ainsi été effectuées sur leurs enzymes notamment les protéases (Pour revue ATOMI (2005); EGOVA et ANTRANIKIAN (2005)).

I.7.1. Réplication, transcription, traduction

La réplication

La réplication de l'ADN est un mécanisme universel en trois étapes principales, l'initiation qui se déroule à une origine de réplication, l'élongation faisant intervenir des ADN polymérases et la terminaison. Le mécanisme général est conservé entre les trois domaines du vivant, ce qui suppose un ancêtre commun aux trois domaines (*Archaea*, *Bacteria* et *Eucarya*). Néanmoins, des différences et similarités existent. Les archées possèdent ainsi les deux systèmes d'origine de réplication suivant l'espèce, certains micro-organismes possèdent un chromosome et une origine de réplication alors que d'autres mécanismes ressemblent plus aux eucaryotes avec plusieurs origines de réplifications et plusieurs chromosomes (SAMSON et BELL, 2011). Lors de l'initiation de la réplication, deux hélicases permettent la création de deux fourches d'ADN partant dans des sens opposés. Ainsi, chez les archées les hélicases sont proches des hélicases minichromosome maintenance (MCM) eucaryotes (BARRY et BELL, 2006). Chez *P. furiosus*, des hélicases homologues aux MCM eucaryotes, sont recrutées par le complexe protéique GINS, responsable de l'initiation de la réplication (YOSHIMUCHI *et al.*, 2008).

La réplication est ensuite effectuée par un complexe protéique qui synthétise les deux brins d'ADN simultanément. Ce complexe est composé entre autres de polymérases, pri-

I. Introduction

mases, hélicases et de protéines se liant à l'ADN simple brin (SSB)(BARRY et BELL, 2006)(Tableau I.3). La façon, dont ces différentes protéines sont arrangées et leur rôle précis diffère selon les domaines. Chez les eucaryotes et les bactéries, ce « réplisome » commence à être relativement bien étudié (O'DONNELL *et al.*, 2013), chez les archées de nombreux points reste à élucider. Néanmoins, des techniques innovantes existent, tels celle développée par PLUCHON *et al.* qui consiste à caractériser des réseaux d'interactions, en utilisant des protéines connues pour être attachées et pour être impliquées dans la réplication chez l'archée *P. abyssi* (PLUCHON *et al.*, 2013). Il est ainsi de plus en plus prouvé que le réplisome archéen s'apparente au complexe eucaryote simplifié plutôt qu'au réplisome bactérien (Tableau I.3). Cela explique pourquoi les archées sont très utilisées pour l'étude des mécanismes précis de réplication chez les eucaryotes.

Composé	<i>Bacteria</i>	<i>Eukarya</i>	<i>Archaea</i>
Polymérase	Pol III	Pol $\alpha/\delta/\epsilon$	Pol
Clamp	β	PCNA	PCNA
Clamp Loader	γ/τ complex	RFC	RFC
SSB	SSB	RPA	RPA
Primase	DnaG	Pol α -primase	Primase
Helicase	DnaB	MCM2-7, CMG	MCM
Autre	?	GINS, Cdc45	GINS

TABLEAU I.3.: Principaux composés impliqués dans la réplication chez les trois domaines du vivant, tiré de YAO et O'DONNELL (2010)

La transcription

La transcription est un processus qui consiste en la copie des régions codantes de l'ADN en molécules d'acide ribonucléique (ARN). La transcription fait intervenir une ARN polymérase, enzyme chargée de cette copie. Elle se déroule en 3 étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison (Figure I.9 page ci-contre). La machinerie de transcription chez les archées est une version simplifiée de celle des eucaryotes. Elle comprend une ARN polymérase, des facteurs de transcription (TF) principaux TATA-Binding protein

(TBP), TFB ainsi que des facteurs accessoires comme TFE, et TFS (GROHMANN *et al.*, 2009)(Figure I.9).

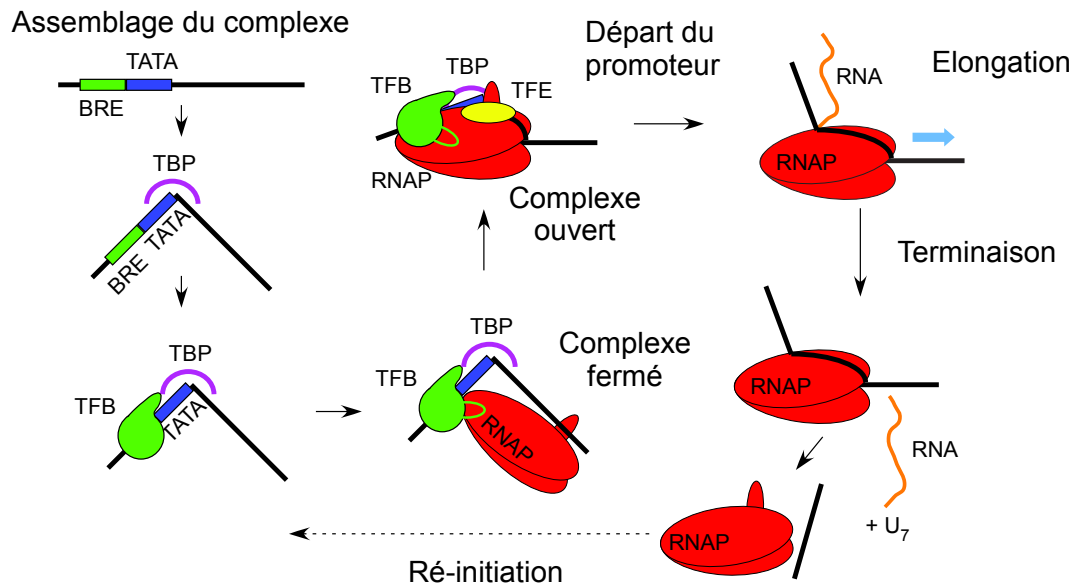


FIGURE I.9.: Modèle simplifié de la transcription chez les *Thermococcales*. La protéine TBP se fixe au motif TATA, recrute la protéine TFB qui se fixe au motif BRE. Ce complexe permet la fixation de l'ARN polymérase (RNAP). Le complexe s'ouvre et permet le passage de l'ADN dans l'ARN polymérase ce qui enclenche le début de l'élongation. L'arrivée de la protéine TFE permet la stabilisation du complexe. Seule l'ARN polymérase est présente et copie l'ADN en ARN, bien que des facteurs d'élongation puisse réguler son activité. Une fois l'élongation terminée, la polymérase se détache de l'ADN et peut à nouveau être réutilisée. Inspiré de GROHMANN *et al.* (2009).

Au cours de l'initiation, la protéine TBP va reconnaître un motif en amont du gène où a le lieu de recrutement de l'ARN polymérase. Chez les archées, ce motif consiste en une boîte TATA-like proche de celle des eucaryotes et situé à 26 pb du site d'initiation (REITER *et al.*, 1990). La protéine TBP va alors recruter la protéine TFB qui va se lier à la fois au complexe TBP-TATA et à une séquence en amont proche appelée BRE. Cette séquence riche en purine est présente chez une majorité de promoteurs archéens (BELL *et al.*, 1999). Des études structurales ont ainsi permis de montrer que cette séquence était nécessaire dans la détermination de la direction de la transcription et qu'elle avait

I. Introduction

un rôle dans le niveau de transcription du gène (LITTLEFIELD *et al.*, 1999). L'ARN polymérase (RNAP) est alors recrutée par ce complexe. La RNAP des archées possède environ 12 sous-unités et est proche de l'ARN polymérase de type 2 eucaryote (LANGER *et al.*, 1995). Les sous-unités D, L, N et P forme un complexe qui sert à assembler le site catalytique composé des sous-unités A'-A''-B'-B''-D-L-N-P. Les autres sous-unités (F, K et F/E) qui ne participent pas à l'activité auraient une fonction stabilisatrice de la polymérase (WERNER et WEINZIERL, 2002; OUHAMMOUCH, 2004). Lors du recrutement de la polymérase, le complexe protéique est dit fermé et n'est donc pas en contact direct avec l'ADN, l'ouverture du complexe entraîne une séparation de la double hélice d'ADN, le brin matrice va se placer entre les « pinces » de la polymérase, tandis que l'autre brin se placera à l'extérieur du complexe, la protéine TFE intervient alors pour stabiliser le complexe RNAP/ADN (GROHMANN *et al.*, 2009) (Figure I.9 page précédente).

La phase d'élongation est effectuée uniquement par la RNAP, mais comme elle n'est pas uniforme certains facteurs d'élongation peuvent intervenir. Un des problèmes que rencontre la polymérase lors de l'élongation est que certaines séquences d'ADN déstabilisent l'hybride ADN/ARN, cela peut entraîner un recul de la polymérase et le détachement de l'ARN 3' du site actif (CRAMER, 2002). Le facteur d'élongation TFIIS coupe alors l'ARN qui est sorti du site actif, permettant ainsi à la polymérase de continuer la transcription (KETTENBERGER *et al.*, 2003). La présence d'autres facteurs d'élongation potentiels a été démontrée (TFS, Spt4/5, NusA et Elp3.), mais leur rôle n'a pas encore été prouvé expérimentalement (WERNER, 2007; GROHMANN *et al.*, 2009).

La phase de terminaison se déroule lorsque la polymérase arrive sur une adénine répétée 7 fois (A_7), ce qui entraîne alors la création d'un hybride A_7-U_7 qui sera déstabilisé (MARTIN et TINOCO, 1980). Un autre modèle suppose que la transcription d'un stretch de U entraîne une pause importante de la polymérase, pause qui arrêterait ainsi la transcription.

La régulation de la transcription s'effectue essentiellement par la force du promoteur et par la relation entre les protéines se liant à l'ADN et la machinerie de transcription. Des ARN non codant (ARNnc) peuvent aussi jouer un rôle important. L'action des répresseurs est souvent liée à l'endroit auquel ceux-ci ils se lient à l'ADN (OUHAMMOUCH, 2004). Comme pour les bactéries, il existe différentes familles de régulateurs transcriptionnels tels les Lrp (BRINKMAN *et al.*, 2003). Un exemple de ces répresseurs est un régulateur intervenant dans la réponse aux chocs thermiques chez *P. furiosus* (VIERKE *et al.*, 2003). Ce répresseur inhibe la transcription en empêchant la fixation du RNAP sur un promoteur d'une AAA⁺ ATPase.

La régulation positive de la transcription est peu connue chez les *Thermococcales* comme chez les archées, néanmoins des études suggèrent qu'elle puisse passer par une interaction du promoteur avec une protéine activatrice, une altération de la conformation de l'ADN autour de la protéine ou l'utilisation d'un autre groupe de protéines TBP-TFB (OUHAMMOUCH, 2004).

La traduction

La traduction est une étape clé dans l'expression des gènes et le lien direct entre génotype et phénotype. C'est un mécanisme très conservé chez les trois domaines du vivant, malgré cela, des spécificités existent, spécialement au niveau de l'initiation et de la terminaison.

L'initiation est l'étape limitante de la traduction, c'est pourquoi la plupart des mécanismes la régulant se déroulent lors de cette étape. La traduction débute par la petite sous-unité du ribosome qui cherche le codon start sur l'ARN messager (ARNm) et assiste sa liaison avec un ARN de transfert inverse (ARNti). Un certain nombre de protéines appelées facteurs d'initiation (IF) assistent le ribosome pour ce démarrage de traduction.

Contrairement aux bactéries et eucaryotes, les ARNm des archées, sont de plusieurs types, certains sont modifiés aux extrémités 5' (Leader) et d'autres ne le sont pas (Lea-

I. Introduction

derless). Néanmoins, les ARN leader ne possèdent pas de motifs type Shine–Dalgarno, ou de coiffe. Le mécanisme de traduction des ARNm leader qui ne possèdent pas de séquences spécifiques au ribosome est encore inconnu. Alors que les ARNm leaderless seraient reconnus par le ribosome si celui-ci contient déjà l'ARN de transfert (ARNt) initiateur (GRILL *et al.*, 2000). La sous-unité 30S du ribosome des archées, à la capacité comme les bactéries, de former un complexe contenant l'ARNm, l'ARNti et la plupart des IF. La machinerie avance ainsi dans le sens 5'-3' jusqu'à ce que le codon d'initiation soit rencontré. La reconnaissance du site d'initiation par le ribosome est modulée par trois IF (IF1, IF2 et IF3) (LAURSEN *et al.*, 2005). La sous-unité 50S du ribosome est alors recrutée à l'aide de l'hydrolyse d'un GTP par un facteur d'initiation et l'élongation débute.

L'élongation est le processus clé de la traduction, cela explique qu'il est très conservé entre les trois domaines (LONDEI, 2007). Un ARNt anticodon (aaARNt) relié spécifiquement à un acide aminé en 3' se lie au ribosome et forme une liaison codon/anticodon avec l'ARNm. Cet aaARNt est relié à un facteur d'élongation (EF1A) chez les archées. Cette protéine G interagit avec le ribosome par le biais d'une liaison GTP. La reconnaissance par le ribosome de la liaison codon/anticodon entraîne l'hydrolyse de ce GTP, catalyse l'allongement de la chaîne peptidique et avance sur l'ARN messager (DINOS *et al.*, 2005).

La terminaison de la traduction se produit lorsqu'un codon-stop entre dans le ribosome. Des facteurs de terminaison sont chargés de la reconnaissance du codon-stop et du détachement par le ribosome du peptide synthétisé. Comme pour les autres mécanismes de traduction, les archées sont proches des eucaryotes au niveau de ces facteurs de terminaison. Les archées possèderaient ainsi un facteur de terminaison reconnaissant les trois codons-stops (UAA, UAG et UGA) par un mécanisme encore inexpliqué (DONTSOVA *et al.*, 2000).

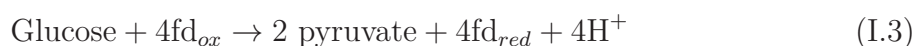
I.7.2. Le métabolisme énergétique

La glycolyse

La voie de la glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof est une voie centrale dans le métabolisme de la cellule. Elle permet la conversion du glucose en pyruvate et entraîne la création de nombreux métabolites précurseurs tels le glucose 6-P, le fructose 6-P, le glyceraldehyde-3P (3PG), le glyceraldehyde 3-phosphate (GAP), le phosphoenolpyruvate (PEP) et le pyruvate. On observe des différences importantes au niveau de cette voie entre d'un côté les bactéries et eucaryotes et de l'autre les archées (VERHEES *et al.*, 2003).

Chez les deux premiers domaines du vivant, la glycolyse démarre par la phosphorylation du glucose, suivi par l'isomérisation en fructose 6-phosphate. Une seconde phosphorylation permet le clivage aldol du fructose 1,6-bisphosphate. Se produit enfin, une activation P_i -dépendante du GAP, qui est ensuite converti en pyruvate. La réaction entraîne ainsi la formation d'énergie sous la forme d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) et de NADH (Équation I.2).

Au contraire, chez les archées et spécialement chez les *Thermococcales*, seuls 4 enzymes sur dix ont des homologues bactériens ou eucaryotes. Il est d'ailleurs considéré que la réaction complète n'entraîne pas la formation d'ATP, mais juste la création d'ions hydrogène (Équation I.3). Cette voie fait intervenir une ferrodixine qui peut soit être oxydée (fd^{ox}) soit réduite (fd^{red}) (VERHEES *et al.*, 2003).



I. Introduction

Chez *P. furiosus*, qui a été très étudiée à ce niveau, la voie d'Embden-Meyerhof est principalement accomplie par trois enzymes que sont la glucokinase (GLK), la phosphofructokinase (PFK) et une glyceraldehyde-3-phosphate ferrédoxine oxydoréductase (GAPOR). La GLK est responsable de la phosphorylation du glucose en glucose-6P ce qui entraîne l'activation de la voie de la glycolyse. La PFK qui catalyse la phosphorylation du fructose-6P est l'enzyme clé, car c'est l'enzyme la plus lente de la glycolyse. Elle contrôle donc la vitesse de la réaction, elle catalyse aussi la première réaction irréversible de la voie. Enfin, la GAPOR est responsable de la conversion glycolytique du GAP en 3PG. L'action de cette enzyme constitue une différence majeure entre les archées et les deux autres domaines du vivant où ce sont les enzymes glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et 3-phosphoglycerate kinase (PGK) qui catalysent la conversion du GAP en 3PG de façon bidirectionnelle et en deux étapes (VAN DER OOST *et al.*, 1998)(Figure I.10).

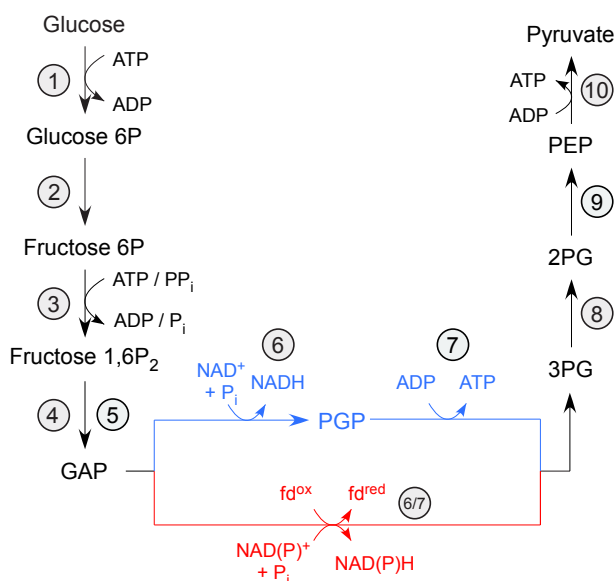


FIGURE I.10.: Comparaisons des voies de la glycolyse chez les *Thermococcales* (rouge) et les bactéries (bleu). Métabolites : GAP, PGP : 2,3 biphosphoglycerate, 3PG, 2PG, PEP. Enzymes : (1) GLK ; (2) PGK ; (3) PFK ; (4) FBA ; (5) TIM ; (6) GAPDH ; (7) PGK ; (6/7) GAPOR ; (8) PGM : phosphoglycerate mutase ; (9) enolase ; (10) PYK : pyruvate kinase. Tiré de VERHEES *et al.* (2003).

La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates est une voie métabolique responsable de la production de ribose-5-phosphate utilisé lors de la synthèse des nucléotides, ainsi que de la production d'érythrose-4-phosphate, précurseur d'acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane. Chez les *Thermococcales* la voie classique retrouvée chez un grand nombre de bactéries est incomplète. Cette voie est classiquement divisée en deux, une phase oxydative qui catalyse le glucose 6P en ribulose 5-phosphate. Ce dernier est le précurseur des nucléotides. Dans la phase non oxydative, le ribulose 5-phosphate est converti en ribose 5-phosphate, et en erythrose 4-phosphate qui sont respectivement des précurseurs des nucléotides et des acides aminés aromatiques (SODERBERG, 2005). Chez les *Thermococcales*, la phase oxydative n'est pas présente, elle est remplacée par la voie ribulose monophosphate. Cette voie métabolique catalyse la conversion du fructose 6P en ribulose 5-phosphate à l'aide de deux enzymes principales la 3-hexulose-6-phosphate synthase (HPS) et la 6-phospho-3-hexuloisomerase (PHI) (KATO *et al.*, 2006; ORITA *et al.*, 2006).

Le cycle de l'acide citrique

Le cycle de l'acide citrique (ou cycle de SZENT-GYÖRGYI et KREBS) est une voie métabolique aérobique responsable de la production d'énergie. Les *Thermococcales* étant des anaérobies stricts, il semble peu utile de posséder des enzymes impliquées dans ce cycle. Seul *P. furiosus*, possède un cluster de 3 gènes qui codent pour une partie du cycle de krebs (PF0201-203) qui codent pour une citrate synthase, une aconitate hydratase et isocitrate déshydrogénase, respectivement. Ces enzymes permettent de convertir l'acetyl-CoA en 2-oxo-glutarate. Une des actions de ces enzymes pourrait être de fournir des précurseurs d'acides aminés notamment la glutamine et l'arginine. Bien que des expériences d'expression, de ces enzymes aient été effectuées (VAN DER OOST *et al.*, 1998),

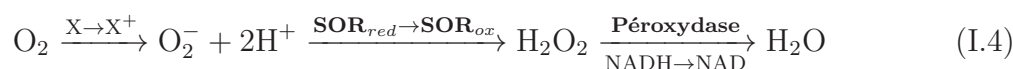
I. Introduction

leurs rôles est encore hypothétique, et d'autres études suggèrent néanmoins qu'elles soient impliquées dans le cycle de l'azote (CONSALVI *et al.*, 1991). Une autre hypothèse est le fait qu'il s'agirait des restes d'un cycle de l'acide citrique inversé. Ce cycle retrouvé uniquement chez des organismes autotrophes a pour but de fixer le CO₂ (THAUER, 2007) et n'est sans doute pas actif chez *P. furiosus*.

La détoxification de l'oxygène

Les *Thermococcales* sont des organismes anaérobies stricts et ne supportent donc pas l'oxygène. Malgré cela, le gradient important entre le flux de la cheminée hydrothermale (chaud et anoxique) et l'eau de mer environnante (froide et oxique) indique que ces micro-organismes puissent entrer en contact avec de l'oxygène. Lors de différentes réactions métaboliques impliquant l'oxygène, des dérivés réactifs d'oxygène ou reactive oxygen species (ROS) sont produits tels l'anion superoxyde O₂⁻, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, ou encore l'ozone O₃⁻. Ces réactifs sont toxiques pour la cellule et peuvent entraîner sa lyse. Les micro-organismes vivant en conditions aérobies possèdent donc un grand nombre d'enzymes permettant de détoxifier la cellule comme des superoxydes dismutases, des peroxydases et des catalases (APEL et HIRT, 2004). La plupart des organismes anaérobies stricts ne possèdent pas ces enzymes et sont donc incapables de détoxifier ces réactifs par ce moyen. Néanmoins des études effectuées sur *P. furiosus* ont permis de montrer la présence d'une superoxyde réductase (SOR) qui possède la capacité de réduire le peroxyde d'hydrogène. Cette enzyme est active à des températures (25 °C) très inférieures à la température optimale de *P. furiosus* (100 °C) (JENNEY *et al.*, 1999). Elle serait donc active lorsque la cellule se trouverait dans l'eau de mer oxique. Un modèle de détoxification des espèces réactives a ainsi été proposé, celui-ci à la caractéristique d'être actif à des températures où la cellule ne se développe plus (Équation I.4). Ce modèle propose que dans un environnement réduit l'oxygène est réduit en superoxyde souvent par l'intermédiaire d'un métal (X). Le superoxyde est ensuite réduit en peroxyde

d'hydrogène par la forme réduite de la SOR. Ce dernier est enfin réduit en eau par une peroxydase (GRUNDEN *et al.*, 2005).



Le métabolisme de l'hydrogène

L'oxygène étant toxique pour la cellule, l'hydrogène joue un rôle clé dans le métabolisme anaérobie, notamment en étant utilisé comme source d'énergie. Les micro-organismes utilisent les protons H^+ de l'eau comme des accepteurs d'électrons afin d'éliminer l'excès de pouvoir réducteur dans la cellule, ainsi que pour réoxyder les coenzymes en absence d'oxygène. De même, les micro-organismes peuvent aussi utiliser l'hydrogène en le réduisant. Les enzymes capables de catalyser ces réactions sont des métalloprotéines nommées hydrogénases. Elles favorisent la réaction réversible : $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ (VIGNAIS et COLBEAU, 2004). Les hydrogénases sont regroupées en classes suivant la composition de leur site actif, les [NiFe]-hydrogénases, les [FeFe]-hydrogénases, et les [Fe]-hydrogénases. Les *Thermococcales* possèdent uniquement les hydrogénases de type [NiFe] (VIGNAIS et BILLOUD, 2007). L'action de ces enzymes est dépendante du potentiel redox de la cellule. Dans le cas des *Thermococcales*, notamment *P. furiosus*, nous avons vu que la glycolyse n'entraînait pas la formation d'ATP, mais d'ions hydrogènes notamment par l'action d'une ferrodixine (Section I.7.2 page 43). Les hydrogénases sont donc dans ce cas impliquées dans la formation d'hydrogène (VERHEES *et al.*, 2003). L'enzyme spécifique impliquée est une hydrogénase membrane-bound hydrogenase (Mbh) qui en formant des ions hydrogènes crée un gradient de protons entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule. Un équilibre va ensuite se produire et ces protons en excès vont ensuite revenir à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire d'une ATP synthase entraînant ainsi la formation d'ATP et donc d'un système de respiration anaérobie (SAPRA *et al.*, 2003). Ce système est actif notamment en absence de soufre (Figure I.11 page suivante).

I. Introduction

En présence de soufre, un shift se produit des Mbh vers des membrane-bound oxydo-reductase (Mbx). Ces oxydoréductases sont très proches des Mbh et utiliseraient aussi la ferrédoxine comme donneur d'électrons. Elles entraîneraient la formation de NADPH à l'aide de NADP^+ et ainsi la création d'un gradient de protons au travers la membrane. Ce NADPH serait alors utilisé par une CoASH-dependent Mbx elemental sulfur reductase (NSR). Cette enzyme transformerait alors l'hydrogène en sulfure d'hydrogène grâce au soufre élémentaire présent dans la cellule. La transformation produirait donc du NADP^+ qui serait utilisé par la Mbx pour créer un gradient de protons et ainsi entraîner la catalyse d'ADP en ATP (SCHUT *et al.*, 2007) (Figure I.11).

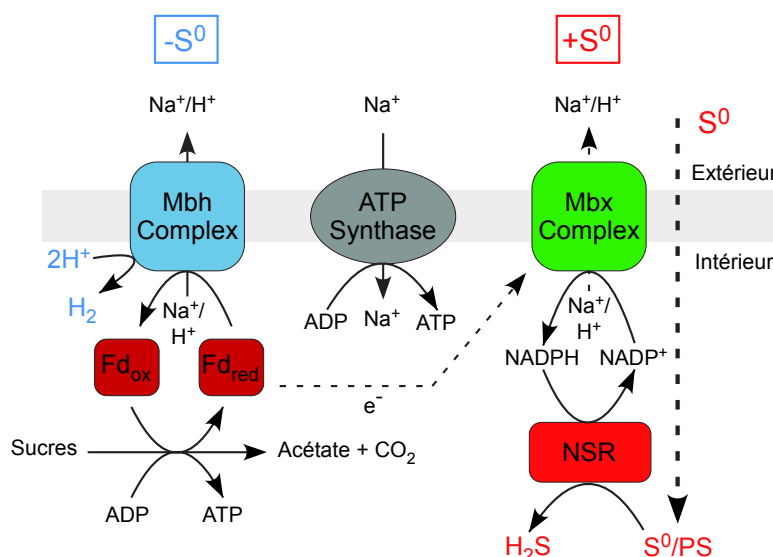


FIGURE I.11.: Modèle d'action des hydrogénases chez *P. furiosus* tiré de SCHUT *et al.* (2012). À partir de la voie de la glycolyse et en absence de soufre, la ferrédoxine servirait de donneur d'électrons pour la formation d'hydrogène et la création de gradients de protons au travers la membrane par l'intermédiaire d'hydrogénases (Mbh) intramembranaires. Ces protons traverseront ensuite la membrane au travers d'ATP synthase, entraînant la formation d'ATP. En présence de soufre, la ferrédoxine servirait de donneur d'électrons à des oxydoréductases (Mbx) qui créerait le même gradient de protons.

Dans le génome de la plupart des *Thermococcales*, des hydrogénases [NiFe] cytosoliques sont retrouvées excepté chez *T. gammatolerans* qui n'en possède aucune et, *P. horiko-*

shii et *P. abyssi* qui n'en possèdent qu'une seule. Ces hydrogénases qui ne sont pas nécessaires pour la croissance cellulaire (LIPSCOMB *et al.*, 2009) seraient impliquées dans la formation de NADPH à partir d'hydrogène comme donneur d'électrons (SCHUT *et al.*, 2012).

Certaines *Thermococcales* possèdent la capacité d'utiliser une formate déshydrogénase en relation avec les hydrogénases comme *Thermococcus litoralis* et *Thermococcus onnurineus* (TA KÁCS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2010). Le formate entre dans la cellule par l'intermédiaire d'un transporteur de formate. Il est alors oxydé en CO₂ par une formate déshydrogénase et les protons sont alors réduits en H₂ par une hydrogénase en réponse à l'accumulation de formate pendant la fermentation. Cela permet entre autre à la cellule de maintenir son pH cytoplasmique. Le cluster responsable de l'utilisation de formate par *T. onnurineus* (fdh2-mfh2-mnh2, TON_1563-1580), comprend 2 unités de déshydrogénases, 7 sous unités [NiFe]-hydrogénase, une protéine hypothétique, le transporteur de formate et 7 sous unités Na⁺/H⁺ antiporter (Figure I.12 page suivante)(KIM *et al.*, 2010).

I.7.3. Les voies de biosynthèse

Les nucléotides

Les voies de biosynthèse des nucléotides, soit des purines et pyrimidines sont complètes chez les *Thermococcales*. Une des seules différences entre les *Thermococcales* est le fait que seules certaines espèces comme *P. yayanosii* et *T. kodakarensis* possèdent une inosine monophosphate (IMP) cyclohydrolase qui convertit le 5-formamidoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (FAICAR) un composé intermédiaire en IMP. COHEN *et al.* ont émis l'hypothèse qu'une carboxylate-amine ligase de la superfamille des ATP grasp pourrait jouer ce rôle chez *P. abyssi* (COHEN *et al.*, 2003). Cette famille d'enzymes possède un domaine de liaison à l'ATP particulier composé de deux domaines protéique

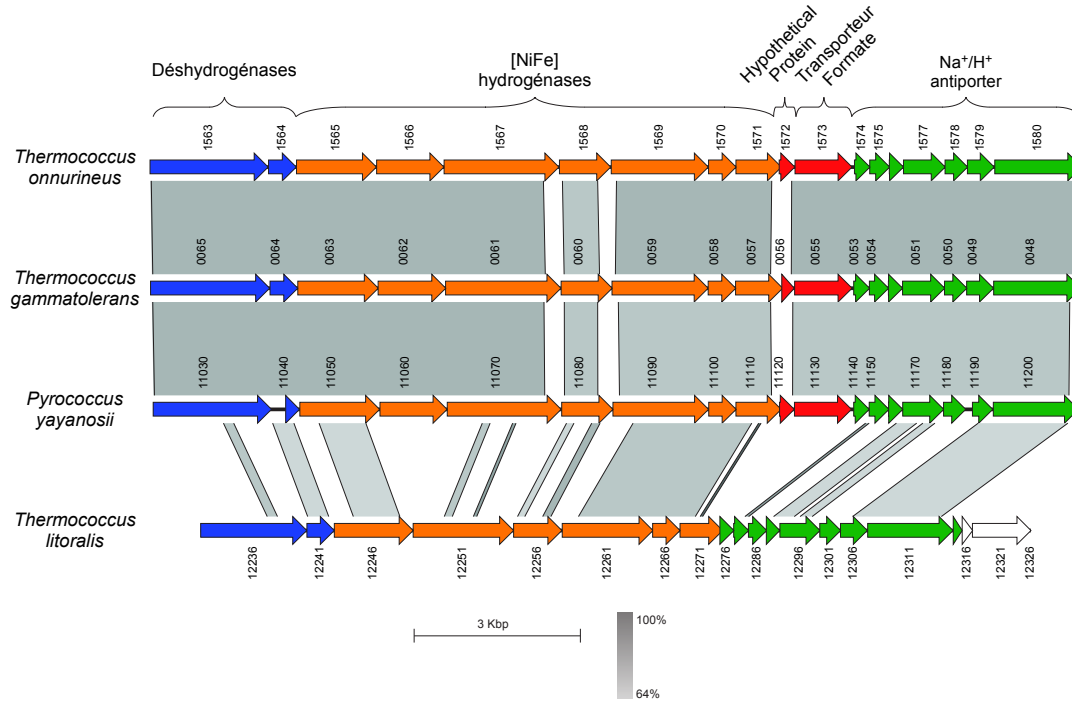


FIGURE I.12.: Clusters responsables du métabolisme du formate chez différentes *Thermococcales*. Ces clusters possèdent 2 unités de déshydrogénases, 7 sous unités [NiFe]-hydrogenase, une protéine hypothétique, le transporteur de formate et 7 sous unités NA⁺/H⁺ antiporter. *T. onnurineus*, *T. gammatolerans* sont capables de se développer sur formate, contrairement à *T. litoralis* (KIM *et al.*, 2010). A noter que *P. yayanosii* possède le cluster et semble donc capable de se développer sur formate.

$\alpha+\beta$ qui attrape (grasp) l'ATP (FAWAZ *et al.*, 2011), elle est impliquée dans de nombreux systèmes dont la voie de biosynthèse des purines tel présenté ici. Cette étude est néanmoins contredite par une étude sur *M. jannaschii* où une étude structurale montrait que les enzymes de *M. jannaschii* et *P. furiosus* sont similaires, mais que l'enzyme de *P. furiosus* ne catalyse pas la réaction entre le FAICAR et l'IMP (ZHANG *et al.*, 2008).

Les acides aminés

Les *Thermococcales* diffèrent entre-elles au niveau de la synthèse des acides aminés comme prédits par une analyse *in silico* par ZIVANOVIC *et al.* (2009) (Tableau I.4 page suivante). Un certain nombre d'acides aminés seraient ainsi produits chez la plupart des *Thermococcales*, dont l'asparagine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, la glutamine, la glycine, la serine et la thréonine. Il est à noter que les acides aminés acides sont tous produits par ces micro-organismes et qu'il en est de même pour les acides aminés polaires excepté la tyrosine qui est aussi un acide aminé aromatique. Le seul acide aminé non produit chez toutes les *Thermococcales* est la proline. Les acides aminés apolaires et aliphatiques que sont la glycine, l'alanine, l'isoleucine, la leucine et la valine sont tous produits par les *Thermococcales*.

Les acides aminés aromatiques (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) et l'histidine qui bien que n'étant pas un acide aminé aromatique, possède un noyau imidazole proche de ceux des acide aminés aromatiques, ne sont pas produits par toutes les *Thermococcales*. Cela peut s'expliquer par le fait que la synthèse de chacun de ces acides aminés nécessite une quantité importante d'ATP. La biosynthèse du tryptophane chez *E. coli* et *Bacillus subtilis* notamment utilise environ 70 équivalents ATP par molécule synthétisée (AKASHI et GOJOBORI, 2002) contre environ 30 pour la moyenne des autres acides aminés.

Acide aminé	Voie de biosynthèse des acides aminés				
	<i>T. gammatolerans</i>	<i>T. kodakarensis</i>	<i>P. furiosus</i>	<i>P. abyssi</i>	<i>P. horikoshii</i>
Arg	-	-	+	-	-
Cys	-	+	+	+	-
Leu	-	-	-§	-§	-
Lys	-	+	+	+	+
Met	-	+	-&	+	+
Phe	-	-	+	-	-
Trp	-	+	+	+	-
Val	-	-	-§	-§	-
Ala	+#	+#	+#	+#	+#
Asn	+	+	+	+	+
Asp	+	+	+	+	+
Glu	+	+	+	+	+
Gln	+	+	+	+	+
Gly	+	+	+	+	+
His	+	+	+	-	-
Ile	-	-	-§	-§	-
Pro	-	-	-	-	-
Ser	+	+	+	+	+
Thr	+	+	+	+	+
Tyr	+	+	+	-	-

TABLEAU I.4.: Exemples de voies prédites de biosynthèses d'acides aminés chez des *Thermococcales* tirée de ZIVANOVIC *et al.* (2009). § : seule la dernière enzyme de cette voie de biosynthèse manque dans ces souches. & : prédit partiellement. # : une alanine aminotransferase (aat) a pu être prédite dans ces génomes

I.7.4. Les transporteurs

Les *Thermococcales* comme nous l'avons vu plus haut sont capables d'assimiler un grand nombre de composés peptidiques ou saccharidiques grâce à un certain nombre d'enzymes dont des protéases et glycosidases. De même, ces micro-organismes sont prototrophes pour certaines voies de biosynthèses d'acides aminés espèces-dépendant. Il se pose donc la question des différents transporteurs cellulaires que possèdent ces espèces leur permettant d'importer différents nutriments ou éléments nécessaires pour leur développement.

La grande majorité des transporteurs que les *Thermococcales* possèdent sont des transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC). Ces transporteurs sont impliqués dans un grand nombre de fonctions cellulaires et sont liés à de nombreux systèmes notamment dans l'entrée de nutriments essentiels, la sortie d'ions, de protéines, la communication intracellulaire, la construction de la membrane, la régulation cellulaire... (HOLLAND et A BLIGHT, 1999). On en distingue deux grands types, les carbohydrate uptake transporters (CUT) et les transporteurs de di/oligopeptide (SCHNEIDER, 2001). Néanmoins, chez les archées le fait que les transporteurs de cette dernière classe puissent transporter un large choix de substrats (KONING *et al.*, 2001) et que des transporteurs de sucres chez *P. furiosus* et *S. solfataricus* montrent des homologies avec des transporteurs ABC di/oligopeptide (ELFERINK *et al.*, 2001) suggèrent que la majorité des transporteurs ABC sont des transporteurs plutôt de sucres.

Chez les archées, les transporteurs ABC sont composés de deux perméases, deux ATPases et d'une protéine ancrée à la membrane et servant de protéine affine aux différents substrats (Figure I.13 page suivante). Cette dernière est glycosylée sur une grande partie de sa structure tel décrit sur une Pullulanase de type II chez *Thermococcus hydrothermalis* (ERRA PUJADA *et al.*, 1999) contrairement aux mêmes protéines bactériennes. La glycosylation peut être effectuée par plusieurs sucres dont le glucose et le mannose

I. Introduction

(ELFERINK *et al.*, 2001). Bien qu'elle ne semble pas être essentielle, elle pourrait stabiliser les protéines extracellulaires contre la dégradation protéolytique, influencer les interactions de ces protéines avec l'enveloppe cellulaire et affecter leur thermostabilité (ALBERS *et al.*, 2004)

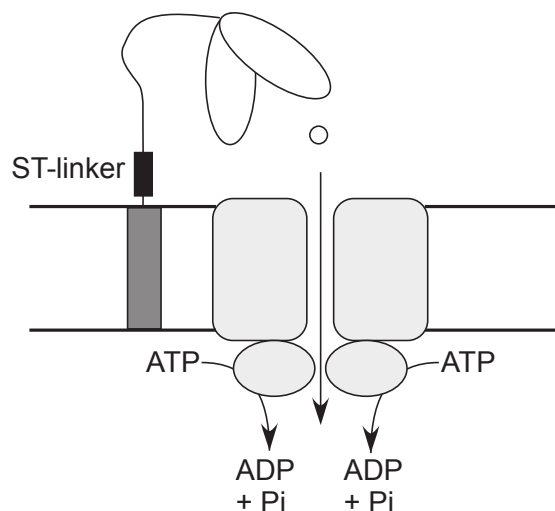


FIGURE I.13.: Schéma d'un transporteur ABC typique chez les archées. Il est composé de deux perméases permettant le passage de substrats qui ont été reconnus par la protéine extra-cellulaire. Ce substrat entre dans le cytoplasme grâce à l'action de deux ATPases qui vont transformer l'ATP en ADP plus un phosphate. Inspiré de ALBERS *et al.* (2004).

Certaines *Thermococcales* sont capables de se développer en présence de différents saccharides tels l'amidon, le maltose, le glucose... Cette capacité à dégrader les sucres à notamment été étudiée chez *P. furiosus*. Cette espèce capable de se développer sur de l'amidon, du maltose et du maltodextrine possède des enzymes extracellulaires capables d'hydrolyser l'amidon en maltose tel une amylopullulanase extracellulaire (DONG *et al.*, 1997) et une α -amylase (JØRGENSEN *et al.*, 1997). Une fois dégradé en maltodextrine ou maltose, *P. furiosus* possède deux transporteurs ABC, un de maltose/tréhalose et un de maltodextrine (KONING *et al.*, 2002). Excepté cette dernière et *Thermococcus litoralis*, les autres *Thermococcales* ne possèdent pas le transporteur maltose/tréhalose (XAVIER *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2006). Cela serait dû au fait que ce transporteur serait

probablement le résultat d'un transfert horizontal récent de gènes entre bactéries et archées. Ce dernier proviendrait d'un ancêtre de la bactérie de l'ordre des *Thermotogales*, *Thermotoga maritima* qui a été isolée au même endroit que *P. furiosus* et *T. litoralis* sur l'île Vulcano en Italie (HUBER *et al.*, 1986; FIALA et STETTER, 1986; NEUNER *et al.*, 1990). Cela est confirmé par le fait que la présence de transfert horizontaux de gènes a été prouvée entre les *Thermococcales* et les *Thermotogales* (CALTEAU *et al.*, 2005; NOLL *et al.*, 2008) Un modèle d'utilisation de l'amidon, du maltose et du maltodextrine a récemment été proposé par LEE *et al.* (2006) chez *P. furiosus*, ce modèle suggère que l'amidon serait dégradé en maltodextrine puis en maltose. Le maltose utiliserait le transporteur maltose/tréhalose pour entrer dans la cellule où il sera hydrolysé en glucose qui serait utilisé dans la voie de la glycolyse. Le maltodextrine utiliserait lui le transporteur de maltodextrine, celui-ci sera alors converti ensuite en glucose (Figure I.14 page suivante).

I.7.5. La mobilité

Dans des environnements dits extrêmes, la mobilité cellulaire joue un rôle important, notamment au niveau des sources hydrothermales. Ces habitats sont très instables notamment à cause du flux hydrothermal qui est alimenté aléatoirement causant des modifications de débits. Les archées ont donc besoin de mécanisme de mobilité pour s'adapter face aux conditions très changeantes du milieu. Des études de vitesse de déplacement ont par ailleurs montré que ces micro-organismes sont parmi les plus rapides du monde microbien (HERZOG et WIRTH, 2012). Les micro-organismes possèdent de nombreux systèmes de mobilité, les plus étudiées étant les flagelles, qui sont des filaments accrochés à la membrane cellulaire. Ce terme longtemps commun à tout les domaines du vivant a été remis en cause du fait des différences structurales existantes entre bactéries, eucaryotes et archées. Chez les eucaryotes, le terme flagelle a été rem-

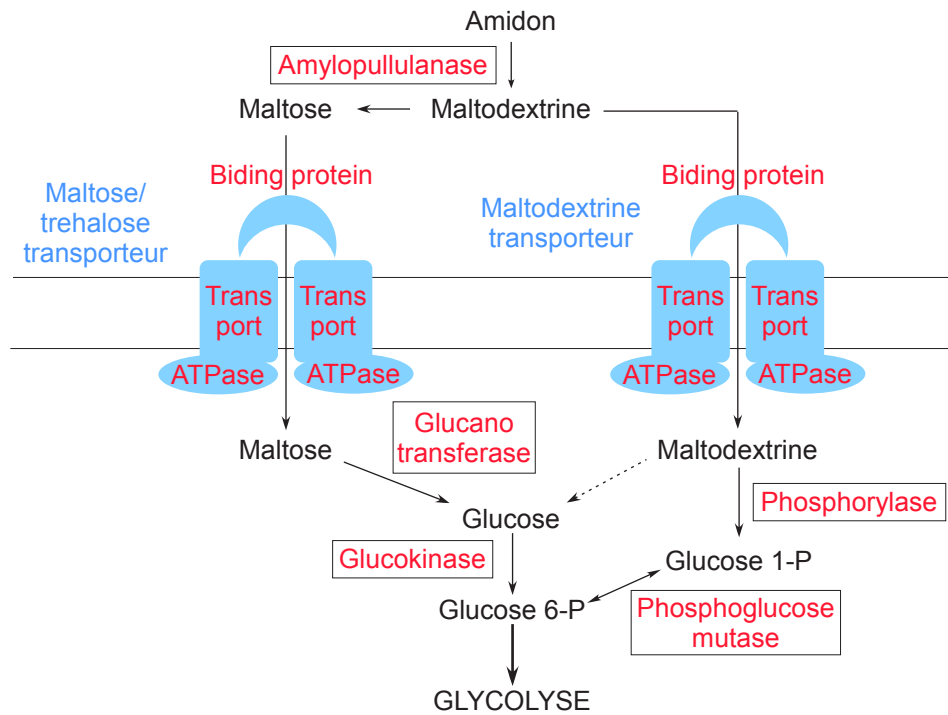


FIGURE I.14.: Modèle de transport de sucres chez *P. furiosus*. Certaines *Thermococcales* dont *P. furiosus* possèdent des transporteurs de saccharides. *P. furiosus* et *T. litorallis* possèdent un transporteur du maltose, d'autres *Thermococcales* (*T. barophilus*, *T. kodakarensis*, *P. yayanosii*, *P. furiosus* ...) possèdent eux un transporteur de maltodextrine. Le glucose produit par l'hydrolyse de ces composés sera utilisé principalement dans la glycolyse. Inspiré de LEE *et al.* (2006) et XAVIER *et al.* (1999)

placé par cilia. Concernant les archées, JARRELL et ALBERS ont proposé que le terme flagelle soit remplacé par archaellum. Ce terme est néanmoins contesté et est disputé par « archaeal flagellum » (WIRTH, 2012). Bactéries et archées se déplacent par rotation de structures hélicoïdales en sens horaire ou anti-horaire (MARWAN *et al.*, 1991), la structure de leurs « hélices » différent néanmoins. L'archaellum étant structurellement semblable aux pili de type IV des bactéries (JARRELL et ALBERS, 2012) (Figure I.5 page 23). Chez les *Thermococcales*, il est codé par un cluster de 10 gènes conservés. 3 gènes sont des sous-unités codant pour des flagellines qui forment la structure de l'archaellum. Ces sous-unités sont amenées à la structure par des protéines PibD/FlaK qui ont pour rôle de supprimer le peptide signal de la sous-unité. Les flagellines seront ajoutés à la base de la structure par une protéine membranaire (FlaJ) interagissant avec une ATPase (FlaI). Certaines *Thermococcales*, possèdent des systèmes à deux composantes participant au chimiotactisme proche de celui des bactéries, comme décrit chez *E. coli* (Section I.6.1 page 22)(SZURMANT et ORDAL, 2004). Typiquement, l'arrivée d'un composant chimique au niveau de protéines réceptrices MCP entraîne l'autophosphorylation d'une histidine kinase (CheA). Le phosphate de CheA est ainsi le substrat du régulateur CheY qui catalyse son transfert. La protéine CheY-P interagit avec la structure de l'archaellum par un mécanisme encore inconnu (JARRELL et ALBERS, 2012). Cette interaction cause un changement de la direction ou de la vitesse de rotation de l'archaellum.

I.7.6. L'immunité cellulaire : les CRISPR

La présence de virus chez les archées a été démontrée la première fois par TORSVIK et DUNDAS en 1974 sur une souche d'*Halobacterium*. Depuis plusieurs virus ont été isolés, ils ont la particularité de montrer une grande diversité morphologique par rapport aux virus de bactéries qui sont majoritairement en forme de tête-queue (Caudovirus)(PRANGISHVILI *et al.*, 2006). Un point intéressant est que la plupart des virus

I. Introduction

isolés de *Crenarchaeota* ont besoin d'un stress pour entrer en cycle lytique, on dit qu'ils sont alors lysogéniques. L'inverse est observé chez les *Euryarchaeota* (PRANGISHVILI *et al.*, 2006; PIETILÄ *et al.*, 2009).

Pour lutter contre l'infection par ces virus, les micro-organismes ont développé un système d'immunité cellulaire. En 1987 a été découvert chez *E. coli*, des séquences répétées de 29 pb qui étaient séparées par 32-33 pb de séquences non répétées (ISHINO *et al.*, 1987). Ces séquences retrouvées chez environ 90 % des archées ont été nommées clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) (GRISSA *et al.*, 2007). Parallèlement aux séquences répétées ont été retrouvés des gènes CRISPR-associated (*cas*), qui sont associés aux CRISPRs et absents lorsque ces derniers ne sont pas présents dans le génome (HAFT *et al.*, 2005). Le système CRISPRs peut diverger selon les espèces, la taille des séquences répétées varie entre 24 et 47 pb, et les séquences non répétées ont des tailles comprises entre 26 et 72 pb. Le nombre de répétitions varie lui entre 2 et 249 (SOREK *et al.*, 2008). Le mécanisme d'action des CRISPRs est encore mal connu, mais il semble que les séquences non répétées soient des séquences provenant de phages et d'éléments génétiques mobiles extra chromosomiques. Lors de l'infection de la cellule par un phage, si la cellule contient une séquence non répétée homologue à l'ADN du phage, les CRISPRs seront exprimés et la séquence homologue ira s'hybrider sur l'ARNm du phage à l'aide des protéines *cas*. Cet ARNm sera alors dégradé et le phage ne lysera ainsi plus la cellule (Figure I.15 page suivante). Ce mécanisme s'apparente peu ou prou au mécanisme d'interférence à ARN (small interfering ARN (siARN)) (HALE *et al.*, 2008) présent chez les eucaryotes.

I.8. Contexte et objectifs

A l'heure actuelle, les études effectuées sur les effets des HPH sur des micro-organismes piézosensibles ou piézophiles ont montré que celles-ci agissaient préférentiellement

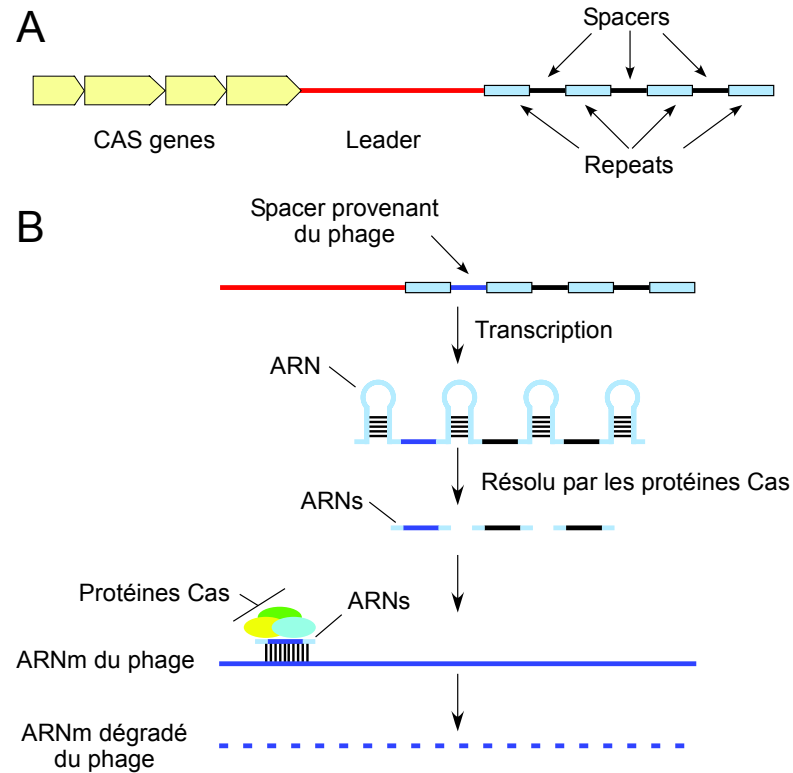


FIGURE I.15.: A : Structure du système CRISPRs. Le système est composé de gènes *cas* à proximité des séquences répétées (repeats) entourées de séquences non répétées (spacers). Entre les *cas* et CRISPRs se trouve une séquence leader. B : Modèle simplifié d'action des CRIPR. Lors de l'infection par le phage, les CRISPRs sont exprimés, les séquences répétées qui sont palindromiques forment des structures secondaires qui sont éliminées par les protéines *cas*. L'ARN restant, composé de séquence non répétée provenant de phage ou d'éléments extra chromosomiques va s'hybrider sur l'ARNm du phage. Cette hybridation favorisée par les protéines *cas* va entraîner la dégradation de l'ARNm du phage et ainsi inhiber l'infection. Inspiré de SOREK *et al.* (2008).

I. Introduction

au niveau de la membrane cytoplasmique et du métabolisme énergétique. Deux problèmes principaux se posent actuellement concernant l'étude des effets des HPH, tout d'abord le faible nombre de micro-organismes étudiés, ainsi que le peu d'étude transcriptomiques ou protéomiques globales effectuées sur ces micro-organismes. La majorité des micro-organismes étudiés sont psychrophiles ou mésophiles se développant de façon optimale à des pressions inférieures à 30 MPa, soit l'équivalent de 3 000 m de profondeur. De même les études globales sur les effets des HPH ne comparent habituellement pas ces effets entre des micro-organismes piézosensibles et piézophiles. Des exceptions existent, notamment l'étude transcriptomique effectuée dans le cadre de la thèse de VANNIER (2012) sur deux *Thermococcus* une piézosensible et une piézophile.

Afin de répondre aux questions que nous nous posons sur les effets des HPH sur des micro-organismes notamment piézophiles, nous avons choisi le modèle *P. yayanosii*, un piézophile stricte en le comparant à l'espèce piézosensible la plus proche soit *P. furiosus*. Nous avons choisi d'effectuer des comparaisons à la fois d'un point de vue génomique, transcriptomique et protéomique, ceci afin d'étudier le fonctionnement cellulaire des deux modèles d'études le plus largement possible.

Dans la première partie, nous comparons les génomes de nos deux modèles d'étude en élargissant au niveau du genre *Pyrococcus*. Cette étude permet d'analyser les différents polymorphismes observés au sein de ce genre et de tenter de relier ceux-ci à la capacité des micro-organismes à résister aux HPH.

Dans la deuxième partie, des études d'expressions transcriptomiques par puces à ADN et protéomiques par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) sont effectuées sur les deux espèces *P. yayanosii* et *P. furiosus*. Celles-ci sont soumises à différentes pressions sub-, supra- et optimales qui ont été déterminées expérimentalement. Ces comparaisons permettent ainsi d'étudier les effets des HPH lorsque les cellules sont soumis à des stress hydrostatiques. Par rapport aux autres

études existantes, l'étude de *P. yayanosii* permet d'observer les réponses d'un micro-organisme à un véritable stress en basse pression, notamment car celui-ci ne se développe pas à pression atmosphérique, contrairement aux micro-organismes piézophiles étudiés précédemment.

La troisième partie récapitule les résultats obtenus et les discute dans une perspective plus large de poursuite des études à mener afin d'approfondir nos connaissances sur les effets des HPH.

La quatrième partie décrit tout d'abord la publication qui résultera des travaux de cette thèse sur *P. yayanosii*. Par ailleurs, deux expériences annexes ayant été effectuées sur *T. barophilus* et *T. kodakarensis*, deux *Thermococcus*. La première a consisté à effectuer des expériences de diffusion neutroniques sur ces micro-organismes. Cette technique permet d'étudier l'influence d'un paramètre physico-chimique (température, pression) sur le dynamisme conformationnel global du protéome cellulaire, cela sur des cellules entières à l'aide de la diffusion de neutrons. Ces expériences ont été effectuées à l'Institut Laue Langevin (ILL) de Grenoble en collaboration avec Judith PETERS (ILL, Grenoble), Bruno FRANZETTI (IBS, Grenoble) et Philippe OGER (ENS de Lyon). Mon travail a consisté principalement en la préparation des échantillons qui sera décrite ici, un article résumant une partie de ce travail vient d'ailleurs d'être soumis (PETERS *et al.*, 2014). Le deuxième travail annexe auquel j'ai participé consistait à développer un outil génétique chez *T. barophilus*. Dans ce travail effectué principalement par Axel THIEL et qui a donné lieu à une publication (THIEL *et al.*, 2014), je me suis surtout impliqué dans les cultures sous HPH de la souche sauvage et ses dérivés afin de vérifier les effets de la délétion de gènes d'intérêts.

II.1. Culture de *Thermococcales*

II.1.1. Milieu de culture

Le TRM (*Thermococcales* Rich Medium) est un milieu riche adapté à la culture des *Thermococcales* (ZENG *et al.*, 2009). Il est composé par litre de : NaCl 23 g, MgCl₂ - 6 H₂O 5 g, KCl 0,7 g, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g, PIPES sodium salt 3,46 x g, extrait de levure 1 g, tryptone 4 g, NaBr 0,5 g, SrCl₂ 0,01 g. Auquel est ajouté 4 gouttes de résazurine, un indicateur coloré qui présente une coloration variant selon le potentiel d'oxydo-réduction du milieu. C'est donc un indicateur de la présence d'oxygène dans le milieu. Le pH est ensuite ajusté à 6,8 et le milieu autoclavé. 1 ml de chacune des solutions suivantes est ensuite ajouté par litre de milieu : K₂HPO₄ 5 %, KH₂PO₄ 5 %, CaCl₂ - 2 H₂O 2 %, FeCl₃ 25 mM, Na₂WO₄ 10 mM.

II.1.2. Culture en condition anaérobie

La culture cellulaire en anaérobie s'effectue dans des fioles pénicillines qui sont fermées hermétiquement. Celles-ci sont remplies à moitié de milieu en présence de soufre élémentaire (2 g/l), puis l'oxygène dans la phase gazeuse est retiré à l'aide d'un système de vide/gaz et remplacé par de l'azote, un gaz inerte. L'oxygène dissous dans la phase aqueuse est éliminé par l'ajout de sodium sulfide (Na_2S) (0,1 % final)

II.1.3. Culture sous pression hydrostatique

La culture sous pression s'effectue à l'aide d'incubateurs hautes pressions, hautes températures (Top Industrie). Le milieu contenant la culture à une concentration d'environ 10^6 cellules/ml est transféré dans des seringues (Terumo) bouchées hermétiquement par un bouchon en propylène, les seringues sont ensuite placées dans l'incubateur et la pression est augmentée dans celui-ci par ajout d'eau. La température est régulée automatiquement alors que la pression est régulée par une valve manuelle de sortie (MARTEINSSON *et al.*, 1997).

II.1.4. Cinétique de croissances

Les courbes de croissance des souches *P. furiosus* et *P. yayanosii* ont été réalisées à 98 °C et différents pressions hydrostatiques : 0,1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80 MPa. Après une pré-culture de 12 h, les cultures sont préparées pour que la concentration initiale soit d'environ 10^6 cellules/ml. Les cultures sont ensuite mises à incuber à pression atmosphérique et dans 4 incubateurs à la pression voulue. Afin d'éviter des étapes de décompression entre chaque prélèvement, chacun des incubateurs n'est ouvert qu'une seule fois sur une durée de 8 h. Toutes les 2 h, un incubateur est ouvert et les cellules fixées au paraformaldéhyde (PFA) 2 % final. Les cellules sont ensuite soit dénombrées par comptage sur cellule de Thoma (profondeur : 0,1 mm, surface : 0,0025 mm²) à

l'objectif 40 x d'un microscope à contraste de phase (Olympus) soit par cytométrie en flux (CyFlow Space, Partec). Les courbes de croissances sont ainsi réalisées et le milieu de phase exponentielle est déterminé Parallèlement, des comptages de cellules non fixées sont réalisés à l'aide du kit Live/Dead® BacLight (Invitrogen) ce qui permet de vérifier la viabilité des cellules. Ce kit repose sur le marquage différentiel de deux fluorochromes : le SYTO® 9 qui va pénétrer dans toutes les cellules viables ou non et marquer l'ADN double brin en émettant dans le vert et l'iodure de propidium qui ne va marquer l'acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules que si leur membrane est détériorée et émettre dans le rouge en prenant le pas sur la fluorescence verte du SYTO® 9. Ainsi les cellules viables seront vertes tandis que les cellules lysées seront rouges. Il est néanmoins important de noter que ce kit est utilisé normalement pour les bactéries dont la composition de la paroi diffère de celle des archées. L'iodure de propidium aura donc tendance chez les archées à émettre dans l'orange de manière diffuse. Les cellules sont également dénombrées sur cellule de Thoma à l'objectif 40 x d'un microscope à épifluorescence.

II.1.5. Observation en microscopie électronique à transmission

Une fois les cellules fixées au PFA, 5 µl de culture en phase exponentielle de croissance pour chaque pression étudiée sont déposés sur une grille de carbone (Formvar-carbone, 400 mesh) pendant 2 minutes. L'excès d'échantillon est ensuite éliminé et 5 µl d'acétate d'uranyle 2% sont appliqués pendant 45 secondes. Cette solution va permettre de contraster les cellules. Les grilles sont ensuite conservées à température ambiante dans des capsules de gélatine jusqu'à l'observation (Microscope électronique JEOL, JEM 100 CX II, plateforme de microscopie à l'UBO Brest).

II.2. Acides nucléiques

II.2.1. Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique commence par la culture de cellules dans un milieu adapté jusqu'à obtenir une concentration cellulaire d'environ 10^8 cellules/ml qui correspond à la fin de la phase exponentielle. Le soufre présent est éliminé par sédimentation ou centrifugation ($300 \times g$, 2 min) et le surnageant est récupéré. La culture est ensuite centrifugée $8\,000 \times g$, 15 min à 4°C . Puis le culot est resuspendu avec 800 μl de TE (10 mM Tris.HCl pH 8 et 1 mM acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) pH 8). 100 μl de dodécylsulfate de sodium (SDS) (10 %) et 100 μl de Sarkosyl (10 %) sont ensuite ajoutés pour lyser les cellules. Puis la solution est incubée 1 h à 55°C en présence de 50 μl de Protéinase K (20 mg/ml). L'ADN est ensuite séparé du reste des autres composants cellulaires par traitement avec 1 volume de phénol-chlorophorme-alcool isoamyl (25 : 24 : 1) et centrifugé 15 min à $14\,000 \times g$ et 4°C . La phase aqueuse est alors transférée dans un tube propre. Un volume de chloroforme est ajouté afin de purifier l'ADN et la solution est centrifugée 15 min à $14\,000 \times g$ et 4°C . 700 μl d'isopropanol sont alors ajoutés à la phase aqueuse ceci afin de précipiter l'ADN. Une centrifugation de 20 min à $14\,000 \times g$ et 4°C permet alors d'observer un culot blanc. La solution est ensuite lavée à l'éthanol 75 % et centrifugée 5 min à $14\,000 \times g$ et 4°C . Puis, le culot est incubé 10-15 min à température ambiante pour éliminer les traces d'éthanol, puis remis en suspension dans 100 à 200 μl d' H_2O . Une étape de traitement à la RNase (cf 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) peut être effectuée afin d'éliminer l'acide ribonucléique (ARN) restant

II.2.2. Amplification par PCR

Les polymerase chain reaction (PCR) ont été effectués à l'aide de la GoTaq (Promega) et avec 40 nM de chaque amorce (Section II.2.7). Le cycle suivant a été réalisé :

94 °C pendant 5 min afin d'activer la GoTaq, suivi de 30 cycles de 30 s à 94 °C (dénaturation), 1 min 30 à la température d'hybridation des amorces (50-60 °C) et 1 minute 30 à 72 °C (élongation) puis un dernier cycle d'élongation de 7 min à 72 °C.

II.2.3. Extraction d'ARN total

Cette méthode a été développée par CHOMCZYNSKI et SACCHI en 2006 et adapté à *P. furiosus* par VOORHORST *et al.* en 1995. L'étape de précipitation au chlorure de lithium est tirée de PUISSANT et HOUDEBINE (1990). Elle a pour but d'améliorer la pureté en ARN de la solution.

Comme précédemment une culture en phase exponentielle d'environ 10^8 cellules/ml de *Thermococcales* est utilisée. Le soufre présent est éliminé par sédimentation ou centrifugation (300 x g, 2 min) et le surnageant est récupéré. La culture est ensuite centrifugée 8 000 x g, 15 min à 4 °C. Puis le culot est resuspendu par aspiration/refoulement dans un volume de solution dénaturante (D) (Guanidinium thiocyanate 4 M ; Sodium citrate 42 mM, pH 7 ; Sarkosyl (N-laurosylsarcosine) 0,83 % ; β -mercaptoéthanol 0,2 mM) à raison d'1 ml par 10^7 cellules/ml. Cette solution a pour but de lyser les cellules et d'inhiber l'action des ribonucléases de façon à conserver l'intégrité de l'ARN. Par ml de lysat est ajouté dans l'ordre : 0,1 ml de sodium acetate 2M, pH 4, puis 1 ml de phénol-chlorophorme-alcool isoamyl (25 : 24 : 1). L'ajout d'acétate de sodium à pH acide va permettre de séparer en présence de phénol, l'ADN et l'ARN. Ce dernier sera alors retrouvé essentiellement dans la phase aqueuse. La solution est ensuite centrifugée 20 min à 10 000 x g à 4 °C. Puis, la phase aqueuse contenant l'ARN est précipitée par l'ajout d'isopropanol (v/v) et incubée 1 h à -20 °C. La solution est alors centrifugée 20 min à 10 000 x g et 4 °C. Le culot est ensuite resuspendu dans 1,5 ml de chlorure de lithium (4M). Ce dernier a pour propriété de précipiter uniquement l'ARN. La solution est alors centrifugée à 5 000 x g pendant 10 min à 4 °C. Puis le culot est dissous dans

II. Matériel et méthodes

0,3 ml de solution D. Une étape supplémentaire de précipitation est alors effectuée en ajoutant 0,3 ml d'isopropanol et en incubant pendant au moins 30 min à -20 °C. L'ARN est centrifugé pendant 10 min à 10 000 x g et 4 °C, et le culot resuspendu avec 0,5-1 ml d'éthanol 75 %. La solution est ensuite incubée 10-15 min à température ambiante pour éliminer les traces résiduelles de guanidinium, puis centrifugée 5 min à 10 000 x g et 4 °C. Le culot est alors séché 5-10 min à température ambiante. La dissolution se fait ensuite 100 à 200 μ l d'eau traité au diéthyl pyrocarbonate (DEPC) et l'ARN est resuspendu 10-15 min à 60 °C.

II.2.4. Purification de l'ARN et vérification

Une fois l'ARN extrait, l'ADN restant est digéré par 6 unités de DNAses pendant 2 fois 30 min. L'ARN est ensuite purifié sur colonne Quiagen (RNeasy Mini Kit). Une PCR est par la suite effectuée afin de vérifier la présence ou l'absence d'ADN après purification.

II.2.5. RT-PCR

La reverse transcriptase PCR (RT-PCR) se fait en 2 étapes, tout d'abord une étape de rétro-transcription à l'aide de la M-MLV Reverse Transcriptase de Promega qui va synthétiser le brin d'ADN complémentaire. A partir de 2 μ g d'ARN dans un volume de 10 μ l, est ajouté 0,5 μ g de random primers et le tout est incubé à 70 °C pendant 5 min afin de délier les structures secondaires de l'ARN et d'apparier les amorces. Le tube est immédiatement déposé dans la glace pour ne pas réapparier les structures secondaires, puis 5 μ l de tampon, 1,25 μ l de dNTP (10 mM chacun) et 200 unités de la M-MLV Reverse Transcriptase sont ajoutés. Le mélange est incubé 1h à 37 °C. Une PCR classique est ensuite effectuée (Section II.2.2 page 66).

II.2.6. Migration sur gel

Afin de vérifier leur intégrité les acides nucléiques sont déposés sur gel d'agarose 0,8 % préparé à l'aide de TAE (40 mM de Tris pH 8 ; 40 mM d'Acétate ; 1 mM EDTA pH 8) en présence de bromure d'éthidium (cf 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Celui-ci est mis à migrer 1 h à 80 V dans le tampon TAE. Le gel est alors révélé aux ultraviolets.

II.2.7. Amorces utilisées

Le design des amorces a été effectué à l'aide du logiciel primer3 (ROZEN et SKALETSKY, 1999) en utilisant les paramètres par défaut excepté la température d'hybridation comprise entre 55 et 60 °C (Tables II.2 à II.3 pages 69–70). Les amorces amplifiant le gène de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S sont issus de la littérature (Table II.1) (DELONG, 1992; TESKE et SØRENSEN, 2007).

Nom	Séquence	Tm	%GC	Taille (pb)
Arc 915R	GTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT	66	65	895
Arc 21F	TTG-CGG-TTG-ATC-CTG-CCG GA	64	60	
Arc 344F	ACG-GGG-YGC-AGC-AGG-CGC-GA	72	75	271
Arc 615R	GTG-CTC-CCC-CGC-CAA-TTC-CT	66	65	

TABLEAU II.1.: Amorces désignés pour amplifier les gènes codant pour l'ARNr 16s chez les archaea (DELONG, 1992; TESKE et SØRENSEN, 2007).

Nom	Séquence	Tm	%GC	Taille (pb)
PYCH_08370_A_L	TAT-TCT-CAA-GCG-TGC-TCT-TGT-CC	50,2	47,8	219
PYCH_08370_A_R	CAT-GCC-CTT-CAC-CTC-TAC-CTT-CT	52	52,2	
PYCH_08380_D_L	AGG-CAG-ACC-GGG-TAG-TCT-ATG-TC	53,7	56,5	291
PYCH_08380_D_R	TCG-TGA-AGA-AGA-TAC-GCG-AGA-AC	50,2	47,8	
PYCH_08390_G_L	CGA-TTG-AAG-GAG-CTG-GGT-AAA-CT	50,2	47,8	194
PYCH_08390_G_R	GAC-GTT-CTC-GAT-TAC-CTC-CCT-GT	52	52,2	
PYCH_08400_B_L	GAG-GCC-GAG-AAC-GTC-AAG-ATA-AT	50,2	47,8	206
PYCH_08400_B_R	GTT-TTC-AGG-CCT-GTA-GCC-GTA-GT	52	52,2	

TABLEAU II.2.: Amorces désignés pour amplifier les gènes PYCH_08370 à PYCH_08400 codant pour un cluster de sulphydrogénase chez *P. yayanosii*

Nom	Séquence	Tm	%GC	Taille (pb)
PF0891_B_L	GAG-GGA-AAA-GCT-CTT-TGA-GTT-CG	50,2	47,8	182
PF0891_B_R	ATC-CCC-TTC-TCT-CTC-CTC-ACC-TT	52	52,2	
PF0892_G_L	ACT-GCA-CCT-CTT-AGG-AGC-GTC-TT	52	52,2	217
PF0892_G_R	AAC-TGC-TGT-GGC-CTA-CCC-TTT-AG	52	52,2	
PF0893_D_L	TTG-TGC-TGT-TCA-AGG-AGG-AGT-TC	50,2	47,8	103
PF0893_D_R	CCT-TCT-TCG-GTT-GGA-ACT-TGA-CT	50,2	47,8	
PF0894_A_L	AGC-TTA-GGG-AAG-CCC-TAC-CAC-TT	52	52,2	213
PF0894_A_R	CTG-TGT-TCA-ACG-ACG-AAC-TCC-TT	50,2	47,8	

TABLEAU II.3.: Primers désignés pour amplifier les gènes PF0891 à PF0894 codant pour un cluster de sulfhydrogénase chez *P. furiosus*

II.2.8. Puces à ADN

Le principe des puces à ADN ou microarrays repose sur la propriété de l'ADN dénaturé à reformer sa double hélice avec un brin d'ADN complémentaire. La puce à ADN permet d'étudier le niveau de l'expression de gènes transcrits dans des conditions données (la pression hydrostatique dans notre cas) et ainsi de comparer entre elles ces conditions.

Nous avons choisi de travailler avec la société Imaxio qui est un prestataire de services en lien direct avec la société Agilent, le fabricant de la puce. La technique choisie est celle de l'hybridation simple ou l'ARN est rétrotranscrit en ADNc et marqué par un fluorophore unique (Cy3). L'ADNc est alors hybridé sur la puce et émet une fluorescence lorsqu'il est apparié à un brin complémentaire. L'intensité de fluorescence est proportionnelle au nombre d'ADN hybridant le brin. En clair, plus cette fluorescence est importante, plus le gène transcrit est exprimé.

La puce, fabriquée par la société Agilent est une plaque d'environ 2,5 cm sur 7,6 cm pouvant contenir 8 x 62 000 sondes. Chaque sonde est un brin d'ADN de 60 bases ou mers qui est synthétisé par une méthode type jet d'encre. Les sondes ont été désignées à l'aide de la plateforme eArray d'Agilent (<http://earray.chem.agilent.com/earray>). Chaque gène ou région intergénique dont la taille est supérieure à 60 pb est couvert et le nombre de sondes par région est fonction de sa taille (environ 1 sonde par 100 pb). Les sondes hybridant plusieurs cibles à l'intérieur d'un même génome ont été éliminées

ce qui implique que les régions dupliquées ne pourront pas être distinguées les uns des autres. Cela concerne environ 20 kb par génome. Le nombre de sondes disponibles étant important, les deux génomes *P. furiosus* et *P. yamanosii* sont présents ensembles sur la puce. les ARN non codant (ARNnc) ont été déterminé à l'aide du serveur LeARN (NOIROT *et al.*, 2008).

Les analyses statistiques ont été réalisées par la plateforme « Génomique Santé » de Rennes (Biogenouest) et par moi-même. Celles-ci ont été effectuées à l'aide du logiciel TMEV (SAEED *et al.*, 2003) et le test statistique significance analysis of microarrays (SAM) en prenant comme limite un false discovery rate (FDR) de 5 % et un fold change (FC) supérieur ou égal à 2.

II.3. Protéines

II.3.1. Extraction de protéines par la méthode de Lee

Cette méthode d'extraction de protéines a été adaptée à partir de l'étude de LEE *et al.* publiée en 2009 sur *P. furiosus*.

On utilise une culture en phase exponentielle d'environ 10^8 cellules/ml de *Thermococcales*. Le soufre présent est éliminé par sédimentation ou centrifugation (300 x g, 2 min) et le surnageant est récupéré. La culture est ensuite centrifugée 8 000 x g, 15 min à 4 °C. Puis le culot est resuspendu dans 1 ml de TE (10 mM Tris.HCl pH 8 et 1 mM EDTA pH 8) et centrifuger à nouveau pendant 15 min à 7 500 x g et 4 °C. Le culot est ensuite resuspendu avec 500 μ l de tampon d'extraction (Tris.HCl pH 8, 25 mM; SDS 1 %; dithiothréitol (DTT) 5 mM) puis vortexé pendant 2 min. Les cellules sont ensuite lysées par sonication à 60 % d'amplitude pendant 20 x 2 s sur glace. Ceci afin de compléter la lyse cellulaire et libérer les protéines. Puis l'échantillon est centrifugé 30 min à 25 000 x g et 4 °C, et le surnageant mis à incuber 1 h à 37 °C.

II.3.2. Dosage des protéines

Quantification de Bradford

La quantification de Bradford est une méthode de dosage colorimétrique simple se basant sur la liaison des protéines avec le bleu de Coomassie (BRADFORD, 1976). Une gamme étalon est réalisée avec des quantités connues de protéines, et l'échantillon avec ou sans dilution est analysé et comparé avec la gamme étalon afin d'estimer la quantité de protéines présentes.

2D Quant Kit

La quantification de protéines à l'aide du « 2-D Quant Kit » (GE Healthcare) permet de s'affranchir des effets du DTT et du SDS. Ce kit est basé sur la liaison spécifique des ions fer aux protéines. Les protéines sont précipitées dans une solution de fer et le fer non lié est mesuré par un colorant spécifique. La liaison des ions fer étant proportionnelle aux protéines, une mesure de l'absorbance à 480 nm permet la quantification des protéines, à l'aide d'une gamme étalon.

II.3.3. Migration SDS-PAGE

La migration sur gel de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le gel est formé par une matrice d'acrylamide et bis-acrylamide ce qui entraîne la formation de pores, plus ou moins grand suivant la concentration d'acrylamide utilisée. Le gel est dit dénaturant grâce à l'action du SDS qui va déplier les protéines et les rendre linéaires et leur fournir une charge négative qui va permettre la migration à l'aide d'un courant électrique. Le gel est composé de 2 parties, tout d'abord un gel de « concentration » dont la concentration en acrylamide est de 5 %. Cela va permettre de concentrer les protéines qui seront ensuite séparées sur un gel de « séparation » contenant 12 %

d'acrylamide. Dans l'idéal, entre 50 et 100 μg sont déposés sur le gel, auquel on ajoute un volume de tampon de Laemmli (Tris.HCl 240 mM pH6,8, SDS 6 %, β -mercapto-éthanol 12 %). Le gel est ensuite mis à migrer à 10 mA dans le gel de concentration puis 20 mA dans le gel de séparation. La coloration est effectuée avec une solution de coloration (2 pastille PhastGel® Blue R (Sigma), 25 % méthanol, 8 % acide acétique) pendant 3-4 h. Le gel est décoloré (40 % éthanol, 10 % acide acétique) puis réhydraté par une solution de stabilisation (200 g/l sulfate d'ammonium).

II.3.4. Analyses en LC-MS/MS « de novo »

Les protéomes de nos deux espèces, *P. furiosus* et *P. yayanosii* ont été analysés en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) par la Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO) à Jouy-en-Josas. La LC-MS/MS est une technique permettant de quantifier qualitativement les protéines en utilisant une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse. Les échantillons (10 μg) en quadruplicat sont déposés sur un gel SDS-PAGE et mis à migrer sur une distance d'environ 5-7 mm. Les gels sont révélés puis découpés grossièrement et envoyés à la PAPPSO à Jouy-en-Josas, où ils sont traités. Les différents traitements présentés ci-après sont décrits plus précisément dans les informations supplémentaires de l'article de ARFI *et al.* (2013). Chaque échantillon est découpé en une bande de gel d'environ 2 mm de largeur et 5-7 mm de longueur. Les bandes sont lavées et ensuite digérées à la trypsine. Les peptides issus de la digestion tryptique sont extraits, concentrés et déssalés sur une précolonne (300 μm i.d., 5 mm Dionex). Les peptides sont ensuite élués sur une colonne de séparation (75 μm i.d., 150 mm, Nanoseparations).

Les peptides sont analysés par la suite à l'aide d'un spectromètre de masse Q-exactive utilisant une source d'ions de type nanoelectrospray. Les identifications protéiques ont

été réalisées en matchant les données MS/MS contre la base de données uniprot en utilisant les données protéiques des deux espèces (*P. yayanosii* et *P. furiosus*) datant du 17/12/2013. Les protéines identifiées par au moins deux peptides uniques et une e-value inférieur à 10^{-4} sont validées.

Les analyses statistiques que j'ai effectuée pour identifier les protéines régulées ont été réalisées à l'aide du logiciel PepC (HEINECKE *et al.*, 2010) en prenant en compte le nombre de spectres obtenus pour chaque protéine. Les différences d'expressions sont considérées comme statistiquement fiable lorsque la p-value obtenue est inférieure à 5 % et le FC supérieur ou égal à 2.

II.4. Analyse et comparaison génomique

Les analyses des génomes d'intérêts (*P. furiosus*, *P. horikoshii*, *P. abyssi* et *P. yayanosii*) se font principalement à l'aide d'outils web, dont les principaux sont décrits dans le tableau II.4.

Nom	Description	Référence
NCBI Genbank	Base de séquences d'ADN et protéines	BENSON <i>et al.</i> (2012)
IMG	Analyse et comparaison de génomes	MARKOWITZ <i>et al.</i> (2012)
KEGG	Liaison entre génomes et fonctions	KANEHISA <i>et al.</i> (2012)
CoGe	Comparaisons de génomes	LYONS et FREELING (2008)
EDGAR	Comparaisons de génomes procaryotiques	BLOM <i>et al.</i> (2009)

TABEAU II.4.: Description des principaux outils informatiques utilisés pour l'analyse et la comparaison de génomes

II.4.1. Analyse des gènes régulés par la pression hydrostatique

Les analyses s'effectuant sur les ARN et protéines régulés en fonction de la pression se sont effectuées de deux façon. Tout d'abord, des tests statistiques sont effectués sur les gènes régulés dans différentes conditions de pressions hydrostatiques, principalement

en comparant la régulation sous la pression considérée de stress (45 MPa pour *P. furiosus* et 20-80 MPa pour *P. yayanosii*) par rapport à la pression optimale (0,1 et 52 MPa pour *P. furiosus* et *P. yayanosii* respectivement). Des enrichissements sont ensuite effectués en déterminant qu'elles étaient les catégories KEGG sur-représentées en utilisant le server KOBAS (XIE *et al.*, 2011) et un test binomial. De même, les termes GO sur-représentés ont été identifiés en utilisant le programme GO Local Exploration Map (GOLEM) (version 2.1) (SEALFON *et al.*, 2006) avec une FDR de 5 %. Le plugin Enrichment Map (MERICO *et al.*, 2010) du programme Cytoscape (SHANNON *et al.*, 2003) a été utilisé pour résumer les données. La syntonie des clusters régulés a été représentée en utilisant le site internet SyntTax (<http://archaea.u-psud.fr/synttax/>) (OBERTO, 2013) ou le programme Easyfig (SULLIVAN *et al.*, 2011).

III.1. Analyses phylogéniques

L'ordre des *Thermococcales* est un groupe d'archée regroupant trois genres que sont les *Pyrococcus*, les *Thermococcus* et les *Paleococcus* (Section I.7 page 36). A l'heure actuelle, le génome de seulement 16 espèces a été complètement séquencé et refermé. Il est composé de 9 *Thermococcus*, et 7 *Pyrococcus* que sont *Thermococcus* sp. CL1, *Thermococcus* sp. 4557, *Thermococcus* sp. AM4, *Thermococcus barophilus* MP, *Thermococcus gammatolerans* EJ3, *Thermococcus kodakarensis* KOD1, *Thermococcus litoralis* DSM 5473, *Thermococcus onnurineus* NA1, *Thermococcus sibiricus* MM739, *Pyrococcus abyssi* GE5, *Pyrococcus horikoshii* OT3, *Pyrococcus furiosus* COM1, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638, *Pyrococcus* sp. NA2, *Pyrococcus* sp. ST04, et *Pyrococcus yayanosii* CH1 (Tableau III.1 page 79).

La phylogénie des procaryotes est souvent effectuée à l'aide du gène de l'ARNr 16S ce qui a été effectuée ici (Figure III.1 page suivante). La différenciation phylogénique entre *Pyrococcus* et *Thermococcus* est très importante confirmant le classement des deux genres.

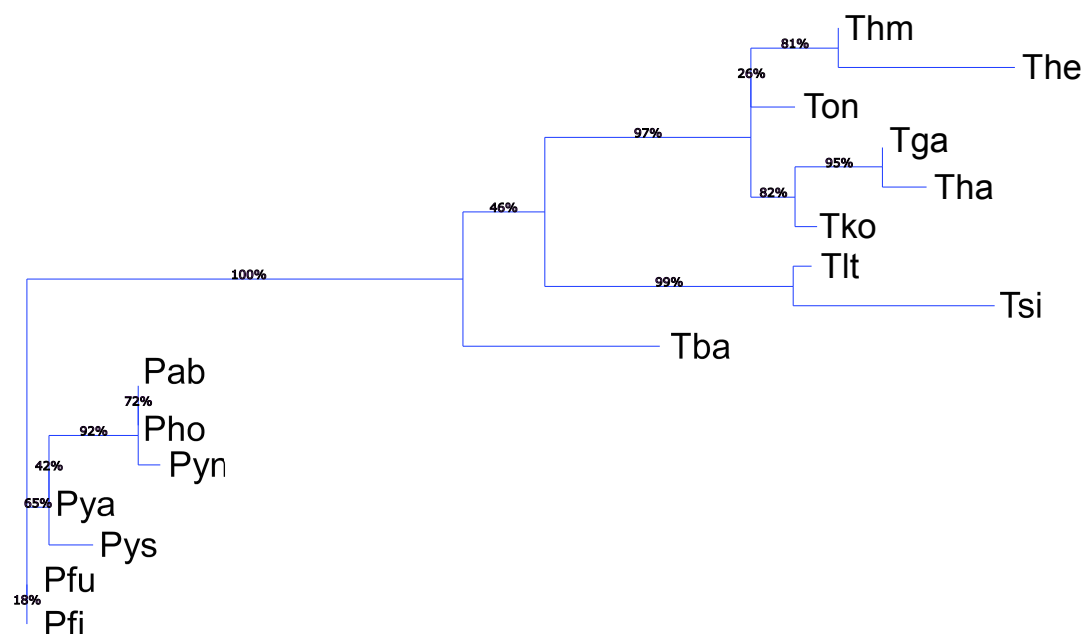


FIGURE III.1.: Arbre phylogénétique des *Thermococcales* séquencées effectué en alignant les gènes de l'ARNr 16S. Les alignements ont été effectués à l'aide du logiciel Clustal Omega (SIEVERS *et al.*, 2011), puis nettoyé à l'aide du programme Gblocks (TALAVERA et CASTRESANA, 2007). La phylogénie a été réalisée par le logiciel PhyML (bootstrap 100) (GUINDON *et al.*, 2010) et l'arbre visualisée par le serveur Newick Viewer (BOC *et al.*, 2012). Thm : *Thermococcus* sp. CL1, The : *Thermococcus* sp. 4557, Tha : *Thermococcus* sp. AM4, Tba : *T. barophilus* MP, Tga : *T. gammatolerans*, Tko : *T. kodakarensis*, Tlt : *T. litoralis*, Ton : *T. onnurineus*, Tsi : *T. sibiricus*, Pyn : *Pyrococcus* sp. NA2, Pys : *Pyrococcus* sp. STO4, Pab : *P. abyssi*, Pfi : *P. furiosus* COM1, Pfu : *P. furiosus* DSM 3638, Pho : *P. horikoshii*, Pya : *P. yayanosii*

TABLEAU III.1.: Résumé de la physiologie des *Thermococcales* séquencées

Isolat	T _{opt} (°C)	Isolation	Profondeur d'isolement (m)	Référence
<i>P. furiosus</i> DSM 3638 (Pfu)	100	Ile Vulcano	0	FIALA et STETTER (1986)
<i>P. furiosus</i> COM1 (Pfc)	100	Ile Vulcano	0	BRIDGER <i>et al.</i> (2012)
<i>T. kodakarensis</i> KOD1 (Tko)	85	Ile Kodakara	0	ATOMI <i>et al.</i> (2004)
<i>T. litoralis</i> DSM 4573 (Tlt)	88	Ile Vulcano	0	NEUNER <i>et al.</i> (1990)
<i>P. horikoshii</i> OT3 (Pho)	98	Dépression d'okinawa	1 395	GONZÁLEZ <i>et al.</i> (1998)
<i>Pyrococcus</i> sp. NA2 (Pyn)	93	Papouasie	1 650	LEE <i>et al.</i> (2011)
<i>T. onnurineus</i> NA1 (Ton)	80	Papouasie	1 650	BAE <i>et al.</i> (2006)
<i>T. sibiricus</i> MM739 (Tsi)	78	Réservoir Samotlor	≈ 1 800	MARDANOV <i>et al.</i> (2009)
<i>P. abyssi</i> GE5 (Pab)	96	Bassin nord Fidgien	2 000	ERAUSO <i>et al.</i> (1993)
<i>Thermococcus</i> sp. 4557 (The)	?	Bassin de Guaymas	2 000	WANG <i>et al.</i> (2011)
<i>Thermococcus</i> sp. CL1 (Thm)	88	Ride Juan de Fuca	2 100 ?	HOLDEN <i>et al.</i> (2001)
<i>Pyrococcus</i> sp. STO4 (Pys)	95	Ride Juan de Fuca	2 290	JUNG <i>et al.</i> (2012)
<i>Thermococcus</i> sp. AM4 (Tha)	80	Ride Est-Pacifique	2 600	OGER <i>et al.</i> (2011)
<i>T. gammatolerans</i> EJ3 (Tga)	88	Bassin de Guaymas	2 616	JOLIVET <i>et al.</i> (2003)
<i>T. barophilus</i> MP (Tba)	85	Ride médio-atlantique	3 555	MARTEINSSON <i>et al.</i> (1999)
<i>P. yayanosii</i> CH1 (Pya)	98	Ride médio-atlantique	4 100	ZENG <i>et al.</i> (2009)

De la même manière, une autre technique permettant de différencier les espèces est la signature génomique. Ce paramètre reflète l'abondance relative de dinucléotides dans les génomes. Cette abondance est similaire entre des espèces proches et dissimilaire lorsque les espèces sont éloignées. La différence dans la signature génomique entre deux séquences est exprimé par le facteur δ^* qui correspond à la moyenne des différences relatives entre deux séquences (VAN PASSEL *et al.*, 2006). Bien que ce paramètre ne permette pas d'établir une phylogénie statistiquement fiable, notamment due au fait qu'il n'est pas possible d'effectuer des bootstraps, il permet de tenter d'observer des éléments extérieurs tels les transferts horizontaux de gènes par exemple. Ce paramètre a été calculé pour les *Thermococcales* (Figure III.2 page suivante). Les résultats obtenus montrent que les *Thermococcales*, au niveau de la signature génomique se classent en deux groupes dont la différence principale se situe au niveau du GC% des différentes espèces soit autour de 50% soit de 40%. La majorité des *Pyrococcus* possèdent un GC% de 40% excepté *P. yayanosii* dont le GC% est de 52%. Au contraire, la majorité des *Thermococcus* possèdent un GC% de 50%, excepté *T. barophilus*, *T. sibiricus* et *T. litoralis* qui sont aux alentours de

III. Comparaison de génomes

40 %. Les différences importantes de GC% entre les espèces ne sont pas encore comprises et ne semblent pas s'expliquer par une raison physiologique tel la température ou la profondeur d'origine, en relation directe avec la résistance à la pression hydrostatique. La température moyenne des *Pyrococcus* se situant à environ 100 °C alors que celle des *Thermococcus* est à 85 °C. En ce qui concerne l'effet de la pression *T. barophilus* a été isolée à 3 500 m alors que *T. litoralis* et *T. sibiricus* ont été respectivement isolés à 10 et $\approx$ 2 000 m de profondeur (MARTEINSSON *et al.*, 1999; MIROSHNICHENKO *et al.*, 2001; NEUNER *et al.*, 1990).

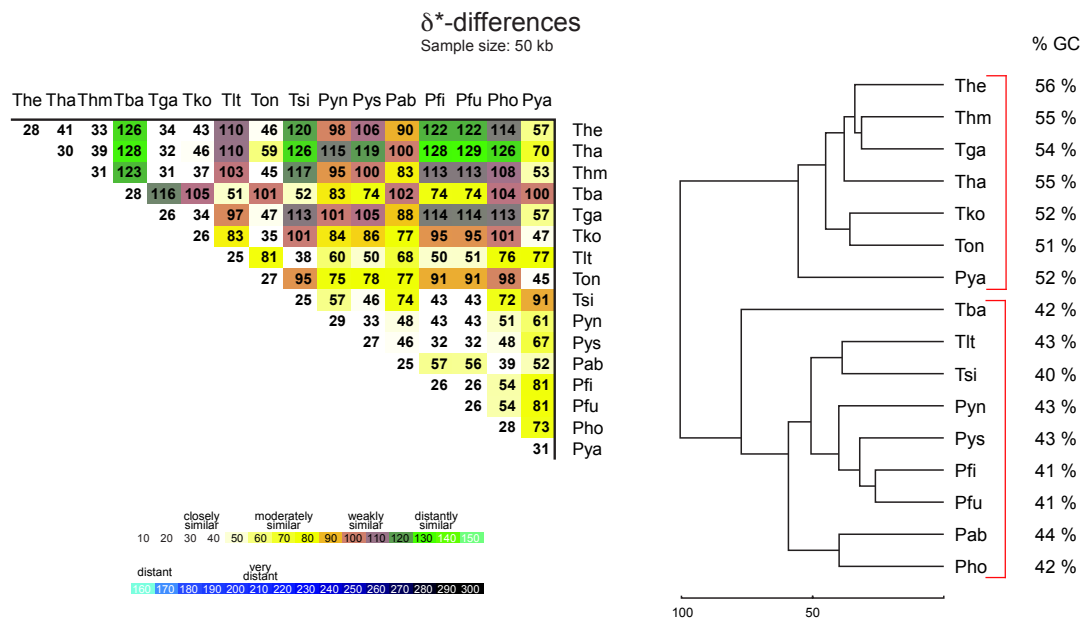


FIGURE III.2.: Calcul de la signature génomique entre *Thermococcales* à l'aide de l'outil : Genome signature comparisons (δ^* -differences)(<http://www.cmb1.uga.edu/software/delta-differences.html>)(KARLIN *et al.*, 1998). Thm : *Thermococcus* sp. CL1, The : *Thermococcus* sp. 4557, Tha : *Thermococcus* sp. AM4, Tba : *T. barophilus*, Tga : *T. gammatolerans*, Tko : *T. kodakarensis*, Tlt : *T. litoralis*, Ton : *t. onnurineus*, Tsi : *T. sibiricus*, Pyn : *Pyrococcus* sp. NA2, Pys : *Pyrococcus* sp. STO4, Pab : *P. abyssi*, Pfi : *P. furiosus* COM1, Pfu : *P. furiosus* DSM 3638, Pho : *P. horikoshii*, Pya : *P. yayanosii*

Le cadre de cette étude ayant concerné principalement l'étude de l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques (HPH) de *P. yayanosii*, je me suis concentré pour la com-

paraison génomique sur trois *Pyrococcus* en plus de *P. yayanosii* qui sont *P. abyssi* GE5, *P. horikoshii* OT3 et, *P. furiosus* DSM 3638. Les trois autres *Pyrococcus* n'ont pas été choisies, notamment, car *Pyrococcus* sp. NA2 et sp. ST04 n'ont jamais été décrites précisément et que *Pyrococcus furiosus* COM1 est une souche de laboratoire ayant évolué à partir de *P. furiosus* DSM 3638 (BRIDGER *et al.*, 2012). Elle possède donc les mêmes caractéristiques physiologiques que cette dernière.

III.2. Physiologie

D'un point de vue physiologique, les *Pyrococcus* sont comme toute les *Thermococcales*, des micro-organismes hétérotrophes, hyperthermophiles et soufre réducteurs. Elles possèdent donc un grand nombre de caractéristiques communes, et ont toutes été isolées au niveau de sources hydrothermales profondes excepté *P. furiosus* qui a été isolée dans un volcan de boue à la surface (FIALA et STETTER, 1986) (Tableau III.2 page suivante). Ce sont des coques mobiles, d'environ 1 à 2 μm de diamètre se développant de façon optimale en présence de soufre, à des températures d'environ 100 °C, un pH neutre et une concentration en sel égal à celle de l'océan (25-35 g/l). La capacité à croître sous pression est d'ailleurs l'une des différences majeures qui différencient physiologiquement les *Pyrococcus*, notamment *P. yayanosii* qui n'est pas capable de se développer à pression atmosphérique. La capacité à se développer sous HPH est d'ailleurs en relation directe avec la profondeur d'origine, où plus l'organisme a été isolé profondément et plus il est capable de se développer sous pression (Tableau III.2 page suivante).

III.3. Génomique

D'un point de vue génomique, on observe plus de différences entre ces 4 *Pyrococcus*. En effet, bien que le nombre de gènes soit à peu près équivalent (≈ 2000), *P. furiosus* possède

III. Comparaison de génomes

	<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1
Origine géographique	Bassin Nord Fidjien	Ile Vulcano Italie	Dépression d'Okinawa	Ride médio-atlantique
Profondeur (m)	2 000	0	1 395	4 100
Mobilité/ Morphologie	Cocci très mobiles	Cocci irrégulières	Cocci irrégulières	Cocci très mobiles
Métabolisme	Anaérobiques strictes	Anaérobiques strictes	Anaérobique	Anaérobiques strictes
Taille (μm)	0,8–2	0,8–2,5	0,8–2	0,6–1,4
Gamme de température ($^{\circ}\text{C}$)	67–102	70–103	80–102	80–108
Optimum de température ($^{\circ}\text{C}$)	96	100	98	98
Gamme de pH	4–8,5	5–9	5–8	6–9,5
Optimum de pH	6,8	7	7	7,5–8
Gamme de NaCl (%)	0,7–5	0,5–5	1–5	2,5–5,5
Optimum de NaCl (%)	3	2	2,4	3,5
Gamme de pression (MPa)	0,1–50	0,1–45	0,1–40	20–120
Optimum de pression (MPa)	20	0,1	0,1	52
Temps de doublement (min)	33	37	32	50
Références	ERAUSO <i>et al.</i> (1993)	FIALA et STETTER (1986)	GONZÁLEZ <i>et al.</i> (1998)	ZENG <i>et al.</i> (2009)

TABLEAU III.2.: Caractéristiques physiologiques de 4 *Pyrococcus* (Tiré de BIRRIEN *et al.* (2011)). Une des différences majeures entre les différentes *Pyrococcus* décrites ici consiste en la capacité à croître sous pression qui est en relation directe avec la profondeur à laquelle ont été isolées les différentes espèces.

un génome 200 kb plus grand que les autres espèces. De même, le GC% de *P. yayanosii* est de 52 % alors qu'il est autour de 42 % pour les autres *Pyrococcus* (Tableau III.3). La taille moyenne des CDS est d'environ 845 pb, le pourcentage de zones codantes est très élevé à environ 90 % du génome. Toutes les *Pyrococcus*, possèdent à peu près le même nombre d'ARN ribosomique (ARNr) (4-5) et d'ARN de transfert (ARNt) (46).

	<i>Pyrococcus abyssii</i> GE5	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1
Taille du génome	1 768 562	1 908 256	1 738 505	1 716 818
Nombre de CDS	2 051	2 179	2 061	1 915
GC %	45	41	42	52
CDS %	92,86	90,41	91,94	89,91
Taille moyenne des CDS	863	842	843	828
rRNA	5	4	4	4
tRNA	46	46	47	46
COG %	72,94	72,28	72,84	74,57
Références	COHEN <i>et al.</i> 2003	ROBB <i>et al.</i> 2001	KAWARABAYASI <i>et al.</i> 1998	JUN <i>et al.</i> 2011

TABLEAU III.3.: Caractéristiques génomiques principales des *Pyrococcus* séquencées

Une analyse Dot Plot a été effectuée entre les 4 génomes de *Pyrococcus* (Figure III.3 page suivante). Cette analyse montre que les génomes de ces espèces sont plus ou moins réarrangés suivant la distance qui les sépare d'un point de vue phylogénétique. *P. abyssii* et *P. horikoshii* sont les espèces les plus proches du point de vue de la syntenie malgré deux inversions et deux duplications en tandem. Les couples *P. abyssii*/*P. furiosus* et *P. horikoshii*/*P. furiosus* sont très réarrangés avec un nombre important de duplications et d'inversions, malgré cela il est encore possible de discerner des similarités entre ces génomes. Au contraire, les couples *P. yayanosii*/*P. furiosus*, *P. yayanosii*/*P. abyssii* et, *P. yayanosii*/*P. horikoshii*, présentent énormément de réarrangements et il est très difficile d'observer des événements tels des inversions ou des duplications au niveau des génomes. Ces syntenies comprenant à chaque fois *P. yayanosii*, il semble que la structure génomique de ce dernier soit très différents des trois autres *Pyrococcus* étudiées ici.

III. Comparaison de génomes

Ces réarrangements posent la question de la présence de séquences d'insertion éventuellement responsable de cet état de fait.

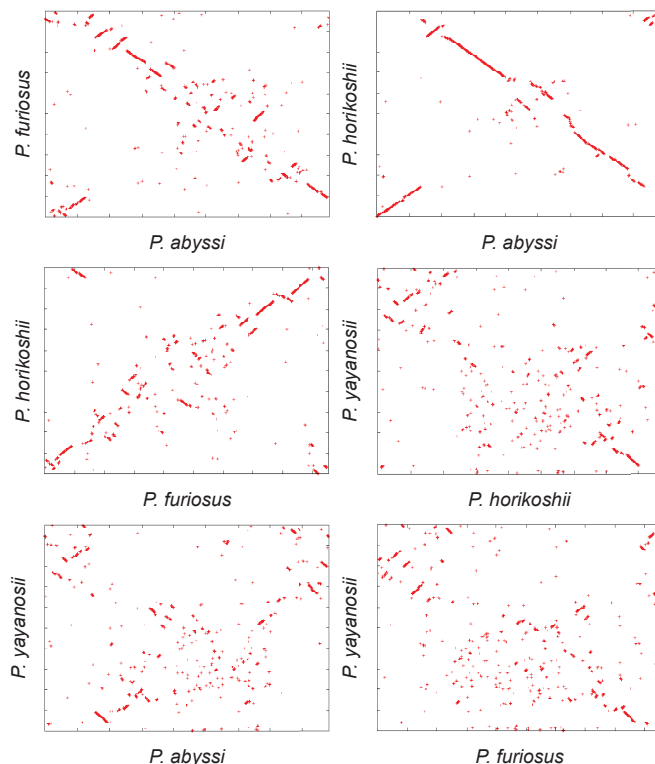


FIGURE III.3.: Analyse DotPlot entre les 4 *Pyrococcus* étudiées

La présence d'ilots génomiques a été déterminé par analyse *in silico* à l'aide du programme IslandViewer (LANGILLE et BRINKMAN, 2009) et est représentée sur le tableau III.4 page 86. Leur nombre par espèces est variable, *P. abyssi* en posséderait 3, *P. horikoshii* 4, *P. furiosus* 8 et *P. yayanosii* 11. Leur taille moyenne est d'environ 9,6 kb avec un maximum de 28 kb et un minimum de 4 kb. Des alignements effectués entre eux ne montrent que très peu de similarité suggérant que les transferts horizontaux ne se sont pas fait au sein de ces 4 espèces. Afin de tenter de déterminer de quelles espèces provenaient ces différents ilots génomiques, des blasts ont été effectués. L'analyse des résultats nous montrent que les ilots présents chez *P. abyssi* et *P. horikoshii* ne sont pas retrouvés chez d'autres micro-organismes connus. Certains ilots présents chez *P. yayanosii* et *P. furiosus* présentent des similarités avec d'autres *Thermococcales*. L'ilot appelé furio_1

est retrouvé chez *T. litoralis* avec un pourcentage d'identité après alignement de 84 %. Ce résultat n'est pas surprenant car il a été déjà observé chez ces deux micro-organismes (DIRUGGIERO *et al.*, 2000). Deux autres îlots génomiques (furio_3 et furio_7) sont aussi respectivement retrouvés chez *P. sp* NA2 et *P. ST04*. La plupart des enzymes présentes dans ces îlots sont des protéines hypothétiques, ou impliqués dans la traduction comme le gène PF1990 codant pour la protéine NusG (transcription antitermination protein) ainsi que les gènes qui codent pour des sous-unités du ribosome 50S (PF1991-94). Chez *P. yayanosii*, les cluster yaya_1, yaya_5, sont retrouvés chez *P. sp*. NA2 et codent pour des transporteurs ABC d'ions métalliques comme le Fe^{3+} et des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la cystéine (PYCH_08680-90). Le cluster yaya_9 est retrouvé pour partie sur le plasmide et le génome de *T. barophilus* (Figure III.4). L'alignement avec le plasmide de *T. barophilus* se fait avec les gènes TERMP_02234-39 codant pour des protéines hypothétiques excepté TERMP_02236 qui code pour une hydrolase, les gènes du chromosome de *T. barophilus* alignés avec ce même cluster (TERMP_01843, 01869-70) codent aussi pour des protéines hypothétiques. De manière intéressante, ces gènes sont dérégulés à 70 MPa par rapport à 40 MPa posant la question de leur rôle éventuel dans la résistance aux HPH (VANNIER, 2012).

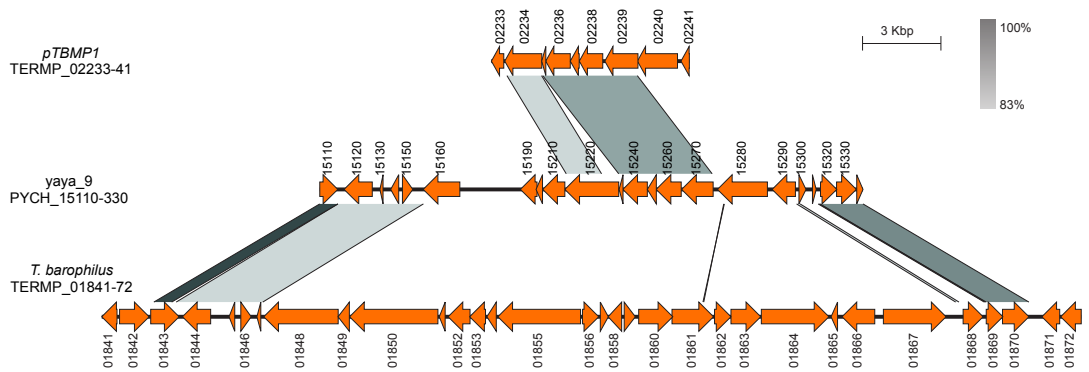


FIGURE III.4.: Alignement d'un îlot génomique de *P. yayanosii* avec le plasmide et le génome de *T. barophilus*

III. Comparaison de génomes

Espèce	"Nom"	Coordonnées		Taille	Locus	différence de %GC	"Fonction"
<i>P. abyssi</i>	aby_1	387 984	402 344	14 360	PAB2084-73	0,6	Hypothetical
	aby_2	791 043	796 435	5 392	PAB0561-1801	-1,7	Purine & thiamine metabolism
	aby_3	1 610 398	1 629 175	18 777	PAB1079-1256	-8,3	Hypothetical
<i>P. furiosus</i>	furio_1	702 106	714 814	12 708	PF0693-714	8,1	Hypothetical
	furio_2	724 074	728 257	4 183	PF0728-32	13,3	Transport cuivre
	furio_3	753 017	757 328	4 311	PF0756-764	2,7	Hypothetical
	furio_4	766 356	789 585	23 229	PF0777-807	-0,6	Hypothetical
	furio_5	793 480	797 838	4 358	PF0811-17	-0,3	Hypothetical
	furio_6	909 057	915 828	6 771	PF0943-53	-0,8	Hypothetical
	furio_7	1 833 103	1 843 556	10 453	PF1983-94	2,1	Hypothetical & traduction
<i>P. horikoshii</i>	hori_1	365 272	375 700	10 428	PH0409-11	-2,2	Hypothetical
	hori_2	380 328	393 802	13 474	PH0419-30	-7,9	Hypothetical & polysaccharides
	hori_3	1 061 480	1 071 074	9 594	PF1172-85	-3,2	Hypothetical
	hori_4	1 615 352	1 620 253	4 901	PH1859-64	-5,7	Hypothetical
<i>P. yayanosii</i>	yaya_1	48 349	53 075	4 726	PYCH_00480-520	-7,2	ABC transport
	yaya_2	377 786	383 862	6 076	PYCH_04590-660	-5,1	Transposase
	yaya_3	672 922	680 881	7 959	PYCH_07770-860	-10,5	Hypothetical
	yaya_4	693 429	705 048	11 619	PYCH_07950-8040	-8	CRISPR Cas
	yaya_5	764 428	769 326	4 898	PYCH_08660-720	-6,3	Biosynthèse des cystéines
	yaya_6	1 065 373	1 069 762	4 389	PYCH_12090-120	-6,3	ABC transport
	yaya_7	1 114 916	1 119 422	4 506	PYCH_12640-670	-9,1	Hypothetical
	yaya_8	1 238 311	1 254 202	15 891	PYCH_14110-330	-8,3	Hypothetical
	yaya_9	1 321 772	1 342 615	20 843	PYCH_15110-340	-11	Hypothetical
	yaya_10	1 569 831	1 597 882	28 051	PYCH_17580-890	-14,5	glycosyl transferase
	yaya_11	1 655 845	1 662 820	6 975	PYCH_18570-650	1,5	ATPase Endopeptidase

TABLEAU III.4.: Ilots génomiques prédits chez *P. abyssi*, *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii* à l'aide du programme IslandViewer (LANGILLE et BRINKMAN, 2009). La différence de GC% est calculé en utilisant le GC% du génome comme référence (Tableau III.3 page 83). La fonction correspond aux principales fonctions prédites des protéines présentes dans ces ilots.

La présence d'ilots génomiques ne permettant pas d'expliquer les nombreux réarrangements observés chez les *Pyrococcus*, des comparaisons génomiques entre ces 4 génomes ont été effectuées à l'aide du serveur EDGAR (<https://edgar.computational.bio.uni-giessen.de/>) à partir duquel les données suivantes ont été extraites notamment, celles contenues dans la figure III.5 page 89 (BLOM *et al.*, 2009). En effectuant des blasts gène à gène entre les différents génomes, il est possible de déterminer quels sont les gènes conservés au sein d'un ou plusieurs génomes. Comme décrit dans l'article de BLOM *et al.* (2009), le serveur EDGAR utilise la technique de blast score ratio value (SRV) avec dans le cas des *Pyrococcus* une limite de cutoff à 34 (LERAT *et al.*, 2003). Le nombre de gènes présent dans le core-génome de ces espèces est de 1 173 gènes, c'est à dire le nombre de gènes communs entre les quatre micro-organismes. Le pan-genome, quand à lui comprend 3 226 gènes. Un diagramme de Venn effectué en comparant ces espèces à l'aide des protéines orthologues montre que bien que les espèces soient proches d'un point de vue phylogénique, environ 60 % des gènes sont conservés entre toutes les *Pyrococcus*. De même entre 10 et 30 % de gènes par espèce ne sont retrouvées chez aucune autre de ces espèces (Figure III.5 page 89).

Les différents gradients de couleurs correspondant à des protéines classifiées dans arCOGs, dont la description est donnée dans le tableau III.5 page suivante (WOLF *et al.*, 2012). Les protéines du core-génome sont ainsi préférentiellement impliquées dans le stockage et le traitement de l'information notamment la traduction (J) ainsi que dans la production et conservation d'énergie (C). *P. yayanosii* étant le seul micro-organisme piézophile strict au sein des *Thermococcales*, il a été étudié plus particulièrement. Les protéines non caractérisées ainsi que celles impliquées dans les mécanismes de défense (V) sont celles majoritairement retrouvées au sein des protéines uniques à *P. yayanosii*. Parmi ceux-ci plus de 65 % correspondent à des protéines associés aux CRISPR qui sont principalement retrouvées dans trois clusters, posant ainsi la question de la présence

Information storage and processing	
J	Translation ; ribosomal structure and biogenesis
K	Transcription
L	Replication ; recombination and repair
Cellular processes and signaling	
D	Cell cycle control ; cell division ; chromosome partitioning
M	Cell wall/membrane/envelope biogenesis
N	Cell motility
O	Posttranslational modification ; protein turnover ; chaperones
T	Signal transduction mechanisms
U	Intracellular trafficking ; secretion ; and vesicular transport
V	Defense mechanisms
Metabolism	
C	Energy production and conversion
G	Carbohydrate transport and metabolism
E	Amino acid transport and metabolism
F	Nucleotide transport and metabolism
H	Coenzyme transport and metabolism
I	Lipid transport and metabolism
P	Inorganic ion transport and metabolism
Q	Secondary metabolites biosynthesis ; transport and catabolism
Poorly characterized genes	
R	General function prediction only
S	Function unknown
X	Not predicted

TABLEAU III.5.: Description des catégories arCOGs

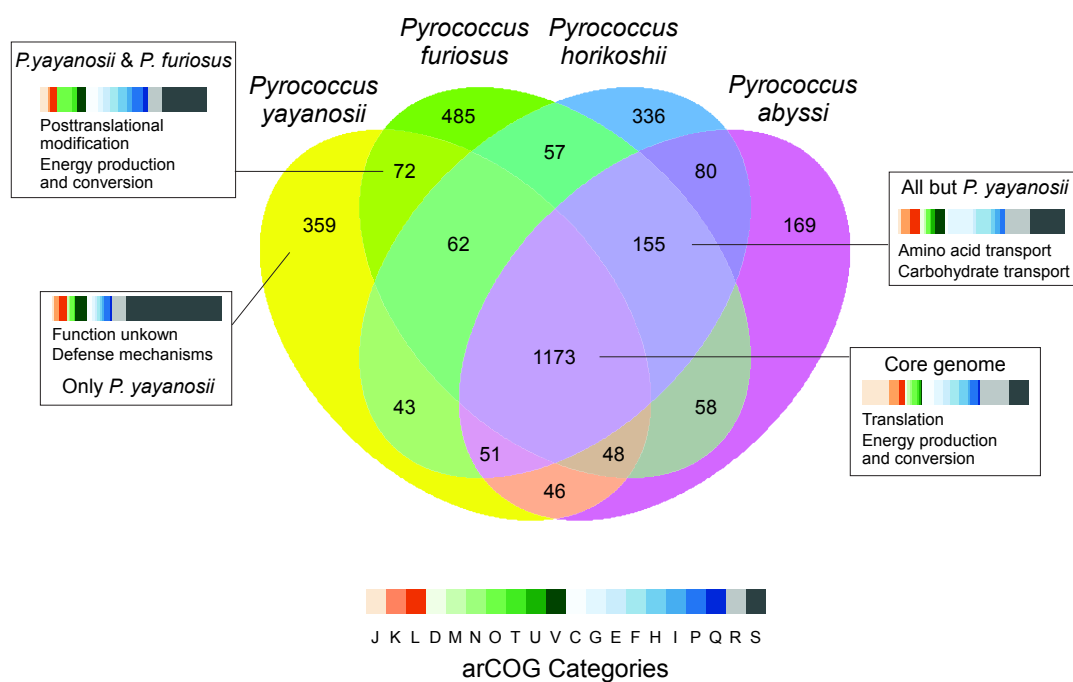


FIGURE III.5.: Diagramme de Venn représentant les protéines orthologues ou non chez 4 génomes de *Pyrococcus* par hits réciproques. *P. furiosus* : vert, *P. yayanosii* : jaune, *P. horikoshii* : bleu, *P. abyssi* en violet. Les nombres indiqués dans le diagramme de Venn correspondent à des groupes de gènes orthologues. Les catégories arCOG représentent le stockage et le traitement de l'information (palette orange), Processus cellulaires et signalisation (palette vert), Métabolisme (palette bleue) et des gènes mal caractérisés (palette grise).

III. Comparaison de génomes

d'éléments génétiques mobiles infectant *P. yayanosii*. Une recherche de prophage effectuée à l'aide du serveur PHAge Search Tool (ZHOU *et al.*, 2011) sur son génome n'a pas démontré leur présence. Néanmoins, la présence d'une intégrase de SSV1 (PYCH_14110) suggère une intégration d'élément génétique. Cela est confirmé par le fait que le cluster (PYCH_14110-270) comprenant cette intégrase est proche d'un plasmide de *Thermococcus* sp. 26-2 (Figure III.6) qui est aussi intégré dans les génomes de *T. kodakarensis*, *P. horikoshii* et *T. gammatolerans* (SOLER *et al.*, 2010). Ce cluster a par ailleurs été considéré comme un îlot génomique par le programme IslandViewer (yaya_8), comme décrit précédemment, les gènes présents codent d'ailleurs pratiquement tous pour des protéines hypothétiques (Tableau III.4 page 86). L'intégration dans le génome semble assez ancienne, car seulement 50 % du plasmide est aligné avec le génome de *P. yayanosii* et que le pourcentage d'identité entre les deux séquences alignées est seulement de 53 %. De même, le gène de l'intégrase de SSV1 de *P. yayanosii* possède moins de 30 % d'identité avec les autres intégrases présentes chez les trois *Thermococcales* décrites précédemment.

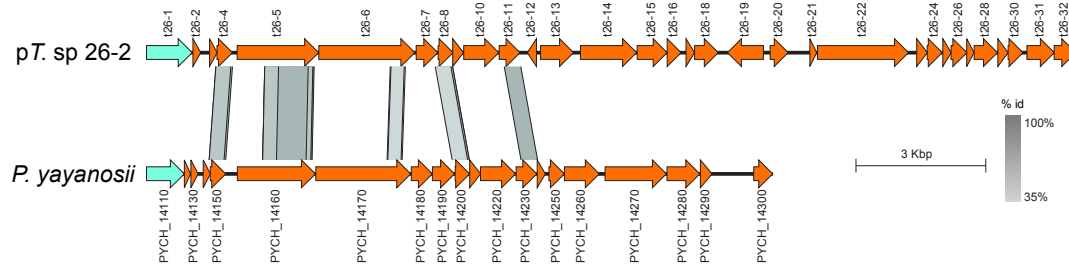


FIGURE III.6.: Alignement d'un cluster de *P. yayanosii* (PYCH_14110-14300) avec une partie du plasmide de *Thermococcus* sp 26-2. L'alignement a été effectué à l'aide du programme Easyfig (tblastx, 30 % id min, e-value 10^{-4}) (SULLIVAN *et al.*, 2011). Le gène en bleu correspond à une intégrase de type SSV1.

P. yayanosii possède 359 protéines qui ne sont pas retrouvés chez les 3 autres *Pyrococcus*. Des blastp ont été effectués sur ces protéines en utilisant la base de données nr et 74, 96, 2 et 187 protéines sont respectivement proches d'autres *Pyrococcus*, *Ther-*

mococcus, d'autres micro-organismes et sont uniques à *P. yayanosii* en tenant compte d'un minimum de 60 % d'identité. Concernant les protéines uniques à *P. yayanosii*, 162/187 (87 %) sont hypothétiques, les autres sont impliquées entre autre dans les mécanismes de défense (V, 4 %), de traduction (J, 2 %) et de réplication (L, 2 %). Les protéines impliquées dans les mécanismes de défense font toute parties du même cluster et sont des CRISPR-associated (*cas*) (PYCH_07980-8050) qui sont représentées dans la figure III.10 page 101 et font partie de l'îlot génomique *yaya_4* (Tableau III.4 page 86).

155 protéines sont présentes chez les trois *Pyrococcus* et absentes chez *P. yayanosii*, avec une sur-représentation des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés (E) ainsi que du transport et de la biosynthèse des carbohydrates (G). Cela suggère que *P. yayanosii* possède des capacités limitées à ce niveau et confirme le polymorphisme des *Thermococcales* concernant ces deux catégories (FRANCK T ROBB, 2004). Afin de déterminer quelles sont les différences observées au niveau du métabolisme entre ces quatre espèces, la présence ou absence de différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des carbohydrates, des acides aminées et le métabolisme énergétique a été déterminée grâce à la base de données KEGG (KANEHISA *et al.*, 2012)(Figure III.7 page suivante). Les valeurs sont exprimées en nombre d'enzymes présente dans la voie métabolique. Il faut signaler néanmoins que la présence ou non des enzymes dans les différents voies métaboliques n'a pas été vérifiée expérimentalement. De même, les noms des différentes voies KEGG sont des noms génériques qui ne correspondent donc pas forcément à des réalités chez les *Thermococcales*, par exemple, celles-ci ne possèdent pas les enzymes capables de métaboliser le méthane alors qu'elles possèdent environ 25 % d'enzymes du pathway « Methane metabolism ». Ces enzymes correspondent en fait, à une métabolisation possible du formate par l'intermédiaire d'hydrogénases. Néanmoins, cette figure met en lumière le fait que des différences importantes existent au sein des *Pyrococcus*, particulièrement visibles concernant la voie de biosynthèse de la lysine, de

III. Comparaison de génomes

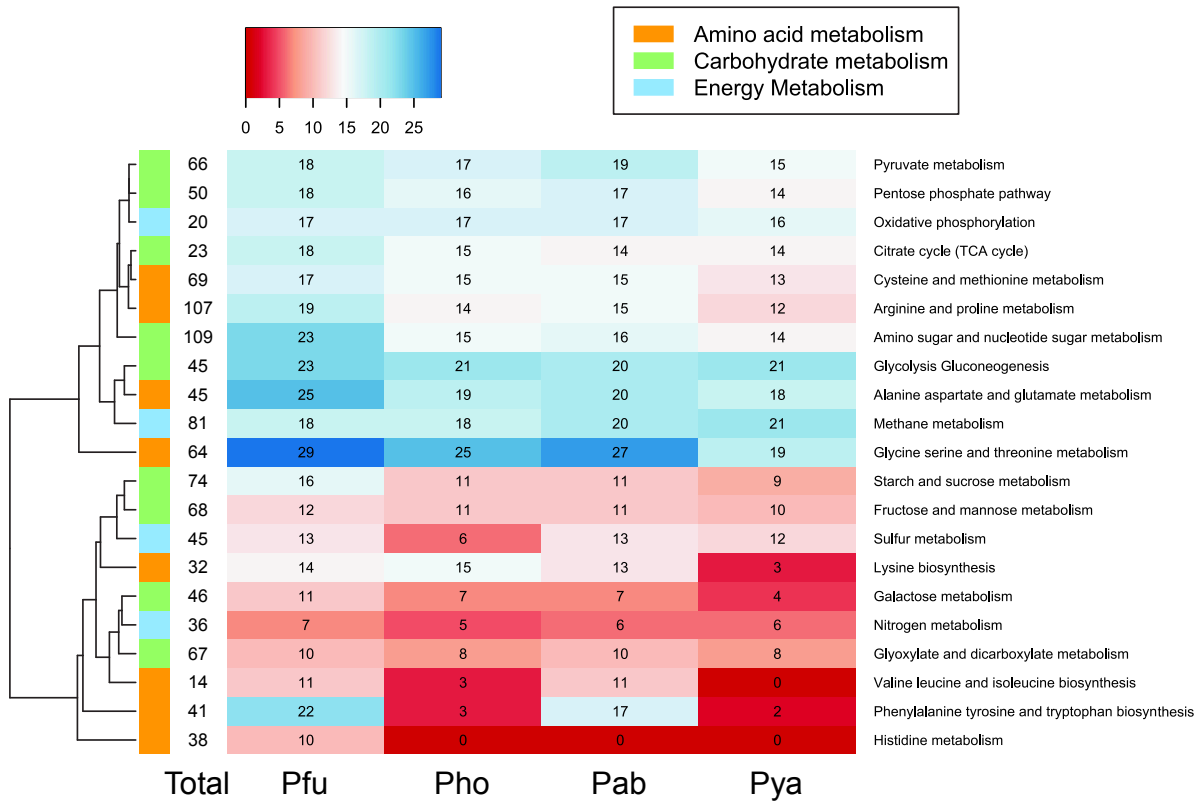


FIGURE III.7.: Heatmap représentant la proportion d'enzymes présentes par pathway chez les *Pyrococcus*, effectué à l'aide du script R "gplots" (WARNES *et al.*, 2009)

la valine, leucine et l'isoleucine, de la phénylalanine, tyrosine et tryptophane, ainsi qu'au niveau du métabolisme de l'histidine (Figure III.7). *P. yayanosii* ne possédant en effet très peu d'enzymes impliquées dans ces différentes voies de biosynthèses et ne semblant donc pas capable de les synthétiser. *P. furiosus* possède les enzymes qui lui permettrait de synthétiser tous ces acides aminés décrits ci-dessus, au contraire de *P. abyssi* qui n'est pas capable de métaboliser l'histidine. *P. horikoshii*, serait en mesure par rapport à *P. yayanosii* de synthétiser la lysine. Néanmoins, la capacité de synthétiser différents acides aminés ne semble pas être en corrélation avec la capacité à résister à la pression, notamment à cause du fait que *P. horikoshii* qui a été isolé à une profondeur inférieure (1395 m) à *P. abyssi* (2000 m) possède moins d'enzymes capables de synthétiser les acides aminés précédemment décrits que cette dernière.

Des corrélations ont été effectuées entre la profondeur d'origine de chaque espèce (Tableau III.2 page 82) (0 m : *P. furiosus*, 1 395 m : *P. horikoshii*, 2 000 m : *P. abyssi* et 4 100 m : *P. yayanosii*) et le nombre d'enzymes pour chaque voie métabolique ou pathway. Dans le cas de ces 4 *Pyrococcus*, la pression optimale de croissance a été déterminée et est proportionnelle à la profondeur d'origine permettant d'utiliser l'un ou l'autre paramètre (BIRRIEN *et al.*, 2011). Les corrélations montrent que pour 7 pathways, plus la profondeur est importante et moins l'organisme possède d'enzymes (Corrélation de Pearson, p-value < 5 %). Au contraire pour le métabolisme du méthane, on observe une corrélation positive (Tableau III.6 page 97). Les voies concernées par une baisse du nombre d'enzymes en relation avec la profondeur d'origine de l'espèce sont regroupées en deux groupes, le premier concerne le métabolisme de sucres (Fructose, mannose, galactose, saccharose et amidon), le second, le métabolisme des acides aminés (Glycine, serine, thréonine, cystéine, méthionine, arginine et proline) ainsi que la voie des pentoses phosphates. Ces résultats montrent que la pression semble réellement avoir un effet sur ces deux groupes de métabolismes mais sont à tempérer dans la mesure où la différence d'enzymes entre les différentes espèces peut être faible (< 5 %) tels le métabolisme de la cystéine et de la méthionine, ainsi que du faible nombre de variables (4).

En analysant la capacité des différentes espèces de *Pyrococcus* à synthétiser les acides aminés, nous observons que *P. yayanosii* et *P. horikoshii* ne semblent pas pouvoir synthétiser les acides aminés basique (Histidine et lysine (*P. yayanosii* uniquement)) et aromatiques (Phénylalanine, tryptophane et tyrosine). L'absence des gènes de biosynthèse des acides aminés aromatiques est probablement due au fait que la biosynthèse de ces acides aminés soit la plus onéreuse d'un point de vue énergétique (HEIZER *et al.*, 2006; SWIRE, 2007). L'analyse de la substitution d'acides aminés entre *P. yayanosii* et *P. furiosus* par DI GIULIO a confirmé que la polarité et la taille des acides aminés étaient des facteurs impliqués dans l'adaptation aux HPH (DI GIULIO, 2013). Les acides aminés

III. Comparaison de génomes

petits et polaires seraient plus piézophiles que les acides aminés apolaires et/ou grands. Néanmoins des doutes subsistent sur la pertinence de ces études en raison notamment des différences de GC% existant entre les espèces comparées (*e.g* 10% entre *P. yayanosii* et *P. furiosus*). les substitutions d'acides aminés seraient alors plus dues aux différences de GC% entre les codons codants pour ceux-ci qu'aux conditions physiologiques dans lesquels les espèces sont retrouvées.

Afin d'augmenter les statistiques des données, les mêmes corrélations ont été effectuées en prenant en compte les *Thermococcales* séquencées décrites précédemment (Tableau III.1 page 79). La figure III.8 page suivante représente ainsi le nombre d'enzymes présentes par rapport à la profondeur d'origine pour les voies de biosynthèses de la phénylananine, de la tyrosine et du tryptophane ainsi que la voie du métabolisme de l'histidine. Cette figure montre que malgré quelques points pouvant être considérés comme « aberrants » tel *P. sp.* ST04 possédant 21 enzymes impliquées dans la biosynthèse des acides aminés aromatiques malgré le fait qu'elle ait été isolée à 2 290 m de profondeur, ou *P. horikoshii* possédant seulement 3 enzymes alors qu'elle a été isolée à 1 395 m de profondeur, la corrélation concernant ces voies de biosynthèse est négative. Au contraire, les *Thermococcales* au niveau du métabolisme de l'histidine, se divise en 2 groupes possédant 0 ou 10 enzymes impliquées dans celui-ci sans lien avec la profondeur d'origine.

Les coefficients de pearson ont été ainsi calculés pour les différentes voies de biosynthèse ou de métabolisme des *Thermococcales* et sont présentés dans le tableau III.6 page 97. Dans ce cas-là, on observe que les corrélations sont moins significative (0,5-0,6) que pour les *Pyrococcus*, cela est sans doute du au fait que la profondeur d'origine n'ait dans certains cas pas été déterminée de façon très précise (HOLDEN *et al.*, 2001). Dans l'idéal, la corrélation aurait du s'effectuer en prenant en compte la pression optimale mais ce paramètre n'a pas été déterminé pour plus de 3/4 des *Thermococcales* séquencées. La

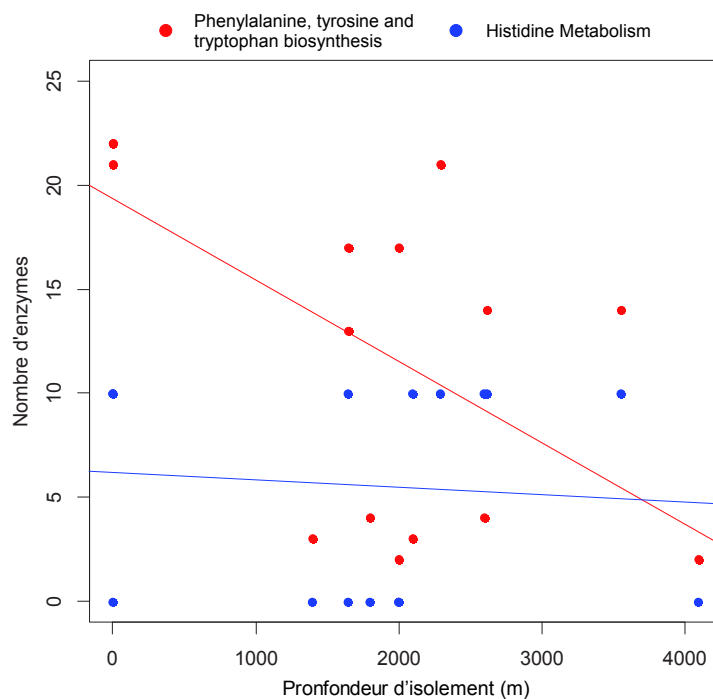


FIGURE III.8.: Corrélation entre le nombre d'enzymes par espèces de *Thermococcales* pour une voie métabolique (Histidine métabolisme : bleu, Phénylananine, tyrosine et tryptophane biosynthesis : rouge) en fonction de la profondeur d'origine des différentes espèces (Tableau III.1 page 79).

III. Comparaison de génomes

pression semble néanmoins avoir un effet négatif sur certaines voies de métabolisme ou biosynthèse dont la voie des pentoses phosphates, du métabolisme de l'arginine et de la proline, ainsi que du galactose, de l'amidon et du saccharose. Certaines voies de biosynthèse des acides aminés semblent aussi particulièrement affectés par la pression tel celle de la lysine, de la phénylalanine, de la tyrosine ainsi que du tryptophane. Le fait qu'à la fois la voie des pentoses phosphates, de la biosynthèse de la phénylalanine, de la tyrosine ainsi que du tryptophane soient affectées est logique, notamment à cause du fait que le précurseur de ces derniers l'érythrose-4-phosphate est produit par la voie des pentoses phosphates. Chez *P. yayanosii*, l'enzyme (transketolase (EC :2.2.1.1)) responsable de la production de ce précurseur est absente de même que la grande majorité des enzymes responsables de la biosynthèse de ces acides aminés aromatiques.

Un autre élément de comparaison possible entre *P. yayanosii* et les autres *Pyrococcus*, consistent à déterminer quels sont les gènes qui sont le plus exprimés au sein des génomes et donc quels métabolismes sont les plus actifs au sein des différentes espèces. Pour cela, le codon adaptation index (CAI) des différentes protéines ont été calculés. Afin de s'affranchir de la différence en GC% entre les *Pyrococcus*, ils ont été calculés en utilisant les protéines ribosomiques orthologues comme références (WU *et al.*, 2005). Le CAI suppose que les gènes les plus exprimés ont tendance à avoir un biais pour des codons particuliers (KARLIN et MRÁZEK, 2000). Les protéines ribosomiques ont été choisies car il a été montré qu'elles sont les plus exprimées au sein du génome et que leur nombre (≈ 65) permet d'augmenter la signification des résultats. Les CAI ont été déterminés en utilisant le serveur : <http://userpages.umbc.edu/~wug1/codon/cai/cais.php> (WU *et al.*, 2005). En excluant les gènes de référence, soit les protéines ribosomales, les 100 premiers gènes possédant le CAI le plus fort ont été étudiés (Figure III.9 page 99). Les résultats concernant la transcription (K) sont ainsi fortement affectés par le fait que les protéines ribosomales ont été exclues. La proportion de gènes hautement exprimés

TABLEAU III.6.: Corrélation de Pearson entre la profondeur d'origine et le nombre d'enzyme par pathway KEGG chez les 4 *Pyrococcus* et chez les *Thermococcales* séquencées. La corrélation est considérée significative lorsque la p-value est inférieur à 5 %. En bleu, la corrélation est négative et en rouge, la corrélation est positive

Pathway	4 <i>Pyrococcus</i>		<i>Thermococcales</i>	
	Corrélation	p-value	Corrélation	p-value
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	-0,84	$9,53 \times 10^{-2}$	-0,37	$1,60 \times 10^{-1}$
Arginine and proline metabolism	-0,91	$3,66 \times 10^{-2}$	-0,56	$2,18 \times 10^{-2}$
Cysteine and methionine metabolism	-0,98	$1,84 \times 10^{-3}$	-0,36	$1,71 \times 10^{-1}$
Glycine, serine and threonine metabolism	-0,93	$2,16 \times 10^{-2}$	-0,48	$6,00 \times 10^{-2}$
Histidine metabolism	-0,73	$2,04 \times 10^{-1}$	-0,08	$7,58 \times 10^{-1}$
Lysine biosynthesis	-0,88	$5,58 \times 10^{-2}$	-0,56	$2,31 \times 10^{-2}$
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	-0,7	$2,35 \times 10^{-1}$	-0,59	$1,44 \times 10^{-2}$
Tyrosine metabolism	-0,82	$1,10 \times 10^{-1}$	-0,62	$9,18 \times 10^{-3}$
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	-0,72	$2,17 \times 10^{-1}$	-0,39	$1,35 \times 10^{-1}$
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	-0,82	$1,15 \times 10^{-1}$	-0,54	$2,88 \times 10^{-2}$
Citrate cycle (TCA cycle)	-0,82	$1,10 \times 10^{-1}$	-0,47	$6,66 \times 10^{-2}$
Fructose and mannose metabolism	-0,98	$1,84 \times 10^{-3}$	-0,03	$9,09 \times 10^{-1}$
Galactose metabolism	-0,96	$6,59 \times 10^{-3}$	-0,64	$7,18 \times 10^{-3}$
Glycolysis / Gluconeogenesis	-0,6	$3,48 \times 10^{-1}$	-0,35	$1,84 \times 10^{-1}$
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	-0,59	$3,58 \times 10^{-1}$	-0,21	$4,29 \times 10^{-1}$
Pentose phosphate pathway	-0,92	$2,64 \times 10^{-2}$	-0,55	$2,67 \times 10^{-2}$
Pyruvate metabolism	-0,7	$2,42 \times 10^{-1}$	-0,29	$2,69 \times 10^{-1}$
Starch and sucrose metabolism	-0,9	$4,00 \times 10^{-2}$	-0,54	$2,90 \times 10^{-2}$
Methane metabolism	0,9	$4,02 \times 10^{-2}$	0,46	$7,20 \times 10^{-2}$
Nitrogen metabolism	-0,33	$6,44 \times 10^{-1}$	-0,15	$5,87 \times 10^{-1}$
Oxidative phosphorylation	-0,87	$6,56 \times 10^{-2}$	-0,17	$5,29 \times 10^{-1}$
Sulfur metabolism	0,07	$9,29 \times 10^{-1}$	0,00	$9,87 \times 10^{-1}$

III. Comparaison de génomes

présent dans chaque catégorie arCOGs (Tableau III.5 page 88) est représentée sur cette figure pour chaque espèce. Par exemple, parmi les 100 gènes les plus exprimés, *P. yayanosii* en possède 11 qui sont classés dans la catégorie arCOGs R (General function prediction only). L'arbre phylogénique à gauche de la figure sert à classer les catégories en fonction du nombre d'enzymes présents, on distingue ainsi 3 groupes, dans le plus haut, la moyenne d'enzymes par voie métabolique est autour 10-12. Dans le groupe du milieu, la moyenne du nombre d'enzymes par voie métabolique est d'environ 5 alors, qu'elle est de 1-2 pour le groupe le plus bas.

Environ 25 % des gènes sont inconnus ou peu caractérisés (R,S, X) ; cette proportion est sensiblement la même que pour le core-génome suggérant une bonne représentativité des données. Les gènes impliqués dans le stockage et le traitement de l'information (Catégories J, K et L) sont sur-représentés ($\approx 20\%$) ce qui est conforme avec la littérature (KARLIN et MRÁZEK, 2000). En ce qui concerne *P. yayanosii*, les gènes impliqués dans la production et la conservation d'énergie (C) sont observés environ deux fois plus (17 %) que pour les trois autres espèces (8-11 %). Parmi ceux-ci, sont retrouvés des gènes impliqués dans la synthèse d'ATP et ADP ainsi que des gènes codant pour des hydrogénases et des ferrédoxines oxydoréductases. L'action de ces dernières est décrite plus précisément ci-après (Section III.6 page 103). Les gènes codant pour des protéines inconnues constituent aussi une différence entre *P. yayanosii* et les autres *Pyrococcus*, en effet ces dernières possèdent 30 % de plus de protéines hypothétiques hautement exprimées que *P. yayanosii*, compensant sans doute les protéines impliquées dans la production et la conservation d'énergie.

III.4. CRISPR et CRISPRcas

L'immunité virale chez les procaryotes serait assuré par des séquences répétées (clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs)) en relation avec des

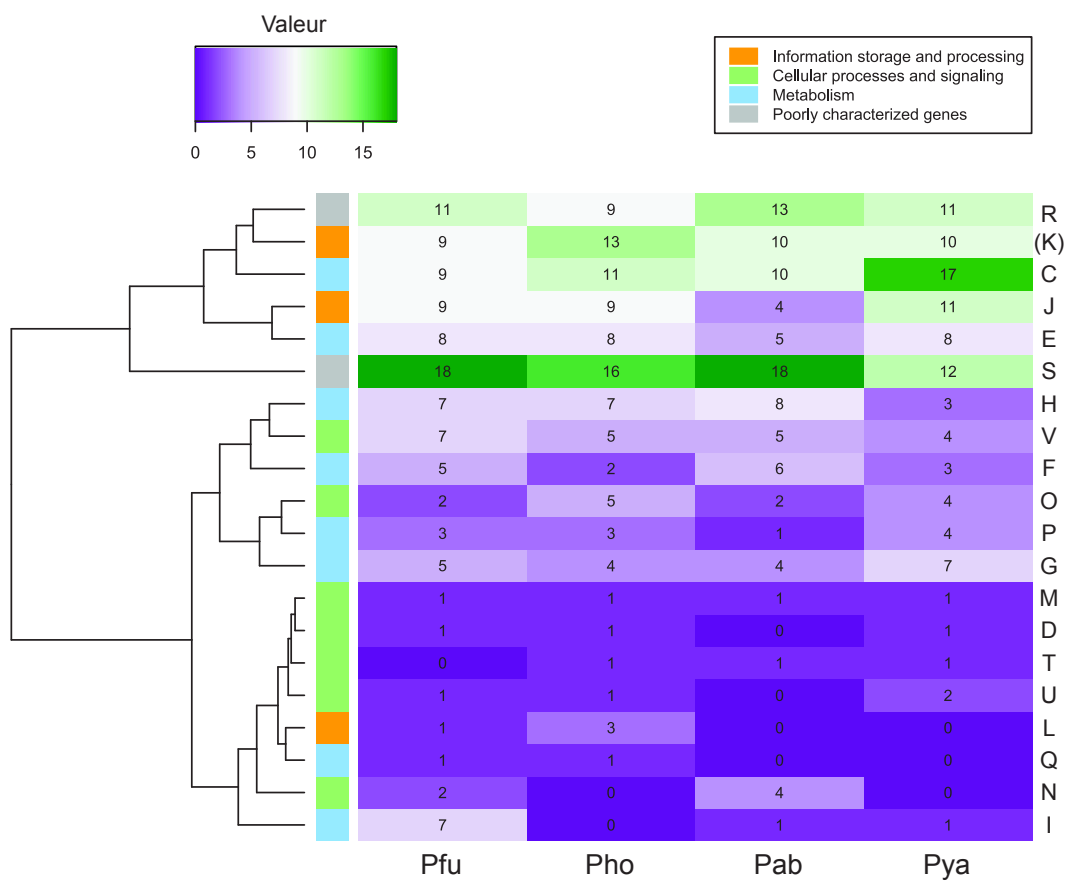


FIGURE III.9.: Heatmap représentant la proportion de gènes hautement exprimés par catégorie arCOG

III. Comparaison de génomes

protéines *cas*. Comme décrit précédemment (Section I.7.6 page 57), Le mécanisme d'action des CRISPRs est encore mal connu, mais il semble que les séquences non répétées soient des séquences provenant de phages et d'éléments génétiques mobiles extra chromosomiques. Lors de l'infection de la cellule par un phage, si la cellule contient une séquence répétée homologue à l'acide désoxyribonucléique (ADN) du phage, les CRISPRs seront exprimés et la séquence homologue ira s'hybrider sur l'ARN messager (ARNm) du phage à l'aide des protéines *cas*. Cet ARNm sera alors dégradé et le phage ne lysera ainsi plus la cellule.

L'étude des CRISPRs et *cas* montrent des disparités importantes. Une recherche de ces séquences répétées dans le génome des quatre *Pyrococcus* étudiés à l'aide de la base de données CRISPRdb (GRISSA *et al.*, 2007) montre que *P. abyssi* ne possède que 4 structures CRISPR alors que les trois autres *Pyrococcus* en possède entre 6 et 8. Les CRISPR étant souvent associée à des Cas, une recherche de ces protéines a été faite à l'aide de la base de données TIGRFAM (HAFT *et al.*, 2003), notamment car ces protéines sont souvent annotées en tant que protéines hypothétiques. On dénombre 9, 25, 29 et 37 protéines Cas qui sont respectivement retrouvées chez *P. abyssi*, *P. furiosus*, *P. horikoshii* et *P. yayanosii*. Dans les génomes, les gènes *cas* sont soit organisés en cluster de 7-8 ou 13-15 gènes soit sont retrouvés isolés dans le génome. Les clusters qui comprennent une grande partie des gènes *cas* ont été alignés entre les différentes espèces (Figure III.10 page suivante). Les CRISPRs présents au niveau de ces clusters apparaissent très réarrangés. Cela est sans doute dû aux séquences répétées et au fait que la taille des alignements soit trop faible (min 100 pb). Les clusters alignés montrent pour certains d'importantes insertions/délétions de gènes confirmant la grande plasticité de ses systèmes. De façon étonnante, tous les clusters de gènes *cas* ne se trouvent pas à proximité immédiate de CRISPR (< 5kb) comme attendu (HAFT *et al.*, 2005) ce qui pose la question de la délétion éventuelle de ces CRISPRs ou du fait qu'il soit possible que

les gènes *cas* aient une autre fonction, de réparation d'ADN par exemple (MAKAROVA *et al.*, 2006). La présence de transferts horizontaux au niveau des gènes *cas* est d'ailleurs renforcé par le fait que le cluster PYCH_07940-8060 de *P. yayanosii* a été prédit comme étant un îlot génomique dont le GC% est très inférieur au GC% du génome (44 % vs 52 %). Ce GC % proche de celui d'une partie des *Thermococcales* peut suggérer un transfert inter-espèces avec une espèce dont le génome n'a pas été séquencé à l'heure actuelle.

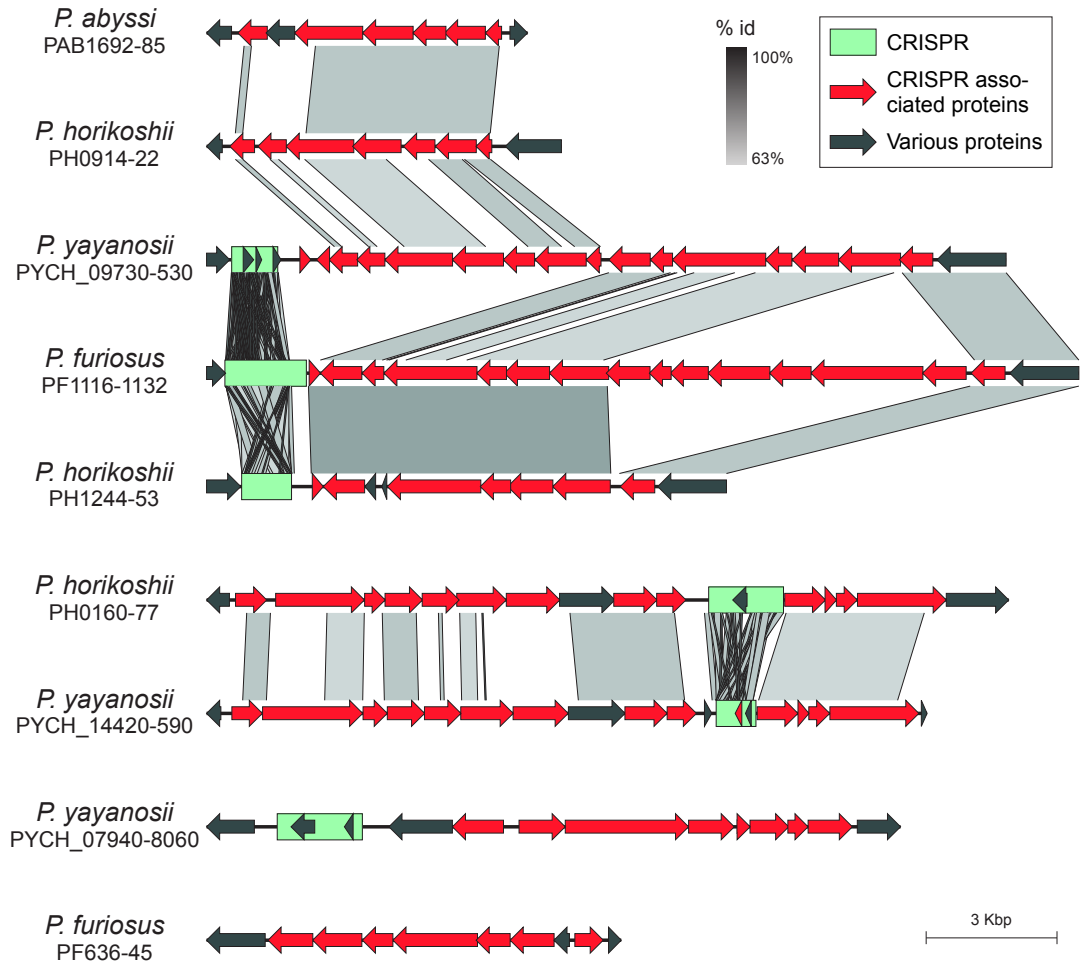


FIGURE III.10.: Alignement des clusters de protéines associées aux CRISPR chez les *Pyrococcus*. L'alignement a été effectué à l'aide du programme Easyfig (blastn, e-value 10^{-4}) (SULLIVAN *et al.*, 2011). Les gènes en orange codent pour des protéines associées aux CRISPR.

III.5. Transporteurs

Les *Pyrococcus* possèdent environ 190–230 transporteurs, dont environ 50 % sont des transporteurs de type ABC essentiellement de sucres (ALBERS *et al.*, 2004). 124/230 de ces transporteurs sont conservés entre les quatre *Pyrococcus*. Fait intéressant, 25 transporteurs sont présents chez trois *Pyrococcus* excepté *P. yayanosii* qui en possède 30 uniques. Comparativement, 8, 13 et 36 transporteurs uniques sont respectivement retrouvés chez *P. abyssi*, *P. horikoshii* et *P. furiosus*. Ces données sont à mettre en relation avec le fait que *P. yayanosii* possède 44 transporteurs de moins que *P. furiosus*. Une analyse des transporteurs montre des disparités entre le nombre de domaines transmembranaires prédits pour chacun de ceux-ci entre les différentes espèces (KROGH *et al.*, 2001)(Figure III.11 page 104). La première chose observée est qu’une proportion importante de ces transporteurs ne possède aucun domaine transmembranaire (25-30%). Cela est dû au fait que des protéines associées aux transporteurs ABC sont classées en tant que transporteurs ABC alors qu’elles sont cytosoliques. Excepté *P. yayanosii* qui semble posséder moins de transporteurs possédant 6 domaines transmembranaires et plus en possédant 3 que les autres *Pyrococcus*, nous observons peu de différence à ce niveau (Figure III.11 page 104). Parmi les différents transporteurs uniques à *P. yayanosii*, trois clusters sont retrouvés (PYCH_00490-00520, PYCH_04550-04570 et PYCH_08880-08890) et sont tous prédits comme étant des transporteurs ABC. Le cluster PYCH_00490-00520 code pour des protéines putatives impliquées dans le transport des ions métalliques. La présence de sous-unités de chélatase de magnésium à proximité immédiate (PYCH_004970-80) a tendance à confirmer cet état de fait. L’environnement génomique de ces transporteurs montre la présence à proximité de transposases (PYCH_003900-4000) pouvant expliquer l’absence de ce cluster chez les trois autres *Pyrococcus*. Ce cluster est fortement conservé chez d’autres *Thermococcales* (80-90 %) que sont *Pyrococcus* sp. NA2 et *T. barophilus*. Il est d’ailleurs considéré comme un îlot génomique (yaya_1, tableau III.4 page 86). Un

autre cluster de transporteurs ABC présent chez les 3 autres *Pyrococcus* est aussi situé à proximité immédiate de ce cluster (PYCH_00530-00570). Ce transporteur ABC est chez *P. furiosus* (PF1967-70) proche des transporteurs MalI et MalII important respectivement du maltose et des maltodextrines (LEE *et al.*, 2006). Un autre opéron unique chez *P. yayanosii* (PYCH_04550-570) est prédit pouvant importer du tungstate et dont des gènes homologues sont présents chez *T. barophilus* et de *T. onnurineus*. De la même manière que pour le cluster précédant des sous-unités de transposases sont présentes à proximité de ce cluster (PYCH_04640-04660)(ilot yaya_2), la présence de 5 gènes encodant pour des tRNA présents dans les 10 kb autour du cluster confirme la possibilité de l'existence de transferts horizontaux de gènes. Le troisième cluster de gènes présent uniquement chez *P. yayanosii* (PYCH_08880-08890) est composé de gènes codant des protéines impliquées dans l'assemblage de cluster Fe-S et donc dans les mécanismes de respiration par l'intermédiaire de ferrédoxines.

Parmi les autres transporteurs uniques à *P. yayanosii* par rapport aux trois autres *Pyrococcus*, nous observons un transporteur du formate (PYCH_11130) ainsi que deux transporteurs d'acides aminés aromatiques (PYCH_00850, PYCH_13200). La présence de ces derniers pourrait ainsi compenser l'absence des voies de biosynthèse des différents acides aminés aromatiques. Le transporteur du formate étant impliqué dans le métabolisme respiratoire par oxydation de ce dernier en H₂ (Section III.6). Les autres transporteurs présents uniquement chez *P. yayanosii* sont principalement impliqués dans le transport d'ion métalliques

III.6. Métabolisme de l'hydrogène et du formate

Comme nous l'avons vu précédemment (Section I.7.2 page 47), les hydrogénases et sulfhydrogénases sont impliquées dans un mécanisme de respiration simple ou ils mettent en relation l'oxydation des ferrédoxines avec la formation d'hydrogène, cela permet la

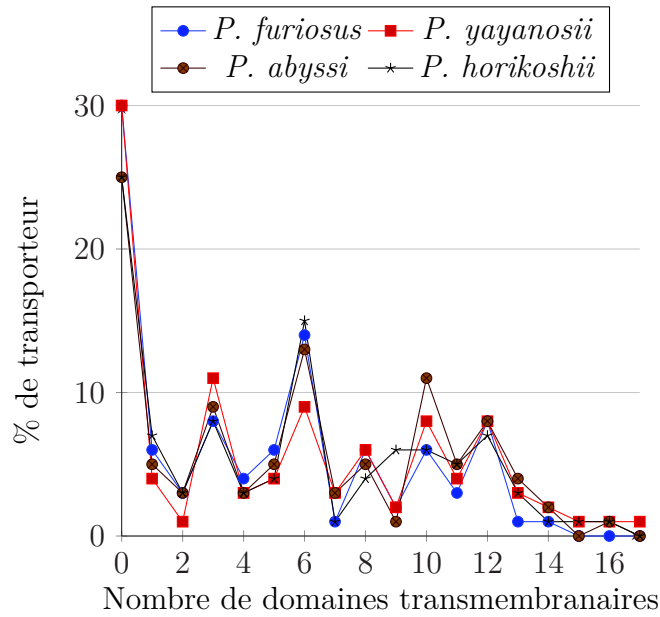


FIGURE III.11.: Nombre de domaines transmembranaires par transporteur

conservation d'énergie sous la forme d'un gradient ionique (SCHUT *et al.*, 2012). Les résultats obtenus à partir des CAI suggèrent que *P. yayanosii* a mis en place un système très actif permettant la production et la conservation d'énergie sous HPH. Les gènes impliqués dans ce système de respiration ont été déterminés par SCHUT *et al.* et sont présentés dans le tableau III.7 (SCHUT *et al.*, 2012). Excepté pour les gènes codants pour le cluster SHII absents chez *P. horikoshii*, les gènes sont très conservés avec une moyenne de 70-75 % d'identité après alignement, ce qui confirme le fait qu'ils soient indispensables au bon fonctionnement de la cellule.

Certaines *Thermococcales* possèdent par ailleurs, la capacité d'utiliser une formate déshydrogénase en relation avec les hydrogénases comme *Thermococcus onnurineus* (TAKÁCS *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2010). Le formate entre dans la cellule par l'intermédiaire d'un transporteur de formate. Il est alors oxydé en CO_2 par une formate deshydrogenase et les protons sont alors réduits en H_2 par une hydrogénase en réponse à l'accumulation de formate pendant la fermentation. Cela permet entre autre à la cellule de maintenir son pH cytoplasmique. Le cluster responsable de l'utilisation de formate par *T. onnu-*

Espèces	Mrp-Mbh	SHI	SHII	Mrp-Mbx
<i>P. furiosus</i>	PF1423-36	PF0891-94	PF1329-32	PF1453-41
<i>P. abyssi</i>	PAB1884-94	PAB1784-87	PAB0638-41	PAB0485-96
<i>P. horikoshii</i>	PH1427-40	PH1290-94	-	PH1456-46
<i>P. yayanosii</i>	PYCH_11230-360	PYCH_08370-400	PYCH_00020-50	PYCH_11530-410
Espèces	Nsr	SurR	Pdo	PF2051-2
<i>P. furiosus</i>	PF1186	PF0095	PF0094	PF2051-52
<i>P. abyssi</i>	PAB0936	PAB0108	PAB2245	PAB2298-3022
<i>P. horikoshii</i>	PH0572	PH0180	PH0178	PH0062-S001
<i>P. yayanosii</i>	PYCH_07890	PYCH_16310	PYCH_16300	PYCH_14930-940

TABEAU III.7.: Gènes impliqués dans le métabolisme de l'hydrogène chez 4 *Pyrococcus*, tiré de SCHUT *et al.* (2012)

rineus (fdh2-mfh2-mnh2, TON_1563-1580), comprend 2 unités de déshydrogénases, 7 sous unités [NiFe]-hydrogenase, une protéine hypothétique, le transporteur de formate et 7 sous unités Na^+/H^+ antiporter (KIM *et al.*, 2010). Ce cluster est aussi présent chez *P. yayanosii*, alors qu'il est absent chez *P. furiosus* et *P. horikoshii*. *P. abyssi* possède des traces de ce cluster mais a apparemment perdu le transporteur qui lui permettrait d'importer le formate à l'intérieur de la cellule (Figure III.12).

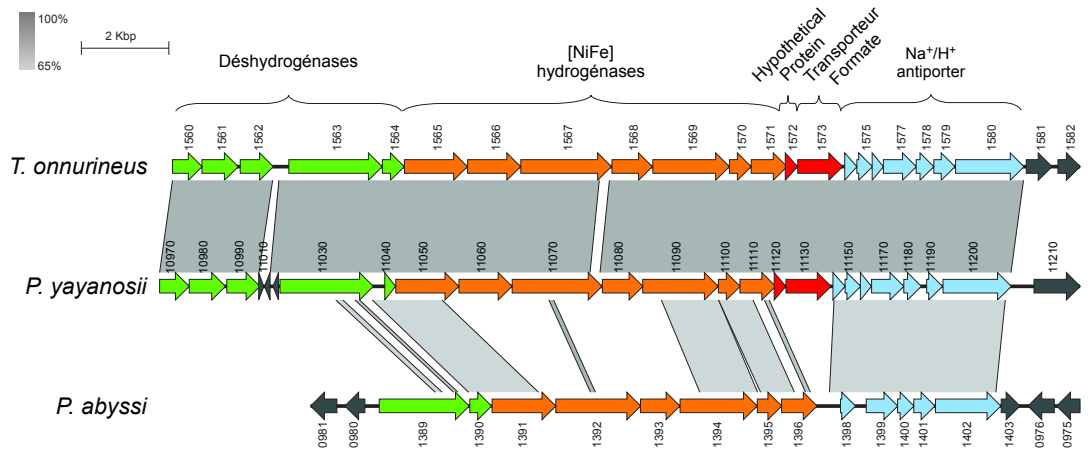


FIGURE III.12.: Alignement de clusters du métabolisme du formate chez les *Pyrococcus*

III.7. Conclusions

Ces analyses ont confirmé les nombreux réarrangements présents au sein des génomes de *Pyrococcus*, notamment au niveau d'îlots génomiques et de CRISPR-*cas*. Malgré cela, environ 65 % des gènes sont communs au sein de ces génomes, avec un nombre important de gènes codant pour des protéines hypothétiques notamment au niveau des protéines uniques ($\approx 80\%$). Les différences importantes de GC % entre *P. yayanosii* et les trois autres *Pyrococcus*, aurait plutôt tendance à classer celle-ci au sein des *Thermococcus*, malgré le fait qu'elle soit plus proche des *Pyrococcus* à la fois d'un point de vue physiologique et génomique.

L'analyse des génomes de *Pyrococcus* nous a aussi montré que des différences existaient entre *P. yayanosii* et les trois autres *Pyrococcus*, notamment au niveau du métabolisme énergétique et de la biosynthèse de certains acides aminés. Le fait que *P. yayanosii* ne puisse apparemment pas synthétiser les acides aminés aromatiques est à relier avec les résultats de VANNIER dans sa thèse. Pour rappel, elle montrait que *T. kodakarensis* et *T. barophilus*, respectivement piézosensibles et piézophiles inhibaient entre autres les voies de biosynthèses des acides aminés aromatiques sous HPH (VANNIER, 2012). *P. yayanosii* n'aurait ainsi plus ces voies de biosynthèse soit parce que leur coût énergétique est trop important, soit à cause de l'encombrement du cycle aromatique et des effets des HPH sur celui-ci.

L'analyse des métabolismes énergétiques nous montre que *P. yayanosii* possède en plus des trois autres *Pyrococcus*, un opéron responsable du métabolisme du formate. Opéron qui est aussi retrouvé chez d'autres *Thermococcus*, tel *T. onnurineus*. Les gènes de ce métabolisme semble aussi chez *P. yayanosii* plus exprimé au sein du génome que chez les autres *Pyrococcus*. Le métabolisme énergétique étant différentiellement exprimé en conditions de HPH chez plusieurs micro-organismes piézophiles tel *S. violacea* et *T. barophilus*.

Ces résultats tentent à appuyer l'hypothèse que *P. yayanosii* aurait fortement adapté son génome aux conditions de pressions dans lesquelles elle se trouve, notamment au niveau de la biosynthèse des acides aminés et de la respiration ou métabolisme énergétique. Néanmoins, ces hypothèses sont à confirmer par des études expérimentales dans lesquelles l'espèce est placée dans différentes conditions de stress hydrostatiques afin de tenter de déterminer avec précision quels mécanismes les cellules mettent en œuvre pour résister ou s'adapter aux HPH.

CHAPITRE IV

ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE ET PROTÉOMIQUE DES EFFETS DES HPH

IV.1. Résultats généraux

Afin de répondre aux questions que nous nous posons sur les effets des hautes pressions hydrostatiques (HPH) notamment sur l'espèce piézophile stricte *P. yayanosii* des approches transcriptomiques et protéomiques ont été effectuées. La combinaison des deux approches permettant de tenter de s'affranchir à la fois de problèmes d'extraction de protéines notamment membranaires et de la non proportionnalité entre le niveau d'ARN messager (ARNm) et de protéines (SUN *et al.*, 2010; VOGEL et MARCOTTE, 2012; GUNAWARDANA et NIRANJAN, 2013). La distinction entre les effets adaptations aux HPH et stress du aux HPH a été effectuée en comparant *P. yayanosii* avec l'espèce piézosensible la plus proche, soit *P. furiosus*.

Les deux espèces *P. yayanosii* et *P. furiosus*, ont donc été cultivées en conditions optimales et de stress par rapport à la pression. Ces conditions ont été déterminées par

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

le taux de croissance des espèces dans des conditions similaires de culture en faisant varier la pression (Figure IV.1)

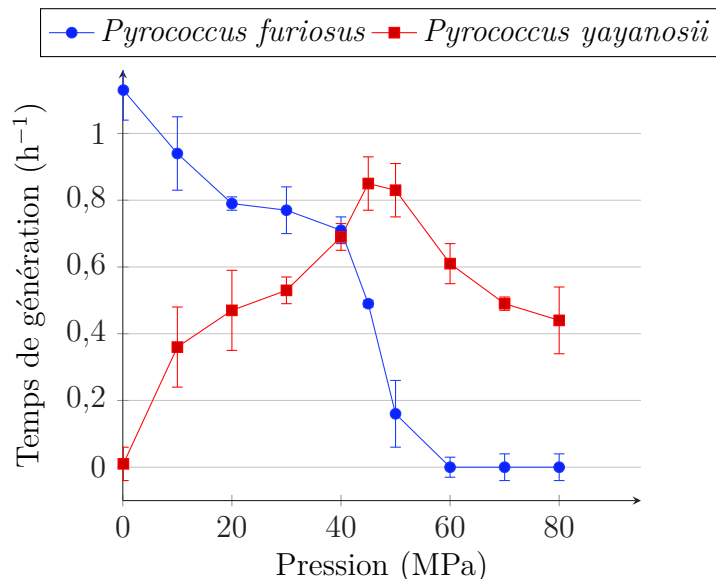


FIGURE IV.1.: Courbes de croissance

Pour *P. yayanosii*, la pression optimale est bien à 52 mégapascal (MPa) comme décrit par BIRRIEN *et al.* (2011), alors que les pressions de stress à la fois sub et supra-optimales sont de 20 et 80 MPa. A ces pressions, le taux de croissance de la souche est diminuée de moitié par rapport au taux de croissance optimale. Pour *P. furiosus*, le taux de croissance optimale se situe à 0,1 MPa et 45 MPa constitue la pression de stress (Figure IV.1). L'analyse des données a été principalement faite en comparant les pressions de stress à la pression optimale (rapport 20-52 MPa, 80-52 MPa pour *P. yayanosii* et 45-0,1 MPa pour *P. furiosus*). Les données sont considérées comme significatives lorsque le fold change (FC) est supérieur à 2, ou inférieur à 1/2 et que le test statistique est fiable (5 % false discovery rate (FDR) : transcriptomique ou p-value 5 % : protéomique)(Section II.4.1 page 74).

En ce qui concerne l'analyse du protéome, 654 et 796 protéines ont été détectées lors de l'expérimentation, ce qui correspond respectivement à 31 % et 42 % des protéomes

de *P. furiosus* et *P. yayanosii*. Ces proportions sont similaires voir supérieures à celles déjà rencontrées chez *T. onnurineus* dans une expérience du même type (30 %) en 2012, ou l'étude était effectuée en comparant l'expression protéique de l'espèce en fonction de différentes sources de carbone (MOON *et al.*, 2012). De façon étonnante au vu de la méthode d'extraction, la proportion de transporteurs membranaires prédits observés est comparable aux résultats obtenus sur le protéome entier, avec 58/224 (26 %) et 81/186 (43 %) de transporteurs respectivement détectés pour *P. furiosus* et *P. yayanosii* (REN *et al.*, 2007). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que seul la moitié de ces transporteurs posséderait des domaines transmembranaires, à cause du fait que la classification des transporteurs compte comme tels des protéines cytosoliques impliquées dans le système ATP-binding cassette (ABC) (KROGH *et al.*, 2001) (Figure III.11 page 104). Les protéines identifiées ont un poids moléculaire moyen d'environ 40 kDa avec un minimum de 4 kDa et un maximum à 200 kDa, ce qui correspond à peu près aux valeurs observées sur le protéome total.

L'analyse de *P. furiosus* montre que 107 gènes et 62 protéines sont sous-exprimés à 45 versus 0,1 MPa alors qu'au contraire 21 gènes et 40 protéines sont sur-exprimés dans les mêmes conditions (Figure IV.2 page suivante). Chez *P. yayanosii*, 84 gènes et 153 protéines sont sur-exprimés à 20 MPa par rapport à 52, alors que 83 gènes et 70 protéines sont sous-exprimés. En ce qui concerne les conditions 80 vs 52 MPa, 138 gènes et 132 protéines sont sur-exprimés et 83 gènes et 77 protéines sont sous-exprimés. Lorsque que l'on compare les deux conditions, c'est-à-dire 20 et 80 MPa versus 52 MPa, nous pouvons observer que 53 gènes et 66 protéines sont sur-exprimés dans les deux conditions alors que 38 gènes et 27 protéines sont sous-exprimés (Figure IV.2 page suivante).

Une analyse rapide de ces données montrent des différences importantes entre *P. furiosus* et *P. yayanosii*, notamment au niveau du pourcentage de gènes ou protéines sous-exprimés. La majorité des éléments régulés chez *P. furiosus* (64 %) sont sous-exprimés

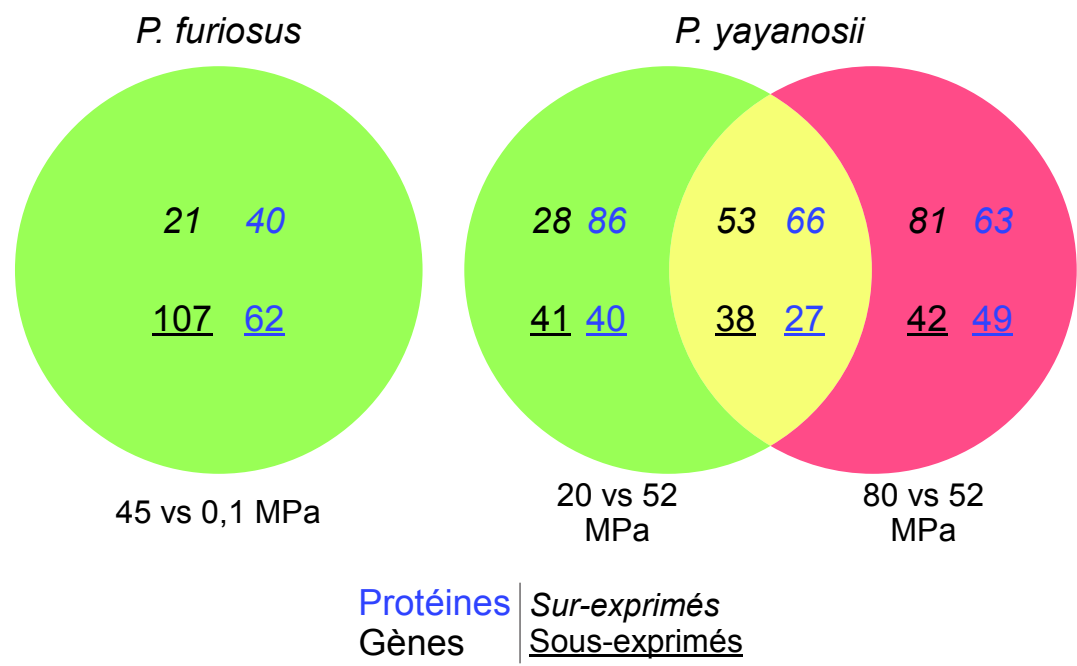


FIGURE IV.2.: Diagramme de Venn présentant les régulations de gènes et protéines observées chez *P. furiosus* et *P. yayanosii*. Les gènes sont en violet et les protéines en bleues. Les éléments sur-exprimés sont en italique et ceux sous-exprimés sont soulignés. Les régulations se font dans le sens 45 vs 0,1 MPa pour *P. furiosus* et 20 et 80 MPa vs 52 MPa pour *P. yayanosii*. 0,1 et 52 MPa étant les pressions optimale et donc les références

en conditions de stress alors que l'inverse est observée chez *P. yayanosii* (38 % d'éléments sous-exprimés). Une donnée intéressante à mentionner à cette analyse concerne les gènes qui sont régulés à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel dans les mêmes conditions de pression et qui sont présentés figure IV.3 page suivante. Fait intéressant, le nombre de gènes régulés à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel dans un sens ou l'autre est faible. Dans le cas de *P. furiosus*, seulement 7 gènes sont sous-exprimés à la fois au niveau transcriptomique et protéomique, deux gènes sont sous-exprimés dans la première condition et sur-exprimés dans la deuxième. Aucun gène n'est à la fois sur-exprimé sous sa forme ARN et protéique. En ce qui concerne *P. yayanosii* et la condition 20 vs 52 MPa, 3 et 5 gènes sont respectivement sur-exprimés et sous-exprimés à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel. Pour la conditions 80 vs 52 MPa, 18 gènes sont sur-exprimés et 18 sont sous-exprimés dans les mêmes conditions. 6 gènes sont sur-exprimés au niveau transcriptionnel et sous-exprimés au niveau traductionnel à la fois en conditions de stress de pression hydrostatique haute et basse. 2 gènes en conditions de basse pression voient leurs transcription réprimée et leurs traductions activée (Figure IV.3 page suivante). Ces résultats montrent que la corrélation entre protéome et transcriptome paraît faible, ce qui est en accord avec la littérature où celle-ci est généralement due aux régulations post-traductionnelles (SUN *et al.*, 2010; VOGEL et MARCOTTE, 2012; GUNAWARDANA et NIRANJAN, 2013).

Les données ont tout d'abord été représentées sur la figure IV.4 page 115. La représentation graphique permet d'observer que les éléments régulés sont à peu près répartis sur tout le chromosome et qu'ils existent des clusters de gènes plus ou moins longs qui sont régulés de la même façon. Fait intéressant concernant *P. yayanosii*, les éléments sous-exprimés en conditions de haute ou basse pression semblent se regrouper dans ces différents cluster tel la région codant pour les sous-unités ribosomales et celle nommée "formate-hydrogénase" qui sera décrit ci-après. Au contraire les éléments

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

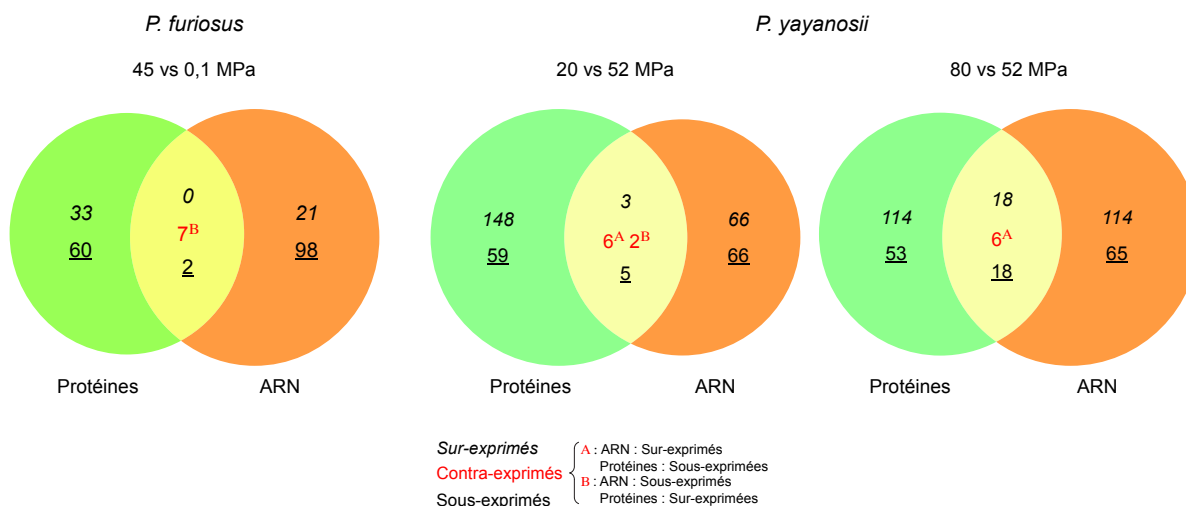


FIGURE IV.3.: Régulations transcriptionnelles et traductionnelles dans les mêmes conditions de pression. Les gènes qui sont à la fois régulés au niveau transcriptionnel et traductionnel sont représentés au centre du diagramme de Venn. Lorsque la régulation est positive au niveau de la transcription et négative pour la traduction, la lettre A est présente, dans le cas contraire, la lettre B est indiquée.

sur-exprimés sont retrouvés tout au long du chromosome, avec une concentration observée pour des clusters de clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs)-CRISPR-associated (*cas*), de sous-unités ribosomales ainsi que des éléments impliqués dans la réplication situés à proximité immédiate de l'origine de réplication. Chez *P. furiosus*, l'inverse est observé ou le nombre d'éléments sur-exprimés est faible et où ceux-ci apparaissent regroupés dans différents clusters tel celui des sous-unités ribosomales (Figure IV.4 page suivante).

Afin de résumer la situation biologique des deux espèces dans différentes conditions de pression, des analyses d'enrichissements ont été effectuées à l'aide des programmes KOBAS et GOLEM en utilisant respectivement les annotations KEGG et les ontologies GO comme décrit précédemment (Section II.4.1 page 74) (XIE *et al.*, 2011; SEALFON *et al.*, 2006; KANEHISA et GOTO, 2000; MAGRANE *et al.*, 2011). L'analyse effectuée avec les annotations KEGG permettant de déterminer quelles sont les voies métaboliques significativement affectées par la pression. Les ontologies GO permettent elles

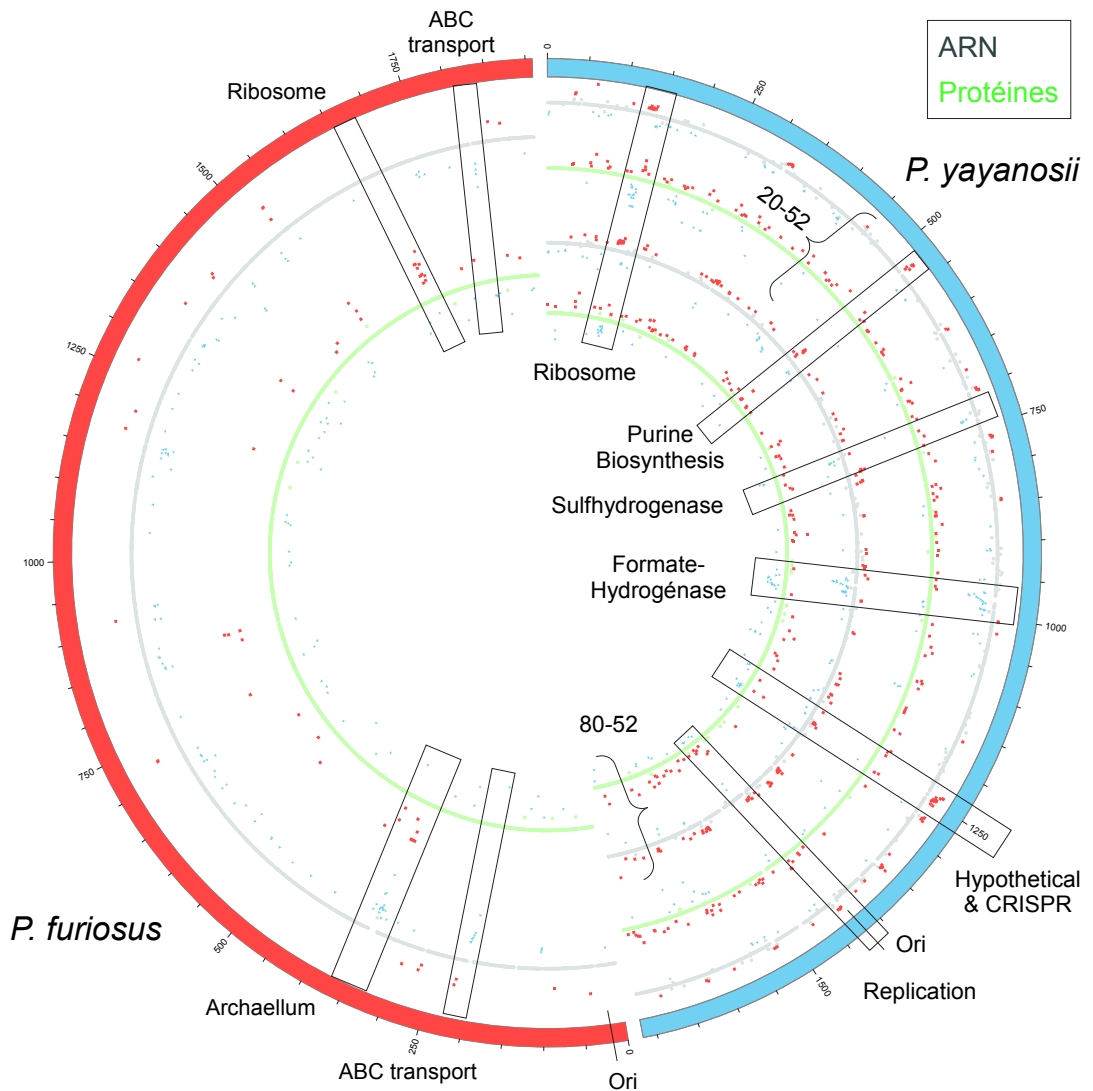


FIGURE IV.4.: Représentation graphique des données transcriptomique et protéomique chez *P. yayanosii* et *P. furiosus*. *P. yayanosii* est représenté en bleu, *P. furiosus* en rouge. Les traits gris représentent les FC obtenues à partir du transcriptome, les traits gris les FC du protéome pour chaque gène. Lorsque le FC est supérieure à 2, les points sont en rouge et lorsqu'il est inférieure à 1/2 les points sont en bleus. Pour *P. furiosus*, le rapport s'effectue entre 45 et 0,1 MPa. Concernant *P. yayanosii*, pour les données extérieurs, les valeurs représentent le rapport 20 sur 52 MPa et les données inférieures le rapport 80 sur 52 MPa comme indiqué sur la figure. Les carrés noirs représentent certains clusters régulés. Figure construite avec le logiciel Circos (KRZYWINSKI *et al.*, 2009)

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

de catégoriser les gènes, ceci afin de déterminer quels types de gènes ou protéines sont affectés par la pression. Les gènes pouvant être compris dans plusieurs catégories GO, le plugin « Enrichment Map » du programme Cytoscape a été utilisé pour regrouper les catégories se superposant entre-elles et ainsi rendre l'interprétation des données plus simple (MERICO *et al.*, 2010; SHANNON *et al.*, 2003). Un exemple de résultat obtenu chez *P. furiosus* à partir de cette méthode est présenté figure IV.5.

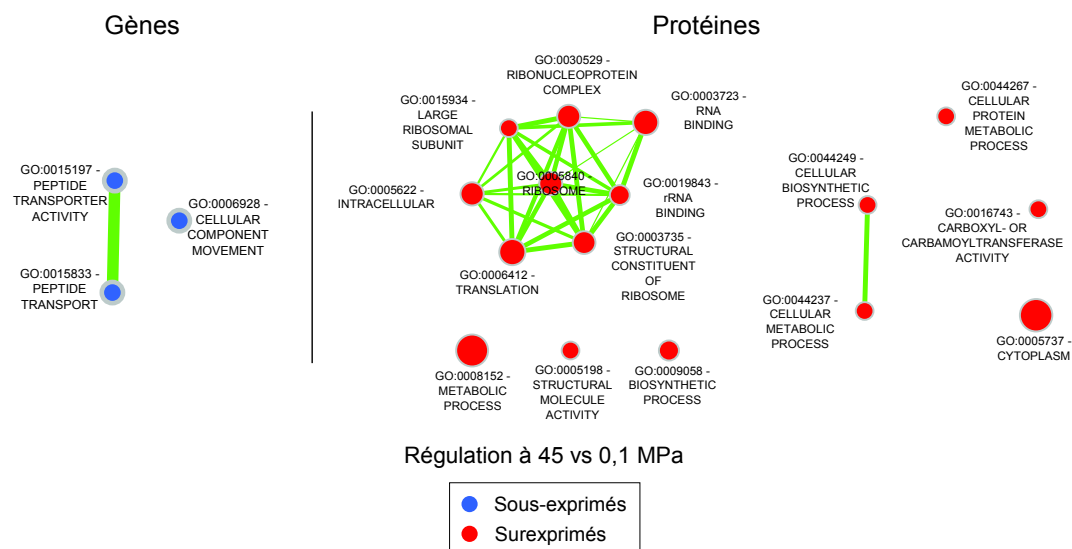


FIGURE IV.5.: Regroupement des catégories GO régulées chez *P. furiosus*. Figure construite avec le plugin « Enrichment Map » du programme Cytoscape (MERICO *et al.*, 2010; SHANNON *et al.*, 2003)

L'analyse des enrichissements sur les données transcriptomiques de *P. furiosus* montre que les ontologies régulées sont toutes sous-exprimées sous HPH et sont impliquées dans le transport de peptides (GO:0015197, GO:0015833) ainsi que dans le mouvement cellulaire (GO:00068928). Au contraire, la même analyse sur les données protéomiques montre que les protéines sont sur-exprimées sous HPH et que les onthologies concernent principalement le ribosome et la traduction (GO:0006412, GO:0005840, GO:0030529, GO:0005622, GO:0015934, GO:0003735, GO:0019843, GO:0003723). Les autres onthologies sont toutes très générales tels celles nommées « metabolic process » (GO:0008152), « structural molecule activity » (GO:0005198), ou « carboxyl- or carbamoyltransferase

activity » (GO:0016743) (Figure IV.5). Cette dernière onthologie regroupant des protéines impliquées dans un grand nombre de fonctions et ne peut donc pas être classée dans une voie métabolique ou une fonction cellulaire particulière tels la biosynthèse d'un acide aminé ou la respiration.

Dans un souci de clarté, les résultats des différentes analyses effectuées à partir des deux méthodes décrites précédemment, sont présentés dans le tableau IV.1 page suivante. Les fonctions principalement affectées par la pression chez *P. furiosus*, sont le transport peptidique et le mouvement cellulaire, dont les gènes sont sous-exprimés en conditions de stress, au contraire les protéines ribosomales sont elles sur-exprimées dans les mêmes conditions. Concernant *P. yayanosii*, les fonctions affectées concerne la respiration par l'intermédiaire d'hydrogénases dont les gènes sont sous-exprimés dans des conditions à la fois sub et supra-optimales de pression. Les protéines impliquées dans le métabolisme du formate ainsi que dans la traduction (sous-unités ribosomales) sont respectivement sous-exprimées à 20 et 80 MPa. Les gènes codant pour la voie du chimiotactisme sont sur-exprimés à basse pression alors que ceux codant pour des sous-unités ribosomales et des ATPases transmembranaires sont sur-exprimés à haute pression. Les protéines sur-exprimées dans des conditions supra-optimales sont impliquées dans la biosynthèse des ARN de transfert (ARNt) ainsi que dans la respiration au niveau des hydrogénases. Certaines protéines possédant une activité oxydoréductases sont aussi sur-exprimées en conditions suboptimales (Tableau IV.1 page suivante)

Des expériences de qRT-PCR ont été effectuées afin de confirmer les résultats des puces à ADN sur des gènes sectionnés caractéristiques des différentes régulations observées (Tableau IV.2 page 119). La plupart des valeurs sont équivalentes entre la puce à ADN et la qRT-PCR confirmant la signification biologique des données transcriptomiques. Néanmoins certaines valeurs de qRT-PCR ne sont pas considérées comme significatives.

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

TABLEAU IV.1.: Résumé des enrichissements GO et KEGG sur *P. furiosus* et *P. yayanosii*. 0,1 et 52 MPa sont les conditions de références. 45, 20 et 80 MPa sont les conditions de stress pour *P. furiosus* et *P. yayanosii* respectivement. UR : sur-exprimés et DR : sous-exprimés.

Espèces	Conditions	Gènes		Protéines	
		DR	UR	DR	UR
<i>P. furiosus</i>	45 vs 0,1 MPa	Transport peptide Déplacement cellulaire			Ribosomes
	20 vs 52 MPa	Hydrogénases	Chimiotactisme	Ribosomes	Biosynthèse des tRNAs Activité Oxydoréductase
<i>P. yayanosii</i>	80 vs 52 MPa	Hydrogénases	Ribosomes ATPases Transmembranaires	Ribosomes Métabolisme du formate	Biosynthèse des tRNAs Hydrogénases

Cela peut s'expliquer par le fait que les valeurs de qRT-PCR sont souvent plus variables que les valeurs de puces à ADN (CHARBONNIER *et al.*, 2005; GARZONI *et al.*, 2007)

Excepté quelques fonctions cellulaires, comme la traduction, les résultats observés semblent montrer peu de similarité entre *P. furiosus* et *P. yayanosii*. Pour cela et dans un souci de clareté, les analyses des deux espèces seront séparés. De même, les différents enrichissements effectués montrent que certains mécanismes cellulaires sont affectés à la fois au niveau transcriptomique et protéomique tel les ribosomes et le métabolisme énergétique (hydrogénase et métabolisme du formate), malgré le faible nombre de gènes régulés à la fois d'un point de vue transcriptionnel et traductionnel (Figure IV.3 page 114). Les données seront donc regroupées pour les différentes analyses.

IV.2. Analyse de *P. furiosus*

IV.2.1. Mobilité

Chez *P. furiosus*, les gènes impliqués dans le mouvement cellulaire sont majoritairement retrouvés dans l'opéron codant pour l'archaellum (PF0330-0341) comme décrit par

TABLEAU IV.2.: Validations par qRT-PCR des données de puces sur *P. yayanosii* et sur *P. furiosus*

<i>P. yayanosii</i>							
Locus	Description	Coordonnées		Puces ADN		qRT-PCR	
				20-52	80-52	20-52	80-52
PYCH_00020	NiFe hydrogenase II subunit	1 016	2 029	-3,96	-3,19	-3,62	-5,52
PYCH_00030	cytochrome-c3 hydrogenase	2 016	2 882	-2,96	-2,83	-3,97	-3,89
PY_HgcF	ARNnc	117 689	117 855	-1,78	1,88	1,09	1,05
PYCH_01430	30S ribosomal protein	132 937	133 569	2,26	3,64	1,9	2,4
PYCH_r10	ARNr 5S	164 226	164 347	-3,27	-1,15	-2,69	-1,16
PY_SscA	ARNnc	235 125	235 218	1,38	3,46	1,88	5,77
PYCH_05460	hypothetical protein	452 227	452 766	2,21	-2,54	2,82	-2,15
PYCH_06240	ribulose-1,5-biphosphate synthetase	524 514	525 272	2,2	2,13	3,25	1,95
PYCH_06250	Thiamine biosynthesis protein	525 353	526 645	5,3	7,05	3,18	2,25
PYCH_08570	Transposase	755 521	756 726	-1,55	1,19	-1,05	1,24
PY0867_0868	Espace Intergénique	765 083	765 369	4,5	8,91	2,35	2,45
PYCH_09590	<i>cas4</i>	847 106	847 621	2,23	2,96	12,34	8,94
PYCH_11050	formate hydrogenlyase II subunit	974 097	975 539	-9,25	-9,87	-12,35	-4,08
PYCH_11070	formate hydrogenlyase II subunit	976 760	978 814	-5,64	-4,94	-27,78	-3,76
PYCH_11420	NADH dehydrogenase subunit	1 004 080	1 005 255	2,08	2,38	1,75	2,11
PYCH_11930	alanine aminotransferase	1 051 537	1 051 764	1,01	1,21	1,15	1,46
tRNA-His	ARNt	1 128 139	1 128 216	-5,19	-2,98	-2,82	-3,62
PYCH_17100	maltodextrin transport - permease	1 522 525	1 523 466	2,04	3,04	1,71	1,9
PYCH_17110	maltodextrin transport - permease	1 523 463	1 524 704	1,92	2,7	1,26	2
PY_HgcC_23	ARNnc	1 553 652	1 553 778	-1,1	3,04	-1,22	2,27
tRNA-Arg	ARNt	1 644 426	1 644 503	-2,21	-1,24	-2,96	-1,95
PY_snoPyro	ARNnc	1 682 881	1 682 938	-1,06	-1,23	-1,32	-1,62
<i>P. furiosus</i>							
Locus	Description	Coordonnées		Puces ADN		qRT-PCR	
				45-0,1 MPa		45-0,1 MPa	
PF0330	flagella accessory protein	344 148	345 854	-2,25		-2,94	
PF0338	flagellin b2 precursor	351 748	352 341	-3,21		-2,58	
PFA0338_0339	Intergenic space	352 342	352 469	-12,39		-2,38	
PF0340	putative HTH transcription regulator	353 433	353 759	-21,55		-4,22	
PF0634	DEXX-box atpase	645 887	647 263	-2,84		-2,71	
PF0728	hypothetical protein	724 074	724 715	3,84		2,99	
PF0729	protein containing iron-sulfur region	724 719	725 885	3,69		9,74	
PF0863	hypothetical protein	838 710	839 225	-2,4		-1,34	
PFS1096_1097	Intergenic space	1 043 928	1 044 056	1		1,01	
PF1246	sarcosine oxidase, subunit beta	1 179 929	1 181 077	-1,01		-1,72	
PF1409	dipeptide transport system permease	1 324 943	1 325 941	-2,01		-2,05	
PF1410	dipeptide transport system permease	1 325 953	1 327 104	-2,21		-2,36	
PF1969	sugar ABC transporter, permease	1 818 064	1 818 897	-3,81		-2,08	
PF1970	sugar-binding transport protein	1 818 876	1 819 997	-2,82		-2,56	

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

JARRELL et ALBERS (2012) (Figure IV.6 page suivante). La sous-expression de ce cluster au niveau transcriptionnel à haute pression hydrostatique est corrélée avec la réponse physiologique de micro-organismes piézosensibles comme *E. coli* à la pression, où la mobilité est le premier paramètre inhibé (MEGANATHAN et MARQUIS, 1973). L'effet de cette régulation chez *P. furiosus* pourrait être plus important que chez *E. coli*, notamment à cause du fait que les *Thermococcales* nagent beaucoup plus vite que *E. coli* (400-500 contre 20 bodies per second (bps))(HERZOG et WIRTH, 2012) sans doute du à l'instabilité de leur environnement. Fait intéressant, les gènes PF0339-41 qui ne font à priori pas partie de l'archaeallum sont régulés de la même façon. Ces trois gènes sont conservés dans le cluster de l'archaeallum chez les *Pyrococcus* séquencées. Le gène PF0339 code pour une méthyltransferase, PF0340 pour un facteur de transcription possédant un domaine helix-turn-helix (HTH) et PF0341 code pour une protéine hypothétique. Cette dernière possède des domaines Nup54 et ISG65-75 qui correspondent à une nucléoporeine et une glycoprotéine membranaire chez l'homme et un parasite (trypanosome) (HU *et al.*, 1996; TRAN *et al.*, 2008). Cette protéine ne possède pas de domaine transmembranaire, il est donc possible qu'elle se situe à proximité de la membrane et joue un rôle dans la glycosylation de protéines. L'opéron de l'archaeallum est sans doute contrôlé par le gène PF0340, un facteur de transcription en aval de celui-ci. Les effets de cette sous-expression des gènes sont néanmoins à nuancer, du fait de la sur-expression de certaines protéines au sein de ce même cluster (PF0331, 335-6, 339, 341)(Figure IV.6 page ci-contre). Ces protéines correspondent aux protéines FlaC, FlaD/E et FlaI. Les autres protéines du cluster n'ont pas été identifiées durant l'analyse protéomique, excepté la protéine FlaJ qui n'est pas régulée significativement. La protéine FlaI est une ATPase active dans l'assemblage et le mouvement de la structure cellulaire, alors que FlaC et FlaD/E interagiraient avec la voie responsable du chimiotactisme, même si *P. furiosus* ne semble pas la posséder (MAEDER *et al.*, 1999; SCHLESNER *et al.*, 2009). La protéine FlaJ quand à elle agirait

comme support membranaire à FlaI lui permettant d'assembler la structure de l'archaellum. Ces résultats pourraient indiquer que sous HPH, *P. furiosus* augmenterait le nombre de protéines assemblant l'archaellum par régulation post-transcriptionnelle afin de compenser l'effet de la pression sur les structures complexes tels les structures quaternaires. Une observation en microscopie électronique à transmission (MET) des cellules de *P. furiosus* à 0,1 et 45 MPa montre une baisse significative du nombre d'archaellum à 45 MPa (Figure IV.7 page suivante) suggérant que l'augmentation des protéines assemblant l'archaellum ne soit pas suffisante pour compenser les effets des HPH sur leur structure.

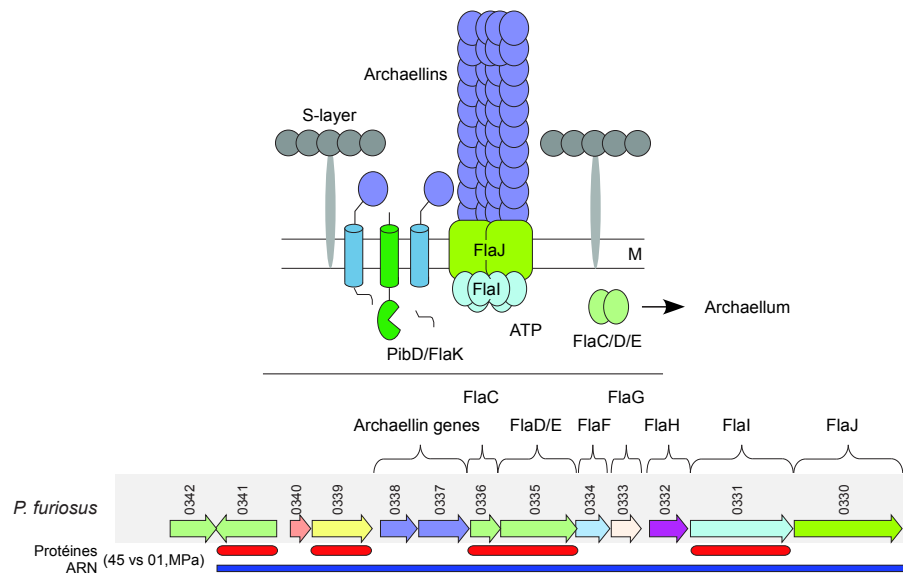


FIGURE IV.6.: Schéma et opéron de l'archaellum régulé chez *P. furiosus* à 45 MPa par rapport à 0,1 MPa. Les flèches représentent les gènes, les ovales la régulation protéomique et les rectangles la régulation transcriptomique. La couleur rouge indique la sur-expression alors que la bleue indique la sous-expression.

IV.2.2. Transport

Les gènes impliqués dans le transport de peptides chez *P. furiosus* sont eux aussi sous-exprimés au niveau transcriptionnel sous HPH ; ces gènes sont retrouvés dans deux

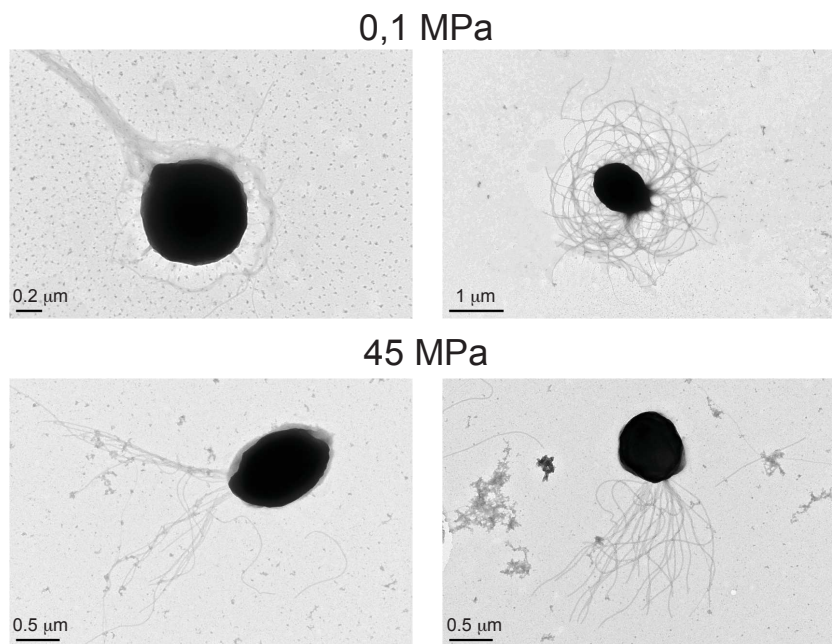


FIGURE IV.7.: Observation en MET de cellules de *P. furiosus* à 0,1 et 45 MPa

clusters PF0190-196 et PF1409-1412. Ces deux clusters sont classifiés comme appartenant à la superfamille des transporteurs ABC par la base de données Transportdb (REN *et al.*, 2007) et transporterait des dipeptides/oligopeptides au travers la membrane. Une étude effectuée sur les transporteurs ABC d'archées et notamment chez *P. furiosus*, a montré que ces transporteurs étaient activés lorsque la cellule était cultivée sur peptides et pyruvate (ALBERS *et al.*, 2004). le groupe de transporteur PF1409-1412 est aussi induit après culture sur cellulose et maltose. La sous-expression de ces gènes qui n'est pas retrouvée au niveau protéique, pourrait indiquer qu'en conditions de stress, *P. furiosus* tente d'économiser son énergie en réduisant l'importation de composés non essentiels à la cellule. Parmi les autres transporteurs régulés, les gènes de tous ou partie des clusters activés en présence de caséine et peptone, sont sous-exprimés selon l'étude de ALBERS *et al.* (2004) (PF1209 et PF1967-70). Ces résultats tendent à confirmer le fait que la régulation de ces transporteurs soit un moyen pour la cellule d'économiser son énergie en entrant dans une période de latence. La seule exception est l'ATPase PF1933

faisant partie d'un opéron (PF1933, 36-38) transportant des maltodextrines (LEE *et al.*, 2009). La forme protéique de cette ATPase est sur-exprimée en conditions de stress, alors que les autres protéines du cluster sont membranaires et non pas été observées au cours de l'expérimentation. Une hypothèse possible est le fait qu'à HPH, *P. furiosus* tente d'importer des sucres au lieu de peptides. La non-régulation des protéines des précédents clusters est peut-être due au fait que le milieu de culture ne comprend pas de sucres, excepté à l'état de traces dans l'extrait de levure. Une culture de *P. furiosus* en présence de sucres tels l'amidon ou le maltose dans les mêmes conditions serait intéressante et pourrait confirmer cette hypothèse de changement de substrat importé dans la cellule. Deux gènes de transporteurs sur-exprimés sont impliqués dans l'export « multidrug export » (PF0262 et PF1350). Les autres transporteurs régulés sont sous-exprimés et transportent des protons (gène PF1882 et protéine PF0179) ou des ions métalliques (protéines PF1286, PF1325, PF1763). La cellule semble ainsi tenter d'éliminer les sous-produits issus du ralentissement du métabolisme créée par l'effet de la pression.

IV.2.3. Traduction

Les gènes codant pour les protéines ribosomales de *P. furiosus* sont sur-exprimées au niveau traductionnel sous HPH, spécialement les sous-unités 50S (PF1803, PF1805-08, PF1814, PF1820, PF1822 and, PF1824-25) (Figure IV.8 page suivante). De façon intéressante, un facteur d'initiation de la transcription (PF1817) présent au milieu de l'opéron 30S-50S (PF1802-27) est lui sous-exprimé sous HPH. Ce facteur possède un domaine protéique SUI1 qui est impliqué dans la reconnaissance par le ribosome du site d'initiation de la traduction (YOON et DONAHUE, 1992). La dérégulation de cette protéine pourrait indiquer qu'elle est moins utile à cause de l'effet déstabilisateur de la haute pression sur les structures quaternaires (OGER et JEBBAR, 2010). La sur-

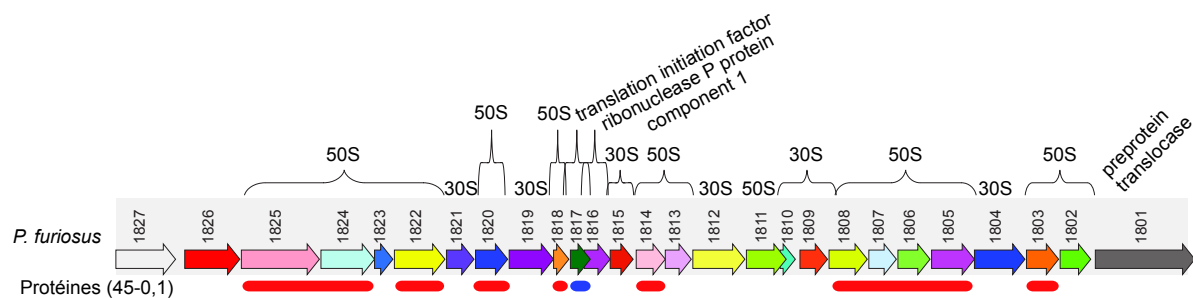


FIGURE IV.8.: Cluster ribosomiques de *P. furiosus*. Les flèches représentent les gènes, et les ovales la régulation protéomique. La couleur rouge indique la sur-expression alors que la bleue indique la sous-expression des conditions indiquées sur la gauche.

expression des sous-unités protéiques 50S serait alors une réponse à la déstabilisation de la structure ribosomale sous HPH comme décrit chez *E. coli* (NIVEN *et al.*, 1999).

IV.3. Analyse de *P. yayanosii*

IV.3.1. Chimiotactisme

Chez *P. yayanosii*, certains gènes codant pour le chimiotactisme (PYCH_15450-490) sont sur-exprimés au niveau transcriptionnel à 20 et 80 MPa par rapport à 52 MPa, la pression optimale (Figure IV.9 page 126). Ces gènes codent pour les protéines CheA, deux CheC et une membrane cofactor protein (MCP) (Section I.6.1 page 22). Pour rappel, la protéine MCP agit comme un récepteur de stimulus et entraîne l'autophosphorylation de l'histidine kinase CheA. Le phosphate est alors utilisé comme substrat pour la protéines CheY, dont le gène (PYCH_15430) n'est pas sur-exprimé différentiellement (FC = 1,6). La protéine CheC hydrolyse CheY et est relié à l'archaellum par un mécanisme encore inconnu chez les archées (SZURMANT et ORDAL, 2004). Deux modes de nages existent, dans le premier l'archaellum ou la flagelle tourne dans le sens des aiguilles d'une montre, ce qui permet à la cellule d'avancer en ligne droite. Durant le second mode de nage, la structure tourne dans le sens contraire des aiguilles d'une montre

et la cellule change de direction. Différentes études chez les bactéries, dont la structure du chimiotactisme est proche de celle des archées, ont montré que lorsque CheA ou CheY étaient sur-exprimées la probabilité de changement de mode de nage augmentait fortement (SZURMANT et ORDAL, 2004; BERG, 2003). La sur-expression de ce cluster chez *P. yayanosii* pourrait indiquer une augmentation des rotations en sens anti-horaire de l'archaellum et donc un moyen pour les cellules de se déplacer vers des pressions plus adaptées à leurs physiologie (52 MPa dans ce cas). Cette sur-expression est en accord avec une étude récente montrant que chez *E. coli*, les HPH ont le même effet sur la rotation du flagellum qu'une augmentation de la concentration de CheY phosphorylé (NISHIYAMA *et al.*, 2013). Ces effets doivent être mis en relation avec la vitesse des événements hydrothermaux (1-2 m/s) qui pourraient facilement propulser les cellules à des profondeurs différentes (HERZOG et WIRTH, 2012). Il est aussi possible de considérer que les HPH aurait un effet indirect sur ce mécanisme en causant probablement une précipitation de certains constituants ou nutriments en présence de soufre qui agirait directement sur le sens de rotation de l'appareil de mobilité cellulaire.

IV.3.2. Transports

Certains transporteurs ABC sont aussi régulés au niveau traductionnel chez *P. yayanosii*, dont deux transporteurs de dipeptides/oligopeptides PYCH_03130-170, et PYCH_15860-900 qui sont orthologues aux clusters PF1408-12 et PF0190-196 de *P. furiosus* décrits précédemment. Certaines protéines de ces deux clusters sont sous-exprimées en basse pression (4/5 et 2/3). Une partie est aussi sur-exprimée à 80 MPa concernant le groupe PYCH_03130-170 (3/5) alors que seulement un gène l'est aussi concernant l'autre groupe (PYCH_15890). De la même manière que chez *P. furiosus*, les gènes d'un transporteur de sucre (PYCH_17080, 10-11, 13) sont sur-exprimés d'un point de vue transcriptionnel sous HPH, ce transporteur est orthologue aux gènes PF0116-9 de *P. fu-*

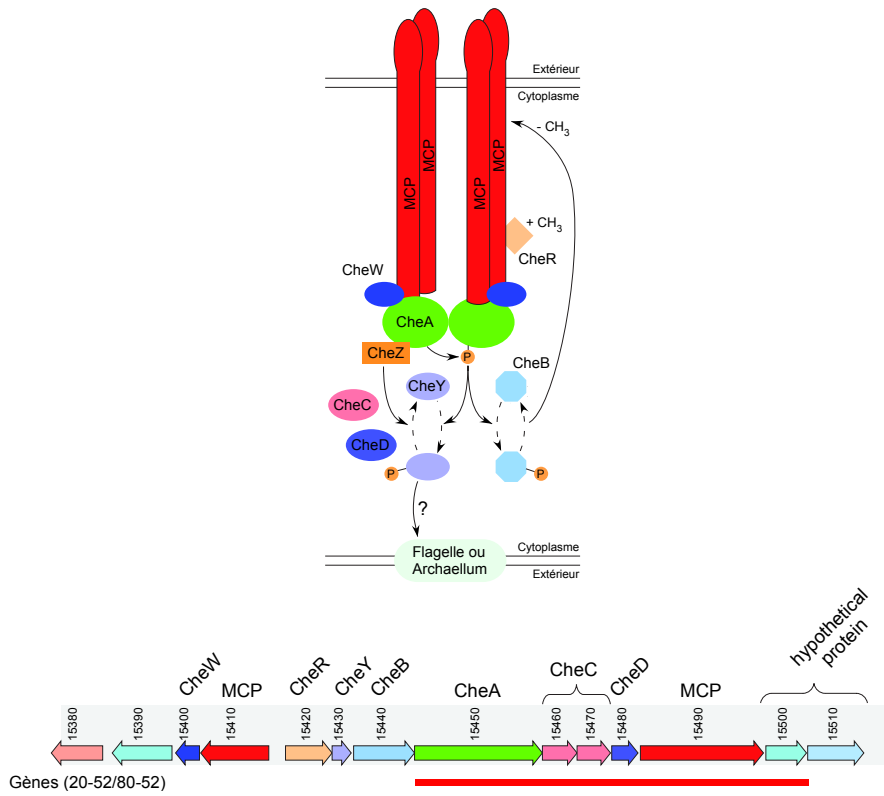


FIGURE IV.9.: Régulation du chimiotactisme chez *P. yayanosii*. Les flèches représentent les gènes, les rectangles la régulation transcriptomique. La couleur rouge indique la sur-expression pour les rapport de pression indiqués sur la gauche.

riosus, qui ne sont pas régulés sous pression ou en présence de différents éléments tels le maltose ou de peptides (ALBERS *et al.*, 2004). Un certain nombre de transporteurs dit « multidrug export » ou ceux ions métalliques sont sous-exprimés sous très haute pressions (PYCH_00220-30, PYCH_02400, PYCH_11800, PYCH_12810, et PYCH_13780-90). Les gènes PYCH_08880-90 codant pour un transporteur de cluster Fe-S sont eux aussi sur-exprimés à 80 MPa. L'analyse des transporteurs de *P. yayanosii* montre que la cellule sous très haute pression augmente leur nombre, qu'ils transportent des sucres ou des peptides. Cette adaptation peut suggérer que l'activité de ceux-ci soit réduite sous HPH du fait de la rigidification de la membrane, par exemple, d'où la nécessité d'augmenter leur nombre afin de compenser cette baisse d'efficacité. Fait intéressant, seulement 4 transporteurs ABC sont sur-exprimés au niveau transcriptionnel à 20 MPa (PYCH_08890, PYCH_15890, PYCH_16600 et PYCH_17100). Trois de ces gènes codent pour des transporteurs de sucres posant la question de l'effet de la basse pression sur la souche au niveau métabolique.

IV.3.3. Traduction

L'opéron comprenant les protéines ribosomales est de même que chez *P. furiosus* aussi partiellement régulé en conditions de stress chez *P. yayanosii* (80 et 20 vs 52 MPa). Contrairement à *P. furiosus*, une partie des gènes de l'opéron sont sur-exprimés (PYCH_01380-90, PYCH_01410-60, PYCH_01490-550 et, PYCH_01570-90) alors que les protéines sont sous-exprimées (PYCH_01370-80, PYCH_01400-20, PYCH_01480-90, PYCH_01510, PYCH_01540-70 et, PYCH_01590-600)(Figure IV.10 page suivante). Les régulations observées se font à la fois au niveau des sous-unités 30S et 50S, bien que le fait que les régulations ne comprennent pas tous le cluster pose question. Le gène du facteur de transcription PYCH_01450 est contrairement à *P. furiosus* régulé de la même façon que le reste du cluster. Les réponses inverses observées entre *P. furiosus* et *P. yaya-*

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

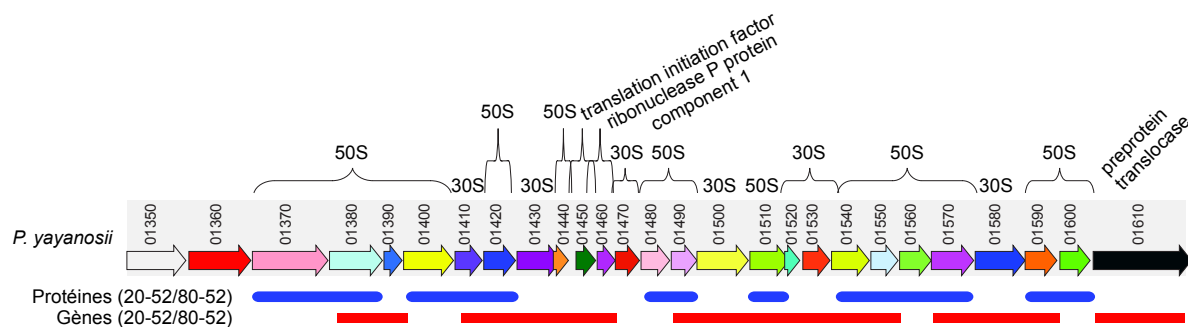


FIGURE IV.10.: Cluster ribosomaux de *P. yayanosii*. Les flèches représentent les gènes, les ovales la régulation protéomique et les rectangles la régulation transcriptomique. La couleur rouge indique la sur-expression alors que la bleue indique la sous-expression des conditions indiquées sur la gauche.

nosii semblent montrer que la régulation des sous-unités ribosomales soit bien des réponses de stress chez ces deux espèces et que celles-ci ne les gèrent pas de la même façon.

P. yayanosii comme les autres *Pyrococcus*, possède toute les aminoacyl-ARNt synthétases nécessaires pour catalyser la formation des aa-ARNt à partir des ARNt par aminoacylation directe. Parmi les 24 aminoacyl-ARNt synthétases (2 sous-unités pour l'amidotransférase ARNt-Gln (PYCH_11560-70) et pour la synthetase ARNt-Phe (PYCH_10260-70)), 15 sont sur-exprimées au niveau traductionnel dans des conditions stressantes (Tableau IV.3 page 130). Ces protéines sont impliquées dans la biosynthèse des aa-ARNt du glutamate, aspartate, asparagine, glycine, sérine, méthionine, valine, leucine, isoleucine, lysine, arginine, proline, tyrosine et tryptophane (PYCH_00680, PYCH_02710, PYCH_03070, PYCH_03590, PYCH_04180, PYCH_05570, PYCH_05590, PYCH_08110, PYCH_09250, PYCH_09360, PYCH_09490, PYCH_10500, PYCH_13210, PYCH_13620, PYCH_16780). Excepté pour la synthetase tRNA-Cys (PYCH_17450) qui n'a pas été détectée durant l'expérience, les autres protéines impliquées dans la synthèse de l'alanine, thréonine, cystéine, et phénylalanine ne sont pas significativement régulées. Fait intéressant, 14 ARNt sont sous-exprimés à basse pression, ils sont impliqués dans la biosynthèse de l'arginine, asparagine, acide glutamique,

glutamine, histidine, leucine, lysine, méthionine, serine, et thréonine (Tableau IV.3). La régulation des ARNt synthétases ainsi que des ARNt ne semble pas corrélée avec la présence ou non des voies de biosynthèse des acides aminés. La sur-expression des ARNt synthétases suggère une baisse d'activité de celles-ci dues aux pressions sub et supra-optimales qui serait alors contrebalancée par une augmentation de leur nombre dans la cellule. L'activité de ces enzymes sous HPH a uniquement été mesurée chez *E. coli*, ou celle-ci diminue fortement à partir de 10 MPa (HILDEBRAND et POLLARD, 1972). Il serait intéressant de mesurer l'activité de ces enzymes chez *P. yayanosii*, notamment à basse pression afin de déterminer si leur activité est corrélée avec leur pression optimale, c'est-à-dire 52 MPa. Dans ce cas-là leur activité devrait baisser à des pressions faibles. La sous-expression des ARNt est corrélée avec celle des sous-unités protéiques des ribosomes à basse pression, ce qui sous entend une diminution de la traduction et une baisse d'activité cellulaire à 20 et 80 MPa.

IV.3.4. Respiration et métabolisme énergétique

Excepté pour les ribosomes et la biosynthèse des ARNt, la plupart des éléments régulés par la HPH chez *P. yayanosii* ont un lien avec la membrane, comme les gènes impliqués dans le chimiotactisme. Les gènes codant pour des ATPases transmembranaires sont aussi sur-exprimés d'un point de vue transcriptomique à 80 MPa par rapport à 52 MPa (PYCH_15710-60). Ces gènes sont des sous-unités d'une V-ATPase qui fonctionne comme un générateur de gradient de protons conduisant à l'accumulation de solutés (LAU et RUBINSTEIN, 2010). Par ailleurs, il a été montré que l'acidification du cytosol chez les levures due aux HPH avait un impact négatif sur la glycolyse et qu'une ATPase permettait d'augmenter le pH cytosolique en transportant les ions H^+ vers les vacuoles (ABE et HORIKOSHI, 1998; SERRANO, 1989). Dans notre cas, la sur-expression des gènes

TABLEAU IV.3.: Récapitulatif de la régulation de la voie de biosynthèse des ARNt chez *P. yayanosii*. La première colonne indique si l'espèce semble capable de synthétiser l'acide aminé (Vert). La régulation des protéines d'ARNt synthétases et des ARNt est indiqué par un signe +. L'absence de régulation est indiqué par un signe -. La sur-expression en conditions de stress est caractérisée par la couleur rouge, la sous-expression par la couleur bleu.

Acide aminé	Voie de biosynthèse	ARNt-synthétase	ARNt
Alanine	+	-	-
Arginine	-	+	+
Asparagine	+	+	+
Acide aspartique	+	+	+
Cystéine	+	-	-
Glutamine	+	-	+
Acide glutamique	+	+	+
Glycine	+	+	-
Histidine	-	+	+
Isoleucine	-	+	-
Leucine	-	+	+
Lysine	-	+	+
Méthionine	?	+	+
Phénylalanine	-	-	-
Proline	-	+	-
Sérine	+	+	+
Thréonine	+	-	+
Tryptophane	-	+	-
Tyrosine	-	+	-
Valine	-	+	-

de cette ATPases pourrait permettre la régulation du pH intracellulaire par gradient de protons, lorsque la cellule est soumise à des fortes HPH.

L'une des principales voie métabolique régulée chez *P. yayanosii*, que ce soit d'un point de vue transcriptomique ou protéomique, est la voie énergétique avec des hydrogénases couplée au métabolisme du formate. Comme nous l'avons vu précédemment, les hydrogénases chez les *Thermococcales* sont classées en différents clusters Mbh, SHI, SHII, Mbx (Section I.7.2). L'expression du cluster Mbh qui correspond aux gènes PYCH_11230-360 est décrit dans le paragraphe suivant. Le cluster Mbx (PYCH_11410-53) n'est lui pas régulé excepté les gènes PYCH_11410-20 qui sont sur-exprimés dans les mêmes conditions. Les clusters SHI (PYCH_00010-40) et SHII (PYCH_08370-400) sont quand à eux sous-exprimés au niveau transcriptionnel en conditions de stress de pression hydrostatique à la fois sub et supra-optimales. *P. yayanosii* possède aussi un cluster responsable du métabolisme du formate qui est régulé sous pression. Dans les sources hydrothermales, le formate provient de micro-organismes methanogènes, tels les *Methanococcales* (e.g., *Methanocaldococcus* et *Methanothermococcus*) et les *Methanopyrales* (i.e., *Methanopyrus*) qui utilisent la voie réductrice de l'acétyl-CoA pour fixer le carbone. La première étape de cette voie consiste en la réduction de CO₂ en formate par une Formate dehydrogenase (NADP(+))(EC :1.2.1.43) que ne possède pas *P. yayanosii* (MINIC et THONGBAM, 2011).

Le principal cluster (PYCH_10960-11360) régulé sous pression code pour le métabolisme du formate (fdh2-mfh2-mnh2 cluster : PYCH_11030-200) et comprend l'opéron Mbh (PYCH_11230-11350)(Figure IV.11 page 133). Ce cluster ne présente pas tel quel d'homologie avec d'autre *Thermococcales*. Chez *T. onnurineus* par exemple, ce cluster est divisé en plusieurs parties au travers du génome. Les gènes qui sont sous-exprimés d'un point de vue transcriptomique en condition de haute et basse pression codent pour un coenzyme F420 hydrogenase (PYCH_10960-70), de formate déhydrogenase (PYCH_-

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

10990, PYCH_11030), une formate hydrogenlyase (PYCH_11050-110), des protéines 4Fe-4S cluster binding proteins (PYCH_11040, PYCH_11220), et une partie du cluster Mbh. Certaines protéines sont aussi sous-exprimés dans les mêmes conditions et sont des formates déshydrogenases (PYCH_10990, PYCH_11030), des sous-unités de formate hydrogenlyases (PYCH_11070, PYCH_11090), un complexe membranaire (PYCH_11170), une oxydo-réductase (PYCH_11210), et le cluster Mbh (Figure IV.11 page ci-contre). Les éléments régulés ne faisant pas partie des deux clusters fdh2-mfh2-mnh2 et mbh sont annotés en tant que Coenzyme F420 hydrogenase (PYCH_10960-70) et Pyridine nucleotide disulfide oxydo-réductase (PYCH_11210). Les Coenzyme F420 hydrogenases sont retrouvés chez des méthanogènes et sont impliqués dans la conservation d'énergie par l'oxydation de protons H_2 afin de créer des formes réduites de coenzyme F420 (BARON et FERRY, 1989). Chez les *Thermococcales*, la fabrication de protons H_2 par ces hydrogenases pourrait être une façon de maintenir le potentiel redox de la cellule durant la culture sur formate (LEE *et al.*, 2008). La Pyridine nucleotide disulfide oxydo reductase est impliquée dans le transfert d'électrons entre des pyridine nucleotides et des composés soufrés. Le couple PYCH_11210-20 comprenant cette enzyme avec une protéine contenant 4 motifs Fe-S servirait de gradient électrochimique afin de coupler l'oxydation de NAD(P)H à la production d' H_2 durant la fermentation de peptides (SCHUT *et al.*, 2012).

La sous-expression de ce cluster à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel dans des conditions stressantes pour la cellule suggère que dans des conditions optimales, la cellule possède au moins deux façons de produire les ions H^+ nécessaires pour la respiration, à la fois par l'intermédiaire du métabolisme du formate et à la fois par l'hydrogénase Mbh. Au contraire, lorsque *P. yayanosii* est placé dans des conditions stressantes, l'effet de la pression inhiberait le transport de formate et empêcherait ainsi son métabolisme. En ce qui concerne le cluster Mbh, chez *P. furiosus*, lorsque du soufre

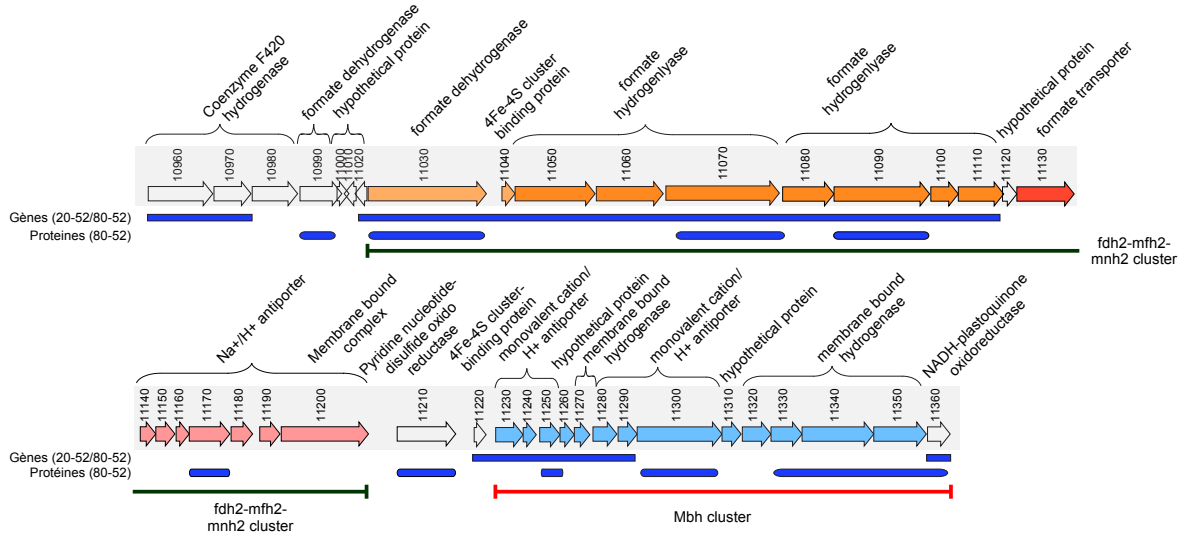


FIGURE IV.11.: Régulation du cluster du formate et des hydrogénase de *P. yayanosii*. Les flèches représentent les gènes, les ovales la régulation protéomique et les rectangles la régulation transcriptomique. La couleur rouge indique la sur-expression alors que la bleue indique la sous-expression des conditions indiquées sur la gauche. La barre verte correspond au cluster fdh2-mfh2-mnh2 décrit chez *T. onnurineus* et responsable du métabolisme du formate (KIM *et al.*, 2010). La barre verte correspond au cluster Mbh décrit chez *P. furiosus* et impliqués dans la réduction de protons en H₂ (SCHUT *et al.*, 2012).

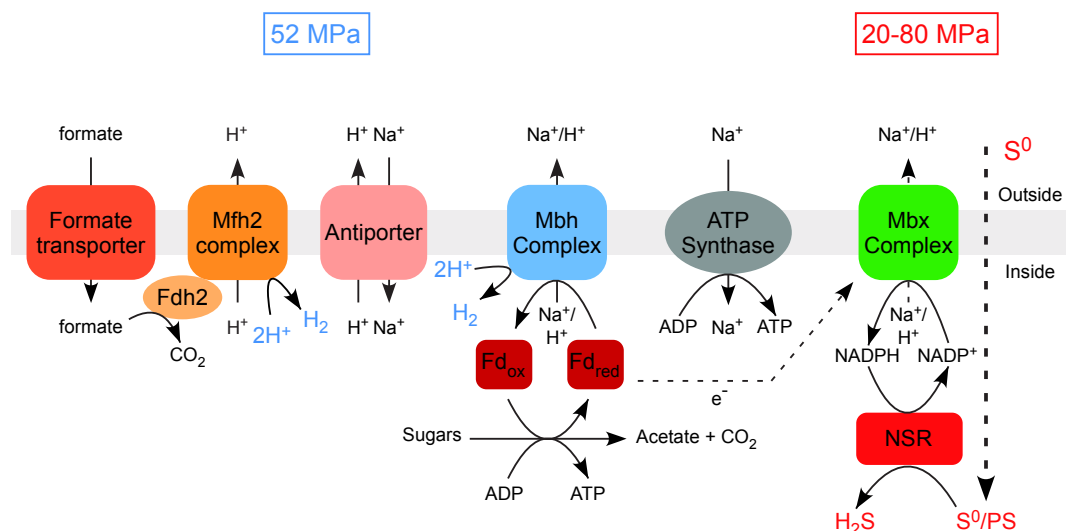


FIGURE IV.12.: Représentation schématique du rôle des clusters fdh2-mfh2-mnh2, Mbh and Mbx dans la production d'ions H^+ chez *P. yayanosii*. L'antiporter correspond à la partie mnh2 du cluster du formate. Fd_{ox} et Fd_{red} correspondent respectivement à la forme oxydée ou réduite de la ferredoxine. Inspiré de SCHUT *et al.* (2012); KIM *et al.* (2010).

est ajouté celui-ci est dérégulé et remplacé par le cluster Mbx. Or chez *P. yayanosii*, une partie de ce cluster est sur-exprimé au niveau transcriptionnel, de même que les gènes codant pour la protéine NSR (PYCH_07890) et Pdo (PYCH_16300) sont elles aussi sur-exprimées d'un point de vue traductionnel.

Ces résultats suggèrent donc qu'il se produit un shift de production d'énergie entre conditions optimale de pression et conditions de stress hydrostatique. Ces effets seraient pour partie similaire à l'addition de soufre chez *P. furiosus*, malgré l'absence du cluster de formate chez cette dernière (SCHUT *et al.*, 2012). La figure IV.12 propose une représentation schématique de ce shift métabolique.

IV.3.5. CRISPR-cas

P. yayanosii compte 3 principaux clusters de CRISPRs et cas qui de façon intéressante ne sont pas régulés de la même façon (Figure IV.13 à IV.14 pages 135–136). Certains gènes du cluster PYCH_07940-8060 (ilot génomique yaya_4), qui est unique à cette

espèce sont sur-exprimés au niveau transcriptomique à basse pression. Les gènes régulés (PYCH_07990-8030) sont tous des gènes *cas*, excepté PYCH_07990 qui a été annoté comme une protéine hypothétique mais qui possède un domaine RAMP retrouvé chez des gènes *cas*. Un autre cluster régulé à la fois à haute et basse pression au niveau transcriptionnel, est composé des gènes PYCH_09730-530 dont seulement 3 sont sur-exprimés à 20 et 80 MPa (PYCH_09580-600). Ces 3 gènes codent pour des *cas* et sont homologues avec les gènes PF1118-20 de *P. furiosus*, comme décrit sur la figure IV.13. Une partie des gènes de ce cluster chez *P. furiosus* sont sous-exprimés d'un point de vue traductionnel à haute pression mais ces protéins (PF1124, 28-29) ne sont pas orthologues à ceux de *P. yayanosii*. La régulation différentielle de ces clusters semble appuyer l'hypothèse selon laquelle ces régions ont été soumises à de forts réarrangements en lien avec les potentielles infections virales (NELSON *et al.*, 1999).

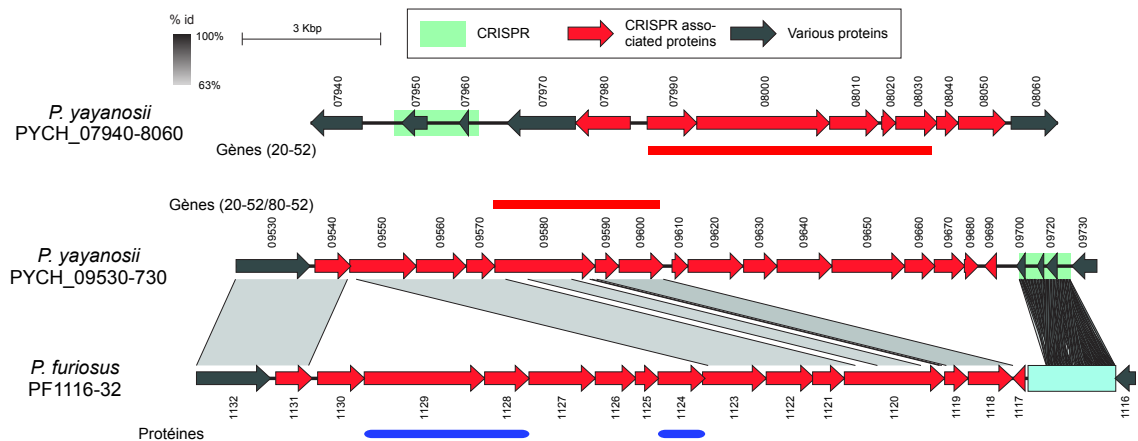


FIGURE IV.13.: Cluster des CRISPR et *cas* régulés chez *P. yayanosii*

Une région génomique comprenant le système CRISPR-*cas* présente un intérêt particulier au niveau de sa régulation (PYCH_14110-590). Cette région peut être divisée en 3 parties, l'ancienne intégration d'un plasmide (PYCH_14110-300), une région intermédiaire (PYCH_14310-420) et enfin le système CRISPR-*cas* (PYCH_14430-590) (Figure IV.14 page suivante). La première partie de la région a été décrite précédemment (Figure III.6 page 90) et correspond à l'ancienne intégration d'un élément génomique

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

caractérisé par la présence d'une intégrase de type SSV1 (PYCH_14110) et l'alignement de certains gènes avec le plasmide de *Thermococcus* sp. 26-2 (SOLER *et al.*, 2010). Ce cluster est pour partie sur-exprimé d'un point de vue transcriptionnel à 20 MPa et code majoritairement pour des protéines hypothétiques (PYCH_14130-70, PYCH_14200-270) excepté le gène PYCH_14270 qui code pour une ATPase. La régulation de cette ancienne intégration suggère fortement que celle-ci est utile à la cellule, malgré son rôle inconnu du fait du grand nombre de protéines hypothétiques présentes. Le gène PYCH_14300 non régulé est un régulateur transcriptionnel de la famille SpoVT_AbrB qui chez *Bacillus subtilis* joue à la fois un rôle d'activateur et de répresseur (STRAUCH *et al.*, 1989; BAGYAN *et al.*, 1996). Dans ce cas-là, il pourrait jouer le rôle d'un répresseur, sa non sur-expression favorisant alors la sur-expression des gènes sous son contrôle.

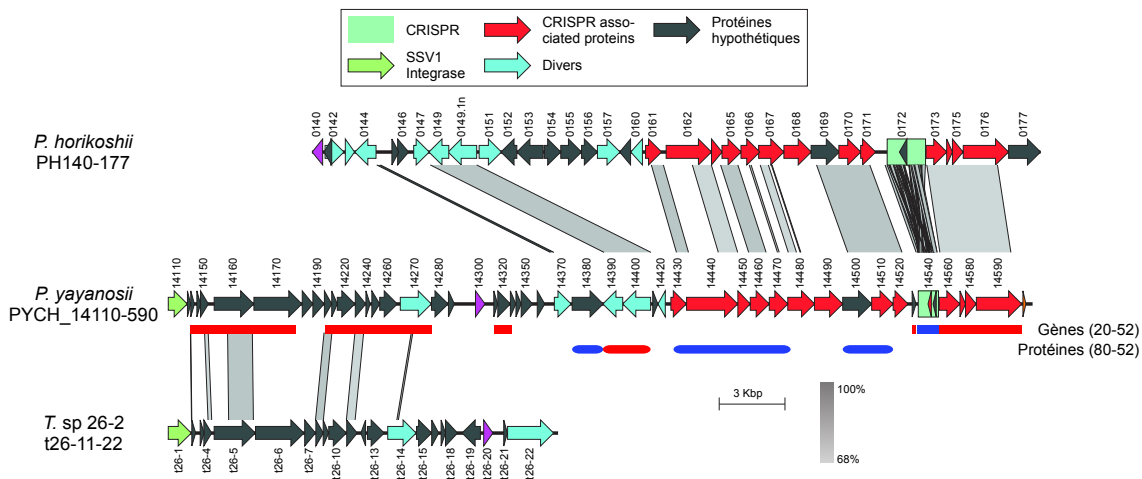


FIGURE IV.14.: Alignement d'un cluster de *cas* régulé chez *P. yayanosii* avec le plasmide de *Thermococcus* sp. 26-2 et *P. horikoshii*

Entre l'intégration du plasmide et le système CRISPR-*cas*, certains gènes et protéines sont régulés de manière significative. Le gène PYCH_14320 codant pour une protéine hypothétique est sur-exprimé à basse pression. Ce gène est uniquement présent chez *Pyrococcus* sp. NA2 et possède un domaine DUF1680 et serait donc lié à des glyco-

sylys hydrolases. Les protéines PYCH_14380-400 sont régulées sous HPH. La protéine hypothétique PYCH_14380 est sous-exprimée dans ces conditions au contraire des protéines PYCH_14390-400 qui sont sur-exprimées dans les mêmes conditions. Ces deux protéines sont en fait retrouvées chez *P. horikoshii* et correspondent respectivement à une 2-phosphoglycerate kinase et à une cyclic 2,3-diphosphoglycerate-synthetase. Ces deux protéines sont responsables de la synthèse de cyclic 2,3-diphosphoglycerate (cDPG). Le cDPG est une molécule de faible poids moléculaire qui est retrouvée en très grande quantité (jusqu'à 1 M) dans le cytoplasme de certaines archées méthanogènes et hyperthermophiles tels *Methanothermus fervidus* et *Methanopyrus kandleri*. La concentration de cette molécule augmentant avec la température, il a été suggéré qu'elle servirait soit de stockage d'énergie soit serait impliquée dans l'adaptation à la température (LEHMACHER et HENSEL, 1994; MATUSSEK *et al.*, 1998). Au vu de la sur-expression de ces deux protéines chez *P. yayanosii*, il est possible que cet élément joue aussi un rôle dans l'adaptation aux HPH, mais servirait sans doute plus à stocker l'énergie dans la cellule. *P. yayanosii* semble par rapport à *P. horikoshii* avoir perdu une partie de la région génomique correspondant aux gènes PH0151-60 qui codent pour partie pour un transporteur ABC de molybdate/tungstate (PH0151, 154, 157), les autres gènes codant pour des protéines hypothétiques.

La troisième partie de la région est composée des gènes PYCH_14430-460 correspondant au cluster CRISPR-*cas*. Une partie des protéines de ce cluster sont sous-exprimées sous HPH (PYCH_14430-70, 14500-510) ce sont toutes des *cas* excepté PYCH_14500 qui a été annoté comme une protéine hypothétique et qui ne possède aucun domaine permettant de lui attribuer une fonction. Une autre partie de ce même cluster est régulée différemment au niveau transcriptionnel, le CRISPR est sous-exprimé à basse pression alors que les gènes l'entourant sont sur-exprimés dans les mêmes conditions (PYCH_14560-590) et codent pour des *cas*.

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

Le fait qu'un grand nombre de *cas* soit régulé chez *P. yayanosii* en fonction de la pression pose la question de leur rôle exact. Une des hypothèse possibles est le fait qu'ils puissent contrôler l'expression d'ARN messager autre que viraux tel le mécanisme d'ARN interférent chez les eucaryotes (MARRAFFINI et SONTHEIMER, 2010). Certaines études montrent aussi que les gènes *cas* soit impliqués dans la formation de biofilms chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* ou la formation des spores de *Myxococcus xanthus* suggérant un rôle de ces *cas* dans la régulation cellulaire autre qu'en relation avec des ARN extracellulaires (ZEGANS *et al.*, 2009; VISWANATHAN *et al.*, 2007).

IV.3.6. ARN non codants

L'analyse de la régulation des ARN non codant (ARNnc) chez *P. yayanosii* montre que seulement quatre d'entre eux sont régulés différentiellement (Tableau IV.4 page 140). Ces ARNnc ont été déterminés à l'aide du programme LeARN (NOIROT *et al.*, 2008). Trois d'entre eux font partie de la famille "high GC"-C (HgcC) et le dernier fait partie de la famille secondary structure conserved A (SscA). Ces deux familles d'ARNnc ont été découvertes chez des micro-organismes hyperthermophiles notamment *M. jannaschii* et les *Pyrococcus*, leurs fonctions sont actuellement inconnues (KLEIN *et al.*, 2002). L'un des problèmes des ARNnc régulés est qu'ils se situent souvent au milieu de gènes, néanmoins la localisation de ceux-ci à proximité d'ARNt et d'ARNt synthétases dans le génome aurait plutôt tendance à confirmer leur présence. L'ARNnc antisens PY_SscA est sur-exprimé à 80 MPa et est situé au milieu du gène PYCH_02850 qui code pour une protéine hypothétique dans le sens inverse à cet ARNnc. Cet ARNnc est situé dans une région génomique à proximité de deux ARNt (PY_tRNA-Val et PY_tRNA-Ala (Tableau IV.3 page 130)), ainsi d'une protéine impliquée dans la division cellulaire permettant la séparation des cellules filles lors de la division cellulaire (FtsZ, PYCH_-02910). Ces éléments ne sont pas régulés. La protéine PYCH_02860 située à proximité

immédiate est-elle sous-exprimée à 80 MPa, cette perméase fait partie de la famille major facilitator superfamily (MFS) un groupe de transporteurs très large. La régulation inverse entre l'ARNnc et cette protéine pourrait indiquer un rôle de répresseur de celui-ci. L'ARN PY_HgcC_18 est lui sur-exprimé dans des conditions de stress (20 et 80 MPa) et est situé dans le même sens au sein du gène PYCH_13530 qui code pour une protéase de la famille TldD/PmbA. Les protéines de cette famille modulerait l'activité de la gyrase, enzyme impliquée dans la résolution des surenroulements de l'ADN chez *E. coli* (MURAYAMA *et al.*, 1996). Les gènes PYCH_13540 et PYCH_13550 sont aussi sur-exprimés à 80 MPa, ils codent respectivement pour une S-adenosyl methionine (SAM)-dependent methyltransferase et une carbon-nitrogen hydrolase. Le composé SAM est un cofacteur universel jouant un rôle dans le transfert de groupes méthyles vers des toutes sortes de biomolécules tel l'ADN, les protéines et des métabolites secondaires (LOENEN, 2006). L'enzyme carbon-nitrogen hydrolase serait impliquée dans la réduction de composés azotés (BORK et KOONIN, 1994). Les deux autres ARNnc sont situés à proximité immédiate (300 pb) l'un de l'autre mais ne sont pas régulés de la même façon de même qu'ils sont situés en sens inverse l'un de l'autre (PY_HgccC_22 : sens et PY_HgccC_22 : antisens). Ils sont situés respectivement dans les gènes PYCH_17430 et PYCH_17440 qui codent pour une alpha-ribazole phosphatase (CobZ) et une Cobalamin (5'-phosphate) synthase. Ces deux protéines sont impliquées dans la biosynthèse de la cobalamine ou vitamine B12 ou CobZ remplace CobC chez les archées (ROTH *et al.*, 1993; ZAYAS *et al.*, 2006). Ces éléments ne sont pas régulés mais les gènes PYCH_17470 et PYCH_17480 sont sous-exprimé à 80 MPa. Ils codent pour des ribonucleoside triphosphate reductases. Ces enzymes catalysent la formation de désoxyribonucléotides à partir de ribonucléotides. Ces enzymes jouent un rôle crucial dans la régulation de la synthèse d'acide désoxyribonucléique (ADN) en maintenant celle-ci à un niveau constant lors de

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

la division cellulaire (ELLEDGE *et al.*, 1992; HERRICK et SCLAVI, 2007). Les ARNnc pourraient donc être impliqués dans cette régulation par un mécanisme encore inconnu.

TABLEAU IV.4.: Régulation des ARNnc de *P. yayanosii*

Locus	Sens	<i>P. yayanosii</i> Coordonnées		Puces ADN	
				20-52 MPa	80-52 MPa
PY_SscA	-	235 125	235 218		UP
PY_HgcC_18	+	1 183 595	1 183 707	UP	UP
PY_HgcC_22	+	1 553 197	1 553 311	DOWN	DOWN
PY_HgcC_23	-	1 553 652	1 553 778		UP

IV.3.7. Régulation diverses

Voie de la glycolyse

La voie de la glycolyse est aussi affectée par la pression chez *P. yayanosii* bien qu'elle ne soit pas considérée comme significativement régulée. *P. yayanosii* comme toutes les *Thermococcales* possède une voie de la glycolyse complète (Section I.7.2 page 43). Tous les éléments régulés au sein de cette voie sont sur-exprimés en conditions de stress excepté la pyruvate kinase (PYK) (PYCH_07870) dont la protéine est sous-exprimée à basse pression qui converti le phosphoenolpyruvate (PEP) en pyruvate. Les autres éléments régulés à basse pression ne sont que des protéines qui correspondent aux enzymes catalysant la transformation du Fructose 1,6P₂ en glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) (triosephosphate isomerase (TIM), PYCH_13930) puis en glyceraldehyde-3P (3PG) (glyceraldehyde-3-phosphate ferrédoxine oxydoréductase (GAPOR), PYCH_18690) enfin en glyceraldehyde-2P (2PG) (phosphoglycerate mutase (PGM), PYCH_00670). L'enzyme catalysant la transformation du 2PG en PEP (Enolase, PYCH_12970) n'est elle pas régulée différemment à basse pression. La transformation du pyruvate en acétate qui est effectuée par deux enzymes (pyruvate synthase et acetyl-CoA synthetase) est-elle aussi sur-exprimée à basse pression (PYCH_06600, PYCH_07600, PYCH_01760).

Tous les éléments sur-exprimés à basse pression le sont aussi à haute pression que ce soit au niveau des gènes ou des protéines excepté la PYK (PYCH_07870) et la pyruvate synthase (PYCH_06600). Les autres éléments sur-exprimés codent pour la catalyse du Glucose en Glucose-6P (glucokinase (GLK), PYCH_10910) ainsi que celle du Fructose 6P en Fructose 1,6P₂ (phosphofructokinase (PFK), PYCH_10910). De même l'énolase transformant le 2PG en PEP (PYCH_12970) est aussi sur-exprimée à haute pression. Pour résumer, tous les éléments catalysant la transformation du glucose en acétate sont sur-exprimés dans des conditions de stress excepté la PYK (PYCH_07870) qui est sous-exprimée à basse pression et la 3-phosphoglycerate kinase (PGK) catalysant la transformation du Glucose 6P en fructose 6P qui n'est pas régulée. La régulation de la voie de la glycolyse confirme l'effet général de la pression sur le métabolisme énergétique. Les effets de celle-ci sur cette voie particulière sont à nuancer du fait de la variabilité importante des régulations au niveau transcriptionnel ou traductionnel, de plus ces enzymes sont souvent impliquées dans d'autres métabolismes tels la biosynthèse des acides aminés ou le cycle de l'acide citrique par exemple.

Biosynthèse des purines et de la thiamine

Les autres cluster régulés chez *P. yayanosii*, incluent des gènes impliqués dans la biosynthèse de purines et thiamine, et la réplication. Certains gènes impliqués dans la biosynthèse de la thiamine et des purines sont sur-exprimés à très haute pression (80 vs 52 MPa). Le cluster PYCH_06240-280 codant pour une ribulose-1,5-phosphatase et une thiamine biosynthesis protein (PYCH_06240-50) faisant partie de la biosynthèse de la thiamine. La deuxième partie du cluster code pour la phosphoribosylaminoimidazolesuccinocarboxamide (SAICAR) synthase, l'5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR) synthase et l'inosine monophosphate (IMP) cyclohydrolase (PYCH_06260-80), qui catalysent la réaction du 5'-phosphoribosyl-4-carboxy-5-aminoimidazole (CAIR) à l'IMP dans la biosynthèse des purines. Néanmoins, *P. yayanosii* ne semble pas pos-

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

séder l'5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole (AIR) carboxylase qui relie les deux voies de biosynthèse malgré le fait que cette enzyme soit présente chez un grand nombre de *Thermococcales* (BROWN *et al.*, 2011).

Régulation d'un ilot génomique

De même que l'ilot génomique *yaya_4* (PYCH_07950-8040) codant pour des CRISPRs-*cas*, l'ilot génomique *yaya_10* est aussi en partie régulé de façon significative (PYCH_17580-890). La majorité des gènes de ce cluster code pour des transférases de groupes glycosylés ou des protéines hypothétiques. Une hypothèse quand au rôle de ce cluster serait d'être impliqué dans la biosynthèse de l'enveloppe cellulaire au travers de la glycosylation des lipides (ALBERS et MEYER, 2011). Certains gènes de cet ilot dont le GC% est de 40 % sont orthologues à *T. barophilus* (Figure IV.15 page suivante). Les gènes de *T. barophilus* ne sont d'ailleurs pas régulés significativement sous pression (VANNIER, 2012). Fait intéressant, la régulation au sein de ce cluster est variable, 4 protéines sont sous-exprimées à 20 MPa (PYCH_17590, 640, 680, 880) alors que 5 sont au contraire sur-exprimées (PYCH_17610, 660-670, 770-780). Les seules protéines régulées qui sont orthologues à *T. barophilus* sont les protéines PYCH_17770-780 qui sont annotées comme une dTDP-glucose 4,6-déhydratase et une glucose-1-phosphate thymidyltransferase. Toutes deux sont impliquées dans la catalyse de D-Glucose-1P en dTDP-4-déhydro-6-déoxy-alpha-D-glucose. Cette catalyse fait partie de la voie de biosynthèse de la streptomycine (BRUTON et HORNER, 1966). Les protéines PYCH_17660-670 qui sont aussi sur-exprimées correspondent à une NDP-sugar déhydrogénase et une UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase qui sont impliquées dans la transformation de α -D-glucose-1P en UDP-D-glucuronate notamment au sein du métabolisme des sucres nucléotidiques. Les protéines PYCH_17640, PYCH_17680, et PYCH_17880 qui sont sous-exprimées à basse pression correspondent à des glycosyls transférases dont le rôle précis dans le métabolisme cellulaire est inconnu. La présence de ces derniers

pourrait suggérer que ce cluster soit impliqué dans la glycosylation des lipides membranaires.

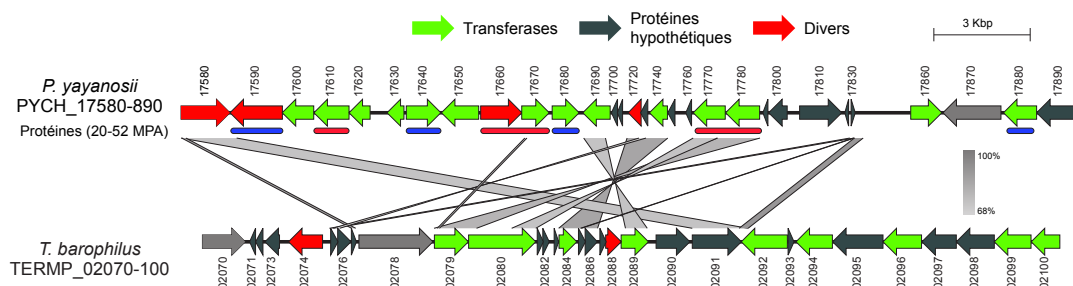


FIGURE IV.15.: Régulation de l'îlot yaya_10 de *P. yayanosii* et alignement de cet îlot avec *T. barophilus*.

Réplication

Certains gènes impliqués dans la réplication sont eux aussi sur-exprimés en conditions de très hautes pressions. Les gènes PYCH_06170 et PYCH_06190 qui codent pour une hélicase (bipolar DNA helicase) et une chromosome segregation protein sont dans ce cas-là. Cette dernière est d'ailleurs plus probablement une ATPase Rad50 (DNA double-strand break repair rad50 ATPase) vu qu'elle partage 75 % d'identité avec une enzyme Rad50 de *T. barophilus*. Un autre cluster aussi impliqué dans la réplication est sur-exprimé à très haute pression (PYCH_16160-210). Celui-ci est composé d'une phosphorylase 5'-methylthioadenosine, le cdc6, deux ADN polymérases, une métallo-beta-lactamase et une protéine impliquée dans la réparation et la recombinaison. La présence du cdc6 suggère fortement que l'origine de réplication est située dans ce cluster. Une recherche blast effectuée avec l'origine de réplication déterminée chez *P. furiosus* (MATSUNAGA *et al.*, 2007) confirme la présence de cette origine de réplication entre la phosphorylase et le cdc6 (PYCH_016160-70). La sur-expression de ces gènes de réplication sous très hautes pression hydrostatiques en relation avec la régulation des protéines ribosomales suggèrent fortement une réponse de stress de *P. yayanosii*. Au

IV. Analyse transcriptomique et protéomique des effets des HPH

contraire, la régulation des hydrogénases et des enzymes impliquées dans le métabolisme du formate pourrait être considéré comme un shift métabolique et donc une adaptation plutôt qu'un véritable stress métabolique.

CHAPITRE V

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

Un grand nombre de micro-organismes se développant dans les océans se situent dans la biosphère profonde à une profondeur supérieure à 1 000 m. A ces profondeurs, l'effet des hautes pressions hydrostatiques (HPH) commence à se faire sentir sur les micro-organismes dit piézosensibles, c'est à dire se développant de façon optimale à pression atmosphérique tel la bactérie mésophile *E. coli*. Ces effets vont en s'amplifiant avec l'augmentation de la pression, néanmoins tous les micro-organismes ne résistent pas à celle-ci de la même façon, on parle alors d'organismes piézotolérants puis piézophiles. Les principaux effets des HPH sur les cellules ont majoritairement été étudiés chez des bactéries mésophiles piézosensibles et psychrophiles piézotolérantes ou piézophiles. La majorité des impacts des HPH se situent au niveau de la membrane cellulaire quand les cellules sont placées dans des conditions compatibles avec les limites de la vie (< 130 mégapascal (MPa)). Cela concerne notamment tout ce qui concerne la mobilité, la respiration et les échanges avec l'extérieur (transporteurs). Certaines cellules développent aussi des réponses de stress cellulaires tels l'activation de chaperonnes, de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ou de mécanismes plus larges tels la traduction et la transcription.

V. Discussion générale et conclusion

Depuis la découverte des sources hydrothermales, un grand nombre d'études ont été effectuées sur ces environnements hétérotrophes où la température des fluides peut atteindre les 400°C comparé à celle moyenne des océans de 3-4°C. Les sources hydrothermales se trouvent à des profondeurs moyennes de 2 500 m avec un maximum à environ 5 000 m de profondeur dans la fosse des caïmans. Malgré cela, très peu d'études se sont intéressées à la résistance à la pression des micro-organismes notamment hyperthermophiles présents au sein de ces sources. Parmi les quelques micro-organismes étudiés dans cette perspective sont retrouvés deux *Thermococcales*, *T. barophilus* qui est piézophile et *T. kodakarensis*, piézosensible, dont la résistance à la pression a été observée d'un point de vue transcriptomique lors d'une thèse au laboratoire (VANNIER, 2012). Les résultats montrent que les cellules jouent principalement sur la biosynthèse et le transport d'acides aminés notamment aromatiques ainsi qu'au niveau des transporteurs et protéines membranaires.

L'isolement de *P. yayanosii* CH1, une *Thermococcale* en 2009 a permis de repousser les limites de la vie d'un point de vue pression/température (ZENG *et al.*, 2009). *P. yayanosii* étant la première espèce piézophile stricte et hyperthermophile isolée, elle ne commence à se développer qu'à partir de 15-20 MPa jusqu'à 130-150 MPa. Elle constitue donc un bon modèle pour l'étude des effets de la résistance à la pression à la fois d'un point de vue sub et supra-optimale. Afin de distinguer les effets stress et adaptation, une comparaison a été effectuée avec l'organisme piézosensible le plus proche, *Pyrococcus furiosus* DSM3638. Les études ont consisté en des comparaisons génomiques, transcriptomiques et protéomiques. Pour ces deux dernières, les pressions sub, supra et optimales ont été déterminées pour les deux souches par des croissances sous différentes pressions.

Les analyses génomiques effectuées sur quatre *Pyrococcus* (*P. yayanosii*, *P. furiosus*, *P. abyssi* et *P. horikoshii*) montrent d'importants réarrangements entre les différentes

espèces, spécialement entre *P. yayanosii* et les trois autres espèces. L'une des différences importantes entre celles-ci est le fait que le GC% de *P. yayanosii* soit 10 % supérieure à celui des trois autres. Fait intéressant, celui-ci est plus proche de la majorité des *Thermococcus* que des *Pyrococcus*, bien que des exceptions existent tels *T. barophilus*, *T. sibiricus* et *T. litoralis*.

La présence d'ilots génomiques au sein de ces quatre *Pyrococcus* a été prédite et bien que certains possèdent des domaines d'intérêts tels des clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs)/CRISPR-associated (*cas*) ou des transporteurs, de nombreux codent pour des protéines hypothétiques ne pouvant pas expliquer de tels réarrangements au sein des génomes. L'isolement géographique pourrait expliquer en partie cet état de fait. Ces espèces ont en effet été isolées d'un peu partout autour du globe (La ride médio-atlantique, l'Italie, le bassin nord Fidjien et la dépression d'Okinawa (BIRRIEN *et al.*, 2011)) et à des profondeurs différentes, suggérant une forte adaptation à leur environnement. Ces dérives génétiques sont donc probablement dues à la relative isolation géographique des sources où ces espèces ont été découvertes comme décrit dans la littérature (ESCOBAR PÁRAMO *et al.*, 2005; WHITE *et al.*, 2008). L'isolement, la caractérisation et le séquençage de plus de *Thermococcales* isolées des mêmes sources pourraient permettre une plus grande compréhension des échanges et dérives génétiques observées au sein de ces espèces.

Les comparaisons génomiques ont permis de confirmer que les voies de biosynthèse des acides aminés constituent les éléments dont le polymorphisme est le plus important au sein des *Thermococcales*. Des corrélations effectuées entre ces espèces montrent ainsi que la pression semble avoir un effet négatif sur la capacité à synthétiser certains acides aminés notamment aromatiques. *P. yayanosii* n'est par exemple pas capable de synthétiser les acides aminés possédant un noyau aromatique (phénylalanine, tryptophane et tyrosine) ou imidazole (histidine), contrairement à *P. furiosus*. Ces corrélations sont

V. Discussion générale et conclusion

appuyées par l'étude de VANNIER qui montre que lorsqu'elle est soumise à des HPH, *T. kodakarensis* sous-exprime fortement la voie de biosynthèse de l'histidine, du tryptophane et du shikimate. Cette dernière liant le métabolisme des carbohydrates à la biosynthèse des acides aminés aromatiques. Parmi ces voies de biosynthèse, seule celle de l'histidine est présente chez *T. barophilus* et elle est aussi inhibé sous HPH (VANNIER, 2012). Au moins deux hypothèses peuvent expliquer l'inhibition ou l'absence de ces voies de biosynthèses chez des micro-organismes soumis à de fortes pressions ou piézophiles. Tout d'abord la biosynthèse des acides aminés aromatiques nécessite une quantité importante d'adénosine-5'-triphosphate (ATP) pour être produits. La biosynthèse du tryptophane chez *E. coli* et *B. subtilis* notamment utilise environ 70 équivalents ATP par molécule synthétisée (AKASHI et GOJOBORI, 2002) contre environ 30 pour la moyenne des autres acides aminés. Il serait donc plus économique pour une cellule de l'importer dans son cytoplasme que de la synthétiser, *P. yayanosii* possède d'ailleurs par rapport aux trois autres *Pyrococcus* deux transporteurs spécifiques d'acides aminés aromatiques (PYCH_00850, PYCH_13200).

P. yayanosii par rapport aux autres *Pyrococcus* se distingue aussi par des différences au niveau des gènes impliqués dans la respiration et le métabolisme énergétique qui semblent pour partie préférentiellement exprimés au sein de la cellule. Elle posséderait aussi la capacité de transporter et de métaboliser le formate tel de rares *Thermococcales* comme *T. onnurineus*, qui est fortement impliqué dans le métabolisme énergétique (KIM *et al.*, 2010).

Ces résultats tentent à appuyer l'hypothèse que *P. yayanosii* aurait fortement adapté son génome aux conditions de pression dans lesquelles elle se trouve, notamment au niveau de la biosynthèse des acides aminés et du métabolisme énergétique. La description de plus de micro-organismes piézophiles strictes pourrait permettre de confirmer ces

adaptations mais est rendu très compliquée par le faible nombre d'équipements adaptés à cette culture.

Les analyses transcriptomiques et protéomiques effectuées sur *P. yayanosii* et *P. furiosus* dans des conditions sub, supra et optimales permettent de tenter de comprendre les mécanismes que mettent en place les cellules pour résister aux HPH. L'analyse d'un micro-organisme piézophile stricte est intéressante notamment en conditions sub-optimales car celles-ci constituent un véritable stress en dessous duquel les cellules ne peuvent pas se développer, au contraire des études sur des organismes piézophiles qui se développent peu ou prou dans de « bonnes » conditions à pression atmosphérique. De la même manière, *in situ*, les cellules ont plus de chances de rencontrer des pressions sub-optimales notamment à cause du flux hydrothermal qui remonte vers la surface et dont l'effet peut encore se faire sentir 1 100 m au dessus de la source (CONNELLY *et al.*, 2012). Les analyses à pression supra-optimales donnant aussi des indications sur les mécanismes de résistance mis en œuvre par les cellules et pourraient ainsi être utiles dans le cas de recherche des effets de la pression en tant que méthode de stérilisation.

Ces différentes analyses ont été effectuées à 20, 52 et 80 MPa en ce qui concerne *P. yayanosii* et à 0,1 et 45 MPa pour *P. furiosus*. Les conditions sub (20 MPa pour *P. yayanosii*) et supra-optimales (45 et 80 MPa pour *P. furiosus* et *P. yayanosii*) ayant été déterminée ainsi car à ces pressions, le taux de croissance de la souche était diminuée de moitié. Fait intéressant, le nombre de gènes régulés à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel était à peu près équivalent entre les deux niveaux d'expression et plus important chez *P. yayanosii* (≈ 350) que chez *P. furiosus* (≈ 100). Ces résultats sont supérieurs à ceux obtenus chez *P. profundum* SS9 ou 260/5746 gènes sont régulés dans une expérience transcriptomique du même type (VEZZI *et al.*, 2005). De la même manière, des analyses transcriptomiques sur des *Thermococcales* ont montré qu'en moyenne 50-150 gènes étaient régulés après différents stress (choc froid, choc chaud, exposition au

cadmium ou au peroxyde d'hydrogène (WEINBERG *et al.*, 2005; SHOCKLEY *et al.*, 2003; LAGORCE *et al.*, 2012; STRAND *et al.*, 2010)). Malgré cela les corrélations entre étude protéomique et transcriptomique sont assez faibles, peu de gènes étant régulés à la fois au niveau traductionnel et transcriptionnel. Les gènes concernés chez *P. yayanosii* sont essentiellement retrouvés au niveau des protéines ribosomales et des enzymes en relation avec le métabolisme énergétique (Hydrogénases et métabolisme du formate).

Le nombre de gènes de *P. furiosus* régulés est assez faible, néanmoins trois principales fonctions sont affectées par les HPH, tout d'abord la mobilité par l'intermédiaire de l'archaellum, la traduction au niveau des sous-unités protéiques 50S du ribosome ainsi qu'au niveau des transporteurs. Le cas de l'archaellum est particulièrement intéressant car la régulation du cluster est négative au niveau transcriptionnel et positive pour certaines protéines, les autres n'ayant pas été observées lors des analyses ce qui complique l'interprétation. Deux de ces protéines régulées seraient ainsi impliquées dans la liaison avec le système du chimiotactisme qui n'est pas présent chez *P. furiosus*, au contraire de la plupart des *Pyrococcus* (MAEDER *et al.*, 1999). Ces régulations opposées suggèrent l'existence de modifications post-traductionnelles. Celles-ci ont été observées chez les archées principalement étudiées comme des halophiles par exemple *Haloferax volcanii* et sont de plusieurs ordres tel la dégradation de protéines par l'intermédiaire du protéasome, la glycosylation ou la méthylation de celles-ci (EICHLER et MAUPIN FURLOW, 2013). Dans ce cas-là il est possible qu'une des protéines influence directement l'expression du cluster, signifiant ainsi une baisse du nombre d'ARN. Les sous-unités 50S du ribosome sont sur-exprimées alors qu'un facteur de transcription liant l'ADN à celles-ci est sous-exprimé. La pression aurait ainsi un effet négatif sur les structures quaternaires du ribosome tel décrit chez *E. coli* (GROSS *et al.*, 1993) que compenserait la cellule en augmentant la quantité de sous-unités ribosomales. La plupart des transporteurs de

P. furiosus régulés sont sous-exprimés sous HPH confirmant les effets des HPH sur la membrane.

Les résultats obtenus sur *P. furiosus* montre que les HPH constituent un véritable stress pour la cellule avec sans doute une réduction de la traduction ainsi qu'une non adaptation de la membrane cytoplasmique à celles-ci appuyé par une réduction du nombre d'archaellum ainsi que de la réduction du nombre de transporteurs présents. Fait intéressant, contrairement à *T. kodakarensis* les voies de biosynthèse des acides aminés aromatiques ne sont pas significativement affectées par les HPH (VANNIER, 2012). Cela pose la question du faible niveau éventuel des HPH appliquées à la souche lors des analyses qui sont malgré cela beaucoup plus élevées que pour cette dernière (45 au lieu de 25 MPa). Cette différence peut s'expliquer en partie par la température optimale de culture de *P. furiosus* supérieures de 15 °C. Or il a été prouvé chez *T. barophilus* notamment qu'une augmentation de température tend à augmenter les optima de pression, c'est ainsi qu'au-delà de 95°C au lieu de 85°C elle est piézophile obligatoire (MARTEINSSON *et al.*, 1999). Une étude de l'expression cellulaire ciblant les métabolismes décrit ci-dessus à des pressions croissantes permettrait d'analyser les mécanismes les plus tôt affectés par les HPH chez les *Thermococcales*.

Les analyses effectuées sur *P. yayanosii* montrent que les fonctions cellulaires affectées sont souvent équivalentes que la cellule soit placée à haute ou a basse pression, notamment au niveau du ribosome, du chimiotactisme, des CRISPR-*cas* et du métabolisme énergétique par l'intermédiaire d'hydrogénases, d'oxydoréductases et du métabolisme du formate. Les métabolismes qui sont uniquement affectés dans l'une ou l'autre conditions sont des ATPases transmembranaires, une partie du métabolisme des purines ainsi que des gènes impliqués dans la réplication qui se situent au niveau de l'origine de réplication, dont la régulation n'est significative qu'à très fortes HPH. Ces métabolismes sont par ailleurs tous sur-exprimés dans ces conditions que cela soit d'un point de vue

V. Discussion générale et conclusion

traductionnel ou transcriptionnel. La sur-expression d'un point de vue transcriptionnel des gènes impliqués dans la réplication (PYCH_16160-210) ainsi que ceux impliqués dans la traduction (sous-unités ribosomales, PYCH_01360-1600) suggère que les HPH ont bien un rôle perturbateur dans la formation des structures protéines quaternaires, notamment celles qui se lient avec les acides nucléiques. Au contraire de ce qui a été observé chez *P. furiosus*, ce même cluster de sous-unités ribosomales est sous-exprimé d'un point de vue traductionnel. Les différences de régulation observées entre les deux espèces pourraient s'expliquer par le fait que *P. yayanosii* possède un système de dégradation de protéines mal repliées plus efficace que *P. furiosus*, expliquant ainsi pourquoi les protéines de celle-ci sont sur-exprimées alors que les gènes codant pour ces mêmes protéines ne sont pas régulés.

Le cluster codant pour le chimiotactisme est sur-exprimé d'un point de vue transcriptionnel dans les deux conditions suggérant ainsi la nécessité pour la cellule de se déplacer vers des pressions plus adaptées à ces conditions optimales de croissance. La régulation de la mobilité cellulaire est un effet des HPH qui a été observé chez plusieurs micro-organismes piézophiles (*P. profundum* SS9 et *S. piezotolerans* WP3 notamment) et constitue sans doute un mécanisme général d'adaptation (ELOE *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). Le shift métabolique observé chez *P. yayanosii* a aussi été observé chez d'autres micro-organismes dont *S. benthica*, *P. profundum* SS9 et *D. piezophilus* (YAMADA *et al.*, 2000; TAMEGAI *et al.*, 2011; PRADEL *et al.*, 2013), bien qu'il ne concerne pas les mêmes mécanismes ni enzymes. Dans ce cas-là, le shift métabolique ressemble à celui observé chez *P. furiosus* lors de l'ajout de soufre dans la culture (SCHUT *et al.*, 2007). Une des différences étant que *P. yayanosii* possède le cluster responsable du métabolisme du formate absent chez *P. furiosus* et présent chez quelques *Thermococcus*. Les hydrogénases Mbh (PYCH_11230-360) et ce cluster (PYCH_11030-200) sont fortement sous-exprimés en conditions de stress de pression hydrostatiques, alors qu'une partie du cluster Mbx co-

dant pour des oxydo-réductases est sur-exprimé. Il est possible que la présence de soufre dans la culture ait déjà activé ces enzymes d'où la faible sur-expression de celles-ci en conditions de stress. Une culture de *P. yayanosii* sans soufre dans les mêmes conditions permettrait ainsi de confirmer ces régulations. Ces résultats permettent de conclure que la modulation des voies respiratoires ainsi que la mobilité constitue des mécanismes généraux par lequel les micro-organismes piézophiles s'adaptent aux variations de la pression hydrostatique.

Les principaux clusters comprenant des *cas* sont régulés sous pressions, dans ce cas-là, les régulations sont le plus souvent positives d'un point de vue transcriptionnel. La régulation de ces cluster avec celle d'un ancien plasmide intégré (PYCH_14110-300) pose la question de leur rôle exact dans la régulation cellulaire en conditions de stress. La plupart des gènes régulés dans ces clusters codent pour des protéines Cas ou des protéines hypothétiques, excepté une région génomique (PYCH_14310-420) comprise entre un cluster de *cas* et le plasmide intégré. Deux des protéines de cette région correspondent à des enzymes responsable de la formation de cyclic 2,3-diphosphoglycerate (cDPG). Cette molécule de faible poids moléculaire qui est retrouvée en très grande quantité (jusqu'à 1 M) dans le cytoplasme de certaines archées méthanogènes et hyperthermophiles servirait soit de stockage d'énergie soit serait impliquée dans l'adaptation à la température ou la pression dans notre cas (LEHMACHER et HENSEL, 1994; MATUSSEK *et al.*, 1998). La régulation des gènes *cas* peut suggérer que les protéines Cas ne soient pas impliquées uniquement en tant que système d'immunité mais joueraient aussi un rôle dans la régulation transcriptionnelle similaire au mécanisme d'ARN interférence présent chez les eucaryotes (MARRAFFINI et SONTHEIMER, 2010).

Au vu des résultats présentés ci-dessus, plusieurs études complémentaires permettraient de confirmer les différentes hypothèses proposées. Tout d'abord, il serait intéressant d'étudier l'expression globale de *P. yayanosii* dans différentes conditions lié notam-

ment à la nature du milieu de culture tel la présence ou non de soufre, de sucres (maltose ou maltodextrine) ou de différentes sources de carbone (formate). De même l'étude de l'expression génomique dans plus de conditions de pressions pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes prioritairement mis en place par les cellules lors d'une augmentation ou une baisse des HPH. Le développement d'un outil génétique tel celui décrit sur *T. barophilus* par THIEL *et al.* (2014) permettrait par exemple d'observer les effets de la délétion des gènes *cas* sur le métabolisme cellulaire sous HPH. Ce développement est néanmoins rendu très compliqué par l'absence d'équipement nécessaire pour maintenir un milieu solide sous HPH et hautes températures afin d'isoler des mutants. L'étude des différentes régulations métaboliques est aussi rendue compliquée par l'absence d'une véritable reconstruction métabolique de *P. yayanosii* en particulier et des *Thermococcales* tel celle décrite chez l'archée thermophile *Sulfolobus Solfataricus* (ULAS *et al.*, 2012). Cela permettrait de déterminer quels sont les gènes clefs du métabolisme et faciliterait l'interprétation des données protéomiques et transcriptomiques. Dans le même ordre d'idées, la prochaine étape dans l'étude des effets des HPH sur les piézophiles est l'analyse du métabolome qui pourrait fournir un aperçu plus précis de l'état physiologique réel de la cellule (TANG, 2011).

**VI.1. Genomics, transcriptomics and proteomics analysis
of an obligate piezophile hyperthermophile
Pyrococcus yayanosii responding to hydrostatic
pressure stress (Michoud et Jebbar, 2014))**

Les travaux de cette thèse feront l'objet d'une publication axée dans un premier temps principalement sur les résultats obtenus sur *P. yayanosii*, elle sera donc un résumé des résultats présentés ci-dessus.

Genomics, transcriptomics and proteomics analysis of a obligate piezophile hyperthermophile *Pyrococcus yayanosii* responding to hydrostatic pressure stress

Grégoire Michoud^{1,2,3}, and Mohamed Jebbar^{1,2,3}

¹ Université de Bretagne Occidentale, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), rue Dumont d'Urville, 29 280 Plouzané, France

² CNRS, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), rue Dumont d'Urville, 29 280 Plouzané, France

³ Ifremer, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Technopôle Brest-Iroise, BP70, 29 280 Plouzané, France

*Corresponding author:
Prof. Mohamed Jebbar
Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)
Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (UMR 6197)
Technopole Brest-Iroise
Rue Dumont d'Urville
29280 Plouzané
Phone: +33 298 498 817
Fax: +33 298 498 705
E-mail: mohamed.jebbar@univ-brest.fr

Running title: multi-omics analysis in *Pyrococcus yayanosii*

Abstract

Genomics, transcriptomics and proteomics analyses were performed in order to study the mechanisms implemented by the cells to cope with high hydrostatic pressure. Genomic analyses showed that *P. yayanosii* genome is highly adapted to its environment with a loss of aromatic amino acid biosynthesis and the high constitutive expression of the energy metabolism compared to others *Pyrococcus* which are not obligate piezophiles. Differential proteomics and transcriptomics analyses identified key HHP responsive genes responsible for translation, chemotaxis, energy metabolism (hydrogenases and formate metabolism) and CRISPR-cas.

Background

The deep biosphere is located in the continental underground and in the oceans below 1000 m depth. The most recent estimations evaluate that life dwells mostly underground, which could represent up to 70 % of all cells as well as 50 % of the primary production of biomass. These biotopes are oligotrophic in nature, and characterized by high hydrostatic pressures (HHP) [1].

High pressure biotopes are almost everywhere on Earth, and represent the largest extreme environment. In contrast to this observation, we have very little information about these environments. Simple questions about the diversity of organisms living in these environments, how the deep-sea or deep-subsurface ecosystems function, or how deep-biosphere organisms are adapted to their environment still remain open.

The deep sea is characterized not only by high pressure (up to 110 MPa) but also by a lack of sunlight, an extremely low temperature ($<5\text{ }^{\circ}\text{C}$) except in the vicinity of hydrothermal vents, where temperature may be as high as $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, but water remains liquid owing to the high hydrostatic pressure. High hydrostatic pressure represents a major parameter in the deep oceans: it relates to 88% of the total volume of the oceans; the average depth is estimated at 3800 m and the average hydrostatic pressure with 38 MPa.

The field of deep-sea microbiology was born 125 years ago and pressure-adapted microbes or piezophiles (previously termed barophiles) have been obtained readily worldwide from many different deep-sea regions. The term "barophilic" microorganism was first used by ZoBell and Johnson in 1949 (from the Greek "baro" meaning weight) and recently replaced by the term "piezophilic" (from the Greek "piezo" meaning pressure). Piezophiles are defined as organisms with an optimal growth rate at a pressure higher than 0.1 MPa or requiring increased pressure for growth.

The field of piezomicrobiology has largely suffered, and is still suffering, from the requirement for specialized and expensive exploration/sampling vehicles, in addition to expensive high pressure retaining samplers and culturing laboratory equipment. Obligate piezophilic and psychrophilic microorganisms that cannot develop at ambient P , T conditions, were isolated and characterized, all of them bacteria. Lastly, the vision that life in the deep is characterized by its dependence upon the remote synthesis of organic carbon by photosynthetic organisms and by a low and constant temperature had to be qualified in

1977 when dense and thriving populations of invertebrates were discovered at hydrothermal vents at about 2600 m depth.

The diversity of bacterial and archaeal species isolated from the hydrothermal environment is large. In contrast to clones isolated from the open ocean, bacteria and archaea isolated from deep-sea hot vents are thermophiles. Most isolates are chemolithotrophs, e.g. capable of gaining energy from the chemical transformation of dissolved minerals and to realize the fixation of dissolved carbonates into organic molecules. Many isolates are aerobes or facultative anaerobes, i.e. they use oxygen as a final electron acceptor. A growing number of obligate anaerobes have been characterized. The deepest microorganisms yet isolated and characterized were sampled at 11,000 m depth or 110 MPa, in the deep-sea sediments of the Marianas Trench, where the Pacific oceanic lithosphere subducts into the Earth's mantle.

Very little is known about the adaptations allowing for growth and survival of microbes under High Hydrostatic pressure (HHP). The effect of high hydrostatic pressures on microbial physiology was largely studied in mesophile model microorganisms (*Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*), and showed that high pressures affects most of various cellular functions [2]. The exploration of these mechanisms was also extended to few piezophilic and piezotolerant microorganisms. Most studied models for which the genome sequences are now available are both piezophilic and psychrophilic. Piezophiles that are also mesophiles or thermophiles (even hyperthermophiles) are less or not studied. Currently, *Photobacterium profundum* SS9, a moderate piezophilic and psychrophilic bacterium, represents, by far the most studied model to characterizing the molecular and physiological mechanisms involved in response to high hydrostatic pressure [3].

One of the first effect on microorganisms is a rigidification of the plasma membrane due to the compaction of the constituent lipids. DeLong and others have shown that deep-sea organisms harbour an unusually high proportion of mono- and poly-unsaturated fatty acids. This leads to highly disordered phospholipids bilayers that are less permeable to water molecules. Hence, this maintains the membrane in a functional liquid crystalline state despite the effect of pressure. The genes responsible for unsaturated lipid synthesis have been shown to be up-regulated by HHP in the moderate piezophile *Photobacterium profundum* strain SS9, and induced by HHP as part of the HHP induced stress response in yeast. As a confirmation that the membrane plays a very important role in HHP adaption, *P.*

profundum SS9 possesses two distinct flagellar systems, a polar and lateral, showing a very fine high pressure adaptation especially considering that while motility is one of the most pressure-sensitive cellular processes in mesophilic microorganisms, piezophilic bacteria possess uniquely adapted motility systems to maintain movement under the high pressures [4].

Similarly to *P. profundum* SS9, the membrane plays a very important role in HHP adaptation in the piezophile *Shewanella*. This organism expressed a specific cytochrome protein complex at high pressure [5], suggesting that it adapt its respiratory mechanism during growth. Under HHP, the cytochrome c which is cytosolic is repressed whereas the membrane bind cytochrome d is expressed. This suggests a shift in the electron chain and the respiration system even though there isn't any differences in oxygen consumption [6]. Interestingly, it seems that for *P. profundum* SS9, higher piezotolerant terminal oxidase activity was observed under higher pressures although contrary to *Shewanella* the cytochrome contents and expression of the genes encoding terminal oxidases were not altered by pressure during growth, suggesting a different adaptation mechanism between the two species [7]. These results have led their authors to propose that adaptation to HHP mainly involved the fine tuning of gene expression and protein synthesis of a common gene set between piezophiles and piezosensitive strains. This view is supported by the genome-wide comparison of piezophile and piezosensitive strains of the *Photobacterium* complex.

In *P. profundum* SS9, transporters are mainly up-regulated at 0.1 MPa (compared to the pressure optimum of 28 MPa). Following the same line of reasoning, it was speculated that SS9 transporters may have evolved a particular protein structure to adapt to elevated pressure, and their up-regulation at 0.1 MPa could compensate for a reduction of functionality. Thus, adaptation to HHP may result from an evolution of proteins towards an optimal activity under HHP.

Recently, a study on *Desulfovibrio piezophilus*, a piezophilic sulfato-reducing anaerobe, showed that piezophilic adaptation goes through major cellular processes such as the transport of solutes and amino acids, amino acid metabolism and enzymes involved in sulfate reduction [8]. This raises the question that adaptation against high hydrostatic pressure is not due to a group of enzymes but due to a general modification of the cell metabolism, not as a stress *per se* but more as a fine tuning adaptation.

The codon usage has also been studied in function of the HHP as it was with the temperature [9]. Comparisons were done on different strains, for example between *Thermococcales* hyperthermophilic archaea [10, 11]. The results suggested that piezophiles organisms seem to promote small and polar amino acids in their genome. These results are in accordance with studies on *Desulfovibrio*, *Photobacterium* and *Shewanella* where an amino acid shift is observed comparing piezophiles and piezosensitives organisms [8, 12]. However doubts exist about bias due to the difference in GC% between organisms.

One of the main problem in studying the effect of HHP is that its effect could be masked by the effect of temperature. Temperature and pressure are strongly correlated by the laws of thermodynamics. Since nearly all studies on hydrostatic pressure adaptation were done on psychrophiles or mesophiles, it's possible that the several effects that the high pressure has on cells is partially due to the low temperature. As a matter of fact, very little is known about the few thermo-piezophilic organisms isolated. To our knowledge, they mainly belonging to the Archaea domain with *Thermococcus barophilus* [13], *Palaeococcus pacificus* [14], *Paleococcus ferrophilus* [15], *Marinitoga piezophila* [16], *Methanopyrus kandleri* [17] and *Pyrococcus yayanosii* [18, 19]. *P. yayanosii* sp. nov., is the first and only known obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *T. barophilus*, *P. yayanosii* and *M. piezophila* genomes are now available [20–22]

P. yayanosii was chosen as the model organism to study the effects of high hydrostatic pressure from a genomic, physiologic, proteomic and transcriptomic point of view. Optimal (52 MPa) and stressful pressures (20 and 80 MPa) were determined for *P. yayanosii*. Genomic comparisons were done on this species comparing with the closest *Pyrococcus* which are not piezophiles, *P. horikoshii* OT3, *P. abyssi* GE5 and *P. furiosus* DSM3638. Transcriptomic and proteomic analysis were then done. These analyses highlighted the importance of several gene clusters and metabolic pathways, such as energy production and conversion in the adaptation to hydrostatic pressure and provided new insight into the piezophilic lifestyle of hyperthermophiles microorganisms.

Results and Discussion

Comparative Genomic analysis of *P. yayanosii* vs other *Pyrococcus*

We first compared *P. yayanosii* CH1 with three other *Pyrococcus* species, *P. furiosus* DSM 3638, *P. abyssi* GE5 and *P. horikoshii* OT3 (Table 1). The genome size is around 1730 kb except for *P. furiosus* whose genome is 200 kb larger. This difference in size is correlated with the difference in genes number where *P. furiosus* possess about 150 more. One of the main difference observed between *P. yayanosii* and the other 3 strains, is the GC %, who is 52 % for the former and 40-45 % for the later strains. Otherwise, no notable differences are observed between the strains where the mean CDS length is about 850 pb, 4-5 rRNA and 46-47 tRNA are found and about 70-75 % of proteins are categorized in arCOG [39].

Alignments between theses genomes were performed and although a lot of genes seems to be common, they are extremely rearranged (Figure 1) posing the question of the presence of insertion sequences who could possibly be responsible of such rearrangements.

Genomic islands were determined using the IslandViewer software [40] and are presented in Table 2. Alignments and homology searches were done on these islands and the results showed little similarity among these regions. Using the ISFinder Database [41], we saw that *P. furiosus* possesses around 30-40 IS whereas the other species possess less than ten which couldn't account for such rearrangements. This could be explained by the fact that although this 4 species share around 50 % genes (Figure 2), they have been isolated from all around the world (Mid Atlantic ridge, Italy, SW Pacific ocean and W Pacific Ocean [18]) at different depths and seems to have adapted to their different environments. These genetic drifts are probably due to the geographic isolation where theses strains are encountered [42, 43].

However, in order to find piezophily markers, core genomes, pan genomes and unique genes for each strain were determined using the EDGAR server (<http://edgar.computational.bio.uni-giessen.de>)[44](Figure 2).

This comparative analyses based on groups of orthologous proteins from *P. yayanosii* and the other 3 *Pyrococcus* revealed 1173 common orthologous protein families shared by all four species (Figure 2), representing a little more than half of proteins in each strain (55-60 %). These data were calculated using reciprocal best hits. These proteins are preferentially

involved in Information storage and processing especially translation and ribosomal structure (J), and the energy production and conversion (C). As *P. yayanosii* is the only obligate piezophile amongst *Pyrococcus*, a comparison was done to try to find piezophily markers. It's interesting to see that more than 60 % of *P. yayanosii* 359 unique genes relatively to *Pyrococcus* cannot be characterized and the genes involved in defence mechanisms (40) are overrepresented. Among those genes, a lot of CRISPR associated proteins in three clusters can be found posing the questions of the presence of virus potentially infecting *P. yayanosii*.

Blastp was done on these 359 unique genes using the nr database and, 74, 96, 2 and 187 respectively matches with *Pyrococcus*, *Thermococcus*, other microbial species and are unique to *P. yayanosii* (min id 60 %). The vast majority of these 187 proteins were annotated as hypothetical proteins (~85 %) and the others are coding for proteins involved in defence mechanisms (4%), transcription (2%) and replication (2%). The proteins involved in defence mechanisms are almost all CRISPR associated proteins, especially belong to a cluster (PYCH_07970-08050)(Table 2). As CRISPRs play a role of prokaryotic immune system [45], it has been suggested that its presence is correlated to viral infections. The fact that some of the CRISPR associated proteins are unique to *P. yayanosii* could be explained by the geographical isolation of this species and the lack of other genomes available from the Ashadze hydrothermal vent where *P. yayanosii* was isolated [19]. Indeed, a recent viral infection responsible for the apparition of these CRISPRs could explain the fact that they are not found in other *Thermococcales* strains, even though an analysis done using the PHAge Search Tool [46], showed the absence of a prophage. However, the presence of an SSV1 integrase (PYCH_14110) suggests the integration of a genetic element. This is confirmed by the fact that the cluster (PYCH_14110-270) showed 53 % id with part of a plasmid isolated from *Thermococcus* sp. 26-2 whose is also found integrated in the genomes of *Thermococcus kodakarensis*, *T. gammatolerans* and *P. horikoschii* [47].

A comparison between all species but *P. yayanosii*, show that genes involved in amino acid, carbohydrate biosynthesis and transport are over-represented. This suggests that *P. yayanosii* appear to be lacking those genes, which is in accordance with the polymorphism between *Thermococcales* regarding the amino acid and carbohydrate biosynthesis and transport [48]. The predicted amino acids pathways for the 4 strains presented in Table 3 are drawn from the KEGG Database [49] and inspired from Zivanovic *et al.* [50]. *P. yayanosii*

appears to be missing a lot of biosynthesis pathway such as the basic (Arginine, Histidine and, Lysine) and aromatic (Phenylalanine, Tryptophan and Tyrosine) amino acid pathways. The fact that aromatic amino acid biosynthesis pathway are missing in *P. yayanosii* and *P. horikoshii* is probably due to the important energy cost needed to synthesise these amino acids [51, 52]. Analyses of amino acid substitution were performed by Di Giulio [11] comparing *P. furiosus* and *P. yayanosii*. He showed that the polarity and size of amino acids are the two elements correlated with the high hydrostatic pressure.

The polar and small amino acids seem to be more piezophilic than the apolar and/or large one. However, doubts exist about the potential bias encountered during the comparison of close species due to the high difference in GC % (10 %) and possibly due to artefacts of extrapolation of short terms changes against long time changes [53, 54].

In an attempt to bypass this difference in GC % especially between *P. yayanosii* and the 3 other strains, Codon Adaptation Index (CAI) were calculated using ribosomal proteins as references [55]. The CAI takes into account the fact that highly expressed genes exhibit a strong bias for particular codons [56]. Ribosomal proteins were chosen because it has been shown that they are highly expressed in the genomes and because their numbers (65) allow the increase of the results' significance. Excluding the reference genes, the first hundred genes that had the highest CAI were studied (Figure 3). Over 25 % of these genes are classified as poorly characterised; this proportion is roughly the same as the core genomes suggesting a good representation of the data. As could be expected and described in the literature, the genes involved in information storage and processing are overrepresented (20 %) [57]. Concerning *P. yayanosii*, genes involved in energy production and conversion (C) are met twice as more (17%) compared to the other strains (8-11 %). Among those, we find genes involved in ATP/ADP synthase and also genes coding for hydrogenases and ferredoxin oxydoreductases.

In *Pyrococcus*, hydrogenases are involved in a simple respiratory system where they link the oxidation of ferredoxin with the formation of hydrogen and conserves energy in the form of an ion gradient [59]. These results suggest that *P. yayanosii* implemented a seemingly highly expressed system in order to produce and conserve energy under high hydrostatic pressure.

Concerning the other strains, we observed an over-representation of genes involved in replication, recombination and repair in *P. abyssi* (7% vs 0-1 %) these genes are mainly coding for primase and polymerase.

Transcriptome and Proteome analysis

Growth characteristics

P. yayanosii was chosen as our study organism because it's the first hyperthermophilic and obligate piezophile described so far [18]. Preliminary studies showed that the optimal pressure of this specie was at 52 MPa [19]. However, these studies were done after 24h of cultures in stationary phase [18]. As described in the literature, pressure studies done on stationary and exponential phases show different results [60]. This is mainly due to the membrane fluidity, which allows transfer between the cytoplasm and the exterior medium during exponential phase, whereas during stationary phase this fluidity is greatly decreased as is the cell metabolism. In order to determine stressful pressures where the growth rates are divided by two relatively to the optimal pressure, growth kinetics were done at pressure ranging from 0.1 to 80 MPa and growth rates were determined (Figure 4). As a result, 20 and 80 MPa were respectively chosen as sub and supra-optimal pressures for *P. yayanosii*.

Transcriptomics and proteomics analyses were then performed in the same conditions as described in the material and methods section.

Concerning the proteomics analysis, 794 proteins were encountered, which corresponded to 42 % of *P. yayanosii* proteome. These proportions are slightly higher to those described previously on a same type of study done on *T. onnurineus* where Moon *et al.* compared the proteomic expression when cells were grown on different carbon sources [61]. The proteins which are identified have a molecular weight of about 40 kDa with a minimum of 4 and a maximum at 200 kDa, which approximately corresponds to the whole proteome values.

P. yayanosii analysis showed that 84 genes and 153 proteins are up-regulated at 20 MPa vs 52 MPa, whereas 83 genes and 70 proteins are down-regulated. Concerning the 80 MPa vs 52 MPa conditions, 138 genes and 132 proteins are up-regulated and 83 genes and 77 proteins are down-regulated. When comparing the two conditions 20 and 80 vs 52 MPa, one can see that 53 genes and 66 are up-regulated in both conditions whereas 38 genes and 27 proteins are down-regulated (Figure 5).

Real time RT-PCR was used to validate the transcriptomic data of a set of 22 selected genes encoding hydrogenase subunits, regulators, transporters, *cas* and conserved hypothetical proteins. As illustrated in Table 4, their expression changes revealed by real time RT-PCR resulted in values mostly broader than those from microarrays, illustrating the broader dynamic range of this method compared to microarray measurements [62, 63].

KOBAS and GOLEM analyses were done using respectively KEGG annotations and GO ontology (UniprotKB) [34, 35, 64, 65] and the results are presented in Table 5. They show distinctive regulations between the transcriptome and proteome analysis.

The expression of genes involved in energy metabolism via hydrogenases is down-regulated in sub and supra optimal pressure conditions whereas the expression of genes involved in chemotaxis, translation via the ribosomes and genes coding for transmembrane ATPases is upregulated in stressful conditions. Concerning the translational regulations, proteins involved in translation and formate metabolism are down-regulated whereas those involved in tRNA biosynthesis, hydrogenases and proteins which possess an oxydo-reductase activity are up-regulated in stressful pressures conditions.

Chemotaxis

P. yayanosii genes encoding for the chemotaxis pathway (PYCH_15450-490) are up-regulated at a transcriptional level at 20 and 80 against 52 MPa as reference. These genes are encoding for CheA, two CheC, CheD and a methyl-accepting chemotaxis protein (MCP). It should be noted that the chemotaxis pathway of Bacteria and Archaea are quite close related [66]. The MCP acts as the stimuli receptor and permit the autophosphorylation of the histidine kinase CheA. The phosphate is then used as a substrate for the CheY protein whose gene (PYCH_015430) is slightly overexpressed although not differentially (FC=1.6). The CheC protein hydrolyse CheY and is predicted to be connected to the archaellum by a still unknown mechanisms in *Archaea*. CheD is a deamidase that deamidates particular glutamines. The role of this function is not yet fully understood. However it seems that the deamidation is necessary for activation of the receptors [66, 67]. Two modes of swimming exists, one where the flagellum or archaellum rotates in clock-wise direction and the cell goes forward and one where the mobility apparatus rotates in counter clock wise direction and the cell change direction. It has been reviewed in bacteria that when CheA or CheY are overexpressed this increase the probability that the motor switches to rotation in the opposite direction [68]. The important changes in the chemotaxis pathway in *P. yayanosii*

confirm the importance of the effects of HHP on cells. Furthermore, the overexpression of this pathway in stressful conditions could indicate an increase number of counter clock wise rotation of the archaellum and a way for the cells to try to find the way to optimal pressure nutritional conditions. These effects should be put into consideration with the speed of the hydrothermal vents (1-2 m/s) which could propel the cells at different depths and so different hydrostatic pressure [69].

Translation

Ribosomal subunits are also regulated under stressful conditions for *P. yayanosii* (80 and 20 vs 52 MPa). The genes in the operon are up-regulated (PYCH_01380-90, PYCH_01410-60, PYCH_01490-550 and, PYCH_01570-90) whereas the proteins are down-regulated (PYCH_01370-80, PYCH_01400-20, PYCH_01480-90, PYCH_01510, PYCH_01540-70 and, PYCH_01590-600)(Figure 6).

P. yayanosii possesses all the aminoacyl-tRNA synthetases needed to catalyse the formation of aa-tRNAs from tRNA by direct aminoacylation. Among the 24 aminoacyl-tRNA synthetases proteins (2 subunits for the glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase (PYCH_11560-70) and for phenylalanyl-tRNA synthetase (PYCH_10260-70)) that *P. yayanosii* possesses, 15 are up-regulated in stressful conditions. These proteins are involved in the biosynthesis of glutamate, aspartate, asparagine, glycine, serine, methionine, valine, leucine, isoleucine, lysine, arginine, proline, tyrosine and tryptophan t-RNA associated (PYCH_00680, PYCH_02710, PYCH_03070, PYCH_03590, PYCH_04180, PYCH_05570, PYCH_05590, PYCH_08110, PYCH_09250, PYCH_09360, PYCH_09490, PYCH_10500, PYCH_13210, PYCH_13620, PYCH_16780). Apart for the cysteinyl-tRNA synthetase (PYCH_17450) which hasn't been detected in the experiment, the other proteins involved in the biosynthesis of alanine, threonine, cysteine, and phenylalanine associated tRNA are not regulated from a translational point of view. Interestingly, 13 tRNA are down-regulated under low pressure in the same strain, these tRNA are the arginine, asparagine, glutamic acid, glutamine, histidine, leucine, lysine, methionine, serine, threonine and a generic tRNA. Regulation of tRNA synthetases and tRNA doesn't seem correlated with the capacity of the strain to synthesise amino acids. Up-regulation of tRNA synthetases suggests a decrease in activity under stressful pressures. The activity of these enzymes under HPH was only measured in *E. coli*,

where it decreases sharply from 10 MPa [70]. On the contrary the down-regulation of tRNA is correlated with that of proteins subunits of the ribosome at low pressure, which implies a decrease in translation at 20 MPa.

Except for ribosomes and tRNA biosynthesis genes or proteins, all the elements regulated by the HHP in *P. yayanosii* have a link to the membrane, like the chemotaxis pathway described above. Genes encoding for a transmembrane ATPase are also up-regulated at 80 vs 52 MPa (PYCH_15710-60). These genes are subunits of a V-ATPase, who serves as generator of a proton gradient driving the accumulation of solutes and ATP synthesis [71]. Incidentally, it has been shown that acidification of the cytosol in yeasts due to high pressure has an impact on glycolysis [72] and that an ATPase plays a role in removing the H⁺ ions to vacuoles thus increasing the cytosolic pH [73]. One could then suppose that the overexpressed V-ATPase genes could regulate the intracellular pH by proton gradient under very high hydrostatic pressure.

Energy metabolism

One of the main pathway regulated under stressful pressures in *P. yayanosii*, whether it's a transcriptional or translation regulation, is the energy pathway with hydrogenases coupled with formate metabolism. Hydrogenases are metalloproteins involved in the reaction $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$ [74]. In *Thermococcales*, hydrogenases can be classified in different clusters, Mbh, SHI, SHII, MBx [59, 75]. These clusters were determined for *P. yayanosii* by homologies with *P. furiosus* genes [59]. The Mbh cluster in *P. yayanosii* corresponds to locus PYCH_11230-360 which is down-regulated under stressful conditions (Figure 7). The Mbx cluster meanwhile is from locus PYCH_11410-530, apart from genes PYCH_11410-20 which are up-regulated under stressful pressures, the rest of the cluster isn't significantly regulated under HHP. Both the SHII (PYCH_08370-400) and the SHI cluster (PYCH_00010-40) are down-regulated under low and high pressure. The function of these last two clusters is still unclear in *P. furiosus* as their deletion doesn't seem to have an effect on the strain, even though they are down-regulated when sulphur is added to the strain [76]. The Mbh cluster has been postulated to represent a simple form of respiration, in that it generates molecular H₂ and can use the energy to create an ion gradient across the membrane [77]. The Mbx cluster is homologous to the Mbh cluster, can accept electrons from ferredoxin and so create an ion gradient such as Mbh. The main difference between the two is that Mbx is active in presence of sulphur and couples the oxidation of ferredoxin to NADPH formation with the implication of an

NADPH elemental sulfur reductase (NSR) (PYCH_07890) and glutaredoxin-like protein (Pdo) (PYCH_16300), even though the function of the latter is still unclear [78].

The main regional cluster regulated under pressure is coding for formate metabolism (fdh2-mfh2-mnh2 cluster: PYCH_11030-200) and the Mbh cluster (PYCH_10960-11360) [79, 80]. This cluster doesn't have a homology with other *Thermococcales*, even though some of the genes present do have some. The genes down-regulated under high and low pressures are coding for a coenzyme F420 hydrogenase (PYCH_10960-70), formate dehydrogenases (PYCH_10990, PYCH_11030), formate hydrogenlyase (PYCH_11050-110), 4Fe-4S cluster binding proteins (PYCH_11040, PYCH_11220), and part of the Mbh cluster (Figure 7). Proteins are also down-regulated with formate dehydrogenases (PYCH_10990, PYCH_11030), subunits of formate hydrogenlyases (PYCH_11070, PYCH_11090), a membrane bound complex (PYCH_11170), a pyridine nucleotide disulphide oxido-reductase (PYCH_11210), and the Mbh cluster (Figure 7).

Relationship between formate metabolism and hydrogenases has been investigated in *Thermococcales* especially *Thermococcus litoralis* and *Thermococcus onnurineus* [79, 81]. Formate is oxidized to CO₂ by a formate dehydrogenase and then protons are reduced to H₂ by a hydrogenase in response to formate accumulation during fermentation. This allows the cell to maintain its cytoplasmic pH. At least three different formate clusters exists in *T. onnurineus* but only one seems to be responsible of cell growth on formate (fdh2-mfh2-mnh2, TON_1536-1580) [79]. This cluster is organised as two dehydrogenase subunits, 7 [NiFe]-hydrogenase subunits, one hypothetical protein, the formate transporter and 7 NA⁺/H⁺ antiporter subunits. This *T. onnurineus* cluster has been aligned by Mauve with the *P. yayanosii* formate cluster (PYCH_10960-11200)[82] (Figure ??). The alignment show that the *T. onnurineus* cluster corresponds to the loci PYCH_11030-11200, with a strong homology between the two clusters, suggesting that *P. yayanosii* can metabolize formate as is the case with *T. litoralis* and *T. onnurineus*. However and in contrast to the other strains, the two clusters of formate dehydrogenase and Mbh are localized near to each other (Figure 7).

Given the down-regulation of this cluster in stressful conditions, one could suggest that in optimal conditions, the strain derive enough energy from the conversion of formate to bicarbonate and H₂ to sustain growth, suggesting a difficulty for the cell to transport formate when placed in stressful conditions. In *P. furiosus*, when sulphur is added the Mbh cluster is down-regulated and is replaced by the Mbx cluster [78]. Interestingly part of this cluster is

up-regulated in stressful conditions in *P. yayanosii*, and at the same time, the NSR protein (PYCH_07890) and the Pdo protein (PYCH_16300) are also up-regulated. These results, strongly suggest an energy shift between optimal and stressful conditions in term of the high pressure, similar to the addition of sulphur to *P. furiosus*, despite the absence of the formate cluster [59](Figure 8).

Thiamine/purine biosynthesis

Other regulated clusters in *P. yayanosii* included genes involved in thiamine/purine biosynthesis, replication, CRISPR and ABC transport. Genes involved in thiamine/purine biosynthesis are overexpressed at 80 vs 52 MPa, especially the cluster PYCH_06240-280, encoding for a ribulose-1,5-phosphatase, and a thiamine biosynthesis protein (PYCH_06240-50) belonging to the thiamine biosynthesis pathway and the SAICAR synthase, AICAR synthase and IMP cyclohydrolase (PYCH_06260-80), catalyzing the reaction from CAIR to IMP in the purine biosynthesis pathway. However, one enzyme appears to be missing in *P. yayanosii* linking the two pathways (AIR carboxylase) even though it's present in a lot of *Thermococcales* [83].

Replication

Next to this cluster, we find two locus (PYCH_06170 and PYCH_06190) encoding for a bipolar DNA helicase and a chromosome segregation protein, who's more probably a DNA double-strand break repair Rad 50 ATPase has it possesses 75% id with a Rad50 ATPase from *T. barophilus*. Both are up-regulated at very high pressure. This up-regulation is in correlation with the up-regulation of another cluster PYCH_16160-210 which is composed of a 5'-methylthioadenosine phosphorylase, the cdc6, two DNA polymerase, a metallo-beta-lactamase and a DNA repair and recombination protein. The presence of the cdc6 strongly suggests that the replication origin is situated in this cluster. A blast search was done using the origin replication determined in *P. furiosus* [84], confirming the presence of the origin of replication between the 5'-methylthioadenosine phosphorylase and the cdc6 (PYCH_016160-70). The upregulation of these replication genes along with the regulation of the ribosomal cluster strongly suggest a stress response of *P. yayanosii* to stressful pressure, whereas the regulation of hydrogenases and formate enzymes could be considered as a metabolic shift and so a metabolic adaptation.

CRISPR-*cas*

P. yayanosii possesses 3 CRISPR-*cas* clusters that aren't regulated in the same way. Some genes from the PYCH_07940-8060 cluster are down-regulated under low pressure. Regulated genes are all *cas* (PYCH_07990-8030). Another regulated cluster is comprised of genes only 3 of which are over-expressed at 20 and 80 MPa (PYCH_09580-600). The differential regulation of these clusters seems to support the hypothesis that these regions are subject to strong rearrangements related to potential viral infections.

Another genomic cluster who's comprised of a CRISPR- *cas* system is also regulated (PYCH_14110-590)(Figure 9). We can divide this cluster in three. First we find a region that seems to be an ancient integration of a genomic element (PYCH_14110-300). This region is characterised by the presence of a SSVI integrase (PYCH_14110) and the alignments of certain genes with a plasmid from *Thermococcus* sp. 26-2 [47]. Almost all the genes are coding for hypothetical proteins and some are up-regulated at low pressure (Figure 9). The second part of the cluster (PYCH_14310-420) is partially orthologous to *P. horikoshii*. Some genes and proteins of this region are regulated by the HHP. The PYCH_14320 gene who's coding for a hypothetic protein is up-regulated at 20 MPa. The PYCH_14390-400 proteins are upregulated at 80 MPa. They correspond to a 2-phosphoglycerate kinase and a cyclic 2,3-diphosphoglycerate-synthetase, respectively. These two proteins are responsible for the cyclic 2,3-diphosphoglycerate (cDPG) synthesis. The cDPG is a low molecular weight compound that accumulates to high levels in some hyperthermophilic methanogens like *Methanothermus fervidus* and *Methanopyrus kandleri*. Studies suggest that it's involved in temperature adaptation or energy storage [85, 86]. In *P. yayanosii*, cDPG could play a role in HHP adaptation. The last part of the cluster corresponds to the PYCH_14430-460 genes coding for CRISPR- *cas* (Figure 9). Part of this cluster is downregulated under HHP (PYCH_14430-70, 14500-510) whereas the other part is upregulated under the same conditions (PYCH_14560-590). All these proteins are coding for *cas*.

These results seem to suggest a particular role of *cas* genes in the resistance or sensitivity to high pressure, even though they are believed to be only involved in the regulation of extracellular RNA coming from viruses or plasmids [87]. However a few studies done on bacteria or fungi have indicated a potential role of *cas* genes in biofilm or spores formation [88, 89]. One could then suggest that in some cases, *cas* genes could play a role in transcriptional regulation a bit like the RNA interference system in eucaryotes Reference 90.

Glycolysis pathway

The glycolysis pathway is also affected by HHP in *P. yayanosii* even though it's not considered to be significantly regulated. Almost all the elements involved in the conversion of glucose to acetate are over-expressed in stressful conditions except the pyruvate kinase (PYK) (PYCH_07870) which convert the phosphoenolpyruvate (PEP) into pyruvate and whose protein is down-regulated at low pressure. The 3-phosphoglycerate kinase (PGK) that catalyses the conversion of Glucose 6P to Fructose 6P isn't regulated under HHP. Regulation of the glycolysis pathway confirms the general effect of pressure on the energy metabolism even though a lot of the regulated genes or proteins are also involved in other metabolisms such as the amino acids biosynthesis and the tricarboxylic acid cycle.

Non coding RNA

Analysis of the regulation of non-coding RNA in *P. yayanosii* showed that four of them appear to be regulated under HHP (Table 6). Three of them are part of the HgcC family whereas the last one is predicted to be part of the SscA family. These two ncRNA families were found in hyperthermophilic microorganisms such as *Methanocaldococcus jannaschii* and *Thermococcales*. Their functions are currently unknown [92].

The antisens ncRNA PY_Ssca is up-regulated at 80 MPa and is located in the middle of the PYCH_02850 gene who's coding for a hypothetical protein in the opposite orientation. Interestingly, the PYCH_02860 protein is up-regulated in the same conditions. This permease is part of large group of transporters (MFS family). The reverse regulation between the two could indicate a repressor role of the ncRNA.

The PY_HgcC_18 ncRNA is up-regulated in stressful conditions and is located in the same orientation in the PYCH_13530 gene who's coding for a TldD/PmbA protease. These proteins play a role in the modulation of the gyrase activity in *E. coli* [93]. PYCH_13540 and PYCH_13550 genes are also up-regulated at 80 MPa. They are coding for a SAM-dependent methyltransferase and a carbon-nitrogen hydrolase. The SAM compound is a universal cofactor that plays a role in the transfer of methyls groups to DNA, proteins, and secondary metabolites [94]. The carbon-nitrogen hydrolase is predicted to be involved in the reduction of nitrogenous compounds [95].

The other two ncRNA are in close vicinity with one another (300 bp) but aren't regulated in the same way just they are located in opposite direction to each other (PY_HgccC_22: sens and PY_HgccC_22 : antisens). They are respectively located in genes PYCH_17430 and

PYCH_17440 who are coding for an alpha-ribazole phosphatase (CobZ) and a Cobalamin (5'-phosphate) synthase. These two proteins are involved in cobalamine (B12 vitamin) where the CobZ protein is replacing CobC in Archaea [96, 97]. These two genomic elements aren't regulated but genes PYCH_17470 and PYCH_17480 are down-regulated at 80 MPa. Both are coding for ribonucleoside triphosphate reductases. These enzymes catalyze the formation of desoxyribonucleotides from ribonucleotides. They are playing a key role in the regulation of DNA synthesis maintaining it at a constant level during cell division [98, 99]. The ncRNA could then be involved in this mechanism of regulation.

Transporters

Pyrococcus possesses ≈ 25 predicted ABC transporter clusters [100]. Among those *P. yayanosii* possesses two di/oligopeptide transporters (PYCH_03130-170, and PYCH_15860-900), and a carbohydrate transporter (PYCH_17080-110) that are regulated under pressure [101]. One of the di/oligopeptide transporter (PYCH_03130-170) protein cluster is down-regulated at low pressure and up-regulated at high pressure, whereas the other (PYCH_15860-900) is only down-regulated at low pressure (2/4 proteins). The carbohydrate transporter genes (PYCH_17080-110) are up-regulated at 80 MPa. This last transporter is quite similar to the a carbohydrate transporter described in *P. furiosus* (PF1739-41) which have been described as a maltodextrin transporter leading to the formation of glucose and the glycolysis pathway [102].

Conclusion

Here, we present the first study on the effect of high pressures on a strict piezophile and hyperthermophile Archaea, *P. yayanosii*. Prior studies done on the effect of high pressure on mesophiles and psychrophiles piezosensitives or piezophiles showed major effects on cellular membranes, energy metabolism and translation [1, 2]. Genomic comparisons done on *P. yayanosii* and piezosensitives or piezotolerants related *Pyrococcus* highlighted the fact that its genome seems to have highly adapted to the pressure conditions, with the absence of aromatic amino acid biosynthesis pathways, and a highly expressed energy metabolism in relation with hydrogenases and formate metabolism. High pressure studies were done comparing the cell responses to high and low pressure by transcriptomic and proteomic analyses. Results showed that the responses between high and low pressure are mostly

similar except for certain functions like transmembrane ATPases, replication and part of purine metabolism that are only up-regulated at very high pressure. The main regulations observed affect the chemotaxis pathway, translation via ribosomes, CRISPR-*cas* and the energy metabolism with the regulation of hydrogenases, oxydoreductases and formate metabolism. This last regulation constitutes an important metabolism shift with the down-regulation of hydrogenases and formate metabolism and the up-regulation of oxydoreductases. One can conclude that the modulation of respiration pathways is a general mechanism by which microorganisms adapt to variations in hydrostatic pressure. As this metabolic shift is similar to the one observed in *P. furiosus* when sulfur is added to the culture media, a *P. yayanosii* experiment done in various media conditions (without sulfur, with sugar) could confirm this shift. The regulation of genes involved in replication and transcription (ribosomal subunits) confirm the extensive action of high pressure to the cell. The up-regulation of these genes implies the disruptive role of high pressure on complex protein structure (ribosomes and replication mechanism) related to nucleic acid (RNA or DNA). One could think that the fact that these regulations hadn't been seen so clearly on piezophiles is due to relatively low pressure in which most piezophiles have been studied (< 50 MPa). The development of new high pressure apparatus could allow the study of these effects at higher pressures near 110-120 MPa. The role of *cas* genes need to be further investigated in relation with the high pressure regulation, these clusters could constitute future targets if a genetic tool is developed in *P. yayanosii* a bit like the one which exists in *T. barophilus* [24]. The next step in the study of piezophiles could be to develop a method to analyze the metabolome which could potentially provide a more accurate snapshot of the actual physiological state of the cell [103].

Methods

Media and growth conditions

Pyrococcus yayanosii strain CH1 was isolated from chimney samples harvested from the Ashadze hydrothermal site, at 4100 m depth on the Mid-Atlantic ridge [18, 19], in March 2007 during the Serpentine oceanographic cruise. It was grown at 98 °C under anaerobic conditions in TRM medium ("Thermococcales Rich Medium", [19]). High hydrostatic pressure cultures were performed in sterile syringes and incubated in a high hydrostatic

pressure/high temperature incubator (Top Industrie) from 0.1 MPa to 80 MPa, as previously described [23].

Determination of cell numbers

Growth was monitored by cell counting using a Thoma chamber and photonic microscopy at x40 (Olympus) or using flow cytometer (CyFlow Space, Partec). Cells were fixed with 2 % paraformaldehyde and counted with one of the two above described methods.

DNA purification and extraction

Genomic DNA extraction of both strains was performed using a phenol–chloroform–isoamyl alcohol (PCI) method as described by Thiel *et al.* [24]. The DNA was quantified by NanoDrop and the quality of extraction was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide at a final concentration of 0.5 mg/ml (in a bath of 40 mM Tris pH 8, 40 mM acetate-1 mM EDTA pH 8 (TAE) 1X). The separation was performed at 85 V for 40 min, with a 1 kb ladder (Promega) as the size marker. The routine tests by PCR amplification were performed using Taq Polymerase (Promega), and the PCR cycle was performed as follows: (94 °C/ 5 min; (94 °C/ 60 sec, (50-58) °C/ 60 sec, 72°C/ (1-2 min)) x 25 cycles; 72 °C/ 10 min.

Microarray

The transcriptome was analysed using an Agilent Microarray. It was designed using the Agilent eArray 5.0 program according to the manufacturer's recommendations (<http://earray.chem.agilent.com/earray/>). Each customized microarray (8x60 K, AMADID 048498, Agilent Technologies) contains the whole genome covered by 60-mer oligonucleotides, representing the genes, intergenic space and non-coding RNA. The genes and intergenic space were extracted from the NCBI GenBank Database [25] whereas the ncRNAs were predicted by the LeARN server [26].

RNA purification and extraction

The total RNA extraction method was adapted from Voorhorst *et al.* [27]. The Lithium Chloride precipitation is derived from Puissant and Houdine [28]. 100 ml of cell culture at exponential growth phase (approximately 5 times 10⁷ cells / ml) were centrifuged at 7500 x g, 15 min at 4 °C. The cell pellet was resuspended in one volume of denaturing buffer (4M guanidinium isothiocyanate, 42 mM sodium citrate, 0.83% N-lauryl sarcosine, 0.2mM β-mercaptoethanol) (one volume per 10⁷ cells/ml) followed by the addition of 0.1 volume of 2

M ammonium acetate (pH 4) and 1 volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1). The mixture was incubated on ice for 15 min, and phase separation was obtained by centrifugation for 20 min (10,000 xg, 4 °C, 20 min). The aqueous phase was removed and supplemented with an equal volume of isopropanol, and RNA was precipitated at -20 °C for 1h. After centrifugation (10,000 xg, 4 °C, 20 min), the RNA pellet was resuspended in 1.5ml of 4 M lithium chloride and centrifuged 10 min at 5,000 xg and 4 °C. The RNA pellet was resuspended in a denaturation buffer, precipitated again, washed with ice-cold 75% ethanol, dried, and resuspended in water. The remaining DNA was removed with the addition of 3 units of RQ1 DNase (Promega) at 37 °C for 30 min. The RNA is then purified on the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and the concentration is assessed by NanoDrop. A PCR is done to verify the lack of remaining DNA. Retrotranscription is done using the M-MLV Reverse Transcriptase from Promega using random primers and 2 µg of RNA at 37 °C. The cDNA was then amplified by a classic PCR.

RNA samples (≈750 µg) were sent to Imaxio company (Lyon, France) for microarray analysis where the quality was assessed by Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies). Low Input Quick Amp WT Labeling Kit, One color (Agilent Technologies) was used to synthesize marked cRNA from 50 ng of total RNA. The amplified cRNA were purified using Qiagen's RNeasy mini Kit, quantified by Nanodrop ND-1000 and analysed by Bioanalyseur. The cRNA quantity ranged between 3 and 5 µg. cRNA were fragmented at 60 °C during 30 min in a specific buffer in order to obtain fragments between 50 and 200 nucleotides. Hybridization was performed using 600 ng cRNA at 65 °C during 17 h. After the hybridization, the slides were washed and the microarrays were scanned using an Agilent G2505C scanner. Feature extraction and image analysis software (Feature Extraction Software; Agilent Technologies) was used to locate and delineate every spot in the array, to integrate each spot's intensity, using simple color Agilent protocol (GE1_1105_Oct12).

Normalization and statistical analysis were done by the platform "Génomique Santé de Biosit" of Rennes, France (<http://ouestgenopuces.univ-rennes1.fr/>). First, data were threshold (values below 1.0 were set equal to 1.0) and log2-transformed. Normalization was performed using per-array and per-gene median normalization method (scaling). TMEV software [29] was used to perform the differential expression analysis. Genes differentially expressed between conditions were identified using a multi-class SAM (Significant Analysis

of Microarray). Adjusted p-values were calculated by controlling for a false discovery rate (FDR) of 5%.

Expression Profiling by Real-time RT-PCR

Total RNA and cDNA synthesis was performed as described above. PCR primer pairs were designed using Primer3 software [30] with standard parameters and calibrated with genomic DNA. qPCR was done using the SYBR® Green PCR Master Mix it (Applied Biosystems). For one reaction, 12.5 µl of Master Mix was used along with 1 µM of primers and 1 ng of cDNA. Standard conditions were used with StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), DNA denaturation at 95°C for 10 min followed by 40 cycles of 95°C for 10 sec, 60°C for 10 sec and 72°C for 15 sec. Gene expression was calculated relative to the transcripts levels of the gene 16S rRNA using the formula $\Delta\Delta C_t$ and the software supplied by the system.

Protein extraction and analysis

Protein extraction was done as described by Lee et al. [31] in quadrupled for each condition. 100 ml of cells were centrifugated at 8,000 xg, 15 min at 4°C. The pellet was resuspended in 1 ml of TE buffer and recentrifuged. 500 µl of extraction buffer (25 mM Tris HCl pH 8, 1% SDS and 5 mM DTT) was used to resuspend and vortex the cells for at least 2 min. The suspension was sonicated on ice at 60 % amplitude using 2 sec pulses in an Ultrasonic processor (Misonix) for 20 pulses. Cellular debris was removed by centrifugation at 25,000 xg for 30 min at 4°C. The whole cell lysate supernatant was incubated in a 37 °C water bath for 1 h to completely reduce the sample. Protein content was assessed with the 2D Quant Kit (GE Healthcare).

Short SDS-PAGE runs (5-12%) were performed with 10 µg of total proteins allowing the proteins to migrate for 5-7 mm within the gel. Gels were stained with Coomassie blue (BioRad), roughly cut and sent to PAPPSO platform facilities, Jouy-en-Josas, France (<http://pappso.inra.fr>). The analysis presented here was more thoroughly described in Reference 32. Each gel is cut in a band of approximately 2 mm width and 5-7 mm length. Bands were then washed and digested with trypsin (Promega). Tryptic peptides were extracted, concentrated and desalted on a precolumn cartridge (300 µm i.d, 5 mm Dionex). A separating column (75µm i.d., 150 mm, Nanoseparations) was used to eluate peptides. Peptides were analysed with a Q-exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA) using a nanoelectrospray ion source. Protein identification was performed against the

predicted proteomes of *P. yayanosii* and *P. furiosus* respectively (Uniprot Database, 2013/12/17, [33]). Proteins identified with at least two unique peptides and a log(E-value) lower than 4 were validated.

Statistical analyses to identify regulated proteins were performed with the PepC software using spectra counts for each protein. Regulations between conditions were considered statistically reliable when the p-value was below 5 % and the fold change greater than 2.

Statistical analysis

Once differential genes and proteins were determined, over-expressed KEGG categories were identified using the KOBAS website [34] and a binomial test. Over-represented GO terms were identified using the GO Local Exploration Map (GOLEM) software (version 2.1) [35] with a FDR of 5 %. The Enrichment Map plugin [36] of the Cytoscape software [37] was used to summarize the data. Syntheny of the regulated genes clusters were represented using the SyntTax website (<http://archaea.u-psud.fr/synttax/>) [38] and the EasyFig software.

Acknowledgments

The authors would like to thank Didier Chevret for performing proteomic analysis and Mickael Beauverger for help with performing proteins extraction and gel migration. We are indebted to Helen McCombie for helpful language improvement. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1725 01-Living deep) and G. M. was supported by a PhD fellowship from the Conseil Régional de Bretagne.

References

1. Oger PM, Jebbar M: **The many ways of coping with pressure.** *Research in microbiology* 2010,**161**:799–809.
2. Bartlett D: **Pressure effects on in vivo microbial processes.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 2002, **1595**:367–381.
3. Simonato F, Campanaro S, Lauro FM, Vezzi A, D'Angelo M, Vitulo N, Valle G, Bartlett DH: **Piezophilic adaptation: a genomic point of view.** *Journal of biotechnology* 2006, **126**:11–25.
4. Eloë EA, Lauro FM, Vogel RF, Bartlett DH: **The deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 utilizes separate flagellar systems for swimming and swarming under high-pressure conditions.** *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**:6298–6305.
5. Tamegai H, Li L, Masui N, Kato C: **A denitrifying bacterium from the deep sea at 11 000-m depth.** *Extremophiles* 1997, **1**:207–211.
6. Chikuma S, Kasahara R, Kato C, Tamegai H: **Bacterial adaptation to high pressure: a respiratory system in the deep-sea bacterium *Shewanella violacea* DSS12.** *FEMS microbiology letters* 2007, **267**:108–112.
7. Tamegai H, Nishikawa S, Haga M, Bartlett DH: **The respiratory system of the piezophile**

- Photobacterium profundum SS9 grown under various pressures.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2011, **76**:1506–1510.
8. Pradel N, Ji B, Gimenez G, Talla E, Lenoble P, Garel M, Tamburini C, Fourquet P, Lebrun R, Bertin P, Denis Y, Pophillat M, Barbe V, Ollivier B, Dolla A: **The First Genomic and Proteomic Characterization of a Deep-Sea Sulfate Reducer: Insights into the Piezophilic Lifestyle of *Desulfovibrio piezophilus*.** *PloS one* 2013, **8**:e55130.
9. McDonald JH, Grasso AM, Rejto LK: **Patterns of temperature adaptation in proteins from *Methanococcus* and *Bacillus*.** *Molecular biology and evolution* 1999, **16**:1785–1790.
10. Di Giulio M: **A comparison of proteins from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus abyssi*: barophily in the physicochemical properties of amino acids and in the genetic code.** *Gene* 2005, **346**:1–6.
11. Di Giulio M: **The origin of the genetic code in the ocean abysses: new comparisons confirm old observations.** *Journal of theoretical biology* 2013.
12. Campanaro S, Treu L, Valle G: **Protein evolution in deep sea bacteria: an analysis of amino acids substitution rates.** *BMC Evolutionary Biology* 2008, **8**:313.
13. Marteinsson VT, Birrien J-L, Reysenbach A-L, Vernet M, Marie D, Gambacorta A, Messner P, Sleytr UB, Prieur D: ***Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent.** *International journal of systematic bacteriology* 1999, **49**:351–359.
14. Zeng X, Zhang X, Jiang L, Alain K, Jebbar M, Shao Z: ***Palaeococcus pacificus* sp. nov., an archaeon from deep-sea hydrothermal sediment.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2013, **63**:2155–2159.
15. Takai K, Sugai A, Itoh T, Horikoshi K: ***Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2000, **50**:489–500.
16. Alain K, Marteinsson VT, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, Prieur D, Birrien JL: ***Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2002, **52**:1331.
17. Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Horikoshi K: **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* 2008, **105**:10949–10954.
18. Birrien J-L, Zeng X, Jebbar M, Cambon-Bonavita M-A, Quérellou J, Oger P, Bienvenu N, Xiao X, Prieur D: ***Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent.** *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2011, **61**:2827–2881.
19. Zeng X, Birrien J-L, Fouquet Y, Cherkashov G, Jebbar M, Querellou J, Oger P, Cambon-Bonavita M-A, Xiao X, Prieur D: ***Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life.** *The ISME journal* 2009, **3**:873–876.
20. Jun X, Lupeng L, Minjuan X, Oger P, Fengping W, Jebbar M, Xiang X: **Complete genome sequence of the obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* CH1.** *Journal of bacteriology* 2011, **193**:4297–4298.
21. Lucas S, Han J, Lapidus A, Cheng J-F, Goodwin LA, Pitluck S, Peters L, Mikhailova N, Teshima H, Detter JC, others: **Complete Genome Sequence of the Thermophilic, Piezophilic, Heterotrophic Bacterium *Marinitoga piezophila* KA3.** *Journal of bacteriology* 2012, **194**:5974–5975.
22. Vannier P, Marteinsson VT, Fridjonsson OH, Oger P, Jebbar M: **Complete genome sequence of the hyperthermophilic, piezophilic, heterotrophic, and carboxydutrophic archaeon *Thermococcus barophilus* MP.** *Journal of bacteriology* 2011, **193**:1481–1482.
23. Marteinsson VT, Moulin P, Birrien J, Gambacorta A, Vernet M, Prieur D: **Physiological Responses to Stress Conditions and Barophilic Behavior of the Hyperthermophilic Vent Archaeon *Pyrococcus abyssi*.** *Applied and environmental microbiology* 1997, **63**:1230–1236.

24. Thiel A, Michoud G, Moalic Y, Flament D, Jebbar M: **Genetic manipulations of the hyperthermophilic piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus***. *Appl. Environ. Microbiol.* 2014.
25. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW: **GenBank**. *Nucleic acids research* 2012, **40**:D48–D53.
26. Noirot C, Gaspin C, Schiex T, Gouzy J: **LeARN: a platform for detecting, clustering and annotating non-coding RNAs**. *BMC bioinformatics* 2008, **9**:21.
27. Voorhorst W, Eggen R, Luesink EJ, De Vos W: **Characterization of the celB gene coding for beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its expression and site-directed mutation in *Escherichia coli***. *Journal of bacteriology* 1995, **177**:7105.
28. Puissant C, Houdebine L-M: **An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction**. *Biotechniques* 1990, **8**:148.
29. Saeed A, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, Braisted J, Klapa M, Currier T, Thiagarajan M, others: **TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis**. *Biotechniques* 2003, **34**:374.
30. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG: **Primer3—new capabilities and interfaces**. *Nucleic acids research* 2012, **40**:e115–e115.
31. Lee AM, Sevinisky JR, Bundy JL, Grunden AM, Stephenson Jr JL: **Proteomics of *Pyrococcus furiosus*, a hyperthermophilic archaeon refractory to traditional methods**. *Journal of proteome research* 2009, **8**:3844–3851.
32. Arfi Y, Chevret D, Henrissat B, Berrin J-G, Levasseur A, Record E: **Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp.** *Nature communications* 2013, **4**:1810.
33. UniProt Consortium T: **Activities at the Universal Protein Resource (UniProt)**. *Nucleic Acids Research* 2014, **42**:D191–D198.
34. Xie C, Mao X, Huang J, Ding Y, Wu J, Dong S, Kong L, Gao G, Li C-Y, Wei L: **KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases**. *Nucleic acids research* 2011, **39**:W316–W322.
35. Sealfon R, Hibbs M, Huttenhower C, Myers C, Troyanskaya O: **GOLEM: an interactive graph-based gene-ontology navigation and analysis tool**. *BMC bioinformatics* 2006, **7**:443.
36. Merico D, Isserlin R, Stueker O, Emili A, Bader GD: **Enrichment map: a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation**. *PloS one* 2010, **5**:e13984.
37. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T: **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks**. *Genome research* 2003, **13**:2498–2504.
38. Oberto J: **SyntTax: a web server linking syntenicity to prokaryotic taxonomy**. *BMC bioinformatics* 2013, **14**:4.
39. Wolf YI, Makarova KS, Yutin N, Koonin EV, others: **Updated clusters of orthologous genes for Archaea: a complex ancestor of the Archaea and the byways of horizontal gene transfer**. *Biol Direct* 2012.
40. Langille MG, Brinkman FS: **IslandViewer: an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands**. *Bioinformatics* 2009, **25**:664–665.
41. Siguier P, Pérochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M: **ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences**. *Nucleic acids research* 2006, **34**:D32–D36.
42. Escobar-Páramo P, Ghosh S, DiRuggiero J: **Evidence for genetic drift in the diversification of a geographically isolated population of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus***. *Molecular biology and evolution* 2005, **22**:2297–2303.
43. White JR, Escobar-Paramo P, Mongodin EF, Nelson KE, DiRuggiero J: **Extensive genome rearrangements and multiple horizontal gene transfers in a population of *Pyrococcus* isolates from Vulcano Island, Italy**. *Applied and environmental microbiology* 2008, **74**:6447–6451.
44. Blom J, Albaum S, Doppmeier D, Pühler A, Vorhölter F-J, Zakrzewski M, Goesmann A: **EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes**. *BMC bioinformatics* 2009, **10**:154.

45. Horvath P, Barrangou R: **CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.** *Science* 2010, **327**:167–170.
46. Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS: **PHAST: a fast phage search tool.** *Nucleic acids research* 2011, **39**:W347–W352.
47. Soler N, Marguet E, Cortez D, Desnoues N, Keller J, van Tilbeurgh H, Sezonov G, Forterre P: **Two novel families of plasmids from hyperthermophilic archaea encoding new families of replication proteins.** *Nucleic acids research* 2010, **38**:5088–5104..
49. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M: **KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets.** *Nucleic acids research* 2012, **40**:D109–D114.
50. Zivanovic Y, Lopez P, Philippe H, Forterre P: **Pyrococcus genome comparison evidences chromosome shuffling-driven evolution.** *Nucleic acids research* 2002, **30**:1902.
51. Heizer EM, Raiford DW, Raymer ML, Doom TE, Miller RV, Krane DE: **Amino acid cost and codon-usage biases in 6 prokaryotic genomes: a whole-genome analysis.** *Molecular biology and evolution* 2006, **23**:1670–1680.
52. Swire J: **Selection on synthesis cost affects interprotein amino acid usage in all three domains of life.** *Journal of molecular evolution* 2007, **64**:558–571.
53. Hurst LD, Feil EJ, Rocha EP: **Protein evolution: causes of trends in amino-acid gain and loss.** *Nature* 2006, **442**:E11–E12.
54. Jordan IK, Kondrashov FA, Adzhubei IA, Wolf YI, Koonin EV, Kondrashov AS, Sunyaev S: **A universal trend of amino acid gain and loss in protein evolution.** *Nature* 2005, **433**:633–638.
55. Wu G, Culley DE, Zhang W: **Predicted highly expressed genes in the genomes of Streptomyces coelicolor and Streptomyces avermitilis and the implications for their metabolism.** *Microbiology* 2005, **151**:2175–2187.
56. Karlin S, Campbell AM, Mrazek J: **Comparative DNA analysis across diverse genomes.** *Annual review of genetics* 1998, **32**:185–225.
57. Karlin S, Mrázek J: **Predicted highly expressed genes of diverse prokaryotic genomes.** *Journal of bacteriology* 2000, **182**:5238–5250.
58. Warnes GR, Bolker B, Bonebakker L, Gentleman R, Huber W, Liaw A, Lumley T, Maechler M, Magnusson A, Moeller S, others: **gplots: Various R programming tools for plotting data.** *R package version* 2009, **2**.
59. Schut GJ, Boyd ES, Peters JW, Adams MW: **The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications.** *FEMS Microbiology Reviews* 2012.
60. Mañas P, Mackey BM: **Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential-and stationary-phase cells of Escherichia coli: relationship with cell death.** *Applied and environmental microbiology* 2004, **70**:1545–1554.
61. Moon Y-J, Kwon J, Yun S-H, Lim HL, Kim M-S, Kang SG, Lee J-H, Choi J-S, Kim SI, Chung Y-H: **Proteome analyses of hydrogen-producing hyperthermophilic archaeon Thermococcus onnurineus NA1 in different one-carbon substrate culture conditions.** *Molecular & Cellular Proteomics* 2012, **11**.
62. Charbonnier Y, Gettler B, François P, Bento M, Renzoni A, Vaudaux P, Schlegel W, Schrenzel J: **A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genotyping, deletion mapping and gene expression analysis on Staphylococcus aureus.** *BMC genomics* 2005, **6**:95.
63. Garzoni C, Francois P, Huyghe A, Couzinet S, Tapparel C, Charbonnier Y, Renzoni A, Lucchini S, Lew DP, Vaudaux P, others: **A global view of Staphylococcus aureus whole genome expression upon internalization in human epithelial cells.** *BMC genomics* 2007, **8**:171.
64. Kanehisa M, Goto S: **KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.** *Nucleic acids research* 2000, **28**:27–30.
65. Magrane M, others: **UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data.** *Database: the journal of biological databases and curation* 2011, **2011**.
66. Szurmant H, Ordal GW: **Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea.**

- Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2004, **68**:301–319.
67. Schlesner M, Miller A, Streif S, Staudinger WF, Müller J, Scheffer B, Siedler F, Oesterhelt D: **Identification of Archaea-specific chemotaxis proteins which interact with the flagellar apparatus.** *BMC microbiology* 2009, **9**:56.
68. Berg HC: **The rotary motor of bacterial flagella.** *Biochemistry* 2003, **72**:19.
69. Herzog B, Wirth R: **Swimming Behavior of Selected Species of Archaea.** *Applied and Environmental Microbiology* 2012, **78**:1670–1674.
70. Hildebrand C, Pollard E: **Hydrostatic pressure effects on protein synthesis.** *Biophysical journal* 1972, **12**:1235–1250.
71. Lau WC, Rubinstein JL: **Structure of intact Thermus thermophilus V-ATPase by cryo-EM reveals organization of the membrane-bound VO motor.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010, **107**:1367–1372.
72. Abe F, Horikoshi K: **Analysis of intracellular pH in the yeast Saccharomyces cerevisiae under elevated hydrostatic pressure: a study in baro-(piezo-) physiology.** *Extremophiles* 1998, **2**:223–228.
73. Serrano R: **Structure and function of plasma membrane ATPase.** *Annual review of plant biology* 1989, **40**:61–94.
74. Vignais PM, Colbeau A: **Molecular biology of microbial hydrogenases.** *Current issues in molecular biology* 2004, **6**:159–188.
75. Lim JK, Kang SG, Lebedinsky AV, Lee J-H, Lee HS: **Identification of a novel class of membrane-bound [NiFe]-hydrogenases in Thermococcus onnurineus NA1 by in silico analysis.** *Applied and environmental microbiology* 2010, **76**:6286–6289.
76. Lipscomb GL, Keese AM, Cowart DM, Schut GJ, Thomm M, Adams MW, Scott RA: **SurR: a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in Pyrococcus furiosus.** *Molecular microbiology* 2009, **71**:332–349.
77. Sapra R, Bagramyan K, Adams MW: **A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**:7545–7550.
78. Schut GJ, Bridger SL, Adams MW: **Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus: characterization of a coenzyme A-dependent NAD (P) H sulfur oxidoreductase.** *Journal of bacteriology* 2007, **189**:4431–4441.
79. Kim YJ, Lee HS, Kim ES, Bae SS, Lim JK, Matsumi R, Lebedinsky AV, Sokolova TG, Kozhevnikova DA, Cha SS, others: **Formate-driven growth coupled with H₂ production.** *Nature* 2010, **467**:352–355.
80. Schut GJ, Nixon WJ, Lipscomb GL, Scott RA, Adams MW: **Mutational analyses of the enzymes involved in the metabolism of hydrogen by the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus.** *Frontiers in microbiology* 2012, **3**.
81. Ta-kács M, Tóth A, Bogos B, Varga A, Rákhely G, Kovács KL: **Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, Thermococcus litoralis.** *BMC microbiology* 2008, **8**:88.
82. Darling AC, Mau B, Blattner FR, Perna NT: **Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements.** *Genome research* 2004, **14**:1394–1403.
83. Brown AM, Hoopes SL, White RH, Sarisky CA: **Purine biosynthesis in archaea: variations on a theme.** *Biology direct* 2011, **6**:63.
84. Matsunaga F, Glatigny A, Mucchielli-Giorgi M-H, Agier N, Delacroix H, Marisa L, Durosay P, Ishino Y, Aggerbeck L, Forterre P: **Genomewide and biochemical analyses of DNA-binding activity of Cdc6/Orc1 and Mcm proteins in Pyrococcus sp.** *Nucleic acids research* 2007, **35**:3214–3222.
85. Lehmacher A, Hensel R: **Cloning, sequencing and expression of the gene encoding 2-phosphoglycerate kinase from Methanothermus fervidus.** *Molecular and General Genetics MGG* 1994, **242**:163–168.
86. Matussek K, Moritz P, Brunner N, Eckerskorn C, Hensel R: **Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding cyclic 2, 3-diphosphoglycerate synthetase, the key enzyme of cyclic 2, 3-diphosphoglycerate metabolism in Methanothermus fervidus.** *Journal of bacteriology* 1998, **180**:5997–6004.
87. Marraffini LA, Sontheimer EJ: **CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria**

and archaea. *Nature Reviews Genetics* 2010, **11**:181–190.

88. Viswanathan P, Murphy K, Julien B, Garza AG, Kroos L: **Regulation of dev, an operon that includes genes essential for Myxococcus xanthus development and CRISPR-associated genes and repeats.** *Journal of bacteriology* 2007, **189**:3738–3750.

89. Zegans ME, Wagner JC, Cady KC, Murphy DM, Hammond JH, O'Toole GA: **Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of Pseudomonas aeruginosa.** *Journal of bacteriology* 2009, **191**:210–219.

90. Makarova KS, Grishin NV, Shabalina SA, Wolf YI, Koonin EV: **A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action.** *Biology direct* 2006, **1**:7.

91. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA: **Easyfig: a genome comparison visualizer.** *Bioinformatics* 2011, **27**:1009–1010.

92. Klein RJ, Misulovin Z, Eddy SR: **Noncoding RNA genes identified in AT-rich hyperthermophiles.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, **99**:7542–7547.

93. Murayama N, Shimizu H, Takiguchi S, Baba Y, Amino H, Horiuchi T, Sekimizu K, Miki T: **Evidence for Involvement of Escherichia coli Genes pmbA, csrA and a Previously Unrecognized Gene tldD, in the Control of DNA Gyrase by letD (ccdB) of Sex Factor F.** *Journal of molecular biology* 1996, **256**:483–502.

94. Loenen W: **S-adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?** *Biochemical Society Transactions* 2006, **34**:330.

95. Bork P, Koonin EV: **A new family of carbon-nitrogen hydrolases.** *Protein Science* 1994, **3**:1344–1346.

96. Zayas CL, Woodson JD, Escalante-Semerena JC: **The cobZ gene of Methanosarcina mazei Gö1 encodes the nonorthologous replacement of the α -ribazole-5'-phosphate phosphatase (CobC) enzyme of Salmonella enterica.** *Journal of bacteriology* 2006, **188**:2740–2743.

97. Roth JR, Lawrence JG, Rubenfield M, Kieffer-Higgins S, Church GM: **Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of Salmonella typhimurium.** *Journal of bacteriology* 1993, **175**:3303–3316.

98. Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB: **Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation.** *Trends in biochemical sciences* 1992, **17**:119–123.

99. Herrick J, Sclavi B: **Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage.** *Molecular microbiology* 2007, **63**:22–34.

100. Albers S-V, Koning SM, Konings WN, Driessen AJ: **Insights into ABC transport in archaea.** *Journal of bioenergetics and biomembranes* 2004, **36**:5–15.

101. Ren Q, Chen K, Paulsen IT: **TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels.** *Nucleic acids research* 2007, **35**:D274–D279.

102. Lee H-S, Shockley KR, Schut GJ, Connors SB, Montero CI, Johnson MR, Chou C-J, Bridger SL, Wigner N, Brehm SD, others: **Transcriptional and biochemical analysis of starch metabolism in the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus.** *Journal of bacteriology* 2006, **188**:2115–2125.

103. Tang J: **Microbial metabolomics.** *Current genomics* 2011, **12**:391.

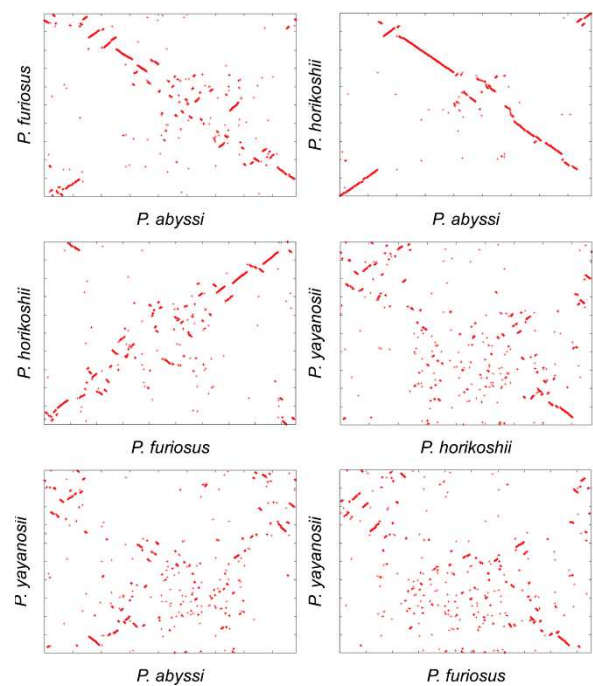


Figure 1 : DotPlot of whole genomes between the four strains. The genomes are extremely rearranged, with duplications and inversions

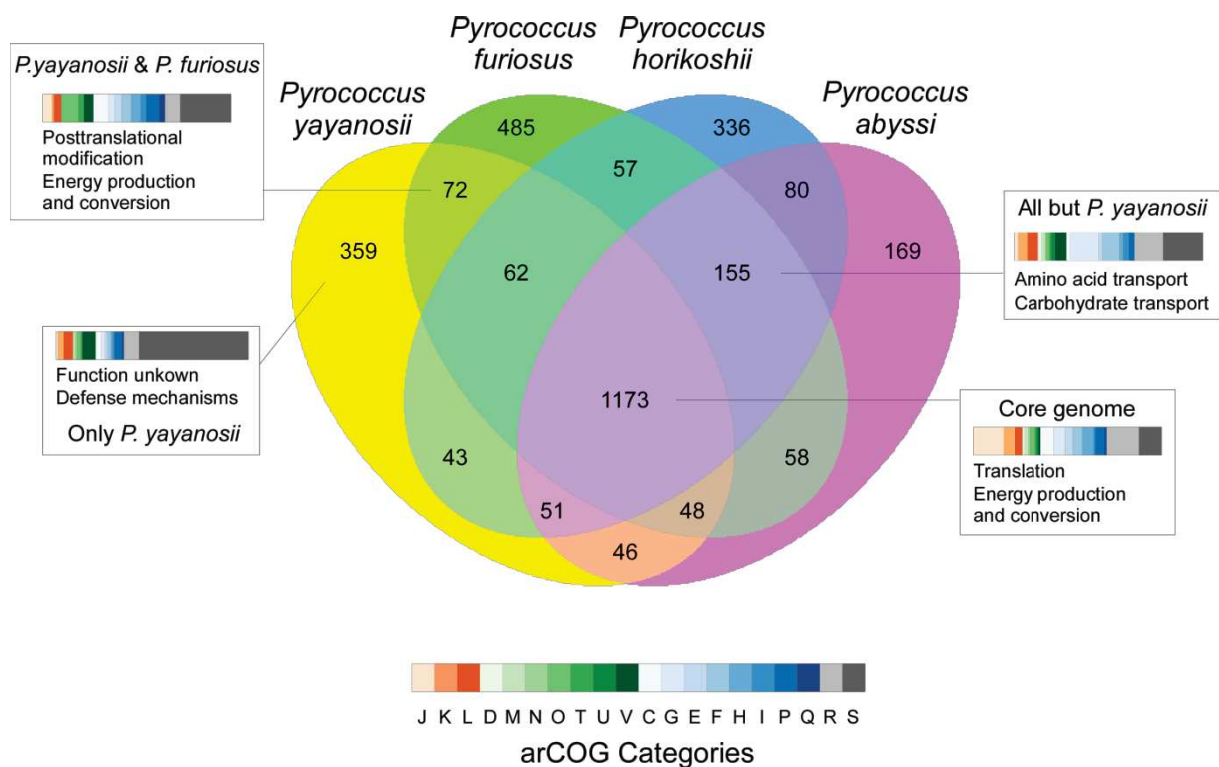


Figure 2 : A - 4 way Venn diagram of orthologous genes calculated by reciprocal hits. *P. yayanosii* (yellow), *P. furiosus* (green), *P. horikoshii* (blue) and *P. abyssi* (purple). Numbers shown in Venn diagram correspond to the orthologous gene groups given in respective pattern. arCOG categories represent the information storage and

processing (orange palette), Cellular processes and signaling (green palette), Metabolism (blue palette) et poorly characterized genes (grey palette). B – CAI was done using ribosomal proteins as references, the 100 higher CAI are represented for each strain.

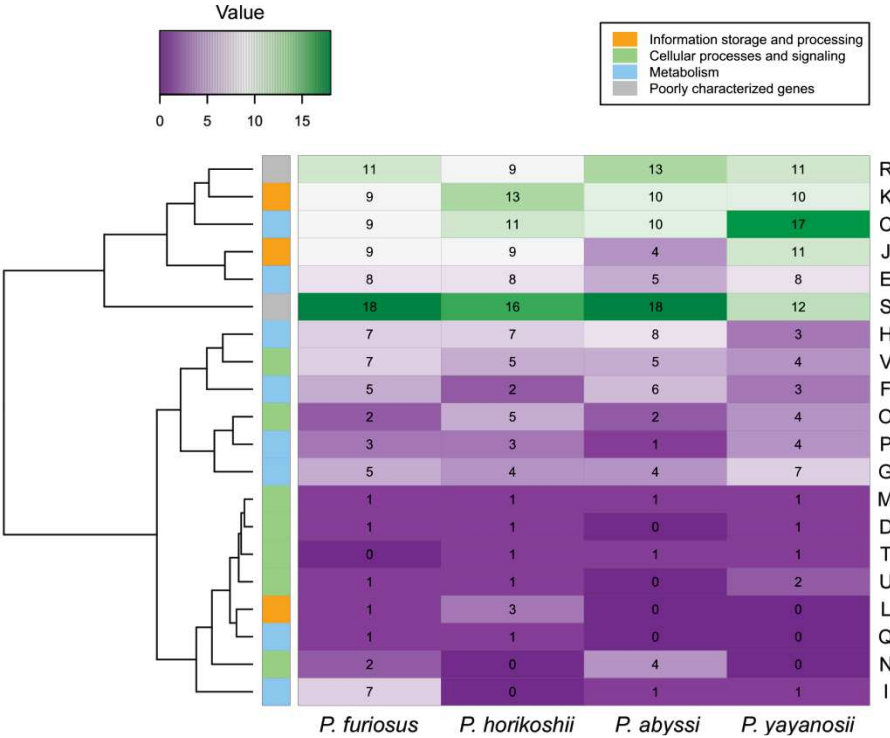


Figure 3 : Heatmap representing the proportion of highly expressed genes by arCOG categories done using the R script “gplots” [58] .

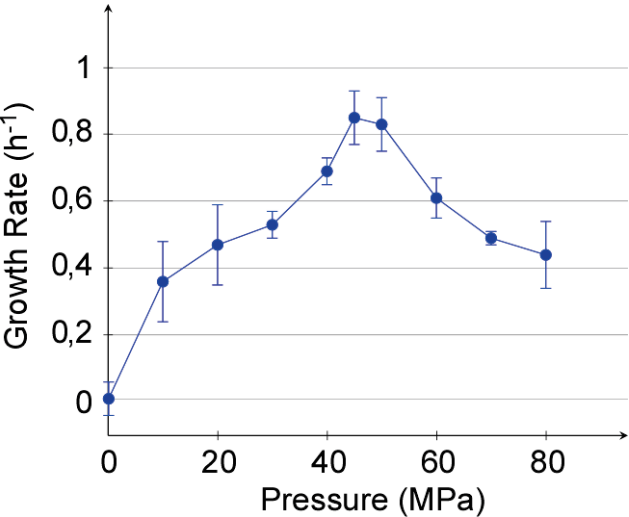


Figure 4 : Growth assays of *P. yayanosii*.

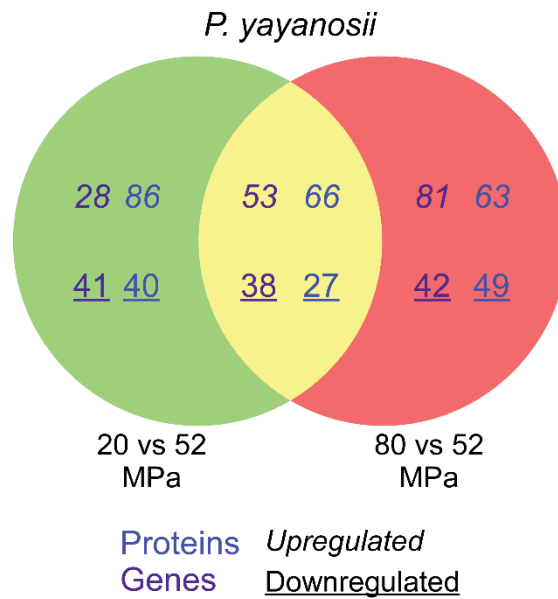


Figure 5 : Venn diagram of proteins and genes regulation in *P. yayanosii*. Genes are in purple and proteins are in blue. Up-regulated element in italic and down-regulated element in bold. The regulation is between 20 and 80 MPa vs 52 MPa as reference for *P. yayanosii*.

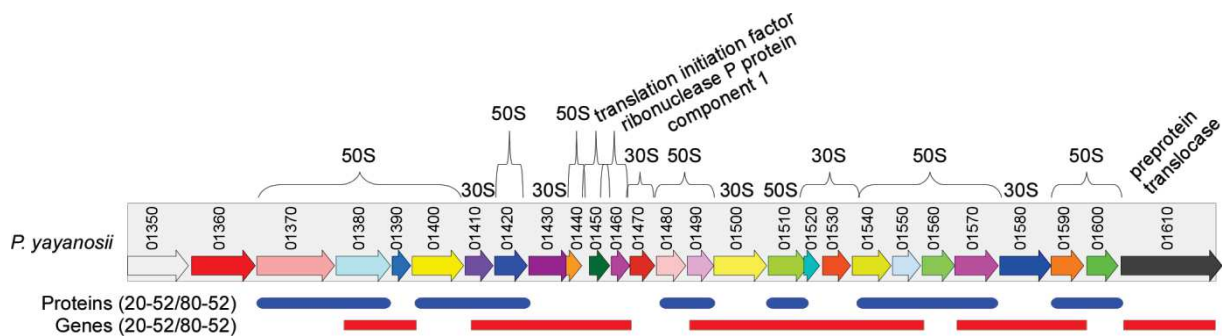


Figure 6 : Ribosomal clusters of *P. yayanosii*. The arrows represents the genes, the ovals the expression results of RNA and the rectangle the expression results of proteins. The red color mean the surexpression whereas the blue on the downregulation on conditions indicated on the left.

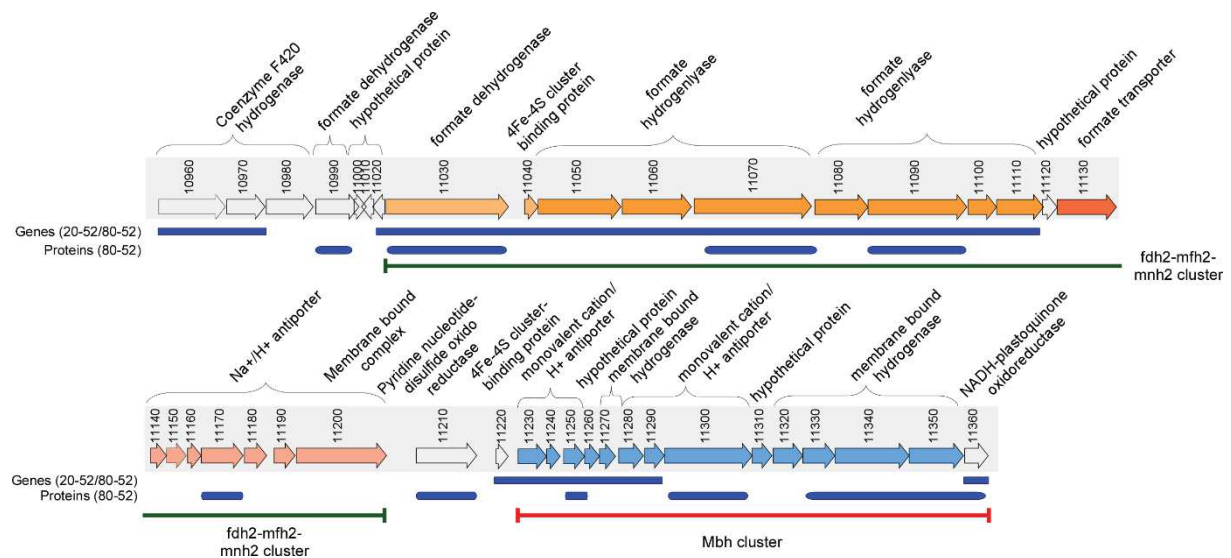


Figure 7 : Formate and hydrogenase clusters of *P. yayanosii*. The arrows represent the genes, the ovals the expression results of RNA and the rectangle the expression results of proteins. The blue color mean the downregulation on conditions indicated on the left. The green bar corresponds to the cluster fdh2-mfh2-mnh2 that has been described in *T. onnurineus* responsible of formate metabolism [79]. The red bar corresponds to the cluster Mbh that have been described in *P. furiosus* involved in the reduction of protons to H_2 [59].

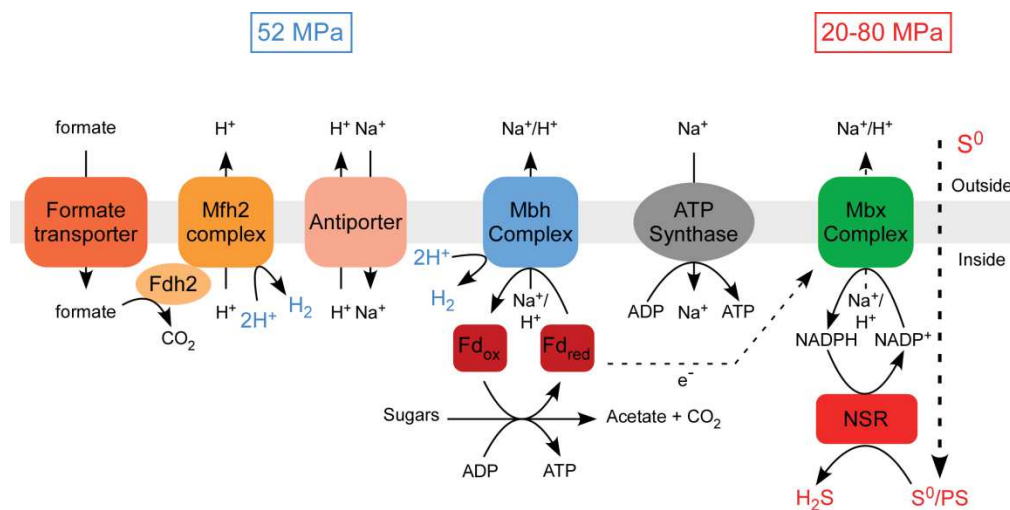


Figure 8 : Schematic representation of the proposed roles of the fdh2-mfh2-mnh2, Mbh and Mbx cluster in the production of H_2 in *P. yayanosii*. The antiporter correspond to the mnh2 part of the formate cluster. Fdox and Fdred indicate oxidized ferredoxin and reduced ferredoxin, respectively. Inspired from Schut *et al.*, 2012 and Kim *et al.*, 2010 [59, 79].

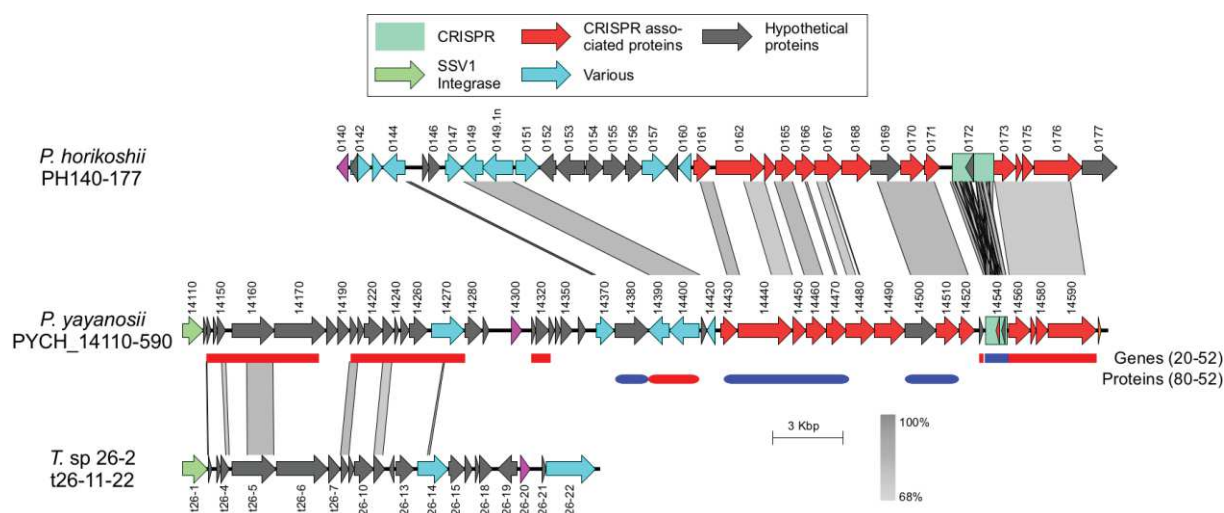


Figure 9 : Alignement of a regulated *P. yayanosii* CRISPR-*cas* cluster with part of a plasmid of *Thermococcus* sp. 26-2 and *P. horikoshii* [47]. The arrows represent the genes, the ovals the expression results of RNA and the rectangle the expression results of proteins. The blue color mean the down-regulation on conditions indicated on the left whereas the red one corresponds to the up-regulation. The alignments were done with the Easyfig software (blastn, e-value 10^{-4})[91].

List of Tables

Table 1 : General features of the 4 species of *Pyrococcus* studied, *P. abyssi* GE5, *P. furiosus* DSM 3638, *P. horikoshii* OT3 and *P. yayanosii* CH1

	<i>Pyrococcus abyssi</i> GE5	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3	<i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1
Size (bp)	1,768,562	1,908,256	1,738,505	1,716,818
Predicted CDS	2051	2179	2061	1915
GC %	45	41	42	52
CDS %	92.86	90.41	91.94	89.91
Mean CDS length (bp)	863	842	843	828
rRNA	5	4	4	4
tRNA	46	46	47	46
arCOG %	72.94	72.28	72.84	74.57

Table 2 : Genomic islands predicted by the IslandViewer software for *P. abyssi*, *P. furiosus*, *P. horikoshii* and *P. yayanosii* [40]. GC % difference is calculated using the genome %GC as reference (Table 1). Function corresponds to the main proteins present in these islands.

Species	"Name"	Coordinates		Length (pb)	Locus	GC% difference	"Function"
<i>P. abyssi</i>	aby_1	387984	402344	14360	PAB2084-73	0.6	Hypothetical
	aby_2	791043	796435	5392	PAB0561-1801	-1.7	Purine & thiamine metabolism
	aby_3	1610398	1629175	18777	PAB1079-1256	-8.3	Hypothetical
<i>P. furiosus</i>	furio_1	702106	714814	12708	PF0693-714	8.1	Hypothetical
	furio_2	724074	728257	4183	PF0728-32	13.3	Copper transport
	furio_3	753017	757328	4311	PF0756-764	2.7	Hypothetical
	furio_4	766356	789585	23229	PF0777-807	-0.6	Hypothetical
	furio_5	793480	797838	4358	PF0811-17	-0.3	Hypothetical
	furio_6	909057	915828	6771	PF0943-53	-0.8	Hypothetical
	furio_7	1833103	1843556	10453	PF1983-94	2.1	Hypothetical & traduction
<i>P. horikoshii</i>	hori_1	365272	375700	10428	PH0409-11	-2.2	Hypothetical
	hori_2	380328	393802	13474	PH0419-30	-7.9	Hypothetical & polysaccharides
	hori_3	1061480	1071074	9594	PF1172-85	-3.2	Hypothetical
	hori_4	1615352	1620253	4901	PH1859-64	-5.7	Hypothetical
<i>P. yayanosii</i>	yaya_1	48349	53075	4726	PYCH_00480-520	-7.2	ABC transport
	yaya_2	377786	383862	6076	PYCH_04590-660	-5.1	Transposase
	yaya_3	672922	680881	7959	PYCH_07770-860	-10.5	Hypothetical
	yaya_4	693429	705048	11619	PYCH_07950-8040	-8	CRISPR-Cas
	yaya_5	764428	769326	4898	PYCH_08660-720	-6.3	Cysteine biosynthesis
	yaya_6	1065373	1069762	4389	PYCH_12090-120	-6.3	ABCt ransport
	yaya_7	1114916	1119422	4506	PYCH_12640-670	-9.1	Hypothetical
	yaya_8	1238311	1254202	15891	PYCH_14110-330	-8.3	Hypothetical
	yaya_9	1321772	1342615	20843	PYCH_15110-340	-11	Hypothetical
	yaya_10	1569831	1597882	28051	PYCH_17580-890	-14.5	glycosyl transferase
	yaya_11	1655845	1662820	6975	PYCH_18570-650	1.5	ATPase Endopeptidase

1019 Table 3 : Predicted pathways of amino acid biosynthesis. -§ is missing the last enzyme
 1020 of the pathway.

Amino Acid	Predicted pathways of amino acid biosynthesis			
	<i>P. abyssi</i>	<i>P. furiosus</i>	<i>P. horikoshii</i>	<i>P. yamanosii</i>
Cys	+	+	-	+
Leu	-§	-§	-	-
Lys	+	+	+	-
Met	-	+	+	-
Phe	-	+	-	-
Trp	+	+	-	-
Val	-§	-§	-	-
Ala	+	+	+	+
Asn	+	+	+	+
Asp	+	+	+	+
Glu	+	+	+	+
Gln	+	+	+	+
Gly	+	+	+	+
His	-	+	-	-
Ile	-§	-§	-	-
Pro	-	-	-	-
Ser	+	+	+	+
Thr	+	+	+	+
Tyr	-	+	-	-

1021

VI.2. Deep sea microbes probed by incoherent neutron scattering under high hydrostatic pressure (Peters *et al.*, 2014)

L'étude des effets des hautes pressions hydrostatiques (HPH) sur les protéines est rendue compliquée par le fait que les pressions nécessaires à atteindre avant d'observer des effets sur leurs structures et leurs cinétiques sont bien au dessus des limites actuelles de la vie sur terre. Il existe un grand nombre de techniques permettant l'étude de ces protéines mais à des pressions souvent supérieures à 200 mégapascal (MPa). Le tableau VI.1 page ci-contre tiré de MOZHAEV *et al.* (1996) décrit ainsi les différents types de techniques et la pression auxquelles elles sont utilisées. Un des exemples illustrant ce problème est une étude sur la structure quaternaire et la fonction d'une peptidase chez *P. horikoshii* qui résiste jusqu'à des pression de 300 MPa et dont l'activité est accrue jusqu'à 180 MPa (ROSENBAUM *et al.*, 2012). Ces pressions se trouvent bien au delà de la pression optimale ou de supraoptimale qui sont respectivement à 0,1 et 40 MPa (ZENG *et al.*, 2009).

La fonction et la structure des protéines ne semblant pas significativement affectée par des pressions compatibles avec celles observées actuellement sur terre, de nouvelles techniques ont été proposées. L'une d'entre-elle est la diffusion neutronique. Elle repose sur le fait que les protéines adaptent à tout moment leur conformation et notamment leur flexibilité ou leur rigidité. Des neutrons sont envoyés sur ces protéines et suivant si celles-ci sont plus ou moins en mouvement, les neutrons seront plus ou moins déviés. La diffusion neutronique est une technique qui a déjà été utilisée pour étudier l'influence de la température sur le dynamisme conformationnel des protéines. Un modèle a ainsi été mis au point par DOSTER *et al.* en 1989, en dessous de 200 K soit ≈ -73 °C les protéines sont des solides dont les mouvements sont très limités. Au contraire, dès que la tempéra-

Structure ou fonction protéique	Techniques	Limite supérieure de la pression appliquée (kbar)
Primaire		Pas d'effet
Secondaire	Vibrational spectroscopy	20
Tertiaire	NMR spectroscopy	5
	X-ray analysis	1
	UV-vis and fluorescence spectroscopy	10
	Molecular dynamic simulation	
Quaternaire	Electrophoresis	5
	Ultracentrifugation	1
	Fluorescence spectroscopy	10
	NMR spectroscopy	2
Liaison au ligand	Flash photolysis	2
	Affinity electrophoresis	2
Activité enzymatique	Different spectroscopie	10
	Stopped flow	2
	Rapid sampling	2

TABLEAU VI.1.: Inventaire non exhaustif de techniques pour l'étude sous hautes pressions de protéines tiré de MOZHAEV *et al.* (1996)

ture dépasse ce seuil, les atomes sont susceptibles de sauter d'une position à une autre. La protéine peut changer de sous-état conformationnel grâce à la température (DOSTER *et al.*, 1989; JASNIN, 2006). Les protéines peuvent posséder plusieurs conformations qui se traduisent par différents états énergétiques possibles pour les atomes et donc une plus grande flexibilité ou rigidité de celles-ci. Les neutrons sont essentiellement « captés » par les atomes d'hydrogènes dont les mouvements reflètent ceux des chaînes latérales et principales et donc de la dynamique globale de la structure. Les études de diffusion neutronique que nous avons effectuées se sont situées à l'Institut Laue Langevin (ILL) (www.ill.fr) à Grenoble, ainsi qu'à l'Institut de Biologie Structurale (www.ibs.fr). Le but était d'étudier l'effet des HPH sur la dynamique global des protéines de deux *Thermococcales*, *T. barophilus* et *T. kodakarensis*, la première piézophile et la deuxième piézosensible et les comparer avec l'espèce *E. coli* dont la dynamique a déjà été étudiée mais en fonction de la température. Ces expériences se sont déroulés sur le spectromètre à rétrodiffusion IN13 de l'ILL (Figure VI.1 page suivante).

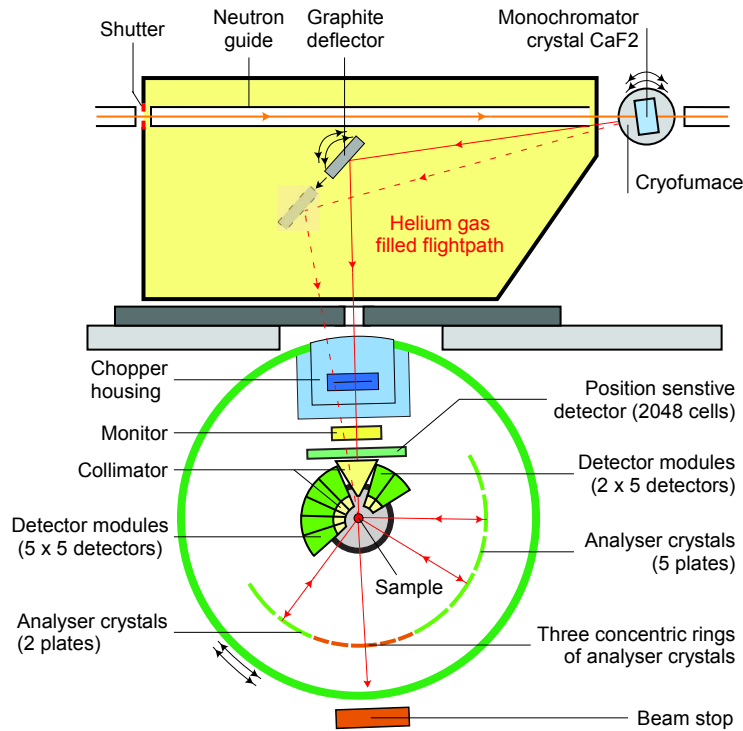


FIGURE VI.1.: Schéma du spectromètre IN13 de l'ILL (image extraite du site www.ill.fr).

Celui-ci permet de détecter des mouvements atomiques de quelques angströms sur une centaine de picoseconde (JASNIN, 2006). Les culots cellulaires sont placés à différentes pressions sous un flux de neutrons dans un cas de diffusion incohérente. La diffusion cohérente représentant l'interaction entre paires d'atomes différents, et la partie incohérente représente l'interaction de chaque atome avec lui-même. La diffusion cohérente donnant ainsi des informations sur la structure de l'échantillon alors que la diffusion incohérente des informations sur sa dynamique. Cette dernière possède aussi l'avantage de pouvoir être utilisée avec des cellules entières sans devoir extraire préalablement le protéome. Les résultats des expériences sont exprimés en autres en déplacements carrés moyen (MSD en $\text{\AA}^2$) en fonction de la pression, ce qui permet de s'affranchir du sens de déplacement des atomes.

La principale difficulté de ce travail consiste à obtenir des échantillons les plus similaires possibles, ce à quoi a consisté mon travail principal. Les cellules ont été cultivées en grand volume (2L) dans du TRM (Section II.1.1 page 63) à 85°C en conditions anaérobies pendant environ 12h jusqu'à atteindre la fin de la phase exponentielle de croissance se situant dans ces conditions à environ 5×10^7 cellules/ml. Un flush sous azote pendant 20-30 min est ensuite réalisé pour éliminer le sulfure d'hydrogène présent en grande quantité. Les cellules sont ensuite centrifugées 8 000 x g pendant 15 min en tentant de conserver l'anaérobie par des flush à l'azote lors du remplissage des pots de centrifugations. Une fois les cellules concentrées, elles sont placées dans une enceinte anaérobie ou elles sont lavées dans un tampon anoxique (150 mM NaCl, 5 mM KCl et 10 mM Tris HCl) puis re-centrifugées dans les mêmes conditions. Le culot cellulaire (100-120 mg) est ensuite introduit dans un tube adapté à l'expérimentation de 6 mm de diamètre, congelé à -80 °C et envoyé à l'ILL en carboglace. Sur place le tube est décongelé puis placé dans un appareil approprié en conditions anoxiques puis compléter avec du D₂O. les expériences ont ensuite été conduites à différentes pressions à température ambiante. La viabilité cellulaire a été estimée avant et après expériences et était d'environ 50 % de cellule. Il faut par ailleurs noter que la re-suspension cellulaire après expérience est très compliquée du fait du faible diamètre du tube et de la sédimentation importante après congélation et une expérience de 3-4 j, contrairement aux expériences précédente sur *E. coli* sans appareillage de pression (MARTY *et al.*, 2013).

Les expériences ont été réalisés en triplicats sur 3 ans, les résultats montrent que *T. barophilus* et *T. kodakarensis* possèdent des profils similaires avec des changements dynamiques et donc des réarrangements structurels à basse pression contrairement au témoin *E. coli*, puis une stabilité des protéines jusqu'à des pressions très élevées (1,2 kbar). Néanmoins il est difficile d'en tirer des conclusions au vu de la faible température d'étude (20 °C) comparée à la température optimale de croissance (85 °C).

Deep sea microbes probed by incoherent neutron scattering under high hydrostatic pressure

J. Peters^{1,2,3 *}, N. Martinez^{1,2,3}, G. Michoud⁴, A. Cario⁵, B. Franzetti², P. Oger⁵, M. Jebbar⁴

¹ Institut Laue Langevin, F-38042 Grenoble Cedex 9, France

² Institut de Biologie Structurale (IBS), CNRS/CEA/Grenoble-Alpes Univ., F-38042 Grenoble Cedex 9, France

³ Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble Cedex 9, France

⁴ Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR 6197 UBO CNRS Ifremer, IUEM Technopole Brest-Iroise, F – 29280 Plouzane

⁵ Laboratoire de Géologie de Lyon, UMR CNRS 5276, Ecole Normale Supérieure de Lyon, F - 69364 LYON cedex 07

Abstract.

The majority of the biosphere is a high pressure environment. Around 79% of the marine biosphere lies at depths below 1000 m, i.e. at pressures of 100 bars or higher. To survive in these environments, deep-biosphere organisms have adapted to life at high pressure. *In vitro* studies showed that the activity of certain proteins originating from deep-sea organisms is less affected by high pressure than that of enzymes from surface organisms [1, 2, 3]. However, the genetic and structural bases for this increased pressure resistance are still unknown. Elastic incoherent neutron scattering studies, which provide access to information about molecular dynamics, constitute a very promising approach to decipher the structural adaptation in proteins living under high pressure. This approach has been used in the past to investigate the adaptation of biological systems to temperature and salinity and proved to be essential and complementary to structural studies. Here first investigations of high pressure effects on cell dynamics are presented using *Thermococcales* as models.

1. Introduction

Recent estimations suggest that life on Earth dwells mostly in the so-called "Deep-Biosphere", e.g. below the surface of the Earth. The deep biosphere, located in the continental underground and in the oceans below 1000 m in depth, could represent up to 70% of all cells on Earth, as well as 50% of the primary production of biomass. Although the deep biosphere represents therefore the largest ecosystem on Earth, it is still poorly characterized in terms of diversity or function [4, 5]. Most of these biotopes are oligotrophic in nature, and characterized by high hydrostatic pressures (HHP). HHP is inhibitory to many biological functions, and deep-biosphere organisms have developed adaptive strategies to counteract its effects, but their mechanism remains largely unknown so far.

Several HHP-adapted organisms, or piezophiles (from the greek piezo = to press and philo = love, piezophiles have optimal growth rates at pressures greater than 1 atmosphere or 0.1 MPa), have been isolated, such as in 1981 the strain MT-41 of *Colwellia*, the first obligate piezophile organism [6], and in 2009 the *Pyrococcus yayanosii* strain CH1, the first obligate piezophile and hyperthermophile isolated from the Ashadze site. These organisms require HHP for growth, and have pressure optima in excess of the permissive pressure for surface organisms. Our current knowledge clearly supports the existence of an adaptation to HHP in piezophilic organisms. Indeed HHP strongly impacts the cell membrane and the cellular pro-

*corresponding author :
peters@ill.fr

teins. It was, for instance, evidenced that microorganisms can adapt the lipid composition of their membranes in order to maintain an appropriate permeability and viscosity, a phenomenon referred to as homeoviscous adaptation [7]. For example, to counteract the rigidifying effect of high pressure and maintain membranes in the physiological liquid state cells will incorporate lipids with increased unsaturation levels. The kinked chain of unsaturated lipids decreases the chain ordering and thus lowers the transition temperature T_m [8] helping in this way the organisms to survive under high pressure conditions. In contrary, it is yet unclear how proteins from piezophilic organisms have adapted.

Elastic incoherent neutron scattering (EINS) experiments have recently revealed important differences in the mean molecular dynamics between organisms adapted to high and low temperature habitats [9]. The mean flexibility and resilience of the macromolecules were obtained and gave valuable insights on how thermoadaptation in macromolecules is achieved. These experiments were performed on whole living cells thus allowing studying the dynamics of biomolecules in their cellular context. The signal obtained from elastic neutron scattering experiments on whole cells is in fact expected to be dominated by the contribution from the proteins. In adaptation studies, measuring whole cell systems is therefore advantageous compared to experiments on individual proteins as the adaptation mechanism of one specific protein can deviate significantly from the predominant mechanism.

2. Materials and Methods

2.1 Sample preparation

Microorganisms used in this study were *Thermococcus barophilus*, a piezophile and hyperthermophile, which grows optimally at 40 MPa and 85°C and *Thermococcus kodakarensis*, a hyperthermophile, which lives at atmospheric pressure and 85° C. *Escherichia coli* was used as a mesophile reference. Cells of *T. barophilus* and *T. kodakarensis* were cultivated in TRM medium [10] at atmospheric pressure and 85°C until late exponential phase at the LM2E laboratory in Brest (France). Under anoxic conditions, cells were washed once in isotonic solution, pelleted in a high pressure aluminum capsule, frozen at -80 °C and transferred in dry ice to the Institut Laue Langevin (ILL) in Grenoble (France), in order to avoid damages due to oxygen contamination during transport.

For the neutron experiments the thin aluminum cartridges of a diameter of 2 mm and a height of 3 cm were loaded into the high pressure container under anaerobic conditions at room temperature to limit the contact of the samples with oxygen. The sample volume (6 mm diameter) was further filled with D₂O as a pressure transmission medium. As neutrons are essentially scattered by hydrogen atoms (see § 2.3 below), this allows to probe only the cells and the H₂O molecules inside the cells or bound to their surface. Under the experimental conditions, the samples were stable for several days at atmospheric pressure.

2.2 High pressure equipment

A high pressure equipment dedicated to neutron scattering experiments of biological samples in solution has been developed over the last years at the ILL in Grenoble [11]. In brief, it consists of a high pressure stick, which can be placed in the cryostats or cryofurnaces of the instruments, a pressure controller which allows a remote control and permanent adjustment of

pressure and cylindrical pressure containers built of a high-tensile aluminum alloy. Two high pressure sample holders are currently available, withstanding pressures up to 7 kbar (700 MPa) and 1.5 kbar, respectively. The latter one was used in the experiments presented here.

2.3 Neutron scattering experiments

Whereas coherent neutron scattering takes advantage of the interference of neutron waves scattered from different atomic nuclei preserving the phase, incoherent scattering sees neutron waves scattered by one and the same nucleus at different times, which gives rise to a self-diffusion effect [12]. Spectrometers allow to investigate incoherent neutron scattering by using samples in solution, what destroys spatial ordering, to follow averaged atomic motion of individual particles in time. The incoherent neutron scattering intensity is dominated by the signal arising from hydrogen. This is due to the hydrogen incoherent scattering cross section, which is one order of magnitude larger than that of all other elements usually occurring in biological matter, and also of its isotope deuterium [13]. The technique thus probes average protein dynamics, because hydrogen atoms are almost uniformly distributed in the protein and representative for the molecular subgroups to which they are bound. Thus when using D₂O for the surrounding water, its signal is negligible compared to signal arising from the sample itself and the light water contained in it.

For the actual study we used a backscattering spectrometer, IN13 [14], of the ILL in Grenoble/France. It has an energy resolution of 8 μ eV, corresponding to a time window up to 100 ps. It is therefore very well suited for such studies as it permits to see internal motions, arising mainly from the amino acid side chains, without mixing them with a signal from global diffusive motions or water motion. The latter movements correspond in fact to longer and smaller time scales, respectively. In consequence, a spectrometer acts as a motion filter highlighting specific dynamics in the samples. Elastic scattering data, corresponding to the situation where no energy is exchanged, but the neutrons are deviated from their initial direction giving rise to an exchange of momentum, designated as Q , were analyzed through the scattering function $S(Q, 0 \pm \Delta E)$, where ΔE means the instrumental resolution. Assuming a normal distribution of the atoms around their average position it reduces in terms of the Gaussian approximation [15] to:

$$S(Q, 0 \pm \Delta E) \approx \exp\left(-\frac{1}{6}Q^2\langle u^2 \rangle\right). \quad (1)$$

Here $\langle u^2 \rangle$ are the average atomic mean-square displacements (MSD). The MSD values are obtained for each temperature/pressure point from the slope of the logarithm of the scattered intensities $S(Q, 0 \pm \Delta E)$ plotted versus Q^2 according to

$$\langle u^2 \rangle = -6 \frac{\partial \ln S(Q, 0 \pm \Delta E)}{\partial Q^2}. \quad (2)$$

This approximation is strictly speaking only valid for $Q \rightarrow 0$, but can be extended to $\langle u^2 \rangle Q^2 < 2$ [16]. Accordingly, in this study the fit range was restricted to the linear range in the low Q regime between 0.5 $\text{\AA}^{-1}$ and 1.9 $\text{\AA}^{-1}$.

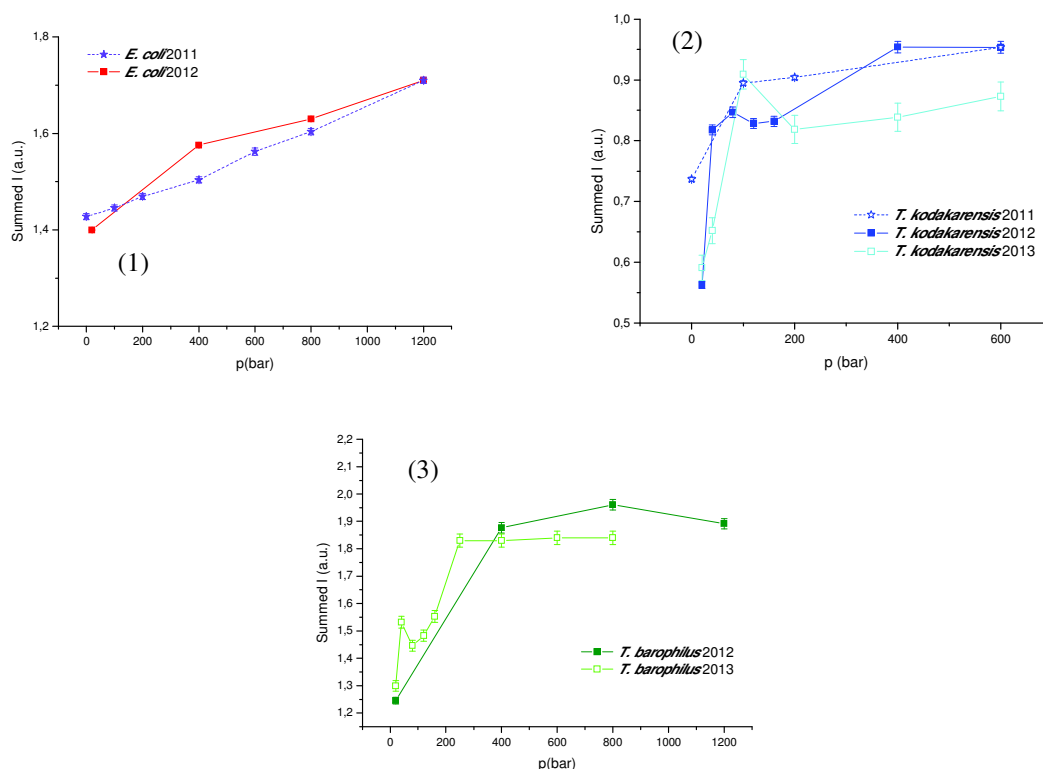
Each pressure and temperature point was measured for at least 6 hours to ensure a sufficient signal-to-noise ratio. For correction and normalization purposes, the empty cell, the buffer (D₂O) and a vanadium rod (a completely incoherent scatterer) were recorded under similar conditions. Absorption corrections based on the formula of Paalman-Pings [17] were applied

and the complete data reduction was carried out using the LAMP software available at the Institut Laue Langevin (ILL) [18, 19].

3. Results and Discussion

3.1 Summed neutron intensities

The main challenge in such experiments arises from the fact that prokaryotic cells are highly complex biological systems. They are composed of several compartments (membrane, cytoplasm, skeleton, ribosomes), which are composed of lipids, cholesterol, proteins, nucleic acids, water, and numerous other molecules. Thus reproducibility of the experiments may be an issue, even when cells are prepared with the greatest care [20, 21]. Neutron scattering experiments are long (typically several days) and usually require the isolation of the cells from nutrients or the use of physico-chemical conditions far from the cell optima. Moreover, the high pressure container absorbs the neutrons much more than standard neutron scattering sample holders, therefore the statistics are poor, further increasing acquisition time. The current series of measurements totaled 3 weeks data acquisition over a 3-year period. In these conditions, it is crucial to determine the most appropriate handling procedures for each type of cells to prepare them for the measurements.



Figures 1 - 3: Neutron intensities summed over the Q-range from 0.5 to 2.1 $\text{\AA}^{-1}$ for all three samples. (1) represents data for *E. coli*, (2) for *T. kodakarensis* and (3) for *T. barophilus*. The stars and dashed lines represent results from 2011 (only for *E. coli* and *T. kodakarensis*), the filled symbols represent results from 2012 and the open symbols from 2013 (only for *T. kodakarensis* and *T. barophilus*).

Figures 1 - 3 show the collected intensities, corrected for the empty cell and buffer contributions and normalized to vanadium, summed over a Q-range from 0.5 to 2.1 Å⁻¹. Starting from eq. (1), one shows that the intensities summed over Q are inversely proportional to the square root of the MSD times a factor and an error function whose argument depends also on the inverse of the square root of the MSD. Such approach permits a fast evaluation of the runs with higher statistics as several points are summed up. The absolute height of the summed intensities depends mainly on the sample mass in the neutron beam. The curves were therefore normalized to allow the direct comparison of their slopes.

At a first glance, all three samples clearly show an increase of the intensities with pressure. As the pressure dependence of the intensities is expected to be inversely related to the behavior of the MSD, such behavior could be expected in agreement with Le Chatelier's principle: high pressure favors a decrease in volume and thus a damping of atomic motions. It is noteworthy that the results are extremely similar for the independent measurements performed over the three years. The error bars take into account statistical uncertainties of the data, but cannot represent differences in the experimental conditions. Taking into account the difficulties inherent to neutron experimentation with samples in a high pressure and anaerobic environment, the agreement is thus rather satisfying.

The intensities' increase with pressure differs from one sample to the other: whereas it looks mostly linear for *E. coli*, the curves for *T. kodakarensis* and *T. barophilus* show two drastically different regimes, with a rapid increase, followed by a plateau. Interestingly, this jump occurs at much lower pressures for the piezosensitive *T. kodakarensis*, ca. 30 bar, than for the piezophile *T. barophilus*, ca. 200 bar. Moreover, the relative increase in summed intensities after the jump seemed to be higher for *T. kodakarensis* than for *T. barophilus*, which may indicate that the *T. barophilus* cells are less affected by HHP than the *T. kodakarensis* cells. These observations are in agreement with the strain physiology; e.g. sensitivity to HHP in *T. kodakarensis* and piezophily for *T. barophilus*.

The MSD – and therefore the inverse of the summed intensities - stand for the flexibility of the sample under specific conditions in pressure and temperature. Comparative measurements of samples under identical conditions permit thus to conclude about their flexibility in a given environment. Moreover, it was possible in the past [22, 23] to establish a function-structure-dynamics relationship showing that proteins can only be operational when they are in a folded, thus native, state, in presence of sufficient hydration and having acquired an adequate flexibility. Indeed when scanning proteins over a large temperature range, going from non-physiological states at 20 K to ambient temperature, a significant change in the mean square displacements occurs typically around 220 K. In the literature it is often referred as “dynamical transition” and interpreted in terms of a transition from purely harmonic motions to anharmonic movements. Obviously the latter ones are mandatory for the functioning of the protein.

It is, however, still unknown if a similar transition exists as function of high pressure. Not many experimental data are available today for proteins exposed to HHP [24, 25, 26] and only a few simulation predictions [27, 28]. They show that a reduction of dynamics with increasing pressure is expected, corresponding first to a reduction of the cavities' volumes, than to a partial unfolding giving access to some internal cavities to water molecules and finally to a complete unfolding process. Protein denaturation induced by unfolding normally occurs at higher pressure than those tested in this experiment, typically above several kbar. In the present case, the results obtained for *E. coli* most probably reflect a linear decrease in flexibility with in-

creasing pressure. However, such a pressure-dependent decrease in flexibility cannot explain the sudden decrease in molecular dynamics observed for the two thermophilic strains *T. kodakarensis* and *T. barophilus*. Their dynamics' decrease is likely to be correlated with structural re-arrangements of macromolecules within the cells. Although our data does not allow to decide which molecules are responding to pressure, there are two major molecules types that are likely to be affected by hydrostatic pressure in this pressure range: the lipids from the membranes and the cell proteins. In the latter case, cavities inside the proteins can be very sensitive to pressure variations and lead to structural rearrangements. At a certain pressure, which depends on the individual strain, an optimum is reached, and allows to withstand high pressure. It is interesting to note that the pressure at the jump for *T. barophilus* and *T. kodakarensis* are close to their optimal growth pressures. Once the optimum state of stability is reached, another regime starts where the summed intensities increase slightly for *T. kodakarensis* with a slope similar to that observed for *E. coli*, which indicate the reduction of protein flexibility for these organisms with pressure. Despite their different temperature optima, e.g. 37°C and 85°C for *E. coli* and *T. kodakarensis*, respectively, we observed a decrease of the dynamics with increasing pressure for both organisms, which is consistent with the fact that both organisms are sensitive to hydrostatic pressure. In contrast to *T. kodakarensis*, *T. barophilus* is piezophilic, and has an optimal growth pressure at ca. 400bar. It is striking that the summed intensities for *T. barophilus* remain constant from that pressure up to at least 1.2kbar, indicating the lack of a pressure-dependent loss of protein flexibility in this organism. Although it does not tell us which molecule/structure is affected, this clearly shows that the cell dynamics is different between pressure adapted and pressure sensitive organisms.

3.2 Atomic mean square displacements

To go further in data analysis, we extracted the MSD (Figure 4). Data from 2012 and 2013 were averaged to increase the counting statistics.

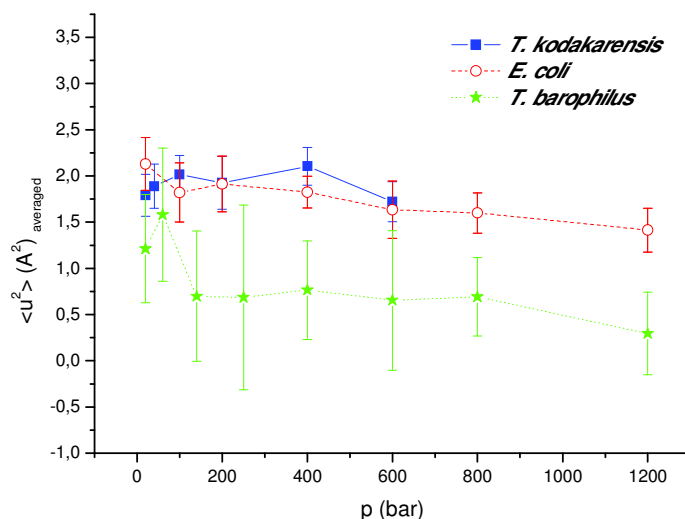


Figure 4: MSD extracted from the measurements performed in 2012 and 2013 and averaged after checking their reproducibility.

The trend is confirmed that the MSD decrease slowly with pressure. The error bars are rather high, but the data permit to present first results for such complex systems under high pressure.

Similarly to what is observed for the summed intensities, the pressure-dependence of the MSD for *E. coli* is almost linear. For *T. kodakarensis* and *T. barophilus* some fluctuations are visible at low pressure reflecting the jump-like behavior described above.

The main difficulty concerning the interpretation of these results arises from the fact that *T. kodakarensis* and *T. barophilus* originate from a high temperature environment. Both live close to hot vents at about 85 °C. However, the high-tensile aluminum alloy (7049-T6) used to build up the high pressure container does not withstand temperatures higher than 50 °C, the material becomes then brittle and breaks. Therefore, the measurements were done at room temperature, which is far from the native conditions of these cells. In consequence, it is not clear how representative these results are with respect to the dynamics of the cells under growth permissive conditions. It should be reminded that the above mentioned dynamical transition occurs at 220 K which is as far from physiological temperatures for proteins. After this point, the slope stays constant up to at least ambient conditions. As a consequence, it may be possible to extract information on the flexibility state of proteins under physiological conditions knowing their behavior at lower temperatures by a linear extrapolation. This behavior has been observed and exploited by Tehei et al. [9] to estimate the MSD of thermo- and hyperthermophile bacteria under their environment growth temperatures, which could not be reached during the experiment. If the generality of such a linear increase of the MSD cannot be proven easily, inversely it cannot be excluded, so that our results at lower temperature might indeed be representative for higher temperature. Additional experiments would be required to confirm this hypothesis.

4. Conclusions

EINS experiments were performed on whole cells of different bacteria and archaea from the *Thermococcales* under hydrostatic pressure conditions up to 1.2 kbar. It is a potent method to characterize molecular dynamics and to shed light on adaptation mechanisms to an extreme environmental condition such as high pressure. However, combining neutron scattering and high pressure is an extremely demanding task, the more as the samples had to be only handled under anaerobic conditions. The experiments were repeated three consecutive years at the ILL in Grenoble/France and the intensities summed over a certain scattering angle range show a rather good reproducibility.

Some differences in summed intensities between the probed systems were identified: The reference mesophile system *E. coli* had a linear behavior with increasing pressure, whereas the hyperthermophile *T. kodakarensis* and the piezophile and hyperthermophile *T. barophilus* underwent a jump-like increase in the intensities around 30 and 200 bar, respectively. The extracted MSD have large error bars, but indicate dynamical changes and structural rearrangements at low pressure of the *Thermococcales* up to an optimum pressure followed by a much higher stability above it. It is interesting to note that the slope for the two piezosensitive organisms display similar decrease in molecular flexibility despite their temperature optima, while HHP seem to have a limited impact on the piezophilic strain. These observations would need further investigations, since the experiments could not be performed at native temperatures, ca. 85 °C, for *T. kodakarensis* and *T. barophilus*, as the high pressure cell is not withstanding high temperatures. We cannot exclude that the slopes for molecular dynamics under HHP in the thermophilic strains could be similar under physiological temperatures. A new high pressure cell allowing to reach higher temperatures is actually under development at the ILL to perform such investigations. Nevertheless and in light of the extreme complexity and

difficulties of the investigations, it seems possible to conduct such studies *in vivo* through incoherent neutron scattering.

Acknowledgements.

This work was supported by grants from the Project ANR 2010 BLAN 1725 01 Living deep. We gratefully acknowledge Giuseppe Zaccai for fruitful discussions. Finally, we thank Mathieu Lemé and all members of the SANE group from the ILL (Jean-Luc Laborier, Claude Payre, Jean-Paul Gonzales, Simon Baudoin, Nadir Belkhier and Eddy Lelièvre-Berna) for their help during the development of the high-pressure equipment and the ILL for according the beam time.

References

- [1] Brindley, A.A.; Pickersgill, R.W.; Partridge J.C.; Dunstan, D.J.; Hunt D.M.; and Warren, M.J.: Enzyme Sequence and Its Relationship to Hyperbaric Stability of Artificial and Natural Fish Lactate Dehydrogenases. PLoS ONE 3 (2008) e2042.
- [2] Morita, T.: Structure based analysis of high-pressure adaptation of alpha-actin. J. Biol. Chem. 278 (2003), 28060-28066.
- [3] Nishiguchi, Y.; Miwa, T.; and Abe, F.: Pressure-adaptive differences in lactate dehydrogenases of three hagfishes: *Eptatretus burgeri*, *Paramyxine atami* and *Eptatretus okinoseanus*. Extremophiles, 12 (2008) 477–480.
- [4] Whitman, W. B.; Coleman, D.C.; and Wiebe, W.J.: Prokaryotes: the unseen majority. Proc Natl Acad Sci USA 95 (1998) 6578-83.
- [5] Kallmeyer, J.; Pockalny, R.; Adhikari, R.R.; Smith, D.C.; and D'Hondt, S.: Global distribution of microbial abundance and biomass in seafloor sediment. Proc Natl Acad Sci USA 109 (2012) 16213-16216.
- [6] Yayanos, A.A.; Dietz, A.S.; Van Boxtel, R.: Obligately barophilic bacterium from the Mariana trench. Proc Natl Acad Sci USA 78 (1981) 5212-5215.
- [7] Sinensky M. Homeoviscous adaptation - homeostatic process that regulates viscosity of membrane lipids in *escherichia coli*. Proc Nat Acad Sci USA 71 (1974) 522-525.
- [8] Bartlett, D.H.: Pressure effects on *in vivo* microbial processes. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) 1595 (2002) 367–381.
- [9] Tehei, M.; Franzetti, B.; Madern, D.; Ginzburg, M.; Ginzburg, B.Z.; Giudici-Orticoni, M.T.; Bruschi, M.; and Zaccai, G.: Adaptation to extreme environments: macromolecular dynamics in bacteria compared *in vivo* by neutron scattering, EMBO Rep. 5 (2004) 66-70.
- [10] Zeng S.; Birrien J.; Fouquet Y.; Cherkashov G.; Jebbar M.; Querellou J.; Oger P.; Cambon-Bonavita M.-A.; Xiang X.; Prieur D.: *Pyrococcus* chl, an obligate piezophilic hyperthermophile : Extending the upper pressure-temperature limits for life. ISME Journal 3 (2009) 873-876.
- [11] Peters J.; Trapp M.; Hughes D.; Rowe S.; Demé B.; Laborier J.-L.; Payre C.; Gonzales J.-P.; Baudoin S.; Belkhier N.; and Lelièvre-Berna E.: High hydrostatic pressure equipment for neutron scattering studies of samples in solutions. High Pressure Res. 32 (2011) 97–102.
- [12] Doster W.; Nakagawa, H.; and Appavou M.S.: Scaling analysis of bio-molecular dynamics derived from elastic Incoherent neutron scattering experiments. The Journal of Chemical Physics 139 (2013) 045105 – 16.
- [13] Sears, V. F.: Neutron scattering lengths and cross sections. Neutron News 3 (1992) 26–37.
- [14] Natali F.; Peters J.; Russo D.; Barbieri S.; Chiapponi C.; Cupane A.; Deriu A.; Di Bari M.T.; Farhi E.; Gerelli Y.; Mariani P.; Paciaroni A.; Rivessau C.; Schiro' G.; and Sonvico F.: IN13 Backscattering Spectrometer at ILL: looking for motions in biological macromolecules and organisms. Neutron News, 19 (2008) 14 - 18.
- [15] Rahman, A.; Singwi, K.S.; and Sjölander, A.: Theory of slow neutron scattering by liquids. I. Phys. Rev. 126 (1962) 986-996.
- [16] Réat, V.; Zaccai, G.; Ferrand, C.; and Pfister, C.: Functional Dynamics in Purple Membranes. In Biological Macromolecular Dynamics. S. Cusack, H. Buttner, M. Ferrand, P. Langan, and P. Timmins, editors. Adenine Press, Schenectady, NY. (1997) 117–122.
- [17] Paalman, H.H.; and Pings, C.J.: Numerical Evaluation of X-Ray Absorption Factors for Cylindrical Samples and Annular Sample Cells, J. Appl. Phys. 33 (1962) 2635-2639.
- [18] Richard, D.; Ferrand, M.; and Kearley, Analysis and Visualisation of Neutron-Scattering Data, G.J.: J. Neutron Research 4 (1996) 33-39.
- [19] LAMP, the Large Array Manipulation Program. http://www.ill.eu/data_treat/lamp/the-lamp-book/
- [20] Marty, V.; Jasnin, M.; Fabiani, E.; Vauclare, P.; Gabel, F.; Trapp, M.; Peters, J.; Zaccai, G.; and Franzetti, B.: Neutron scattering: a tool to detect *in vivo* thermal stress effects at the molecular dynamics level in micro-organisms, J. R. Soc. Interface 10 (2013) 20130003.
- [21] Tehei, M. Franzetti, B.; Wood, K.; Gabel, F.; Fabiani, E.; Jasnin, M.; Zamponi, M.; Oesterhelt, D.; Zaccai, G.; Ginzburg, M.; and Ginzburg, B.Z.: Neutron scattering reveals extremely slow cell water in a Dead Sea organism. PNAS 104 (2007) 766 – 771.
- [22] Doster, W.; Cusack S.; and Petry, W.: Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. Nature 337 (1989) 754 – 756.

- [23] Zaccai, G.: How Soft Is a Protein? A Protein Dynamics Force Constant Measured by Neutron Scattering. *Science* 288 (2000) 1604 – 1607.
- [24] Filabozzi, A.; Deriu, A.; Di Bari, M.T.; Russo, D.; Croci, S.; and Di Venere, A.: Elastic incoherent neutron scattering as a probe of high pressure induced changes in protein flexibility. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics*, 1804 (2010) 63–67.
- [25] Ortore, M.G.; Spinozzi, F.; Mariani, P.; Paciaroni, A.; Barbosa, L.R.S.; Amenitsch, H.; Steinhart, M.; Ollivier, J.; and Russo, D.: Combining structure and dynamics: non-denaturing high-pressure effect on lysozyme in solution. *J. R. Soc. Interface* 6 (2009) 619–634.
- [26] Doster, W.; and Gebhardt, R.: High pressure – unfolding of myoglobin studied by dynamic neutron scattering. *Chem. Phys.* 292 (2003) 383–387.
- [27] Meinhold, L.; and Smith, J.C.: Pressure-dependent transition in protein dynamics at about 4 kbar revealed by molecular dynamics simulation. *Phys. Rev. E* 72 (2005) 061908.
- [28] Meinhold, L.; Smith, J.C.; Kitao, A.; and Zewail, A.H.: Picosecond fluctuating protein energy landscape mapped by pressure–temperature molecular dynamics simulation. *PNAS* 104 (2007) 17261–17265.

VI.3. Genetic manipulations of the hyperthermophilic piezophilic archaeon *T. barophilus* (Thiel et al., 2014)

Le développement d'outils génétiques chez les *Thermococcales* a débuté chez *P. furiosus* et *T. kodakarensis* (MATSUMI et al., 2007; WAEGE et al., 2010) deux micro-organismes piézosensibles. Afin d'étudier les effets de délétions de gènes sur une *Thermococcales* piézophile, THIEL et al. ont développé un outil génétique chez *T. barophilus*, auquel j'ai participé. Ce système utilise un plasmide suicide pour déléter des gènes par recombinaison homologue. Il est basé sur l'auxotrophie à l'uracile et la résistance à la simvastatine, un antibiotique, par une méthode dite « pop-in/pop-out ». L'intégration du plasmide suicide dans la région d'intérêt (pop-in) est sélectionnée par la résistance à la simvastatine et la recombinaison entraînant la perte du plasmide ainsi que de la région d'intérêt est sélectionnée en utilisant le 5-Fluoroorotic acid (5-FOA) qui est toxique pour les cellules possédant le gène *pyrF* présent sur le plasmide.

Le gène *hisB* (TERMP_00437) a été délété par cette méthode en tant que preuve de concept. Ce gène code pour une imidazole glycerol-phosphate déshydratase dont la délétion entraîne l'incapacité de la cellule à se développer sans histidine. Des cultures à différentes pressions (0,1, 40 et 70 MPa), auxquelles j'ai participé ont été effectuées sur ce mutant afin de prouver l'efficacité de l'outil. Les cultures sous différentes pressions n'ont pas montré de différences entre les cellules sauvages et mutantes complémentées en histidine, alors que les cellules mutantes ne se sont pas développées en l'absence de cet acide aminé.

Genetic Manipulations of the Hyperthermophilic Piezophilic Archaeon *Thermococcus barophilus*

Axel Thiel,^{a,b,c} Grégoire Michoud,^{a,b,c} Yann Moalic,^{a,b,c} Didier Flament,^{a,b,c} Mohamed Jebbar^{a,b,c}

Université de Bretagne Occidentale, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzané, France^a; CNRS, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzané, France^b; Ifremer, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, Technopôle Brest-Iroise, Plouzané, France^c

In this study, we developed a gene disruption system for *Thermococcus barophilus* using simvastatin for positive selection and 5-fluoroorotic acid (5-FOA) for negative selection or counterselection to obtain markerless deletion mutants using single- and double-crossover events. Disruption plasmids carrying flanking regions of each targeted gene were constructed and introduced by transformation into wild-type *T. barophilus* MP cells. Initially, a *pyrF* deletion mutant was obtained as a starting point for the construction of further markerless mutants. A deletion of the *hisB* gene was also constructed in the UBOCC-3256 ($\Delta pyrF$) background, generating a strain (UBOCC-3260) that was auxotrophic for histidine. A functional *pyrF* or *hisB* allele from *T. barophilus* was inserted into the chromosome of UBOCC-3256 ($\Delta pyrF$) or UBOCC-3260 ($\Delta pyrF \Delta hisB$), allowing homologous complementation of these mutants. The piezophilic genetic tools developed in this study provide a way to construct strains with multiple genetic backgrounds that will allow further genetic studies for hyperthermophilic piezophilic archaea.

Since the discovery of deep-sea hydrothermal vents, many mesophilic, thermophilic, and hyperthermophilic *Bacteria* and *Archaea* have been described. However, only a few thermopiezophilic organisms have been described so far, mainly belonging to the domain *Archaea*: *Thermococcus barophilus* (1), *Palaeococcus pacificus* (2), *Palaeococcus ferrophilus* (3), *Marinitoga piezophila* (4), *Methanopyrus kandleri* (5), and *Pyrococcus yayanosii* (6, 7). *P. yayanosii* is the first and only known obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. The genomes of *M. kandleri*, *T. barophilus*, *P. yayanosii*, and *M. piezophila* are now available (8–11), but the development of genetic tools for the above species is lagging.

T. barophilus strain MP was the first true hyperthermophilic piezophilic archaeon isolated, in 1993 (1); it grows in rich medium from 48°C to 100°C, with an optimum at 85°C, and within a pressure range of 0.1 to 85 MPa, with an optimum of 40 MPa (1). *T. barophilus* is an obligate piezophile for temperatures over 95°C.

Genetic manipulations in nonpiezophilic members of the *Thermococcales*, such as *Thermococcus kodakarensis* and *Pyrococcus furiosus*, which are phylogenetically related to *T. barophilus*, have been described (12–14). For some archaeal genetic systems, such as *T. kodakarensis*, many selectable markers have been described, allowing selection according to prototrophic markers (arginine/citrulline, tryptophan, agmatine, or uracil) or antibiotics (simvastatin or mevinolin) (15); simvastatin or mevinolin can be used to screen for transformed cells. Such cells can overexpress the *P. furiosus hmg* gene (*hmg_{pf}*), which encodes 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase, a pivotal enzyme for archaeal membrane lipid biosynthesis (16), so that the *hmg_{pf}* gene can then be used as a positive selection marker (17). Among prototrophic selective markers, arginine/citrulline-based selection is used when strains are able to transform aspartate into arginine using citrulline supplied by the culture medium and thus achieve arginine prototrophy (15). Agmatine, a polyamine produced by decarboxylation of arginine, is used as a marker for positive selection for agmatine prototrophs in strains from which the *argD* gene encoding arginine decarboxylase has been deleted (18).

Agmatine auxotrophy is lethal, even in rich medium, which facilitates the isolation of transformants overnight on rich medium, in contrast to the several days required when transformants are selected on defined medium. As for other types of prototrophic selection, tryptophan-based selection is limited to defined medium and plasmid introduction into a specific strain from which the *trpE* gene, encoding the large subunit of anthranilate synthase, has previously been deleted (12).

The uracil marker is used in all model organisms for genetics in *Archaea* (17). The *pyrEF* genes enable complementation of the uracil auxotrophy, and 5-fluoroorotic acid (5-FOA) can be used as a counterselection marker; the uracil marker is functional for both positive selection and counterselection (negative selection) for constructing markerless deletion mutants. A similar counterselective strategy is also offered by 6-methyl purine (6-MP) (18), which must be paired with a positive selection marker because it cannot be used for positive selection itself. All these markers have at least one disadvantage, such as limitation to use in defined medium, supplement requirement, spontaneous resistance providing a high background, limited host range, and/or no consecutive positive selection and counterselection (15).

Thus, the development of genetic manipulations of the deep-sea hydrothermal vent strain *T. barophilus* MP, proposed in this study, was derived from what we knew about gene deletion systems established in the shallow hydrothermal vent species *T. kodakarensis*. A suicide vector was constructed to be used as a tool for

Received 8 January 2014 Accepted 27 January 2014

Published ahead of print 31 January 2014

Editor: R. E. Parales

Address correspondence to Mohamed Jebbar, mohamed.jebbar@univ-brest.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00084-14>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
doi:10.1128/AEM.00084-14

gene disruption by homologous recombination in *T. barophilus*. We showed that 1 kb can be efficiently integrated directly into the chromosome by using circular DNA fragments. A strategy was developed to generate deletion mutants by PCR amplification and vector cloning to select marker replacement events with subsequent disruption, or “pop-out,” of the selected marker. The genetic manipulations in *T. barophilus* established here rely on uracil auxotrophy and simvastatin resistance as selectable markers, using the pop-in/pop-out method. We constructed multiple gene mutants and tested the possibility of complementation in *trans*.

MATERIALS AND METHODS

Media and growth conditions. *T. barophilus* strain MP was isolated from chimney samples harvested from the Snake Pit hydrothermal site, at a depth of 3,550 m on the mid-Atlantic ridge, in July 1993 (1). *T. barophilus* cultures were grown under anaerobic conditions at 85°C in *Thermococcus* rich medium (TRM) (7) or *Thermococcales* amino acid (TAA) medium (A. Cario and P. Oger, unpublished data) supplemented with sulfur. The TAA medium composition is as follows: 23 g NaCl, 3.3 g PIPES [piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid)], 3 g MgCl₂ · 6H₂O, 2 g C₂H₃NaO₂, 1 g (NH₄)₂SO₄, 0.5 g KCl, 0.05g NaBr, 0.02 g SrCl₂ · 6H₂O, vitamin mixture, modified Wolfe's trace minerals, 1 ml resazurin, and 0.1 g per liter of each of 19 amino acids (except histidine). After cell transformation, the mutants were selected on TRM supplemented with 2.5 µg/ml simvastatin (Sigma) or 8 mg/ml 5-FOA (5-fluoroorotic acid hydrate; Euromedex). Auxotrophic growth assays were performed on TAA medium with the addition of uracil in the presence or absence of histidine, as appropriate. After filtration (Millipore filter, 0.45 µm), the liquid medium was dispensed anaerobically into 50-ml vials which were sealed with butyl-rubber stoppers, and the medium was reduced with 0.1 ml of a 10% (wt/vol) sterile Na₂S · 9H₂O solution just before inoculation. Unless stated otherwise, the experiments were carried out in triplicate in the presence of sulfur.

A pressure ranging from 0.1 MPa to 70 MPa was used to monitor the growth of mutants in TRM and TAA medium; cultivation under hydrostatic pressure was performed in sterile syringes, and cultures were incubated in a high-hydrostatic-pressure (HHP), high-temperature incubator (Top Industrie), as previously described (7).

Growth was monitored by cell counting using a Thoma chamber and photonic microscopy at a magnification of ×40 (Olympus) or using flow cytometry (CyFlow Space; Partec). Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde and counted by one of the two previously described methods.

The genetic manipulations, DNA preparation, and transformation protocols were conducted under atmospheric pressure (0.1 MPa). *Escherichia coli* strain DH5α was used for general DNA manipulation, *E. coli* was cultured in LB medium (liquid or solid) at 37°C, and the presence of plasmids was selected for by adding 100 µg/ml ampicillin to the medium.

Construction of suicide vectors. The pUD plasmid was kindly provided by the Imanaka lab (19). This plasmid bears the ampicillin resistance gene and the *T. kodakarensis* *pyrF* gene with its putative promoter region; it is a replicative plasmid in *E. coli* but not in *Thermococcales* strains.

The *hmg_{pf}* gene was obtained by PCR amplification on the pLC70 plasmid (20) with the primers SalI-HMG-CoA-Up and KpnI-HMG-CoA-Do (see Table S1 in the supplemental material); the resulting PCR product bears the KpnI and SalI restriction enzyme sites at its extremities. The *hmg_{pf}* amplicon was cloned in the pUD plasmid digested by the restriction enzymes KpnI and SalI, and after ligation between the pUD plasmid and the *hmg_{pf}* PCR-amplified gene (using T4 ligase; Promega), a plasmid named pUDH was constructed (Fig. 1).

In the second step of this work, the pUDH plasmid was digested by XhoI and SmaI enzymes. This digestion linearized the plasmid, allowing the excision of the *T. kodakarensis* *pyrF* gene but not its promoter region.

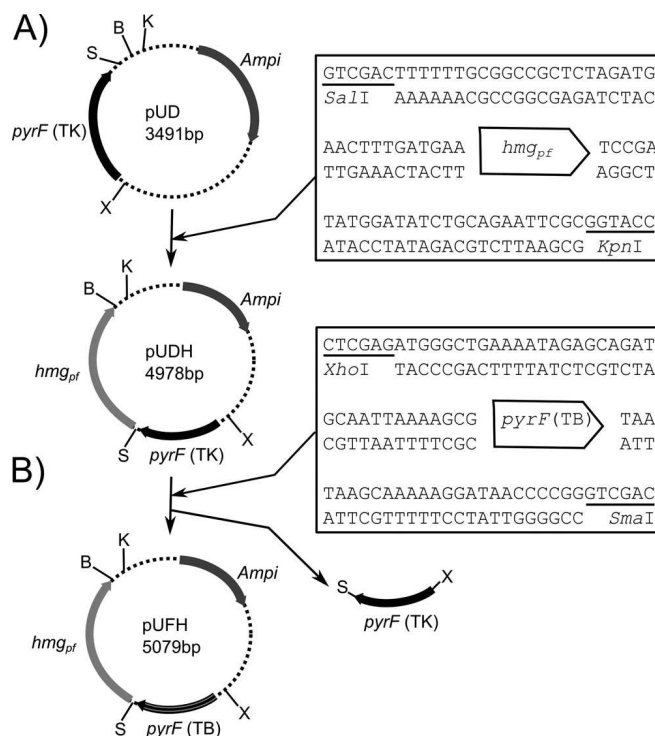


FIG 1 Construction of pUDH and pUFH plasmids. (A) Primers SalI-HMG-CoA-Up and KpnI-HMG-CoA-Do were used to amplify *hmg_{pf}* from the vector pLC70 (20). pUD and HMG-CoA were digested by SalI (S) and BamHI (B) and were then ligated to obtain the plasmid pUDH. (B) Primers XhoI-*pyrF*-TB-Up and XmaI-SmaI-*pyrF*-TB-Do were used to amplify the *T. barophilus* *pyrF* gene. pUDH and *pyrF*(TB) were digested by XhoI (X) and SmaI (S) and were then ligated to obtain the plasmid pUFH. In pUDH and pUFH, the restriction enzyme sites BamHI (B) and KpnI (K) were conserved to enable cloning of the homologous regions in these plasmids.

The linearized plasmid was ligated with the PCR-amplified *T. barophilus* *pyrF* gene obtained with the primers XhoI-*pyrF*-TB-Up and SmaI-*pyrF*-TB-Do from genomic DNA, and the resulting plasmid was named pUFH (Fig. 1).

The homologous regions encompassing the target genes to be excised were amplified by two successive PCR amplification steps, in a process known as splicing by overlap extension (21, 22). After the first amplification, two fragments of 1 kb encompassing the targeted genes were obtained; the primers used for this first amplification were named 1Up/1Do and 2Up/2Do (see Table S1 in the supplemental material). The two fragments were used as the matrix for the second PCR amplification, by using the primers 1Up and 2Do (see Table S1 in the supplemental material), and the resulting PCR product of the second step was a DNA fragment of 2 kb composed of the two merged homologous regions. The different primers used for amplified homologous regions were Δ *pyrF*-1Up, Δ *pyrF*-1Do, Δ *pyrF*-2Up, and Δ *pyrF*-2Do for deletion of *pyrF* (TERMP_01290); Δ *hisB*-1Up, Δ *hisB*-1Do, Δ *hisB*-2Up, and Δ *hisB*-2Do for deletion of *hisB* (TERMP_00437); and Δ TERMP_00005-1Up, Δ TERMP_00005-1Do, Δ TERMP_00005-2Up, and Δ TERMP_00005-2Do for the deletion of TERMP_00005 (see Table S1 in the supplemental material). By using this approach, three homologous-region fragments were created: the Δ *pyrF*, Δ *hisB*, and Δ TERMP_00005 fragments. The fragment TERMP_01289(HR1)-TERMP_01291(HR2) was cloned into the plasmid pUDH using the restriction sites KpnI and BglII (on the amplification)/BamHI (on the plasmid), and the fragments TERMP_00436(HR1)-TERMP_00438(HR2) and TERMP_00004(HR1)-TERMP_00006(HR2) were cloned into the plasmid pUFH using the restriction sites KpnI and BglII/BamHI; we thus obtained the suicide vectors pUDH-1, pUFH-1, and pUFH-2 (Table 1).

TABLE 1 *T. barophilus* plasmids used and constructed in this study

Plasmids	Resistance	Parent plasmid	Description	Reference
pUD	Ampicillin			19
pUDH	Ampicillin, simvastatin	pUD	Cloning of HMG-CoA reductase-encoding gene in pUD	This work
pUFH	Ampicillin, simvastatin	pUDH	Replacement of <i>pyrF</i> (<i>T. kodakarensis</i>) by <i>pyrF</i> (<i>T. barophilus</i>)	This work
pUDH-1	Ampicillin, simvastatin	pUDH	Cloning of homologous regions flanking <i>pyrF</i>	This work
pUFH-1	Ampicillin, simvastatin	pUFH	Cloning of homologous regions flanking <i>hisB</i>	This work
pUFH-2	Ampicillin, simvastatin	pUFH	Cloning of homologous regions flanking <i>TERMP_00005</i>	This work
pUHH	Ampicillin, simvastatin	pUFH-2	Replacement of <i>pyrF</i> by <i>hisB</i>	This work

In order to complement the *hisB* mutant, the *pyrF* gene present in pUFH but not its promoter region was replaced by the *T. barophilus hisB* gene; the *hisB* gene was amplified using the primers Verif-hisB-Up and Verif-hisB-Do (see Table S1 in the supplemental material). The *hisB* PCR product and pUFH vector were digested by *Xho*I and *Sma*I and then ligated (using T4 ligase; Promega), and the resulting plasmid was named pUHH (Table 1).

Transformation of *T. barophilus*. The CaCl_2 method for *Methanococcus voltae* PS (23) was modified for the transformation of *T. barophilus*. The CaCl_2 cell treatment was not a prerequisite for the transformation. Cells were cultivated in liquid TRM with sulfur for 16 h at 85°C at atmospheric pressure, and an aliquot of 1 ml of this overnight culture was introduced into 50 ml of fresh TRM without sulfur and incubated for 6 h at 85°C. Cells were harvested by centrifugation ($8,000 \times g$, 6 min), concentrated in 1 ml of fresh TRM without sulfur, and kept on ice for 30 min under an anaerobic tent. An aliquot of 4 to 5 μg of plasmid DNA was added to 200 μl of concentrated cells, and the mixture was incubated on ice for 1 h. A heat shock at 85°C was carried out for 10 min, followed by incubation for 10 min on ice. The transformants were then used to inoculate 20 ml of fresh TRM with sulfur and incubated at 85°C for 18 h. The cells were harvested by centrifugation ($8,000 \times g$, 6 min), resuspended in 100 μl of fresh TRM, and spread on plated TRM containing simvastatin (final concentration of 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or 5-FOA (8 mg/ml) under anaerobic conditions. Medium solidification was achieved using Phytigel (Sigma) at a concentration of 10 g/liter, and the plates were incubated for 5 days at 85°C. The resulting Sim^r strains were analyzed by PCR using genomic DNA as a matrix.

Complementation of *pyrF* and *hisB* mutants. The pUFH-2 and pUHH plasmids were introduced, respectively, into UBOCC-3256 (ΔpyrF) and UBOCC-3260 ($\Delta\text{pyrF} \Delta\text{hisB}$). Many transformants that were resistant to simvastatin were obtained, and after PCR screening, all clones had undergone single-crossover recombination (*pyrF*⁺ or *hisB*⁺) at one or the other of the homologous regions (*TERMP_00004* or *TERMP_00006*) carried by both plasmids (data not shown).

Pop-out recombination. After the transformation of *T. barophilus* by a suicide vector (Fig. 2), two steps were needed to perform the excision of the targeted gene, a pop-in (vector insertion) by one crossover event and a pop-out recombination. For this purpose, a strain with a suicide vector inserted was streaked onto TRM plates supplemented with 5-FOA at 8 mg/ml. In principle, the strains that are able to grow on this medium are obviously resistant to 5-FOA, sensitive to simvastatin, and ΔpyrF ; however, we observed several false positives at this step. To address this problem, the colonies that grew on TRM-5-FOA plates were restreaked on TRM-simvastatin plates to eliminate the false positives that were still simvastatin resistant. The strains which were simvastatin sensitive and 5-FOA resistant were kept; the pop-out recombination was then obtained, and a PCR amplification was performed to check whether the pop-out recombination resulted in a targeted gene deletion or wild type (WT) genotype recurrence (Fig. 2).

DNA purification and extraction. Plasmid DNA was extracted from an *E. coli* DH5 α strain with a plasmid extraction kit supplied by Thermo-fisher. *E. coli* DH5 α cultures (5 ml) at exponential growth phase were harvested after centrifugation ($6,000 \times g$, 6 min, 4°C) and then used to extract DNA vectors with a final concentration of 160 to 200 ng/ μl .

Genomic DNA extraction of *T. barophilus* was performed using a phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI) extraction method, as follows. A 20-ml portion of cell culture at exponential growth phase (approximately 10^8 cells/ml) was centrifuged at $7,500 \times g$ for 15 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in 800 μl TE buffer (100 mM Tris HCl [pH 8], 50 mM NaCl, 50 mM EDTA [pH 8]). To ensure cell lysis, 100 μl of 10% SDS, 100 μl of 10% Sarkosyl, and 50 μl of proteinase K (20 mg/ml) were added, and the cell suspension was then incubated for 1 h at 55°C; 1 ml phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI) (25:24:1) was added, and after centrifugation at $14,000 \times g$ for 15 min at 4°C, the aqueous phase containing the total DNA was recovered, to which 1 ml of chloroform was then added to eliminate all phenol traces. The DNA was subsequently precipitated by the addition of 0.7 ml isopropanol for 1 h at -20°C and recovered after centrifugation ($14,000 \times g$ for 15 min at 4°C). The DNA was then washed with 75% ethanol, and after centrifugation ($14,000 \times g$ for 15 min at 4°C), it was resuspended in 200 μl 10 mM Tris-HCl (pH 8) buffer; RNase (50 mg/ml) was added to eliminate residual RNA in each sample.

The DNA was quantified by NanoDrop, and the quality of extraction was checked by electrophoresis on a 1% agarose gel containing ethidium bromide at a final concentration of 0.5 mg/ml (in a bath of 40 mM Tris [pH 8], 40 mM acetate, 1 mM EDTA [pH 8] [$1 \times \text{TAE}$]). The separation was performed at 85 V for 40 min, with a 1-kb ladder (Promega) as the size marker.

PCR conditions. *hmg_{pp}*, *pyrF*, *hisB*, and all homologous regions were amplified using *Pfu* polymerase (Promega). Routine tests by PCR amplification were performed using *Taq* Polymerase (Promega), and PCR was performed as follows: 94°C for 5 min; 30 cycles of 94°C for 60 s, 50 to 58°C for 60 s, and 72°C for 1 to 4 min; 72°C for 10 min.

RESULTS

Effects of different simvastatin and 5-FOA concentrations on the growth of *T. barophilus*. To select the markers that could be used for positive-selection integration and counterselection excision from the *T. barophilus* genome, the sensitivity of *T. barophilus* to different drugs and antibiotics was assessed using 5-FOA, 6-MP, simvastatin, and mevinolin. Surprisingly, *T. barophilus* was insensitive to the drug 6-MP, even though it possesses a gene (*TERMP_00517*) (9) annotated as encoding a hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase. *TERMP_00517* is a homologue of the *TK0664* gene in *T. kodakarensis* (80% of identity), the inactivation of which results in 6-MP resistance in *T. kodakarensis* (18). In contrast to *T. kodakarensis*, the *T. barophilus* MP strain is auxotrophic for tryptophan, and it is not amenable to tryptophan-based positive selection, because this WT species possesses only one gene (*TERMP_00157*) encoding a Trp synthase-like β subunit and lacks six genes (among them *trpE*) encoding enzymes that transform chorismate to tryptophan (9, 24).

T. barophilus MP seems to be sensitive to 5-FOA concentrations ranging from 5 to 8 mg/ml, but only during 24 h of growth on solid rich medium and less than 10 h of growth on liquid rich medium (see Fig. S2A in the supplemental material), beyond

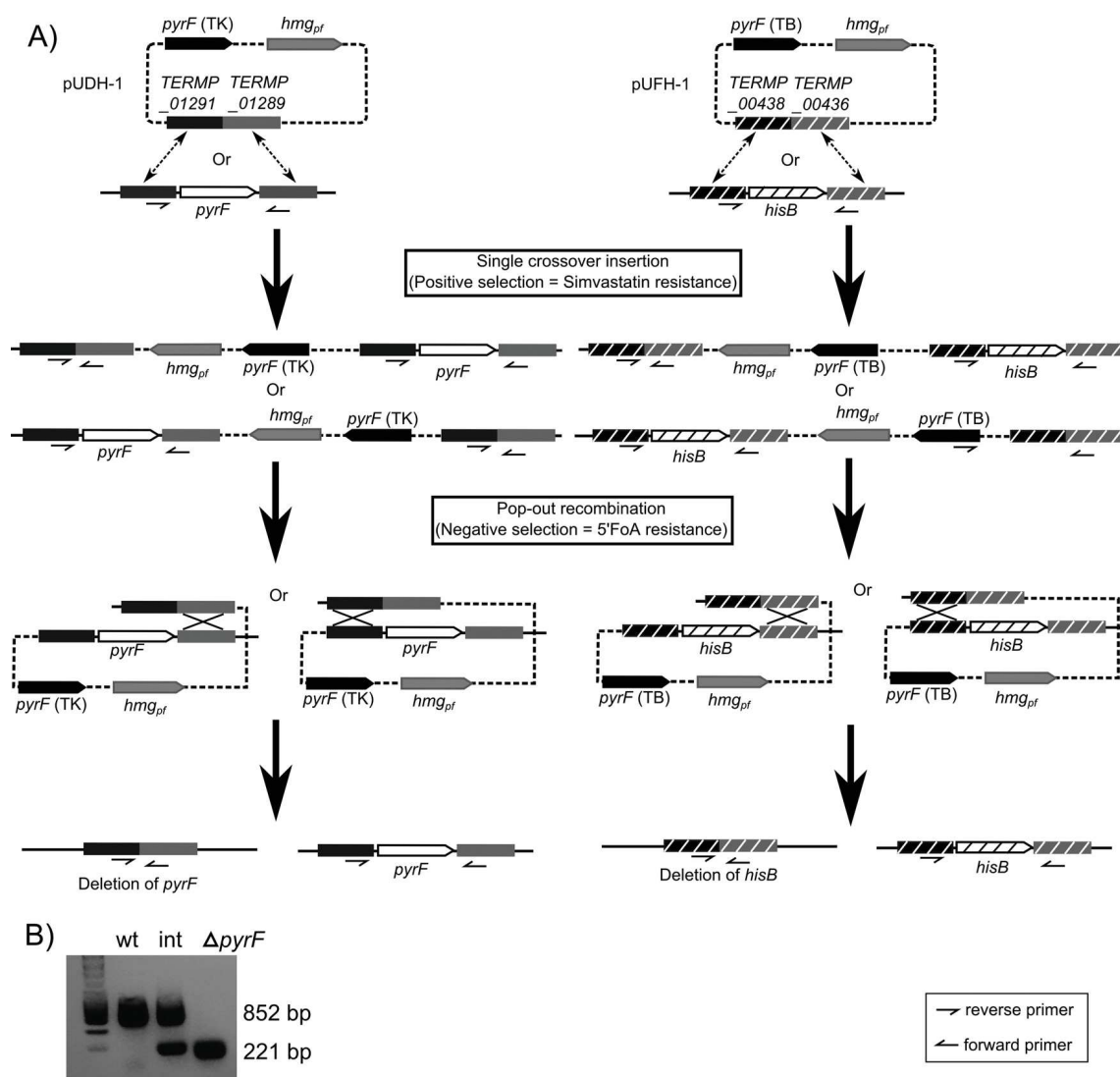


FIG 2 Deletion pathway of *pyrF* and *hisB* genes. (A) Two suicide vectors were constructed to ligate homologous-region amplification (*TERMP_01289*, *TERMP_01291*, *TERMP_00436*, and *TERMP_00438*) with pUDH or pUFH. The plasmids used were pUDH-1 and pUFH-1. After transformation, the plasmid was integrated into the genome by a first crossover event in the homologous-region fragment. The second step was the pop-out recombination (or excision) event. There are two possibilities: a recombination between the other homologous fragments, resulting in the deletion of the targeted gene, or a recombination between the same homologous fragments of the first recombination, which gives the WT genotype. *pyrF* was deleted from strain UBOCC-3107 (WT), and *hisB* was deleted from strain UBOCC-3256 (Δ *pyrF*). (B) To verify the different genotype configurations, PCR amplification was performed with the primers matching the HR1 and HR2 regions: XhoI-*pyrF*-TB-Up and SmaI-*pyrF*-TB-Do for *pyrF* deletion and Verif-*hisB*-Up and Verif-*hisB*-Do for *hisB* deletion (data not shown).

which cell growth was observed, probably due to uracil contamination or drug thermal degradation, which gives high backgrounds, as was reported for *T. kodakarensis* and other *Archaea* (15, 17). The uracil marker is functional in *T. barophilus*, and a concentration as high as 8 mg/ml was chosen, at least for negative selection.

In comparison with *T. kodakarensis*, sensitivity to simvastatin was assessed in *T. barophilus* using drug concentrations ranging from 1 to 10 μ g/ml. As previously described, 5 μ g/ml of simvastatin was needed to observe a total inhibition of *T. kodakarensis* growth (13). In contrast, 2.5 μ g/ml of simvastatin was sufficient to inhibit the growth of *T. barophilus* cells for at least 5 days of incubation on both solid and liquid media (see Fig. S2B in the supplemental material), indicating that this concentration would be

suitable and sufficient for selecting *Sim^r* transformants and that simvastatin could be used for positive selection.

Construction of gene deletion plasmids. To achieve gene disruption in *T. barophilus*, two plasmids, pUDH and pUFH, were designed for double-crossover events (Fig. 1) and constructed using the plasmid pUD (19) (see Materials and Methods). The pUDH plasmid contains a marker cassette containing the *pyrF* gene from *T. kodakarensis* and an *hmg_{pf}* cassette (Fig. 1A), whereas the pUFH plasmid contains the same *hmg_{pf}* cassette and the *pyrF* gene from *T. barophilus* (Fig. 1B). These two plasmids were replicative in *E. coli* and conferred ampicillin resistance but were not replicative in *T. barophilus*. The strategy for construction of a targeted gene excision strain is shown in Fig. 1. The pop-in/pop-out method was used in *T. barophilus*; by this method, inte-

TABLE 2 *T. barophilus* strains used and constructed in this study

Strain	Genotype	Parent strain	Genome region(s) deleted from parent strain	Reference
UBOCC-3107	Wild type	<i>T. barophilus</i> MP		1
UBOCC-3256	$\Delta pyrF$	UBOCC-3107	TERMP_01290 (nucleotides 1122862–1123491)	This work
UBOCC-3260	$\Delta pyrF \Delta hisB$	UBOCC-3256	TERMP_00437 (nucleotides 362319–362849)	This work
UBOCC-3262	$\Delta pyrF$ TERMP_00006::pUFH-2	UBOCC-3256		This work
UBOCC-3265	$\Delta pyrF \Delta hisB$ TERMP_00004::pUHH	UBOCC-3260		This work

gration of constructs into the genome (pop-in) is selected for by transformation to simvastatin resistance, and intramolecular recombinants that have lost the plasmid (pop-out) are counterselected using 5-FOA.

Construction of *pyrF* and *hisB* mutants. The new constructs pUDH and pUFH were used to clone the flanking regions of the targeted genes *pyrF* and *hisB*, respectively, and the resulting plasmids were named pUDH-1 and pUFH-1 (Fig. 2A). These plasmids were used to transform *T. barophilus* MP using simvastatin as the resistant marker (see Materials and Methods). The transformation efficiency was approximately 10^2 transformants per μg plasmid DNA. The Sim^r transformants containing plasmids integrated into the *T. barophilus* chromosome were checked by PCR, and as shown in Fig. 2B, this led to an amplification of two bands: a large one (852 bp), corresponding to the WT allele, and a small one (221 bp), corresponding to the deleted gene (Fig. 2B). After PCR verification, selected clones were spread on solid TRM with 5-FOA (8 mg/ml) and incubated for 4 days at 85°C. About 100 to 300 colonies per plate were obtained, some of which were restreaked on solid TRM containing simvastatin (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$); 70 to 90% of these were Sim^r , which demonstrated that the pop-out event had not occurred in these cases. At least 10% of the colonies were Sim^s and were checked by PCR amplification of a 221-bp fragment, demonstrating that the pop-out event had occurred. (Fig. 2B). One $\Delta pyrF$ strain mutant (UBOCC-3256) (Table 2) was selected and will serve as a starting point for further genetic manipulations.

In order to delete the *hisB* gene, the plasmid pUFH-1 was used to transform the strain UBOCC-3256 by following the strategy described above for pUDH-1. Similar frequencies of pop-in and pop-out events were obtained, and at least three Sim^s mutants were verified by PCR to confirm the excision of the *hisB* gene (data not shown). One strain, named UBOCC-3260 (Table 2), was selected for further experiments.

Characterization of mutants. A comparison of the growth rates and yields of the *T. barophilus* wild type and *T. barophilus* strains UBOCC-3256 and UBOCC-3260 in TAA medium in the presence or absence of uracil and/or uracil plus histidine is shown in Fig. 3. Growth experiments were performed at 0.1 MPa, 40 MPa (Fig. 3), and 70 MPa (see Fig. S1 in the supplemental material). Strain UBOCC-3256 ($\Delta pyrF$) did not grow in the absence of uracil but did grow in defined medium supplemented with uracil and showed a growth rate and yield comparable to those of the wild type (Fig. 3). Strain UBOCC-3260 ($\Delta pyrF \Delta hisB$) was not able to grow on TAA medium with or without uracil. The growth of this strain resumed when defined medium was supplemented with uracil and histidine (Fig. 3), and the growth rate and yield were similar to those of the wild-type strain. These data demonstrated that UBOCC-3256 and UBOCC-3260 are auxotrophic for uracil and for uracil plus histidine,

respectively. The mutants and the WT strains grew better in a defined medium at 40 MPa (Fig. 3), which corresponds to the optimal growth pressure for *T. barophilus* MP (1), and they also showed growth capabilities that were comparable at 0.1 and 70 MPa (Fig. 3; also, see Fig. S1 in the supplemental material) but slightly lower than at 40 MPa (Fig. 3). The growth yield of the mutants was comparable to that of the WT when cells were grown in TRM regardless of the hydrostatic pressure applied (see Table S2 in the supplemental material). These results demonstrated that *pyrF* and *hisB* gene deletion did not show pleiotropic effects in *T. barophilus*.

Complementation of the $\Delta pyrF$ and *hisB* strains by wild-type *pyrF* and *hisB* alleles restores uracil and histidine prototrophy.

Several attempts to transform *T. barophilus* MP with the pLC70 plasmid (20) were unsuccessful. This shuttle vector, known to replicate and to express genes in both *T. kodakarensis* and *E. coli*, was constructed by ligating the pTN1 plasmid (25) from *Thermococcus nautilus* to the commercial vector pCR2.1-TOPO with addition of selectable markers (*hmg_{py}* and *trpE*) (20). Maintenance of the pLC70 plasmid in *T. kodakarensis* depends on a likely functional replication protein, Rep74, of pTN1 (25), but this plasmid could not be propagated in *T. barophilus* even though it carries an *hmg_{py}* gene, which confers simvastatin resistance to *T. barophilus* cells. Neither an *E. coli*/*T. barophilus* shuttle vector nor a plasmid replicative in *T. barophilus* is yet available, and these should be constructed in order to expand the genetic toolbox for this species. An alternative complementation strategy was used by introducing pUFH-2 into UBOCC-3256 ($\Delta pyrF$) (Table 1). This plasmid carries the flanking regions of the gene TERMP_00005 and a copy of the *pyrF* gene from *T. barophilus*. The construct was integrated into the chromosome of the UBOCC-3256 strain, and transformants were selected for their resistance to simvastatin. Many clones were screened by PCR, and all had undergone single-crossover recombination (*pyrF*⁺) at one or the other of the homologous regions (data not shown). One clone was selected and named strain UBOCC-3262 (Table 2). The chromosome of this strain was checked using the primers Verif-int-comp-2Up and Verif-int-comp-2Do (see Table S1 in the supplemental material), and this showed that the plasmid pUFH-2 was inserted in TERMP_00006 gene (data not shown). We examined the growth of *T. barophilus* MP and its derivatives in TAA medium. The growth rate of UBOCC-3262 was comparable to that of the WT, while UBOCC-3256 could not grow in the absence of uracil (Fig. 4A).

The *T. barophilus pyrF* gene of pUFH-2 plasmid was replaced by the *T. barophilus hisB* gene, and the resulting plasmid, pUHH (Table 1), was introduced into UBOCC-3260 ($\Delta pyrF \Delta hisB$). A number of transformants were selected for their resistance to simvastatin, and after PCR screening and growth assays (data not shown), one clone was selected and named UBOCC-3265 (Table 2).

A) UBOCC-3107 (wt)

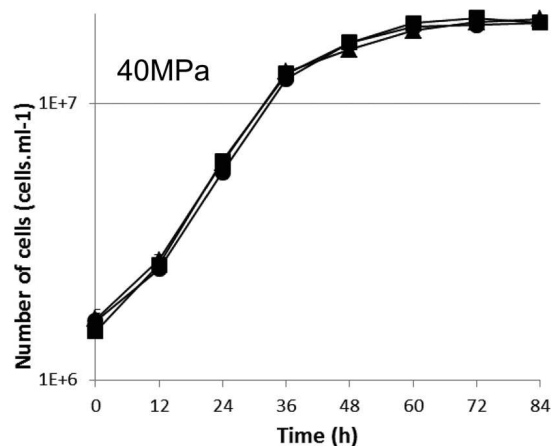
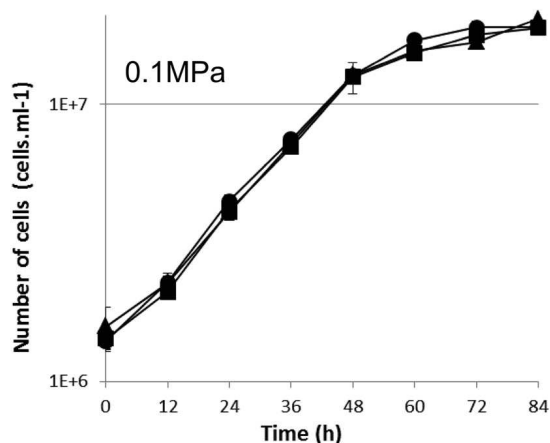
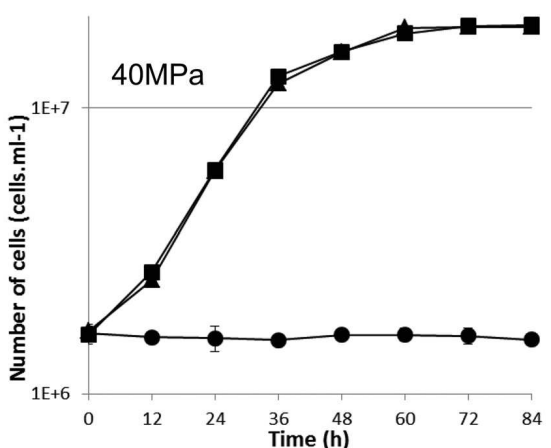
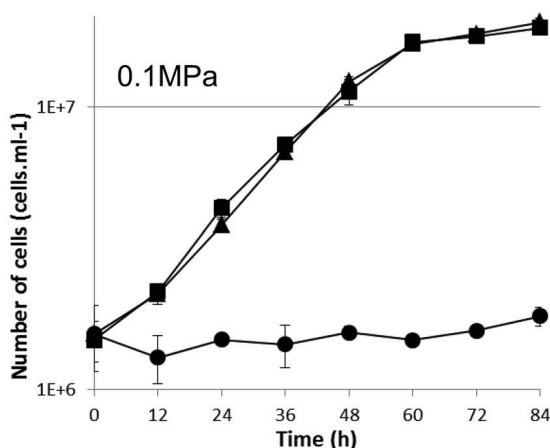
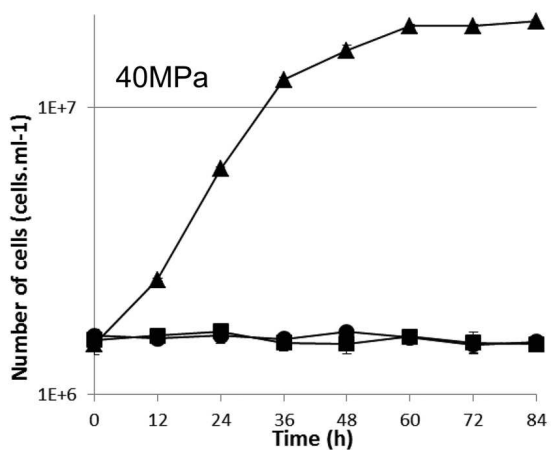
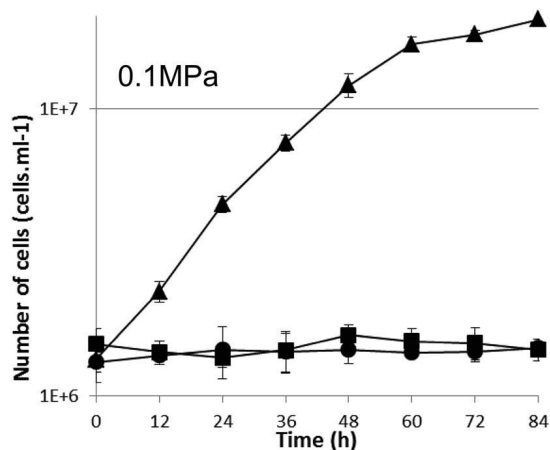
B) UBOCC-3256 ($\Delta pyrF$)C) UBOCC-3260 ($\Delta pyrF$ $\Delta hisB$)

FIG 3 Characterization of UBOCC-3256 ($\Delta pyrF$) and UBOCC-3260 ($\Delta pyrF$ $\Delta hisB$) mutants at 0.1 MPa and 40 MPa. Growth assays were carried out in TAA medium at 85°C, without uracil (■), with uracil (●), and with uracil and histidine (▲). These growth experiments were carried out at hydrostatic pressures of 0.1 MPa and 40 MPa.

The chromosome of this strain was checked using the primers Verif-int-comp-1Up and Verif-int-comp-1Do (see Table S1 in the supplemental material), and this showed that the plasmid pUHH was inserted in the *TERMP_00004* gene (data not shown). The

growth rate and yield of UBOCC-3265 were comparable to those of the WT strain, while UBOCC-3260 could not grow in the absence of histidine (Fig. 4B).

These results demonstrated that *pyrF* or *hisB* gene deletion in

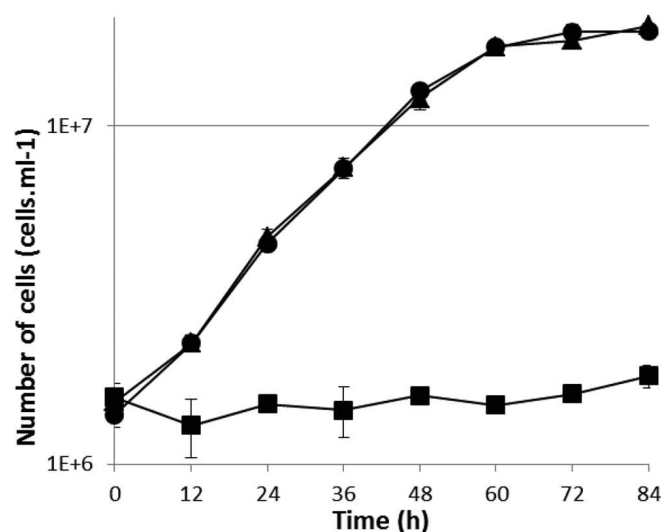
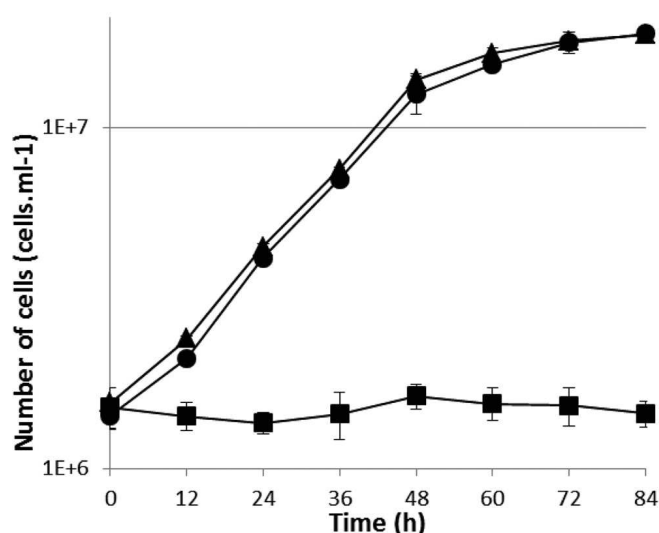
A) Complementation of *pyrF* deletionB) Complementation of *hisB* deletion

FIG 4 Complementation of *pyrF* and *hisB* mutations. Growth assays of strains UBOCC-3107 (WT) (●), UBOCC-3256 ($\Delta pyrF$) (■), and UBOCC-3262 ($\Delta pyrF$ TERMP_00006::pUFH-2) (▲) (A) and of strains UBOCC-3107 (WT) (●), UBOCC-3260 ($\Delta pyrF \Delta hisB$) (■), and UBOCC-3265 ($\Delta pyrF \Delta hisB$ TERMP_00004::pUHH) (▲) (B) were carried out at 85°C in TAA medium without (A) or with (B) uracil. These growth experiments were performed at 0.1 MPa.

T. barophilus can be complemented by ectopic integration of a *pyrF* or *hisB* allele from *T. barophilus*.

DISCUSSION

In this study, we report the successful disruption of the *pyrF* locus in *T. barophilus*, a hyperthermophilic piezophilic archaeon, and the development of a gene deletion system based on resistance against simvastatin and 5-FOA. Simvastatin was used for positive-selection transformants in nutrient-rich medium for hyperthermophilic and halophilic archaea (13, 26–29). *T. barophilus* appeared to be more sensitive to this drug than *T. kodakarensis* (13) and *P. furiosus* (28). The MIC for the untransformed host was low

(1 μ g/ml), and the sensitivity of *T. barophilus* to 5-FOA is comparable to that of *T. kodakarensis* (19). As in *T. kodakarensis* and *P. furiosus*, an effective gene disruption system has been established in *T. barophilus*, and the ability to use this method to generate single and multiple deletions in the same strain will help analyze and decipher the mechanisms of adaptation to HHP in this important hyperthermophilic piezophilic archaeon. Using circular DNA containing 1 kb of homologous regions, the frequency of transformation for *T. barophilus* is estimated at 10^2 transformants per μ g DNA, which is comparable to that reported for *T. kodakarensis* (10^1 to 10^2 transformants per μ g DNA) (12) but less than that observed for *P. furiosus* (10^5 transformants per μ g of DNA) (30). The advantage of the method developed here to generate gene deletion in *T. barophilus* is that the selection and counterselection steps can be performed in rich medium. Even through no spontaneous Sim^r mutants were generated in *T. barophilus*, in contrast to what was reported for the genetic manipulation of *T. kodakarensis* and *P. furiosus* (13, 15, 30), it is necessary to enrich Sim^r cells in liquid medium after transformation prior to direct isolation of Sim^r colonies on plates.

Uracil prototrophic selection can be used for simultaneous transformation and gene deletion in *T. barophilus*, but the limitation of this selectable marker is the interference caused by background growth of the $\Delta pyrF$ strain on solid medium. Simvastatin-based selection is useful for positive selection in *T. barophilus*, whereas uracil-based negative selection or counterselection suffers from a lack of efficiency in *T. barophilus*. This pattern has already been observed in other hyperthermophiles: such a counterselective strategy is also available for a 6-methyl purine-based marker, which provides a reliable counterselective pressure in *T. kodakarensis* and *P. furiosus* strains from which the *xgpT* gene (TK0664 and PF1950), encoding a hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (20, 31), has been deleted. *T. barophilus* is insensitive to 6-MP despite the presence of TERMP_00517, which is orthologous to TK0664 (80% identity) and PF1950 (77% identity), in its genome.

As a proof of concept of the efficiency of these genetic tools, the *hisB* gene, encoding imidazole glycerol-phosphate dehydratase, was deleted in UBOCC-3256. The corresponding mutant showed impaired growth in defined medium in the absence of histidine, and the growth resumed in defined medium where histidine was supplied. Moreover, we introduced a nonreplicative plasmid carrying the *pyrF* allele from *T. kodakarensis* or *T. barophilus*, which was integrated into the $\Delta pyrF$ *T. barophilus* strain by a single cross-over into the homologous genomic region of TERMP_00005, and we demonstrated that *T. barophilus* mutants can be complemented using this strategy until a shuttle vector that can stably replicate and express selectable phenotypes in both *T. barophilus* and *E. coli* becomes available.

The nutritional markers targeted in this study provide nutrition selection, and the resulting mutants were auxotrophic regardless of the culture hydrostatic pressure. These genetic tools developed for *T. barophilus* will help to study the adaptation of *T. barophilus* to deep-sea hydrothermal-vent conditions, notably HHP. Indeed, transcriptomic studies have highlighted HHP-responsive genes involved in hydrogen production, amino acid uptake and metabolism, sugar uptake and metabolism, and CO assimilation (24). Deletions of genes involved in these pathways *in vivo* are in progress to examine the roles of related enzymes in hydrostatic pressure adaptation. This will provide greater insight

into the mechanisms that have evolved to allow *T. barophilus* to cope with HHP conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jacques Oberto, Tadayuki Imanaka, Haruyuki Atomi, and Thomas J. Santangelo for helpful discussions and/or for providing vectors and protocols and Mickael Beauverger for his advice and help with performing growth experiments under high hydrostatic pressure. We are indebted to Helen McCombie for helpful language improvement. We also thank Nadège Quintin for the deposition of strains described in this work in the UBO culture collection (<http://www.univ-brest.fr/souchotheque/Collection+LM2E>).

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-10-BLAN-1725 01-Living deep). A.T. was supported by a postdoctoral fellowship from the Conseil Général 29 and from Ifremer. G.M. was supported by a Ph.D. fellowship from the Conseil Régional de Bretagne.

REFERENCES

- Marteinsson VT, Birrien JL, Reysenbach AL, Vernet M, Marie D, Gambacorta A, Messner P, Sleytr UB, Prieur D. 1999. *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49:351–359. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-2-351>.
- Zeng X, Zhang X, Jiang L, Alain K, Jebbar M, Shao Z. 2012. *Palaeococcus pacificus* sp. nov., a novel archaeon from a deep-sea hydrothermal sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63:2155–2159. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.044487-0>.
- Takai K, Sugai A, Itoh T, Horikoshi K. 2000. *Palaeococcus ferrophilus* gen. nov., sp. nov., a barophilic, hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:489–500. <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-50-2-489>.
- Alain K, Marteinsson VT, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, Prieur D, Birrien JL. 2002. *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52:1331–1339. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.02068-0>.
- Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J, Hirayama H, Nakagawa S, Nunoura T, Horikoshi K. 2008. Cell proliferation at 122 degrees C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:10949–10954. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0712334105>.
- Birrien JL, Zeng X, Jebbar M, Cambon-Bonavita MA, Querellou J, Oger P, Biennu N, Xiao X, Prieur D. 2011. *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61:2827–2831. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.024653-0>.
- Zeng X, Birrien JL, Fouquet Y, Cherkashov G, Jebbar M, Querellou J, Oger P, Cambon-Bonavita MA, Xiao X, Prieur D. 2009. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *ISME J.* 3:873–876. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.21>.
- Slesarev AI, Mezhevaya KV, Makarova KS, Polushin NN, Shcherbinina OV, Shakhova VV, Belova GI, Aravind L, Natale DA, Rogozin IB, Tatusov RL, Woll YI, Stetter KO, Malykh AG, Koonin EV, Kozynavkin SA. 2002. The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:4644–4649. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.032671499>.
- Vannier P, Marteinsson VT, Fridjonsson OH, Oger P, Jebbar M. 2011. Complete genome sequence of the hyperthermophilic, piezophilic, heterotrophic, and carboxydutrophic archaeon *Thermococcus barophilus* MP. *J. Bacteriol.* 193:1481–1482. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01490-10>.
- Jun X, Lupeng L, Minjuan X, Oger P, Fengping W, Jebbar M, Xiang X. 2011. Complete genome sequence of the obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* CH1. *J. Bacteriol.* 193:4297–4298. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.05345-11>.
- Lucas S, Han J, Lapidus A, Cheng JF, Goodwin LA, Pitluck S, Peters L, Mikhailova N, Teshima H, Dettler JC, Han C, Tapia R, Land M, Hauser L, Kyrpides NC, Ivanova N, Pagani I, Vannier P, Oger P, Bartlett DH, Noll KM, Woyke T, Jebbar M. 2012. Complete genome sequence of the thermophilic, piezophilic, heterotrophic bacterium *Marinitoga piezophila* KA3. *J. Bacteriol.* 194:5974–5975. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01430-12>.
- Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. 2005. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3889–3899. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.7.3889-3899.2005>.
- Matsumi R, Manabe K, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. 2007. Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host-marker system based on antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 189:2683–2691. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01692-06>.
- Farkas J, Stirrett K, Lipscomb GL, Nixon W, Scott RA, Adams MWW, Westpheling J. 2012. Recombinogenic properties of *Pyrococcus furiosus* strain COM1 enable rapid selection of targeted mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:4669–4676. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00936-12>.
- Hileman TH, Santangelo TJ. 2012. Genetics techniques for *Thermococcus kodakaraensis*. *Front. Microbiol.* 3:195. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00195>.
- Cabrera JA, Bolds J, Shields PE, Havel CM, Watson A. 1986. Isoprenoid synthesis in *Halobacterium halobium*. *J. Biol. Chem.* 261:3578–3583.
- Leigh JA, Albers S-V, Atomi H, Allers T. 2011. Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS Microbiol. Rev.* 35:577–608. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00265.x>.
- Santangelo TJ, Cubonová L, Reeve JN, Cubonova L. 2010. *Thermococcus kodakaraensis* genetics: TK1827-encoded beta-glycosidase, new positive-selection protocol, and targeted and repetitive deletion technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1044–1052. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02497-09>.
- Sato T, Fukui T, Atomi H, Imanaka T. 2003. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* 185:210–220. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.1.210-220.2003>.
- Santangelo TJ, Cubonova L, Reeve JN. 2008. Shuttle vector expression in *Thermococcus kodakaraensis*: contributions of cis elements to protein synthesis in a hyperthermophilic archaeon. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:3099–3104. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00305-08>.
- Higuchi Krummel B, Saiki R. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res.* 16:7351–7367. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.15.7351>.
- Horton RM, Cai ZL, Ho SN, Pease LR. 1990. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Bio-techniques* 8:528–535.
- Bertani G, Baresi L. 1987. Genetic transformation in the methanogen *Methanococcus voltae* PS. *J. Bacteriol.* 169:2730–2738.
- Vannier P. 2012. Ph.D. thesis. Université de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Soler N, Justome A, Quevillon-Cheruel S, Lorieux F, Le Cam E, Marguet E, Forterre P. 2007. The rolling-circle plasmid pTN1 from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus nautilus*. *Mol. Microbiol.* 66:357–370. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05912.x>.
- Zheng T, Huang Q, Zhang C, Ni J, She Q, Shen Y. 2012. Development of a simvastatin selection marker for a hyperthermophilic acidophile, *Sulfolobus islandicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:568–574. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.06095-11>.
- Zhang C, Whitaker RJ. 2012. A broadly applicable gene knockout system for the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus islandicus* based on simvastatin selection. *Microbiology* 158:1513–1522. <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.058289-0>.
- Waage I, Schmid G, Thumann S, Thomm M, Hausner W. 2010. Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:3308–3313. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01951-09>.
- Wendoloski D, Ferrer C, Dyall-Smith ML. 2001. A new simvastatin (mevinolin)-resistance marker from *Haloarcula hispanica* and a new *Haloferax volcanii* strain cured of plasmid pHV2. *Microbiology* 147:959–964.
- Lipscomb GL, Stirrett K, Schut GJ, Yang F, Jenney FE, Scott RA, Adams MWW, Westpheling J. 2011. Natural competence in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* facilitates genetic manipulation: construction of markerless deletions of genes encoding the two cytoplasmic hydrogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:2232–2238. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02624-10>.
- Kreuzer M, Schmutzler K, Waage I, Thomm M, Hausner W. 2013. Genetic engineering of *Pyrococcus furiosus* to use chitin as a carbon source. *BMC Biotechnol.* 13:9. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-13-9>.

- ABE F., **1998**. Hydrostatic pressure enhances vital staining with carboxyfluorescein or carboxydichlorofluorescein in *Saccharomyces cerevisiae* : efficient detection of labeled yeasts by flow cytometry. *Applied and environmental microbiology*, 64(3) :1139–1142.
- ABE F. et HORIKOSHI K., **1997**. Vacuolar acidification in *Saccharomyces cerevisiae* induced by elevated hydrostatic pressure is transient and is mediated by vacuolar H⁺-ATPase. *Extremophiles*, 1(2) :89–93.
- ABE F. et HORIKOSHI K., **1998**. Analysis of the pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure : a study in baro-(piezo-) physiology. *Extremophiles*, 2(3) :223–228.
- ABE F. et HORIKOSHI K., **2000**. Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 20(21) :8093–8102.
- ABE F. et HORIKOSHI K., **2001**. The biotechnological potential of piezophiles. *TRENDS in Biotechnology*, 19(3) :102–108.
- AERTSEN A., DE SPIEGELEER P., VANOIRBEEK K., LAVILLA M., et MICHIELS C.W., **2005**. Induction of oxidative stress by high hydrostatic pressure in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 71(5) :2226–2231.
- AKASHI H. et GOJOBORI T., **2002**. Metabolic efficiency and amino acid composition in the proteomes of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6) :3695–3700.
- ALAIN K., MARTEINSSON V., MIROSHNICHENKO M., BONCH OSMOLOVSKAYA E., PRIEUR D., et BIRRIEN J., **2002**. *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(4) :1331.
- ALAZARD D., DUKAN S., URIOS A., VERHÉ F., BOUABIDA N., MOREL F., THOMAS P., GARCIA J.L., et OLLIVIER B., **2003**. *Desulfovibrio hydrothermalis* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from hydrothermal vents. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1) :173–178.

- ALBERS S.V., KONING S.M., KONINGS W.N., et DRIESSEN A.J., **2004**. Insights into ABC transport in archaea. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 36(1) :5–15.
- ALBERS S.V. et MEYER B.H., **2011**. The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology*, 9(6) :414–426.
- APEL K. et HIRT H., **2004**. Reactive oxygen species : metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55 :373–399.
- ARFI Y., CHEVRET D., HENRISSAT B., BERRIN J.G., LEVASSEUR A., et RECORD E., **2013**. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. *Nature communications*, 4 :1810.
- ATOMI H., **2005**. Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current opinion in chemical biology*, 9(2) :166–173.
- ATOMI H., FUKUI T., KANAI T., MORIKAWA M., et IMANAKA T., **2004**. Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea*, 1(4) :263–267.
- BAE S., KIM Y., YANG S., LIM J., JEON J., LEE H., KANG S., KIM S., et LEE J., **2006**. *Thermococcus onnurineus* sp. nov., a Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent Area at the PACMANUS Field. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16.
- BAGYAN I., HOBOT J., et CUTTING S., **1996**. A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 178(15) :4500–4507.
- BALE S., GOODMAN K., ROCHELLE P., MARCHESI J., FRY J., WEIGHTMAN A., et PARKES R., **1997**. *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea. *International journal of systematic bacteriology*, 47(2) :515–521.
- BALNY C., MASSON P., et HEREMANS K., **2002**. High pressure effects on biological macromolecules : from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochimica et biophysica acta*, 1595(1-2) :3.
- BARON S.F. et FERRY J.G., **1989**. Purification and properties of the membrane-associated coenzyme F420-reducing hydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. *Journal of bacteriology*, 171(7) :3846–3853.
- BARRY E.R. et BELL S.D., **2006**. DNA replication in the archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4) :876–887.
- BARTLETT D., **2002**. Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1) :367–381.
- BEAULIEU S.E., **2010**. InterRidge Global Database of Active Submarine Hydrothermal Vent Fields : prepared for InterRidge. <http://www.interridge.org/{I}{R}vents>.

- BEHURA S.K. et SEVERSON D.W., **2013**. Codon usage bias : causative factors, quantification methods and genome-wide patterns : with emphasis on insect genomes. *Biological Reviews*, 88(1) :49–61.
- BELL S.D., KOSA P.L., SIGLER P.B., et JACKSON S.P., **1999**. Orientation of the transcription preinitiation complex in archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24) :13 662–13 667.
- BENSON D.A., KARSCH MIZRACHI I., CLARK K., LIPMAN D.J., OSTELL J., et SAYERS E.W., **2012**. GenBank. *Nucleic acids research*, 40(D1) :D48–D53.
- BERG H.C., **2003**. The rotary motor of bacterial flagella. *Biochemistry*, 72(1) :19.
- BINA J., ZHU J., DZIEJMAN M., FARUQUE S., CALDERWOOD S., et MEKALANOS J., **2003**. ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5) :2801–2806.
- BIRRIEN J.L., ZENG X., JEBBAR M., CAMBON BONAVITA M.A., QUÉRELLOU J., OGER P., BIENVENU N., XIAO X., et PRIEUR D., **2011**. *Pyrococcus yayanosii* sp. nov., an obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(12) :2827–2881.
- BLOM J., ALBAUM S., DOPPMEIER D., PÜHLER A., VORHÖLTER F.J., ZAKRZEWSKI M., et GOESMANN A., **2009**. EDGAR : a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. *BMC bioinformatics*, 10(1) :154.
- BOC A., MAKARENKOV V., *et al.*, **2012**. T-REX : a web server for inferring, validating and visualizing phylogenetic trees and networks. *Nucleic acids research*, 40(W1) :W573–W579.
- BORK P. et KOONIN E.V., **1994**. A new family of carbon-nitrogen hydrolases. *Protein Science*, 3(8) :1344–1346.
- BOWMAN J.P., BITTENCOURT C.R., et ROSS T., **2008**. Differential gene expression of *Listeria monocytogenes* during high hydrostatic pressure processing. *Microbiology*, 154(2) :462–475.
- BRADFORD M.M., **1976**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 :248–54.
- BRIDGER S.L., LANCASTER W.A., POOLE F.L., SCHUT G.J., et ADAMS M.W., **2012**. Genome Sequencing of a Genetically Tractable *Pyrococcus furiosus* Strain Reveals a Highly Dynamic Genome. *Journal of bacteriology*, 194(15) :4097–4106.
- BRINKMAN A.B., ETTEMA T.J., DE VOS W.M., et VAN DER OOST J., **2003**. The Lrp family of transcriptional regulators. *Molecular microbiology*, 48(2) :287–294.
- BROWN A.M., HOOPES S.L., WHITE R.H., et SARISKY C.A., **2011**. Purine biosynthesis in archaea : variations on a theme. *Biology direct*, 6(1) :63.
- BRUTON J. et HORNER W.H., **1966**. Biosynthesis of streptomycin III. Origin of the carbon atoms of streptose. *Journal of Biological Chemistry*, 241(13) :3142–3146.

- CALTEAU A., GOUY M., et PERRIÈRE G., **2005**. Horizontal transfer of two operons coding for hydrogenases between bacteria and archaea. *Journal of molecular evolution*, 60(5) :557–565.
- CAMPANARO S., TREU L., et VALLE G., **2008**. Protein evolution in deep sea bacteria : an analysis of amino acids substitution rates. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1) :313.
- CAMPANARO S., VEZZI A., VITULO N., LAURO F., D'ANGELO M., SIMONATO F., CESTARO A., MALACRIDA G., BERTOLONI G., *et al.*, **2005**. Laterally transferred elements and high pressure adaptation in *Photobacterium profundum* strains. *BMC genomics*, 6(1) :122.
- CERTES A., **1884**. Sur la culture, a l'abri des germes atmospheriques, des eaux et des sediments rapportes par les expeditions du Travailleur et du Talisman ; 1882-1883. *Compt. Rend. Acad. Sci*, 98 :690–693.
- CHARBONNIER Y., GETTLER B., FRANÇOIS P., BENTO M., RENZONI A., VAUDAUX P., SCHLEGEL W., et SCHRENZEL J., **2005**. A generic approach for the design of whole-genome oligoarrays, validated for genotyping, deletion mapping and gene expression analysis on *Staphylococcus aureus*. *BMC genomics*, 6(1) :95.
- CHOMCZYNSKI P. et SACCHI N., **2006**. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction : twenty-something years on. *Nature protocols*, 1(2) :581–585.
- CIOBANU M.C., BURGAUD G., DUFRESNE A., BREUKER A., RÉDOU V., MAAMAR S.B., GABOYER F., VANDENABEELE TRAMBOUZE O., LIPP J.S., *et al.*, **2014**. Microorganisms persist at record depths in the seafloor of the Canterbury Basin. *The ISME journal*.
- COHEN G.N., BARBE V., FLAMENT D., GALPERIN M., HEILIG R., LECOMPTE O., POCH O., PRIEUR D., QUÉRELLOU J., *et al.*, **2003**. An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Molecular microbiology*, 47(6) :1495–1512.
- CONNELLY D.P., COPLEY J.T., MURTON B.J., STANSFIELD K., TYLER P.A., GERMAN C.R., VAN DOVER C.L., AMON D., FURLONG M., *et al.*, **2012**. Hydrothermal vent fields and chemosynthetic biota on the world's deepest seafloor spreading centre. *Nature communications*, 3 :620.
- CONSALVI V., CHIARALUCE R., POLITI L., VACCARO R., DE ROSA M., et SCANDURRA R., **1991**. Extremely thermostable glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *European journal of biochemistry/FEBS*, 202(3) :1189–1196.
- CORLISS J.B., DYMOND J., GORDON L.I., EDMOND J.M., VON HERZEN R.P., BALLARD R.D., GREEN K., WILLIAMS D., BAINBRIDGE A., *et al.*, **1979**. Submarine thermal springs on the Galapagos Rift. *Science*, 203(4385) :1073–1083.
- CRAMER P., **2002**. Multisubunit RNA polymerases. *Current opinion in structural biology*, 12(1) :89–97.
- DELONG E.F., **1992**. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(12) :5685–5689.

- DELONG E.F. et YAYANOS A.A., **1986**. Biochemical function and ecological significance of novel bacterial lipids in deep-sea procaryotes. *Applied and environmental microbiology*, 51(4) :730–737.
- DI GIULIO M., **2005**. A comparison of proteins from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus abyssi* : barophily in the physicochemical properties of amino acids and in the genetic code. *Gene*, 346 :1–6.
- DI GIULIO M., **2013**. The origin of the genetic code in the ocean abysses : new comparisons confirm old observations. *Journal of theoretical biology*.
- DINOS G., KALPAXIS D.L., WILSON D.N., et NIERHAUS K.H., **2005**. Deacylated tRNA is released from the E site upon A site occupation but before GTP is hydrolyzed by EF-Tu. *Nucleic acids research*, 33(16) :5291–5296.
- DIRUGGIERO J., DUNN D., MAEDER D.L., HOLLEY SHANKS R., CHATARD J., HORLACHER R., ROBB F.T., BOOS W., et WEISS R.B., **2000**. Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic archaea. *Molecular microbiology*, 38(4) :684–693.
- DONG G., VIEILLE C., et ZEIKUS J.G., **1997**. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding amylopullulanase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Applied and environmental microbiology*, 63(9) :3577–3584.
- DONTSOVA M., FROLOVA L., VASSILIEVA J., PIENDL W., KISSELEV L., et GARBER M., **2000**. Translation termination factor aRF1 from the archaeon *Methanococcus jannaschii* is active with eukaryotic ribosomes. *FEBS letters*, 472(2) :213–216.
- DOSTER W., CUSACK S., et PETRY W., **1989**. Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering. *Nature*, 337(6209) :754–756.
- EGOROVA K. et ANTRANIKIAN G., **2005**. Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current opinion in microbiology*, 8(6) :649–655.
- EICHLER J. et MAUPIN FURLOW J., **2013**. Post-translation modification in Archaea : lessons from *Haloferax volcanii* and other haloarchaea. *FEMS microbiology reviews*, 37(4) :583–606.
- ELFERINK M.G., ALBERS S.V., KONINGS W.N., et DRIESSEN A.J., **2001**. Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. *Molecular microbiology*, 39(6) :1494–1503.
- ELLEDGE S.J., ZHOU Z., et ALLEN J.B., **1992**. Ribonucleotide reductase : regulation, regulation, regulation. *Trends in biochemical sciences*, 17(3) :119–123.
- ELOE E.A., LAURO F.M., VOGEL R.F., et BARTLETT D.H., **2008**. The deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 utilizes separate flagellar systems for swimming and swarming under high-pressure conditions. *Applied and environmental microbiology*, 74(20) :6298–6305.
- ELOE E.A., Malfatti F., GUTIERREZ J., HARDY K., SCHMIDT W.E., POGLIANO K., POGLIANO J., AZAM F., et BARTLETT D.H., **2011**. Isolation and characterization of a psychropiezophilic alphaproteobacterium. *Applied and environmental microbiology*, 77(22) :8145–8153.

- ERAUSO G., REYSENBACH A.L., GODFROY A., MEUNIER J.R., CRUMP B., PARTENSKY F., BAROSS J.A., MARTEINSSON V., BARBIER G., *et al.*, **1993**. *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Archives of microbiology*, 160(5) :338–349.
- ERIJMAN L. et CLEGG R.M., **1995**. Heterogeneity of *E. coli* RNA Polymerase Revealed by High Pressure. *Journal of molecular biology*, 253(2) :259–265.
- ERRA PUJADA M., DEBEIRE P., DUCHIRON F., et O'DONOHUE M.J., **1999**. The type II pullulanase of *Thermococcus hydrothermalis* : molecular characterization of the gene and expression of the catalytic domain. *Journal of bacteriology*, 181(10) :3284–3287.
- ESCOBAR PÁRAMO P., GHOSH S., et DIRUGGIERO J., **2005**. Evidence for genetic drift in the diversification of a geographically isolated population of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus*. *Molecular biology and evolution*, 22(11) :2297–2303.
- FAWAZ M.V., TOPPER M.E., et FIRESTINE S.M., **2011**. The ATP-grasp enzymes. *Bioorganic chemistry*, 39(5) :185–191.
- FIALA G. et STETTER K.O., **1986**. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 C. *Archives of Microbiology*, 145(1) :56–61.
- FRANCK T ROBB, **2004**. Genomics of Thermophiles. Dans Claire M. Fraser, Timothy Read, et Karen E. Nelson, rédacteurs, *Microbial Genomes*. Humana Press.
- GARZONI C., FRANCOIS P., HUYGHE A., COUZINET S., TAPPAREL C., CHARBONNIER Y., RENZONI A., LUCCHINI S., LEW D.P., *et al.*, **2007**. A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC genomics*, 8(1) :171.
- GEST H., **2008**. Unknowledgeables promote “unculturables”. *Microbe*, 3(11) :499.
- GONZÁLEZ J.M., MASUCHI Y., ROBB F.T., AMMERMAN J.W., MAEDER D.L., YANAGIBAYASHI M., TAMAOKA J., et KATO C., **1998**. *Pyrococcus horikoshii* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon isolated from a hydrothermal vent at the Okinawa Trough. *Extremophiles*, 2(2) :123–130.
- GRILL S., GUALERZI C.O., LONDEI P., et BLÄSI U., **2000**. Selective stimulation of translation of leaderless mRNA by initiation factor 2 : evolutionary implications for translation. *The EMBO journal*, 19(15) :4101–4110.
- GRISSA I., VERGNAUD G., et POURCEL C., **2007**. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC bioinformatics*, 8(1) :172.
- GROHMANN D., HIRTREITER A., et WERNER F., **2009**. Molecular mechanisms of archaeal RNA polymerase. *Biochemical Society Transactions*, 37(1) :12.

- GROSS M., LEHLE K., JAENICKE R., et NIERHAUS K.H., **1993**. Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. *European Journal of Biochemistry*, 218(2) :463–468.
- GRUNDEN A.M., JENNEY F.E., MA K., JI M., WEINBERG M.V., et ADAMS M.W., **2005**. *In vitro* reconstitution of an NADPH-dependent superoxide reduction pathway from *Pyrococcus furiosus*. *Applied and environmental microbiology*, 71(3) :1522–1530.
- GUINDON S., DUFAYARD J.F., LEFORT V., ANISIMOVA M., HORDIJK W., et GASCUEL O., **2010**. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies : assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3) :307–321.
- GUNAWARDANA Y. et NIRANJAN M., **2013**. Bridging the gap between transcriptome and proteome measurements identifies post-translationally regulated genes. *Bioinformatics*, 29(23) :3060–3066.
- HAFT D.H., SELENGUT J., MONGODIN E.F., et NELSON K.E., **2005**. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS computational biology*, 1(6) :e60.
- HAFT D.H., SELENGUT J.D., et WHITE O., **2003**. The TIGRFAMs database of protein families. *Nucleic acids research*, 31(1) :371–373.
- HALE C., KLEPPE K., TERNS R.M., et TERNS M.P., **2008**. Prokaryotic silencing (psi) RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *Rna*, 14(12) :2572–2579.
- HANEY P.J., BADGER J.H., BULDAK G.L., REICH C.I., WOESE C.R., et OLSEN G.J., **1999**. Thermal adaptation analyzed by comparison of protein sequences from mesophilic and extremely thermophilic *Methanococcus* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7) :3578–3583.
- HEINECKE N., PRATT B., VAISAR T., et BECKER L., **2010**. PepC : proteomics software for identifying differentially expressed proteins based on spectral counting. *Bioinformatics*, 26(12) :1574–1575.
- HEIZER E.M., RAIFORD D.W., RAYMER M.L., DOOM T.E., MILLER R.V., et KRANE D.E., **2006**. Amino acid cost and codon-usage biases in 6 prokaryotic genomes : a whole-genome analysis. *Molecular biology and evolution*, 23(9) :1670–1680.
- HERRICK J. et SCLAVI B., **2007**. Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication : an old story and an ancient heritage. *Molecular microbiology*, 63(1) :22–34.
- HERZOG B. et WIRTH R., **2012**. Swimming Behavior of Selected Species of Archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(6) :1670–1674.
- HILDEBRAND C. et POLLARD E., **1972**. Hydrostatic pressure effects on protein synthesis. *Biophysical journal*, 12(10) :1235–1250.

- HOLDEN J.F., TAKAI K., SUMMIT M., BOLTON S., ZYSKOWSKI J., et BAROSS J.A., **2001**. Diversity among three novel groups of hyperthermophilic deep-sea *Thermococcus* species from three sites in the northeastern Pacific Ocean. *FEMS microbiology ecology*, 36(1) :51–60.
- HOLLAND I.B. et A BLIGHT M., **1999**. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of molecular biology*, 293(2) :381–399.
- HOWE A., **2009**. Deep-sea hydrothermal vent fauna : evolution, dispersal, succession and biogeography. *Macalester Reviews in Biogeography*, 1(1) :6.
- HU T., GUAN T., et GERACE L., **1996**. Molecular and functional characterization of the p62 complex, an assembly of nuclear pore complex glycoproteins. *The Journal of cell biology*, 134(3) :589–601.
- HUBER R., LANGWORTHY T.A., KÖNIG H., THOMM M., WOESE C.R., SLEYTR U.B., et STETTER K.O., **1986**. *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 C. *Archives of Microbiology*, 144(4) :324–333.
- HURST L.D., FEIL E.J., et ROCHA E.P., **2006**. Protein evolution : causes of trends in amino-acid gain and loss. *Nature*, 442(7105) :E11–E12.
- ISHII A., OSHIMA T., SATO T., NAKASONE K., MORI H., et KATO C., **2005**. Analysis of hydrostatic pressure effects on transcription in *Escherichia coli* by DNA microarray procedure. *Extremophiles*, 9(1) :65–73.
- ISHII A., SATO T., WACHI M., NAGAI K., et KATO C., **2004**. Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers *in vivo* and *in vitro*. *Microbiology*, 150(6) :1965–1972.
- ISHINO Y., SHINAGAWA H., MAKINO K., AMEMURA M., et NAKATA A., **1987**. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, 169(12) :5429–5433.
- IWAHASHI H., ODANI M., ISHIDOU E., et KITAGAWA E., **2005**. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high hydrostatic pressure causing growth inhibition. *FEBS letters*, 579(13) :2847–2852.
- JANNASCH H.W. et MOTTTL M.J., **1985**. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*, 229(4715) :717–725.
- JANNASCH H.W. et TAYLOR C.D., **1984**. Deep-sea microbiology. *Annual Reviews in Microbiology*, 38(1) :487–487.
- JARRELL K.F. et ALBERS S.V., **2012**. The archaellum : an old motility structure with a new name. *Trends in microbiology*, 20(7) :307–312.
- JASNIN M., **2006**. Bioneutronique : la diffusion de neutrons pour l'étude de la dynamique des protéines. *Spectra analyse*, 35(251) :28.

- JENNEY F.E., VERHAGEN M.F., CUI X., et ADAMS M.W., **1999**. Anaerobic microbes : oxygen detoxification without superoxide dismutase. *Science*, 286(5438) :306–309.
- JOLIVET E., L'HARIDON S., CORRE E., FORTERRER P., et PRIEUR D., **2003**. *Thermococcus gammatolerans* sp. nov., a hyperthermophilic archaeon from a deep-sea hydrothermal vent that resists ionizing radiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(3) :847–851.
- JONES W., LEIGH J., MAYER F., WOESE C., et WOLFE R., **1983**. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology*, 136(4) :254–261.
- JØRGENSEN S., VORGIAS C.E., et ANTRANIKIAN G., **1997**. Cloning, Sequencing, Characterization, and Expression of an Extracellular α -Amylase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(26) :16 335–16 342.
- JUN X., LUPENG L., MINJUAN X., OGER P., FENGPING W., JEBBAR M., et XIANG X., **2011**. Complete genome sequence of the obligate piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii* CH1. *Journal of bacteriology*, 193(16) :4297–4298.
- JUNG J.H., LEE J.H., HOLDEN J.F., SEO D.H., SHIN H., KIM H.Y., KIM W., RYU S., et PARK C.S., **2012**. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus* sp. strain ST04, isolated from a deep-sea hydrothermal sulfide chimney on the Juan de Fuca Ridge. *Journal of bacteriology*, 194(16) :4434–4435.
- KANEHISA M. et GOTO S., **2000**. KEGG : kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1) :27–30.
- KANEHISA M., GOTO S., SATO Y., FURUMICHI M., et TANABE M., **2012**. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic acids research*, 40(D1) :D109–D114.
- KANESHIRO S.M. et CLARK D.S., **1995**. Pressure effects on the composition and thermal behavior of lipids from the deep-sea thermophile *Methanococcus jannaschii*. *Journal of bacteriology*, 177(13) :3668–3672.
- KARLIN S., CAMPBELL A.M., et MRAZEK J., **1998**. Comparative DNA analysis across diverse genomes. *Annual review of genetics*, 32(1) :185–225.
- KARLIN S. et MRÁZEK J., **2000**. Predicted highly expressed genes of diverse prokaryotic genomes. *Journal of bacteriology*, 182(18) :5238–5250.
- KATO C., LI L., NOGI Y., NAKAMURA Y., TAMAOKA J., et HORIKOSHI K., **1998**. Extremely barophilic bacteria isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a depth of 11,000 meters. *Applied and environmental microbiology*, 64(4) :1510–1513.
- KATO C. et QURESHI M., **1999**. Pressure response in deep-sea piezophilic bacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1) :87–92.

- KATO C., SATO T., et HORIKOSHI K., **1995**. Isolation and properties of barophilic and baro-tolerant bacteria from deep-sea mud samples. *Biodiversity & Conservation*, 4(1) :1–9.
- KATO N., YURIMOTO H., et THAUER R.K., **2006**. The physiological role of the ribulose monophosphate pathway in bacteria and archaea. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(1) :10–21.
- KAWARABAYASI Y., SAWADA M., HORIKAWA H., HAIKAWA Y., HINO Y., YAMAMOTO S., SEKINE M., BABA S.i., KOSUGI H., *et al.*, **1998**. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA research*, 5(2) :55–76.
- KAWARAI T., WACHI M., OGINO H., FURUKAWA S., SUZUKI K., OGIHARA H., et YAMASAKI M., **2004**. SulA-independent filamentation of *Escherichia coli* during growth after release from high hydrostatic pressure treatment. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(2) :255–262.
- KETTENBERGER H., ARMACHE K.J., et CRAMER P., **2003**. Architecture of the RNA polymerase II-TFIIS complex and implications for mRNA cleavage. *Cell*, 114(3) :347–357.
- KHELAIFIA S., FARDEAU M.L., PRADEL N., AUSSIGNARGUES C., GAREL M., TAMBURINI C., CAYOL J.L., GAUDRON S., GAILL F., *et al.*, **2011**. *Desulfovibrio piezophilus* sp. nov., a piezophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from wood falls in the Mediterranean Sea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(11) :2706–2711.
- KIM Y., LEE H., KIM E., BAE S., LIM J., MATSUMI R., LEBEDINSKY A., SOKOLOVA T., KOZHEVNIKOVA D., *et al.*, **2010**. Formate-driven growth coupled with H₂ production. *Nature*, 467(7313) :352–355.
- KLEIN R.J., MISULOVIN Z., et EDDY S.R., **2002**. Noncoding RNA genes identified in AT-rich hyperthermophiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(11) :7542–7547.
- KOBORI H., SATO M., TAMEIKE A., HAMADA K., SHIMADA S., et OSUMI M., **1995**. Ultrastructural effects of pressure stress to the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae* : a study by immunoelectron microscopy using frozen thin sections. *FEMS microbiology letters*, 132(3) :253–258.
- KONING S.M., ELFERINK M.G., KONINGS W.N., et DRIESSEN A.J., **2001**. Cellobiose Uptake in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Is Mediated by an Inducible, High-Affinity ABC Transporter. *Journal of bacteriology*, 183(17) :4979–4984.
- KONING S.M., KONINGS W.N., et DRIESSEN A.J., **2002**. Biochemical evidence for the presence of two α -glucoside ABC-transport systems in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea*, 1(1) :19–25.
- KROGH A., LARSSON B., VON HEIJNE G., et SONNHAMMER E.L., **2001**. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model : application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3) :567–580.
- KRZYWINSKI M., SCHEIN J., BIROL Í., CONNORS J., GASCOYNE R., HORSMAN D., JONES S.J., et MARRA M.A., **2009**. Circos : an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research*, 19(9) :1639–1645.

- LAGORCE A., FOURÇANS A., DUTERTRE M., BOUYSSIERE B., ZIVANOVIC Y., et CONFALONIERI F., **2012**. Genome-Wide Transcriptional Response of the Archaeon *Thermococcus gammatolerans* to Cadmium. *PloS one*, 7(7) :e41 935.
- LANGER D., HAIN J., THURIAUX P., et ZILLIG W., **1995**. Transcription in archaea : similarity to that in eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(13) :5768–5772.
- LANGILLE M.G. et BRINKMAN F.S., **2009**. IslandViewer : an integrated interface for computational identification and visualization of genomic islands. *Bioinformatics*, 25(5) :664–665.
- LAU W.C. et RUBINSTEIN J.L., **2010**. Structure of intact *Thermus thermophilus* V-ATPase by cryo-EM reveals organization of the membrane-bound VO motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(4) :1367–1372.
- LAURO F.M., CHASTAIN R.A., BLANKENSHIP L.E., YAYANOS A.A., et BARTLETT D.H., **2007**. The unique 16S rRNA genes of piezophiles reflect both phylogeny and adaptation. *Applied and environmental microbiology*, 73(3) :838–845.
- LAURSEN B.S., SØRENSEN H.P., MORTENSEN K.K., et SPERLING PETERSEN H.U., **2005**. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69(1) :101–123.
- LE CHATELIER H., **1884**. Sur un énoncé général des lois des équilibres chimiques. *Comptes-rendus de l'Académie des sciences*, 99 :786–789.
- LEE A., SEVINSKY J., BUNDY J., GRUNDEN A., et STEPHENSON JR J., **2009**. Proteomics of *Pyrococcus furiosus*, a hyperthermophilic archaeon refractory to traditional methods. *Journal of proteome research*, 8(8) :3844–3851.
- LEE H.S., BAE S.S., KIM M.S., KWON K.K., KANG S.G., et LEE J.H., **2011**. Complete genome sequence of hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. strain NA2, isolated from a deep-sea hydrothermal vent area. *Journal of bacteriology*, 193(14) :3666–3667.
- LEE H.S., KANG S.G., BAE S.S., LIM J.K., CHO Y., KIM Y.J., JEON J.H., CHA S.S., KWON K.K., *et al.*, **2008**. The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydutrophic metabolism. *Journal of bacteriology*, 190(22) :7491–7499.
- LEE H.S., SHOCKLEY K.R., SCHUT G.J., CONNERS S.B., MONTERO C.I., JOHNSON M.R., CHOU C.J., BRIDGER S.L., WIGNER N., *et al.*, **2006**. Transcriptional and biochemical analysis of starch metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of bacteriology*, 188(6) :2115–2125.
- LEHMACHER A. et HENSEL R., **1994**. Cloning, sequencing and expression of the gene encoding 2-phosphoglycerate kinase from *Methanothermus fervidus*. *Molecular and General Genetics MGG*, 242(2) :163–168.
- LERAT E., DAUBIN V., et MORAN N.A., **2003**. From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes : The case of the γ -proteobacteria. *PLoS biology*, 1(1) :e19.

- LIPSCOMB G.L., KEESE A.M., COWART D.M., SCHUT G.J., THOMM M., ADAMS M.W., et SCOTT R.A., **2009**. SurR : a transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulphur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Molecular microbiology*, 71(2) :332–349.
- LITTLEFIELD O., KORKHIN Y., et SIGLER P.B., **1999**. The structural basis for the oriented assembly of a TBP/TFB/promoter complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24) :13 668–13 673.
- LOENEN W., **2006**. S-adenosylmethionine : jack of all trades and master of everything? *Biochemical Society Transactions*, 34(2) :330.
- LONDEI P., **2007**. Translation. Dans *Archaea : molecular and cellular biology*. ASM Press.
- LONS DALE P., **1977**. Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Research*, 24(9) :857–863.
- LYONS E. et FREELING M., **2008**. How to usefully compare homologous plant genes and chromosomes as DNA sequences. *The Plant Journal*, 53(4) :661–673.
- MACDONELL M. et COLWELL R., **1985**. Phylogeny of the *Vibrionaceae*, and Recommendation for Two New Genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Systematic and applied microbiology*, 6(2) :171–182.
- MACGREGOR R.B., **1998**. Effect of hydrostatic pressure on nucleic acids. *Biopolymers*, 48(4) :253–263.
- MACGREGOR R.B., **2002**. The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1) :266–276.
- MAEDER D.L., WEISS R.B., DUNN D.M., CHERRY J.L., GONZÁLEZ J.M., DIRUGGIERO J., et ROBB F.T., **1999**. Divergence of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *P. horikoshii* inferred from complete genomic sequences. *Genetics*, 152(4) :1299–1305.
- MAGRANE M. *et al.*, **2011**. UniProt Knowledgebase : a hub of integrated protein data. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2011.
- MAKAROVA K.S., GRISHIN N.V., SHABALINA S.A., WOLF Y.I., et KOONIN E.V., **2006**. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes : computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*, 1(1) :7.
- MAÑAS P. et MACKEY B.M., **2004**. Morphological and physiological changes induced by high hydrostatic pressure in exponential-and stationary-phase cells of *Escherichia coli* : relationship with cell death. *Applied and environmental microbiology*, 70(3) :1545–1554.
- MARDANOV A.V., RAVIN N.V., SVETLITCHNYI V.A., BELETSKY A.V., MIROSHNICHENKO M.L., BONCH OSMOLOVSKAYA E.A., et SKRYABIN K.G., **2009**. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a Siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. *Applied and environmental microbiology*, 75(13) :4580–4588.

- MARKOWITZ V.M., CHEN I.M.A., PALANIAPPAN K., CHU K., SZETO E., GRECHKIN Y., RATNER A., JACOB B., HUANG J., *et al.*, **2012**. IMG : the integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic acids research*, 40(D1) :D115–D122.
- MARQUIS R.E., **1976**. High-pressure microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol*, 14 :159–241.
- MARRAFFINI L.A. et SONTHEIMER E.J., **2010**. CRISPR interference : RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Reviews Genetics*, 11(3) :181–190.
- MARTEINSSON V.T., BIRRIEN J.L., REYSENBACH A.L., VERNET M., MARIE D., GAMBACORTA A., MESSNER P., SLEYTR U.B., et PRIEUR D., **1999**. *Thermococcus barophilus* sp. nov., a new barophilic and hyperthermophilic archaeon isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic bacteriology*, 49(2) :351–359.
- MARTEINSSON V.T., MOULIN P., BIRRIEN J., GAMBACORTA A., VERNET M., et PRIEUR D., **1997**. Physiological Responses to Stress Conditions and Barophilic Behavior of the Hyperthermophilic Vent Archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Applied and environmental microbiology*, 63(4) :1230–1236.
- MARTIN F.H. et TINOCO I., **1980**. DNA-RNA hybrid duplexes containing oligo (dA : rU) sequences are exceptionally unstable and may facilitate termination of transcription. *Nucleic acids research*, 8(10) :2295–2300.
- MARTY V., JASNIN M., FABIANI E., VAUCLARE P., GABEL F., TRAPP M., PETERS J., ZACCAI G., et FRANZETTI B., **2013**. Neutron scattering : a tool to detect in vivo thermal stress effects at the molecular dynamics level in micro-organisms. *Journal of The Royal Society Interface*, 10(82) :20130 003.
- MARWAN W., ALAM M., et OESTERHELT D., **1991**. Rotation and switching of the flagellar motor assembly in *Halobacterium halobium*. *Journal of bacteriology*, 173(6) :1971–1977.
- MATSER A.M., KREBBERS B., VAN DEN BERG R.W., et BARTELS P.V., **2004**. Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2) :79–85.
- MATSUMI R., MANABE K., FUKUI T., ATOMI H., et IMANAKA T., **2007**. Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host-marker system based on antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 189(7) :2683–2691.
- MATSUNAGA F., GLATIGNY A., MUCCHIELLI GIORGI M.H., AGIER N., DELACROIX H., MARISA L., DUROSAY P., ISHINO Y., AGGERBECK L., *et al.*, **2007**. Genomewide and biochemical analyses of DNA-binding activity of Cdc6/Orc1 and Mcm proteins in *Pyrococcus* sp. *Nucleic acids research*, 35(10) :3214–3222.
- MATTES T.E., NUNN B.L., MARSHALL K.T., PROSKUROWSKI G., KELLEY D.S., KAWKA O.E., GOODLETT D.R., HANSELL D.A., et MORRIS R.M., **2013**. Sulfur oxidizers dominate carbon fixation at a biogeochemical hot spot in the dark ocean. *The ISME journal*.

- MATUSSEK K., MORITZ P., BRUNNER N., ECKERSKORN C., et HENSEL R., **1998**. Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding cyclic 2, 3-diphosphoglycerate synthetase, the key enzyme of cyclic 2, 3-diphosphoglycerate metabolism in *Methanothermus fervidus*. *Journal of bacteriology*, 180(22) :5997–6004.
- MEGANATHAN R. et MARQUIS R., **1973**. Loss of bacterial motility under pressure. *Nature*, 246 :525–527.
- MERICO D., ISSERLIN R., STUEKER O., EMILI A., et BADER G.D., **2010**. Enrichment map : a network-based method for gene-set enrichment visualization and interpretation. *PloS one*, 5(11) :e13 984.
- MICHELS P. et CLARK D., **1997**. Pressure-enhanced activity and stability of a hyperthermophilic protease from a deep-sea methanogen. *Applied and environmental microbiology*, 63(10) :3985.
- MINIC Z. et THONGBAM P.D., **2011**. The biological deep sea hydrothermal vent as a model to study carbon dioxide capturing enzymes. *Marine drugs*, 9(5) :719–738.
- MIROSHNICHENKO M.L., HIPPE H., STACKEBRANDT E., KOSTRIKINA N.A., CHERNYH N.A., JEANTHON C., NAZINA T.N., BELYAEV S.S., et BONCH OSMOLOVSKAYA E.A., **2001**. Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir. *Extremophiles*, 5(2) :85–91.
- MIURA T., MINEGISHI H., USAMI R., et ABE F., **2006**. Systematic analysis of HSP gene expression and effects on cell growth and survival at high hydrostatic pressure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Extremophiles*, 10(4) :279–284.
- MOON Y.J., KWON J., YUN S.H., LIM H.L., KIM M.S., KANG S.G., LEE J.H., CHOI J.S., KIM S.I., *et al.*, **2012**. Proteome analyses of hydrogen-producing hyperthermophilic archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1 in different one-carbon substrate culture conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(6).
- MORITA R.Y., **1975**. Psychrophilic bacteria. *Bacteriological reviews*, 39(2) :144.
- MOZHAEV V.V., HEREMANS K., FRANK J., MASSON P., et BALNY C., **1996**. High pressure effects on protein structure and function. *Proteins : Structure, Function, and Bioinformatics*, 24(1) :81–91.
- MURAYAMA N., SHIMIZU H., TAKIGUCHI S., BABA Y., AMINO H., HORIUCHI T., SEKIMIZU K., et MIKI T., **1996**. Evidence for Involvement of *Escherichia coli* Genes pmbA, csrA and a Previously Unrecognized Gene tldD, in the Control of DNA Gyrase by letD (ccdB) of Sex Factor F. *Journal of molecular biology*, 256(3) :483–502.
- NAKASONE K., IKEGAMI A., KAWANO H., KATO C., USAMI R., et HORIKOSHI K., **2002**. Transcriptional regulation under pressure conditions by RNA polymerase $\sigma 54$ factor with a two-component regulatory system in *Shewanella violacea*. *Extremophiles*, 6(2) :89–95.

- NELSON K.E., CLAYTON R.A., GILL S.R., GWINN M.L., DODSON R.J., HAFT D.H., HICKEY E.K., PETERSON J.D., NELSON W.C., *et al.*, **1999**. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, 399(6734) :323–329.
- NEUNER A., JANNASCH H.W., BELKIN S., et STETTER K.O., **1990**. *Thermococcus litoralis* sp. nov. : a new species of extremely thermophilic marine archaeobacteria. *Archives of microbiology*, 153(2) :205–207.
- NISHIYAMA M., SOWA Y., KIMURA Y., HOMMA M., ISHIJIMA A., et TERAZIMA M., **2013**. High Hydrostatic Pressure Induces Counterclockwise to Clockwise Reversals of the *Escherichia coli* Flagellar Motor. *Journal of bacteriology*, 195(8) :1809–1814.
- NIVEN G.W., MILES C.A., et MACKEY B.M., **1999**. The effects of hydrostatic pressure on ribosome conformation in *Escherichia coli* : an in vivo study using differential scanning calorimetry. *Microbiology*, 145(2) :419–425.
- NOGI Y., HOSOYA S., KATO C., et HORIKOSHI K., **2004**. *Colwellia piezophila* sp. nov., a novel piezophilic species from deep-sea sediments of the Japan Trench. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5) :1627–1631.
- NOGI Y., HOSOYA S., KATO C., et HORIKOSHI K., **2007**. *Psychromonas hadalis* sp. nov., a novel piezophilic bacterium isolated from the bottom of the Japan Trench. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(6) :1360–1364.
- NOGI Y., KATO C., et HORIKOSHI K., **2002**. *Psychromonas kaikoe* sp. nov., a novel from the deepest piezophilic bacterium cold-seep sediments in the Japan Trench. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(5) :1527–1532.
- NOGI Y., MASUI N., et KATO C., **1998**. *Photobacterium profundum* sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment. *Extremophiles*, 2(1) :1–8.
- NOIROT C., GASPIN C., SCHIEX T., et GOUZY J., **2008**. LeARN : a platform for detecting, clustering and annotating non-coding RNAs. *BMC bioinformatics*, 9(1) :21.
- NOLL K.M., LAPIERRE P., GOGARTEN J.P., et NANAVATI D.M., **2008**. Evolution of mal ABC transporter operons in the *Thermococcales* and *Thermotogales*. *BMC evolutionary biology*, 8(1) :7.
- OBERTO J., **2013**. SyntTax : a web server linking synteny to prokaryotic taxonomy. *BMC bioinformatics*, 14(1) :4.
- O'DONNELL M., LANGSTON L., et STILLMAN B., **2013**. Principles and Concepts of DNA Replication in Bacteria, Archaea, and Eukarya. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(7).
- OGER P. et JEBBAR M., **2010**. The many ways of coping with pressure. *Research in microbiology*, 161(10) :799–809.

- OGER P., SOKOLOVA T.G., KOZHEVNIKOVA D.A., CHERNYH N.A., BARTLETT D.H., BONCH OSMOLOVSKAYA E.A., et LEBEDINSKY A.V., **2011**. Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. strain AM4, capable of organotrophic growth and growth at the expense of hydrogenogenic or sulfidogenic oxidation of carbon monoxide. *Journal of bacteriology*, 193(24) :7019–7020.
- OGER P.M. et CARIO A., **2013**. Adaptation of the membrane in Archaea. *Biophysical chemistry*.
- ORITA I., SATO T., YURIMOTO H., KATO N., ATOMI H., IMANAKA T., et SAKAI Y., **2006**. The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of bacteriology*, 188(13) :4698–4704.
- OUHAMMOUCH M., **2004**. Transcriptional regulation in Archaea. *Current opinion in genetics & development*, 14(2) :133–138.
- PARKES R.J., LINNANE C.D., WEBSTER G., SASS H., WEIGHTMAN A.J., HORNIBROOK E.R., et HORSFIELD B., **2011**. Prokaryotes stimulate mineral H₂ formation for the deep biosphere and subsequent thermogenic activity. *Geology*, 39(3) :219–222.
- PARSONS A. et HEAL R., **2002**. Biological Sensor. US 2002/0192637 A1, United States Patent Application.
- PATHOM AREE W., NOGI Y., SUTCLIFFE I.C., WARD A.C., HORIKOSHI K., BULL A.T., et GOODFELLOW M., **2006**. *Dermacoccus abyssi* sp. nov., a piezotolerant actinomycete isolated from the Mariana Trench. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(6) :1233–1237.
- PERRETT S. et ZHOU J.M., **2002**. Expanding the pressure technique : insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1) :210–223.
- PETERS J., MARTINEZ N., MICHOD G., CARIO A., FRANZETTI B., OGER P., et JEBBAR M., **2014**. Deep sea microbes probed by incoherent neutron scattering under high hydrostatic pressure. Submitted.
- PIETILÄ M.K., ROINE E., PAULIN L., KALKKINEN N., et BAMFORD D.H., **2009**. An ssDNA virus infecting archaea : a new lineage of viruses with a membrane envelope. *Molecular microbiology*, 72(2) :307–319.
- PLUCHON P.F., FOUQUEAU T., CREZÉ C., LAURENT S., BRIFFOTAUX J., HOGREL G., PALUD A., HENNEKE G., GODFROY A., *et al.*, **2013**. An Extended Network of Genomic Maintenance in the Archaeon *Pyrococcus abyssi* Highlights Unexpected Associations between Eucaryotic Homologs. *PloS one*, 8(11) :e79707.
- PRADEL N., JI B., GIMENEZ G., TALLA E., LENOBLE P., GAREL M., TAMBURINI C., FOURQUET P., LEBRUN R., *et al.*, **2013**. The First Genomic and Proteomic Characterization of a Deep-Sea Sulfate Reducer : Insights into the Piezophilic Lifestyle of *Desulfovibrio piezophilus*. *PloS one*, 8(1) :e55130.

- PRANGISHVILI D., FORTERRE P., et GARRETT R.A., **2006**. Viruses of the Archaea : a unifying view. *Nature Reviews Microbiology*, 4(11) :837–848.
- PRIEUR D., ERAUSO G., GESLIN C., LUCAS S., GAILLARD M., BIDAULT A., MATTENET A., ROUAULT K., FLAMENT D., *et al.*, **2004**. Genetic elements of *Thermococcales*. *Biochemical Society Transactions*, 32(2) :184–187.
- PUISSANT C. et HOUDEBINE L.M., **1990**. An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques*, 8(2) :148.
- QURESHI M.H., KATO C., et HORIKOSHI K., **1998**. Purification of two pressure-regulated c-type cytochromes from a deep-sea barophilic bacterium, *Shewanella* sp. strain DB-172F. *FEMS microbiology letters*, 161(2) :301–309.
- REITER W.D., HÜDEPOHL U., et ZILLIG W., **1990**. Mutational analysis of an archaeobacterial promoter : essential role of a TATA box for transcription efficiency and start-site selection *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24) :9509–9513.
- REN Q., CHEN K., et PAULSEN I.T., **2007**. TransportDB : a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic acids research*, 35(1) :D274–D279.
- ROBB F.T., MAEDER D.L., BROWN J.R., DIRUGGIERO J., STUMP M.D., YEH R.K., WEISS R.B., et DUNN D.M., **2001**. Genomic sequence of hyperthermophile, *Pyrococcus furiosus* : Implications for physiology and enzymology. *Methods in enzymology*, 330 :134–157.
- ROSENBAUM E., GABEL F., DURÁ M.A., FINET S., CLÉRY BARRAUD C., MASSON P., et FRANZETTI B., **2012**. Effects of hydrostatic pressure on the quaternary structure and enzymatic activity of a large peptidase complex from *Pyrococcus horikoshii*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 517(2) :104–110.
- ROTH J.R., LAWRENCE J.G., RUBENFIELD M., KIEFFER HIGGINS S., et CHURCH G.M., **1993**. Characterization of the cobalamin (vitamin B12) biosynthetic genes of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 175(11) :3303–3316.
- ROUSSEL E.G., BONAVIDA M.A.C., QUERELLOU J., CRAGG B.A., WEBSTER G., PRIEUR D., et PARKES R.J., **2008**. Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science*, 320(5879) :1046–1046.
- ROZEN S. et SKALETISKY H., **1999**. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Dans *Bioinformatics methods and protocols*, 365–386. Springer.
- SAEED A., SHAROV V., WHITE J., LI J., LIANG W., BHAGABATI N., BRAISTED J., KLAPA M., CURRIER T., *et al.*, **2003**. TM4 : a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34(2) :374.
- SAMSON R.Y. et BELL S.D., **2011**. Cell cycles and cell division in the archaea. *Current opinion in microbiology*, 14(3) :350–356.

- SAPRA R., BAGRAMYAN K., et ADAMS M.W., **2003**. A simple energy-conserving system : proton reduction coupled to proton translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13) :7545–7550.
- SARKAR M.K., PAUL K., et BLAIR D., **2010**. Chemotaxis signaling protein CheY binds to the rotor protein FliN to control the direction of flagellar rotation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20) :9370–9375.
- SCHLESNER M., MILLER A., STREIF S., STAUDINGER W.F., MÜLLER J., SCHEFFER B., SIEDLER F., et OESTERHELT D., **2009**. Identification of Archaea-specific chemotaxis proteins which interact with the flagellar apparatus. *BMC microbiology*, 9(1) :56.
- SCHNEIDER E., **2001**. ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Research in microbiology*, 152(3) :303–310.
- SCHUT G.J., BOYD E.S., PETERS J.W., et ADAMS M.W., **2012**. The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiology Reviews*.
- SCHUT G.J., BRIDGER S.L., et ADAMS M.W., **2007**. Insights into the metabolism of elemental sulfur by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* : characterization of a coenzyme A-dependent NAD (P) H sulfur oxidoreductase. *Journal of bacteriology*, 189(12) :4431–4441.
- SEALFON R., HIBBS M., HUTTENHOWER C., MYERS C., et TROYANSKAYA O., **2006**. GOLEM : an interactive graph-based gene-ontology navigation and analysis tool. *BMC bioinformatics*, 7(1) :443.
- SERRANO R., **1989**. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual review of plant biology*, 40(1) :61–94.
- SHANNON P., MARKIEL A., OZIER O., BALIGA N.S., WANG J.T., RAMAGE D., AMIN N., SCHWIKOWSKI B., et IDEKER T., **2003**. Cytoscape : a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11) :2498–2504.
- SHOCKLEY K.R., WARD D.E., CHHABRA S.R., CONNERS S.B., MONTERO C.I., et KELLY R.M., **2003**. Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Applied and environmental microbiology*, 69(4) :2365–2371.
- SIEVERS F., WILM A., DINEEN D., GIBSON T.J., KARPLUS K., LI W., LOPEZ R., MCWILLIAM H., REMMERT M., *et al.*, **2011**. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1).
- SINENSKY M., **1974**. Homeoviscous adaptation—a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(2) :522–525.
- SMELLER L., **2002**. Pressure-temperature phase diagrams of biomolecules. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1595(1-2) :11–29.

- SODERBERG T., **2005**. Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea : a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea*, 1(5) :347–352.
- SOLER N., MARGUET E., CORTEZ D., DESNOUES N., KELLER J., VAN TILBEURGH H., SEZONOV G., et FORTERRE P., **2010**. Two novel families of plasmids from hyperthermophilic archaea encoding new families of replication proteins. *Nucleic acids research*, 38(15) :5088–5104.
- SOREK R., KUNIN V., et HUGENHOLTZ P., **2008**. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3) :181–186.
- STRAND K.R., SUN C., LI T., JENNEY JR F.E., SCHUT G.J., et ADAMS M.W., **2010**. Oxidative stress protection and the repair response to hydrogen peroxide in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and in related species. *Archives of microbiology*, 192(6) :447–459.
- STRAUCH M., SPIEGELMAN G., PEREGO M., JOHNSON W., BURBULYS D., et HOCH J., **1989**. The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *The EMBO journal*, 8(5) :1615.
- SULLIVAN M.J., PETTY N.K., et BEATSON S.A., **2011**. Easyfig : a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 27(7) :1009–1010.
- SUN N., PAN C., NICKELL S., MANN M., BAUMEISTER W., et NAGY I., **2010**. Quantitative proteome and transcriptome analysis of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* cultured under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of proteome research*, 9(9) :4839–4850.
- SWIRE J., **2007**. Selection on synthesis cost affects interprotein amino acid usage in all three domains of life. *Journal of molecular evolution*, 64(5) :558–571.
- SZURMANT H. et ORDAL G.W., **2004**. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2) :301–319.
- TA KÁCS M., TÓTH A., BOGOS B., VARGA A., RÁKHELY G., et KOVÁCS K.L., **2008**. Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis*. *BMC microbiology*, 8(1) :88.
- TAKAI K., NAKAMURA K., TOKI T., TSUNOGAI U., MIYAZAKI M., MIYAZAKI J., HIRAYAMA H., NAKAGAWA S., NUNOURA T., *et al.*, **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*, 105(31) :10 949–10 954.
- TALAVERA G. et CASTRESANA J., **2007**. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic biology*, 56(4) :564–577.
- TAMEGAI H., KATO C., et HORIKOSHI K., **1998**. Pressure-regulated respiratory system in barotolerant bacterium, *Shewanella* sp. strain DSS 12. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, 1(3) :213–220.

- TAMEGAI H., NISHIKAWA S., HAGA M., et BARTLETT D.H., **2011**. The respiratory system of the piezophile *Photobacterium profundum* SS9 grown under various pressures. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(8) :1506–1510.
- TANG J., **2011**. Microbial metabolomics. *Current genomics*, 12(6) :391.
- TESKE A. et SØRENSEN K.B., **2007**. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments : have we caught them all? *The ISME journal*, 2(1) :3–18.
- THAUER R.K., **2007**. A Fifth Pathway of Carbon Fixation. *Science*, 318(5857) :1732–1733.
- THIEL A., MICHOU D., MOALIC Y., FLAMENT D., et JEBBAR M., **2014**. Genetic manipulations of the hyperthermophilic piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Applied and environmental microbiology*.
- TORSVIK T. et DUNDAS I.D., **1974**. Bacteriophage of *Halobacterium salinarum*. *Nature*, 248 :680–681.
- TRAN T., BÜSCHER P., VANDENBUSSCHE G., WYNS L., MESSENS J., et DE GREVE H., **2008**. Heterologous expression, purification and characterisation of the extracellular domain of trypanosome invariant surface glycoprotein ISG75. *Journal of biotechnology*, 135(3) :247–254.
- ULAS T., RIEMER S.A., ZAPARTY M., SIEBERS B., et SCHOMBURG D., **2012**. Genome-scale reconstruction and analysis of the metabolic network in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *PloS one*, 7(8) :e43401.
- UNDEN G. et BONGAERTS J., **1997**. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli* : energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1320(3) :217–234.
- VAN DER OOST J., SCHUT G., KENGEN S.M., HAGEN W.R., THOMM M., et DE VOS W.M., **1998**. The Ferredoxin-dependent Conversion of Glyceraldehyde-3-phosphate in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* Represents a Novel Site of Glycolytic Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(43) :28149–28154.
- VAN DOVER C., HUMPHRIS S., FORNARI D., CAVANAUGH C., COLLIER R., GOFFREDI S., HASHIMOTO J., LILLEY M., REYSENBACH A., et al., **2001**. Biogeography and ecological setting of Indian Ocean hydrothermal vents. *Science*, 294(5543) :818–823.
- VAN PASSEL M.W., KURAMAE E.E., LUYF A.C., BART A., et BOEKHOUT T., **2006**. The reach of the genome signature in prokaryotes. *BMC evolutionary biology*, 6(1) :84.
- VANNIER P., **2012**. *Bases génomiques, protéomiques et transcriptomiques de l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques de l'archée hyperthermophile : Thermococcus barophilus*. Thèse de doctorat, Ecole doctorale des Sciences de la Mer.
- VARTOUKIAN S.R., PALMER R.M., et WADE W.G., **2010**. Strategies for culture of ‘unculturable’ bacteria. *FEMS microbiology letters*, 309(1) :1–7.

- VERHEES C., KENGEN S., TUININGA J., SCHUT G., ADAMS M., DE VOS W., et VAN DER OOST J., **2003**. The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem. J.*, 375 :231–246.
- VEZZI A., CAMPANARO S., D'ANGELO M., SIMONATO F., VITULO N., LAURO F., CESTARO A., MALACRIDA G., SIMIONATI B., *et al.*, **2005**. Life at depth : *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science*, 307(5714) :1459.
- VIERKE G., ENGELMANN A., HEBBELN C., et THOMM M., **2003**. A novel archaeal transcriptional regulator of heat shock response. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1) :18–26.
- VIGNAIS P.M. et BILLOUD B., **2007**. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases : an overview. *Chemical Reviews*, 107(10) :4206–4272.
- VIGNAIS P.M. et COLBEAU A., **2004**. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Current issues in molecular biology*, 6(2) :159–188.
- VISWANATHAN P., MURPHY K., JULIEN B., GARZA A.G., et KROOS L., **2007**. Regulation of dev, an operon that includes genes essential for *Myxococcus xanthus* development and CRISPR-associated genes and repeats. *Journal of bacteriology*, 189(10) :3738–3750.
- VOGEL C. et MARCOTTE E.M., **2012**. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4) :227–232.
- VOORHORST W., EGGEN R., LUESINK E., et DE VOS W., **1995**. Characterization of the celB gene coding for beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and its expression and site-directed mutation in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 177(24) :7105.
- WADHAMS G.H. et ARMITAGE J.P., **2004**. Making sense of it all : bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(12) :1024–1037.
- WAEGE I., SCHMID G., THUMANN S., THOMM M., et HAUSNER W., **2010**. Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Applied and environmental microbiology*, 76(10) :3308–3313.
- WANG F., WANG J., JIAN H., ZHANG B., LI S., WANG F., ZENG X., GAO L., BARTLETT D.H., *et al.*, **2008**. Environmental adaptation : genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3. *PLoS One*, 3(4) :e1937.
- WANG X., GAO Z., XU X., et RUAN L., **2011**. Complete Genome Sequence of *Thermococcus* sp. Strain 4557, a Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent Area. *Journal of bacteriology*, 193(19) :5544–5545.
- WARNES G.R., BOLKER B., BONEBAKKER L., GENTLEMAN R., HUBER W., LIAW A., LUMLEY T., MAECHLER M., MAGNUSSON A., *et al.*, **2009**. gplots : Various R programming tools for plotting data. *R package version*, 2(4).

- WEINBERG M.V., SCHUT G.J., BREHM S., DATTA S., et ADAMS M.W., **2005**. Cold shock of a hyperthermophilic archaeon : *Pyrococcus furiosus* exhibits multiple responses to a suboptimal growth temperature with a key role for membrane-bound glycoproteins. *Journal of bacteriology*, 187(1) :336–348.
- WELCH T. et BARTLETT D., **1998**. Identification of a regulatory protein required for pressure-responsive gene expression in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Molecular microbiology*, 27(5) :977–985.
- WELCH T.J. et BARTLETT D.H., **1996**. Isolation and characterization of the structural gene for OmpL, a pressure-regulated porin-like protein from the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Journal of bacteriology*, 178(16) :5027–5031.
- WELCH T.J., FAREWELL A., NEIDHARDT F.C., et BARTLETT D.H., **1993**. Stress response of *Escherichia coli* to elevated hydrostatic pressure. *Journal of bacteriology*, 175(22) :7170–7177.
- WERNER F., **2007**. Structure and function of archaeal RNA polymerases. *Molecular microbiology*, 65(6) :1395–1404.
- WERNER F. et WEINZIERL R.O., **2002**. A recombinant RNA polymerase II-like enzyme capable of promoter-specific transcription. *Molecular cell*, 10(3) :635–646.
- WHITE J.R., ESCOBAR PARAMO P., MONGODIN E.F., NELSON K.E., et DIRUGGIERO J., **2008**. Extensive genome rearrangements and multiple horizontal gene transfers in a population of *Pyrococcus* isolates from Vulcano Island, Italy. *Applied and environmental microbiology*, 74(20) :6447–6451.
- WIRSEN C.O., JANNASCH H.W., WAKEHAM S.G., et CANUEL E.A., **1986**. Membrane lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium. *Current Microbiology*, 14(6) :319–322.
- WIRTH R., **2012**. Response to Jarrell and Albers : seven letters less does not say more. *Trends in microbiology*.
- WOESE C.R. et FOX G.E., **1977**. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : the primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(11) :5088–5090.
- WOLF Y.I., MAKAROVA K.S., YUTIN N., KOONIN E.V., *et al.*, **2012**. Updated clusters of orthologous genes for Archaea : a complex ancestor of the Archaea and the byways of horizontal gene transfer. *Biol Direct*.
- WU G., CULLEY D.E., et ZHANG W., **2005**. Predicted highly expressed genes in the genomes of *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces avermitilis* and the implications for their metabolism. *Microbiology*, 151(7) :2175–2187.
- XAVIER K.B., PEIST R., KOSSMANN M., BOOS W., et SANTOS H., **1999**. Maltose metabolism in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* : purification and characterization of key enzymes. *Journal of bacteriology*, 181(11) :3358–3367.

- XIAO X., WANG P., ZENG X., BARTLETT D.H., et WANG F., **2007**. *Shewanella psychrophila* sp. nov. and *Shewanella piezotolerans* sp. nov., isolated from west Pacific deep-sea sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1) :60–65.
- XIE C., MAO X., HUANG J., DING Y., WU J., DONG S., KONG L., GAO G., LI C.Y., et al., **2011**. KOBAS 2.0 : a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic acids research*, 39(2) :W316–W322.
- XU Y., NOGI Y., KATO C., LIANG Z., RÜGER H.J., DE KEGEL D., et GLANSDORFF N., **2003a**. *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(2) :533–538.
- XU Y., NOGI Y., KATO C., LIANG Z., RÜGER H.J., DE KEGEL D., et GLANSDORFF N., **2003b**. *Psychromonas profunda* sp. nov., a psychropiezophilic bacterium from deep Atlantic sediments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(2) :527–532.
- YAMADA M., NAKASONE K., TAMEGAI H., KATO C., USAMI R., et HORIKOSHI K., **2000**. Pressure Regulation of Soluble Cytochromesc in a Deep-Sea Piezophilic Bacterium, *Shewanella violacea*. *Journal of bacteriology*, 182(10) :2945–2952.
- YANO Y., NAKAYAMA A., ISHIHARA K., et SAITO H., **1998**. Adaptive changes in membrane lipids of barophilic bacteria in response to changes in growth pressure. *Applied and environmental microbiology*, 64(2) :479–485.
- YAO N.Y. et O'DONNELL M., **2010**. SnapShot : the replisome. *Cell*, 141(6) :1088–1088.
- YAYANOS A., **1986**. Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24) :9542.
- YAYANOS A. et CHASTAIN R., **1999**. The influence of nutrition on the physiology of piezophilic bacteria. Dans *CR Bell. M. Brylinsky, and P. Johnson-Green (ed.). Microbial Biosystems : New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.*
- YAYANOS A., DIETZ A., et VAN BOXTEL R., **1981**. Obligately barophilic bacterium from the Mariana Trench. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(8) :5212.
- YAYANOS A. et POLLARD E., **1969**. A study of the effects of hydrostatic pressure on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 9(12) :1464–1482.
- YAYANOS A.A., **1995**. Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1) :777–805.
- YOON H. et DONAHUE T.F., **1992**. The suil suppressor locus in *Saccharomyces cerevisiae* encodes a translation factor that functions during tRNA (iMet) recognition of the start codon. *Molecular and cellular biology*, 12(1) :248–260.

- YOSHIMUCHI T., FUJIKANE R., KAWANAMI M., MATSUNAGA F., et ISHINO Y., **2008**. The GINS complex from *Pyrococcus furiosus* stimulates the MCM helicase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 283(3) :1601–1609.
- ZAYAS C.L., WOODSON J.D., et ESCALANTE SEMERENA J.C., **2006**. The cobZ gene of *Methanobacterium mazei* Gö1 encodes the nonorthologous replacement of the α -ribazole-5'-phosphate phosphatase (CobC) enzyme of *Salmonella enterica*. *Journal of bacteriology*, 188(7) :2740–2743.
- ZEGANS M.E., WAGNER J.C., CADY K.C., MURPHY D.M., HAMMOND J.H., et O'TOOLE G.A., **2009**. Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 191(1) :210–219.
- ZENG X., BIRRIEN J.L., FOUQUET Y., CHERKASHOV G., JEBBAR M., QUERELLOU J., OGER P., CAMBON BONAVITA M.A., XIAO X., *et al.*, **2009**. *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile : extending the upper pressure-temperature limits for life. *The ISME journal*, 3(7) :873–876.
- ZHANG Y., WHITE R.H., et EALICK S.E., **2008**. Crystal structure and function of 5-formaminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide synthetase from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochemistry*, 47(1) :205–217.
- ZHOU Y., LIANG Y., LYNCH K.H., DENNIS J.J., et WISHART D.S., **2011**. PHAST : a fast phage search tool. *Nucleic acids research*, 39(2) :W347–W352.
- ZIVANOVIC Y., ARMENGAUD J., LAGORCE A., LEPLAT C., GUÉRIN P., DUTERTRE M., ANTHOUARD V., FORTERRE P., WINCKER P., *et al.*, **2009**. Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the Archaea. *Genome Biol*, 10(6) :R70.
- ZOBELL C.E. et COBET A.B., **1964**. Filament formation by *Escherichia coli* at increased hydrostatic pressures. *Journal of bacteriology*, 87(3) :710–719.
- ZOBELL C.E. et JOHNSON F.H., **1949**. The influence of hydrostatic pressure on the growth and viability of terrestrial and marine bacteria. *Journal of bacteriology*, 57(2) :179.

Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii*, un piézophile extrême par une approche multi-« omics »

Depuis la découverte des sources hydrothermales en 1977, un petit nombre d'études ont permis l'isolement et la caractérisation de micro-organismes pouvant résister à de hautes pressions et températures. Parmi ceux-ci, *Pyrococcus yayanosii*, une archée hyperthermophile de l'ordre des *Thermococcales* est issue du site Ashadze (dorsale medio-atlantique) à 4100 m de profondeur. Cette espèce représente le premier organisme à la fois hyperthermophile et piézophile strict décrit à ce jour. Elle ne peut en effet se diviser à des pressions inférieures à 20 MPa et sa pression optimale de croissance est de 52 MPa. Afin d'étudier les mécanismes que met en œuvre cette espèce pour se développer sous hautes pressions, des expériences de transcriptomique (puces à ADN) et protéomique (LC-MS/MS) ont été entreprises à différentes pressions notamment sub- et supra-optimales. La distinction entre les effets « stress » et « adaptations » à la pression a été effectuée en comparant les résultats obtenus chez une autre *Thermococcale* proche, *Pyrococcus furiosus*, qui est piézosensible. La détermination des pressions sub et supra optimales a été préalablement effectuée sur une large gamme de pression hydrostatique. Des analyses génomiques ont aussi été effectuées sur les *Thermococcales* en général et ses deux espèces en particulier et montrent des différences importantes au niveau des voies de biosynthèse des acides aminés ainsi que des transporteurs membranaires. Les analyses transcriptomiques et protéomiques montrent que *P. yayanosii* joue essentiellement sur ses mécanismes de production d'énergie (métabolisme de l'hydrogène), de mobilité (chimiotactisme), de traduction (protéines ribosomales) ainsi que sur ses mécanismes de défense (CRISPR/cas). *P. furiosus* met en place des mécanismes se basant aussi sur la traduction et la mobilité (archaellum). Il semble que ces derniers puissent ainsi être considérés comme des réponses aux stress, alors que la modulation énergétique uniquement présente chez *P. yayanosii* soit plus un « shift » métabolique permettant à la cellule de s'adapter aux différentes conditions de pression de son environnement.

Mots clés : micro-organismes, pression, piézophile extrême, hyperthermophile.