



**HAL**  
open science

**Génétique et génomique des microorganismes piézophiles des sources hydrothermales océaniques profondes : adaptation aux hautes pressions hydrostatiques chez l'archée piézo-hyperthermophile : Thermococcus barophilus, apport de la génétique et impact des hydrogénases**

Tiphaine Birien

► **To cite this version:**

Tiphaine Birien. Génétique et génomique des microorganismes piézophiles des sources hydrothermales océaniques profondes : adaptation aux hautes pressions hydrostatiques chez l'archée piézo-hyperthermophile : Thermococcus barophilus, apport de la génétique et impact des hydrogénases. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2018. Français. NNT : 2018BRES0018 . tel-03166816

**HAL Id: tel-03166816**

**<https://theses.hal.science/tel-03166816>**

Submitted on 11 Mar 2021

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

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

# THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE  
DE BRETAGNE OCCIDENTALE  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 598  
*Sciences de la Mer et du littoral*  
Spécialité : *Microbiologie*

Par

**Tiphaine BIRIEN**

**Génétique et génomique des microorganismes piézophiles des sources hydrothermales océaniques profondes (Adaptation aux hautes pressions hydrostatiques chez l'archée piézophile : *Thermococcus barophilus*, apport de la génétique et impact des hydrogénases).**

Thèse présentée et soutenue à l'IUEM, Plouzané le 24 avril 2018  
Unité de recherche : LM2E-UMR6197 UBO-CNRS-Ifremer

## Rapporteurs avant soutenance :

Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI  
Directrice de recherche, CNRS, Marseille

Philippe OGER  
Directeur de recherche, INSA Lyon

## Composition du Jury :

Marie-Thérèse GIUDICI-ORTICONI  
Directrice de recherche, CNRS, Marseille

Présidente du Jury  
Gwennola ERMEL  
Professeure, Université de Rennes 1

Jacques OBERTO  
Directeur de recherche, CNRS, Paris

Co-directeur de thèse  
Yann MOALIC  
Enseignant chercheur, Université de Bretagne Occidentale

Directeur de thèse  
Mohamed JEBBAR  
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

*"Après avoir cherché sans trouver, il arrive qu'on trouve sans chercher"*

*Jerome Klapka Jerome*

*"La mer est tout ! Elle couvre les sept dixièmes du globe terrestre... C'est l'immense désert où l'homme n'est jamais seul car il sent frémir la vie à ses côtés."*

*J. Verne  
(Vingt mille lieues sous les mers)*

*"Les micro-organismes peuvent faire ce que vous voulez. Il suffit d'imaginer comment"*

*Koki Horikoshi, spécialiste japonais des extrémophiles*



*Henn Kim, Black Wave*

## Remerciements

*Il est difficile de définir trois années de thèse, c'est court et long à la fois entend-t-on souvent... une chose est sûre en ce qui concerne le nombre de belles rencontres que l'on a la chance de faire pendant ces trois années... Entre simple rencontre ou collaboration, des personnes rentrent, passent dans notre vie et parfois y restent, mais dans tous les cas nous gardons tous une trace de ces passages et la plupart du temps de bons souvenirs des moments passés ensemble...*

*Je tiens tout d'abord à remercier Mohamed Jebbar, Didier Flament et Anne Godfroy, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein du LM2E. Je remercie l'ensemble des personnes travaillant ou ayant travaillé au sein des deux UMR (composante UBC et IFREMER) durant mes années passées au sein du laboratoire.*

*Merci Mohamed pour m'avoir confié ce projet de thèse, un projet certes de longue haleine, jalonné de hauts et de bas, mais qui reste une première expérience professionnelle tellement formatrice. Merci de m'avoir fait confiance pour la campagne océanographique chinoise COMRA DY 34, cette expérience sur le Da Yang Yi Hao a été une véritable aventure autant sur le plan professionnel qu'humain. Une aventure certes un peu redoutée mais tant attendue, et qui m'a beaucoup appris. Je profite d'évoquer cette expérience pour remercier le laboratoire « key laboratory of marine biogenetic resources of third institute of oceanography » et l'ensemble des personnes qui étaient présentes sur ce mois et demi de navigation au sud-ouest de l'Océan Indien.*

*Je remercie tout particulièrement Yann Moalic, co-encadrant de mon stage de M2 et de ma thèse, pour son aide pour la compréhension des outils moléculaires, le travail à la paillasse; mais aussi pour son soutien moral, son franc parlé et ses innombrables phrases cultes notamment la réplique « pourquoi dès que je tente un truc de dingue ça foire » lors du concours de création de plasmide, ses nombreuses excuses pour ne pas faire de jogging le midi avec Steph et Alex, et le fameux « je me casse ».*

*Je tiens également à citer Axel Thiel, investigateur du projet « génétique et adaptation à la pression » pendant son post doctorat au LM2E. Merci de m'avoir*

*fait confiance pour le stage de M2, de m'avoir formée sur le sujet, et d'avoir toujours trouvé les mots justes pour que je continue à avancer malgré les difficultés et la pression. Le sujet de stage a débouché sur un financement de thèse, tu n'étais pas à nos côtés pour continuer les manips, mais tu es et resteras le maître de la transformation chez *Thermococcus barophilus*.*

*Je tiens à remercier Gishlaine Henneke, Christian Jeanthon et Jacques Oberto pour leur bienveillance et leurs conseils lors des comités de thèse.*

*Je remercie l'équipe technique du LM2E, Nadège, Myriam et Stéphane, plus anciennement Morgane et Alex, pour leurs conseils, et leur travail de tous les jours afin d'assurer la bonne gestion du laboratoire.*

*Je remercie l'ensemble des chercheurs et enseignants chercheurs. Beaucoup ont contribué pendant leur cours à développer mon intérêt pour la microbiologie, et à me donner envie de continuer dans la recherche, même si ce n'est pas chose aisée. Merci donc à Marc Leromancer, Gwenaelle Leblay, Frédérique Duthoit, Karine Alain (petit clin d'œil pour les séjours en Chine, en Afrique du Sud pour *Thermophiles*, que nous avons eu la chance de partager et les petites pauses mots croisés du midi), Lois Maignien, et une spéciale dédicace à Claire Geslin, qui est vraiment une super enseignante.*

*Je remercie le côté Ifremer du LM2E, et plus particulièrement Erwan et son thésard Sébastien pour m'avoir consacré de leur temps quand j'avais besoin de faire des mesures d'hydrogène au micro-GC ; bon courage pour la fin de ta thèse Séb. Je remercie également Raphaël, Patricia et Christine. Un petit mot pour l'équipe réplication : Didier, Gishlaine, Rémi, Audrey et Sébastien Laurent. Merci à tous pour votre bonne humeur.*

*Je remercie Stéphanie Renard, la fille de l'île d'Ouessant pour son investissement au sein du laboratoire, que ferait-on sans notre secrétaire... mais au-delà du travail je te remercie pour ta présence, nos conversations, nos petites pauses goûters avec Mimi, nos discussions sur Yann Tiersen.*

*Myriam, mon autre confidente, je te remercie pour ta disponibilité, ton dynamisme, ton oreille toujours attentive. J'ai adoré nos discussions sur tes nombreuses activités.*

*Nadège, impératrice des Mr/Mme, merci pour ta bonne humeur, ton rire si communicatif, pour tous les bons moments partagés lors de nos associations de nom de famille/prénom avec Sam et Alex, puis Sarah et Stéphanie. Merci également pour l'idée des petits cadeaux pendant la campagne océanographique, une idée géniale qui fait du bien au moral!*

*Alex ou le Mac gyver du labo, c'est un peu l'image que j'ai de toi, capable de tout réparer avec brillo, mais également une personne gentille, simple et dotée d'un humour et de jeux de mots comment dire, toujours là où on ne les attend pas!!! Ton départ nous a vraiment rendu triste, plein de belles choses pour la suite à Morlaix.*

*Sam aussi dit Sam le pompier, mon deuxième concurrent pour les Mr/Mme, merci pour les bons moments partagés, tes petites blagues/petits mensonges qui me faisaient bien rire.*

*Je tiens à remercier Sandy et Thierry, d'une part pour leur savoir-faire en informatique (dépassant largement le mien), on se souvient des fameuses « infections » à deux reprises de mon ordi pro par Yann ; mais aussi et surtout pour leur bonne humeur.*

*Merci également à Sophie et Yannick, que serait mes passages matinaux devant l'accueil de l'IUEM sans votre bonne humeur quotidienne.*

*Kévin alias Batman, mon coéquipier/binôme durant le master, est devenu un ami par la suite, merci pour tes phrases poétiques, ton humour. Je profite d'avoir évoqué mes années de Master pour remercier ma petite Sam pour son amitié, j'ai découvert une personne en or et Christian « l'espagnol » également une personne que j'ai eu plaisir à connaître.*

*Je remercie les deux stagiaires de Loïs que j'ai eu la chance de rencontrer en M2, Clarisse pour nos repas partagés au RU et les recherches actives de mots fléchés avant de reprendre le travail, Flo alias poney indigo pour sa passion pour la science et l'informatique, vous êtes vraiment deux personnes attachantes. Jordan, merci pour ta bonne humeur, ta connaissance du milieu marin, n'est pas guide bilingue à Océanopolis qui veut. Bon courage pour la fin de vos thèses. Ellynn « l'irlandaise de cœur » la stagiaire de Matty, merci pour ta simplicité, de nous avoir fait partagé ton don pour la cuisine à travers tes nombreux gâteaux, un délice*

à chaque fois.

*Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont travaillé à mes côtés pendant ma thèse. J'ai eu le plaisir d'encadrer Marion Gardette lors de ma deuxième année de thèse, on s'est bien cassé les dents sur les manip pressions que l'on a enchaînées de semaine en semaine. On se souviendra de la technique du hérisson encore longtemps, un concept peut être à breveter. Une personne formidable, travailleuse, avec toujours de bonnes idées, je te souhaite le meilleur pour la suite, j'étais vraiment heureuse quand j'ai appris pour ta thèse, tu le mérites.*

*Je remercie mes collègues et amis thésards/post-docs, avec qui j'ai partagé mon bureau, Coraline, merci pour nos petites séances potins avec notre fameuse expression « mammouth sous coquillage ». Merci Matthieu pour tes répliques cultes, pour ta voix cristalline toujours prête à chanter des morceaux qui rentrent dans la tête. Merci à Cess, d'avoir été présente et de m'avoir soutenue dans les bons et mauvais moments. Un grand merci à Damien (merci pour ton soutien et pour ton aide quand j'en avais besoin pour les manips et autre) et à Gwen (bon courage pour cette proche fin de thèse). Merci à Mélanie, Charlene, Vincent, Yang, Junwei, Sabrina, Sarah, Marc, Blandine, Caroline, David, Pierre et Marion. Bon courage à tous pour la continuation de vos recherches.*

*Une petite pensée pour les thésards devenus grands, avec qui j'ai eu l'occasion de passer de bons moments : Greg, Julien, Fred, Simon, Gaëlle et Sandrine... Bonne continuation pour les stagiaires actuels et peut être la relève à venir: Virginie, Paul et Amandine. Une pensée pour feu Extrême et Pression, les poissons rouges qui nous supportaient dans le bureau.*

*Je n'ai pas eu la chance d'enseigner durant ma thèse, cela n'a pas été facile à accepter; mais je voulais remercier Anouck de m'avoir proposé l'UE sciences et société pendant la deuxième année de thèse. J'ai adoré m'investir dans ce projet et j'ai une pensée pour les M2 qui ont travaillé à mes côtés pendant 2 mois: Antoine Briand, Roxane Boullard, Sylvain Dutaut, Jérémy Fauchet, Gauthier Nourdin, Gaëtan Olivier, Nicolas Richet, Kevin Fallec (notre chef, créateur des pinatas), Clément Janvet, Jordan Foullec et Emilie Vanpeene. On s'est bien amusé. Certains sont en thèse à l'heure actuelle, bon courage à vous. Une mention spéciale pour Gaëtan, je te souhaite pleins de réussites.*

*Merci aux personnes du LEMAR, que j'ai eu l'occasion de croiser, voir avec qui*

*j'ai sympathisé. Gene, merci pour les discussions quand on se croisait dans les couloirs. Couloirs qui ont eu la chance d'exposer tes jolies photos.*

*Je remercie également mes amies : Mélanie, Sandra et Sophie, pour m'avoir permis de décompresser quand j'en avais besoin, d'avoir toujours été compréhensives, et pour nos après-midi girly du samedi en ville, nos pauses café à Izee, nos soirées, les nombreux petits restos... pour votre présence dans ma vie tout simplement. «Je veux vivre le reste de ma vie à vivre de petites et grandes aventures avec les gens que j'aime» cette phrase n'est pas de moi, mais voilà ce que m'inspire notre amitié, encore beaucoup de moments tout à la fois simples et passionnants à vivre avec vous trois. Un énorme merci à Nadège, Gwendoline et Guillaume (mon Guigui) pour votre sincère amitié.*

*Je remercie et encore le terme n'est pas suffisant face à la reconnaissance et l'amour que je leur porte, ma famille: mes parents pour leur implication dans tout ce que j'ai entrepris, leur intérêt pour mes projets que ce soit la thèse mais également tous les autres, leur soutien sans limite, les paroles réconfortantes, le partage des bons comme des mauvais moments. Je pense que sans vous je n'en serai pas là. Un grand merci à mon frère, pour notre complicité, on le sait bien on pourra toujours compter l'un sur l'autre. La vie nous apprend qu'on a rarement besoin de grands discours quand les sentiments sont sincères. Merci à ma mamie pour son soutien, nos discussions, les petits mots laissés sur mon répondeur. Tu n'auras pas vu la fin de ce travail, je pense à toi.*

*Enfin un énorme merci à Antoine, de partager ma vie et pour son soutien sans limite. La fin de la thèse n'est pas une période facile, mais tu étais à mes côtés dans ce moment, encore merci. Je nous souhaite encore pleins de belles aventures, je t'aime.*



## «Avant-propos»

Vivre dans les grands fonds : une question d'adaptation ?

La vie est largement rependue sur Terre, y compris dans les niches écologiques où règnent des paramètres physico-chimiques les plus extravagants et extrêmes : absence d'oxygène, température, pH, osmolarité, teneur en eau, pression... La qualification d'un biotope d'extrême est déformée par notre propre perception, puisqu'il s'agit premièrement d'une vision très anthropocentrée : « des milieux hostiles à l'homme et où toute vie humaine semble impossible ». Cependant tout biotope défini par une valeur faible ou forte d'au minimum un paramètre majeur influençant les cycles vitaux peut être agréé de ce qualificatif (Gargaud et al., 2007).

La découverte du microbiologiste américain Thomas Brock en 1969, d'un microorganisme *Thermus aquaticus*, se développant dans les sources chaudes (50-90°C) du parc de Yellowstone aux Etats Unis, jusqu'alors considérées comme stériles, ont balayé les idées reçues. Dès lors les milieux extrêmes de la planète allaient faire l'objet de nombreuses investigations... Les sources hydrothermales océaniques profondes, régions ponctuelles de fortes activités volcaniques, situées dans les grands fonds, font partie de ces endroits *a priori* hostiles ; du fait des conditions de température, de pression hydrostatique et de la composition du fluide anoxique réduit qui émane de ces édifices.

En dépit de ces contraintes les cheminées hydrothermales sont considérées comme de véritables oasis de vie. Le terme d'extrémophile qualifie ces espèces possédant la particularité de se développer dans des conditions flirtant avec les limites de la vie. Ces découvertes ont fait reculer les limites physiques et chimiques connues de la Vie sur Terre, et ont aussi conduit à réviser les hypothèses de la vie de type Terrestre sur d'autres planètes du système solaire : l'exobiologie. L'intérêt d'étudier les environnements profonds et les espèces associées, est de rendre compte de la vaste biodiversité qu'ils abritent, des mécanismes mis en œuvre par ces organismes pour s'adapter (voies métaboliques et molécules originales) et valoriser à terme les recherches fondamentales par des applications innovantes en biotechnologie. La biotechnologie des extrémophiles a pour objectif de rechercher et d'exploiter ces ressources naturelles de biomolécules, comme les enzymes, les biopolymères, les métabolites secondaires.

Le projet de thèse vise à élucider les bases des signatures moléculaires de l'adaptation aux fortes pressions hydrostatiques, chez le modèle archéen *Thermococcus barophilus*. Cette archée fait l'objet d'étude depuis une dizaine d'années au LM2E et pour laquelle un outil génétique a été développé au laboratoire (Thiel et al., 2014), qui servira de support biologique. Un volume important de la biosphère est soumis aux hautes pressions hydrostatiques, et pourtant l'impact de ce paramètre sur l'adaptation et la physiologie des organismes reste encore peu étudié.

# Table des matières

## Table des illustrations

## Liste des abréviations

## Introduction

<b>I.</b>	<b><u>La découverte de la biosphère profonde</u></b> .....	1
I.a.	Les abysses, un environnement aux conditions extrêmes.....	1
I.b.	La découverte des sources hydrothermales océaniques profondes.....	3
I.c.	La pression: le paramètre physique majeur des grands fonds.....	7
<b>II.</b>	<b><u>Les microorganismes adaptés à la vie sous pression</u></b> .....	9
II.a.	Les débuts de la microbiologie abyssale.....	9
II.b.	Diversité des procaryotes psychro-piézophiles.....	11
II.c.	Diversité des procaryotes des sources hydrothermales profondes.....	13
<b>III.</b>	<b><u>La pression hydrostatique et ses effets</u></b> .....	16
III.a.	Les effets de la pression sur les cellules.....	16
III.a.1.	Influence de la pression sur les acides nucléiques.....	17
III.a.2.	Influence de la pression sur la membrane cellulaire.....	18
III.a.3.	Influence de la pression sur les protéines.....	19
III.a.4.	Influence de la pression sur la traduction.....	20
III.a.5.	Influence de la pression sur le pH intracellulaire.....	20
III.b.	Les adaptations aux HPH chez les piézophiles.....	21
III.b.1.	Gènes régulés par la pression.....	21
III.b.2.	Adaptations structurales des biomolécules.....	25
III.b.3.	Régulation du stress pression.....	27
<b>IV.</b>	<b><u>Métabolisme de l'hydrogène</u></b> .....	31
IV.a.	Les hydrogénases.....	31
IV.a.1.	(Ni-Fe)-hydrogénases.....	32
IV.a.2.	(Fe-Fe)-hydrogénases.....	34
IV.a.3.	Hydrogénases sans métaux.....	34
IV.b.	Le métabolisme de l'hydrogène chez les <i>Thermococcales</i> .....	35
IV.b.1.	Les hydrogénases des <i>Thermococcales</i> .....	35
IV.b.2.	Rôle des différentes hydrogénases.....	38
IV.b.3.	Influence du soufre dans le métabolisme.....	41
IV.b.4.	Le régulateur transcriptionnel SurR.....	42

IV.c. Les hydrogénases chez <i>Thermococcus barophilus</i> .....	45
<b>V. <u>Etudes physiologiques par des approches de génétiques</u></b> .....	48
V.a. La découverte du troisième domaine du vivant.....	49
V.b. Les intérêts des archées.....	51
V.c. Les transferts génétiques chez les archées.....	53
V.c.1. La transformation.....	58
V.c.2. La conjugaison.....	64
V.c.3. La transduction.....	65
V.d. Les défis de la génétique des archées.....	65
V.e. L'outil génétique développé chez <i>Thermococcus barophilus</i> .....	68
<b>VI. <u>Objectifs de la thèse</u></b> .....	70

## **Matériel et Méthodes**

<b>I. <u>Outil génétique</u></b> .....	73
I.a. Matériel biologique.....	73
I.b. Milieu de culture.....	76
I.b.1. Milieu TRM.....	76
I.b.2. Milieu LB.....	77
I.c. Construction des plasmides.....	77
I.c.1. pUPH.....	77
I.c.2. Liste des plasmides construits.....	79
I.d. Transformation dans <i>Thermococcus barophilus</i> .....	81
I.d.1. Etape de transformation.....	81
I.d.2. Sélection des mutants.....	82
I.d.3. Extraction/purification de l'ADN génomique et vérification des mutants.....	83
I.d.4. Réalisation de stries sur TRM complémenté en Simvastatine et TRM.....	85
I.e. Tests de croissance en milieu liquide.....	86
<b>II. <u>Caractérisation des mutants hydrogénases</u></b> .....	87
II.a. Suivi de croissance des mutants hydrogénases sous pression.....	87
II.a.1. Préparation des seringues.....	87
II.a.2. Mise en pression des incubateurs.....	88
II.a.3. Dénombrement cellulaire.....	89
II.a.4. Contraintes liées à la pression.....	90
II.b. Mesures d'hydrogène.....	92
II.b.1. Préparation des fioles.....	92
II.b.2. Mesures au micro-GC.....	93

## **Résultats**

<b>Chapitre I : Amélioration de l'outil génétique</b> .....	94
I.a. Contexte de l'étude.....	94
I.b. Tests de sensibilité de <i>T. barophilus</i> MP sauvage à la 6-MP.....	94
I.c. Construction de <i>T. barophilus</i> $\Delta$ TERMP_00517.....	97
I.d. Résultats de la transformation de <i>T. barophilus</i> MP par le plasmide pUPH1.....	99
I.e. Tests de sensibilité des souches mutées.....	101
I.f. Efficacité du nouveau marqueur de sélection.....	103
I.g. Conclusion de l'étude.....	104
<b>Chapitre 2 : Obtention et caractérisation des mutants hydrogénases</b> .....	106
II.a. Construction des mutants hydrogénases.....	106
II.a.1. Contexte de l'étude.....	106
II.a.2. Obtention des mutants.....	108
II.a.2.a. Obtention du mutant $\Delta$ mbh ( $\Delta$ mbh).....	108
II.a.2.b. Obtention des mutants $\Delta$ shI ( $\Delta$ shI) et $\Delta$ shII ( $\Delta$ shII).....	109
II.a.2.c. Obtention du mutant $\Delta$ mbh-codh ( $\Delta$ co-mbh) et du double mutant $\Delta$ mbh/ $\Delta$ mbh-codh ( $\Delta$ mbh/ $\Delta$ co-mbh).....	110
II.a.2.d. Obtention du mutant $\Delta$ mbx ( $\Delta$ mbx).....	111
II.a.3. Vérification de l'absence du plasmide.....	112
II.a.4. Conclusion de l'étude.....	112
II.b. Caractérisation des mutants hydrogénases.....	114
II.b.1. Contexte de l'étude.....	114
II.b.2. Résultats des croissances des mutants hydrogénases sous pression.....	114
II.b.2.a. Croissances à 0,1 MPa.....	115
II.b.2.b. Croissances à 40 MPa et 70 MPa.....	116
II.b.3. Résultats de la production d'hydrogène des mutants hydrogénases.....	118
II.b.4. Discussion et conclusion de l'étude.....	121
II.b.4.a. Croissance des mutants hydrogénases et production d'H <sub>2</sub> à 0,1MPa.....	121
II.b.4.b. Croissance des mutants hydrogénases sous pression.....	129
<b><u>Discussion générale et conclusion</u></b> .....	133
<b><u>Bibliographie</u></b> .....	143
<b><u>Valorisation des travaux de thèse</u></b> .....	161

# Table des illustrations

## Liste des figures :

Figure 1: Coupe transversale schématique de la biosphère profonde .....	1
Figure 2: Localisation des sites hydrothermaux .....	4
Figure 3: Représentation schématique d'une source hydrothermale .....	5
Figure 4: Photographie d'un fumeur noir .....	6
Figure 5: Evolution de la densité cellulaire des microorganismes en fonction de la pression ...	8
Figure 6: Les effets de la pression sur la cellule .....	17
Figure 7: Adaptation des lipides archéens aux conditions environnementales chez <i>M. jannaschii</i> .....	19
Figure 8: Les effets des HPH sur le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i> et acidification de la vacuole .....	21
Figure 9: Représentation schématique du système ToxR/S chez <i>P. profundum</i> SS9 .....	23
Figure 10: Fonctionnement du système respiratoire de <i>Shewanella benthica</i> à 0,1 et 60 MPa	25
Figure 11: Structure des sites catalytiques des hydrogénases .....	35
Figure 12: Métabolisme des hydrogénases .....	41
Figure 13: Le régulateur transcriptionnel SurR.....	44
Figure 14: Les trois domaines du vivant .....	51
Figure 15: Les transferts génétiques chez les archées .....	56
Figure 16: Méthode de disruption de gène .....	63
Figure 17: Les challenges à surpasser pour étudier les archées .....	66
Figure 18: Schéma du principe de l'outil génétique chez <i>T. barophilus</i> .....	70
Figure 19: Schéma récapitulatif de l'étape d'obtention des vecteurs plasmidiques.....	81
Figure 20: Principe de la PCR de vérification de l'obtention des mutants .....	84
Figure 21: Schéma récapitulatif de la transformation chez <i>T. barophilus</i> .....	86
Figure 22: Incubateurs hautes pressions/hautes températures (Top Industrie).....	89
Figure 23: Schéma récapitulatif des étapes de suivi de croissance sous pression.....	90
Figure 24: Bioréacteur HP systems .....	92
Figure 25: Mesures au micro-GC .....	93
Figure 26: Tests de sensibilité à la 6-MP des souches <i>T. kodakarensis</i> et <i>T. barophilus</i> .....	95
Figure 27: Construction du plasmide pUPH .....	98
Figure 28: Schéma explicatif de l'outil génétique amélioré .....	99
Figure 29: Gel de vérification de la transformation .....	101
Figure 30: Tests de sensibilité des mutants obtenus .....	102
Figure 31: Les hydrogénases ciblées dans cette étude .....	107
Figure 32: Gel de vérification des mutants $\Delta mbh$ .....	108
Figure 33: Gel de vérification des mutants $\Delta shI$ et $\Delta shII$ .....	109
Figure 34: Gel de vérification du mutant $\Delta co-mbh$ et du double mutant $\Delta mbh/\Delta co-mbh$ .....	110
Figure 35: Gel de vérification de l'obtention du mutant $\Delta mbx$ .....	111
Figure 36: Croissance des mutants hydrogénases à 0,1 MPa avec et sans soufre.....	115
Figure 37: Croissance des mutants hydrogénases à 40 MPa, avec et sans soufre.....	117
Figure 38: Croissance des mutants hydrogénases à 70 MPa, avec et sans soufre.....	117
Figure 39: Pourcentage de production d'hydrogène par les mutants et suivi de leurs croissances.....	120

## **Liste des tableaux :**

Tableau 1: Les piézophiles psychrophiles isolés .....	11
Tableau 2: Les piézophiles thermophiles et hyperthermophiles isolés .....	15
Tableau 3: Les hydrogénases chez les <i>Thermococcales</i> .....	38
Tableau 4: Expression des gènes codant pour les hydrogénases de <i>T. barophilus</i> , en fonction des variations de pression.....	46
Tableau 5: Exemple de vecteurs présents chez certaines archées .....	56
Tableau 6: Méthodes de délivrance de l'ADN chez certaines archées .....	58
Tableau 7: Exemple de système de transformation chez les quatre groupes d'archées .....	60
Tableau 8: Exemples de mécanismes de conjugaison chez les <i>Sulfolobales</i> .....	65
Tableau 9: Exemples de méthodes de sélection et contre-sélection efficaces chez les archées.....	68
Tableau 10: Tableau récapitulatif des souches de l'étude .....	73
Tableau 11: Liste des amorces.....	79
Tableau 12: Séquence des amorces utilisées pour la vérification des mutants .....	84
Tableau 13: Clusters hydrogénases étudiés dans cette étude .....	107
Tableau 14: Taille des amplicons attendus .....	108

## Liste des abréviations

aa : acide aminé  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
Ampi: Ampicilline  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNt : ARN de transfert  
ADP : Adénosine diphosphate  
ATP : Adénosine-5'-triphosphate  
C : cystéine  
°C : degré celsius  
Cell.mL<sup>-1</sup> : Cellule par millilitre  
CO : monoxyde de carbone  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
CRISPRS: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats  
dNTP: Désoxyribonucléotide  
DHA: Acide docosahexanoïque (C22:6 ω-3)  
e<sup>-</sup> : électron  
EDTA: Acide Ethylène Diamine Tetraacétique  
EPA: acide icaosapentanoïque (C20:5 ω3)  
5-FoA: 5-Fluorotic Acid  
FP : Faux positif  
g: gravitationnel  
g/L: gramme/litre  
h: heure  
His: Histidine  
HMG-Coa: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A  
HPHs: Hautes Pressions Hydrostatiques  
H<sub>2</sub> : hydrogène  
H<sub>2</sub>S : Sulfure d'hydrogène  
IPTG: Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside  
j: jour  
KDa: Kilodalton  
Km: Kilomètre  
L: litre  
LB: Luria Bertani  
LUCA: Last Universal Common Ancestor  
m: mètre  
min: minute  
Mbh: Membrane bound hydrogenase  
Mbh Codh: Carbon monoxide dehydrogenase  
Mbx: Membrane bound oxydoreductase  
mM: millimolaire  
MPa: mégapascal  
MPa.Km<sup>-1</sup> : mégapascal par kilomètre  
6-MP: 6-méthylpurine  
NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide  
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Nsr: NAD(P)H linked sulfur reductase  
OmpH: Outer membrane protein H, gène associé *ompL*  
OmpL: Outer membrane protein L, gène associé *ompH*  
ORF : Open Reading Frame  
pb: paire de base  
PC: Phosphatidylcholine  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
pdo: protein disulfide oxydoreductase  
PE: Phosphatidyléthanolamine  
PEG: Polyéthylène glycol  
PF: flagelles polaires  
PFA: Paraformaldéhyde  
PG: phosphatidylglycérol  
PL: Flagelles latéraux  
pH : potentiel Hydrogène  
PUFAs: acides gras polyinsaturés  
Pur: Purine  
PyrF: Orotidine-5'-monophosphate décarboxylase  
ROV: remotely operated vehicle  
RPM: Rotation par minute  
SDS: Dodécylsulfate de sodium  
SHI: Sulfhydrogenase I  
SHII: Sulfhydrogenase II  
Sim: Simvastatine  
SurR: Régulateur transcritonnel (Sulfur response)  
T: temps  
TAE: Tris Acetate EDTA  
Taq PFU: Taq polymérase  
TE: Tris EDTA  
ToxR/ToxS : protéine membranaire qui active les gènes de virulences de *Vibrio cholerae*  
TRM: Thermococcus Rich Medium  
*T.b*: *T. barophilus* wt: *Thermococcus barophilus* wild type  
*T.K*: *T. kodakarensis*: *Thermococcus kodakarensis*  
s: seconde  
S: soufre  
μM: micromolaire  
U: unité  
UV: ultra violet  
V: Volt  
VTA: Voltae tranfert agent  
Xgal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-béta-D-galactopyranoside  
Δ + gène : mutant de délétion

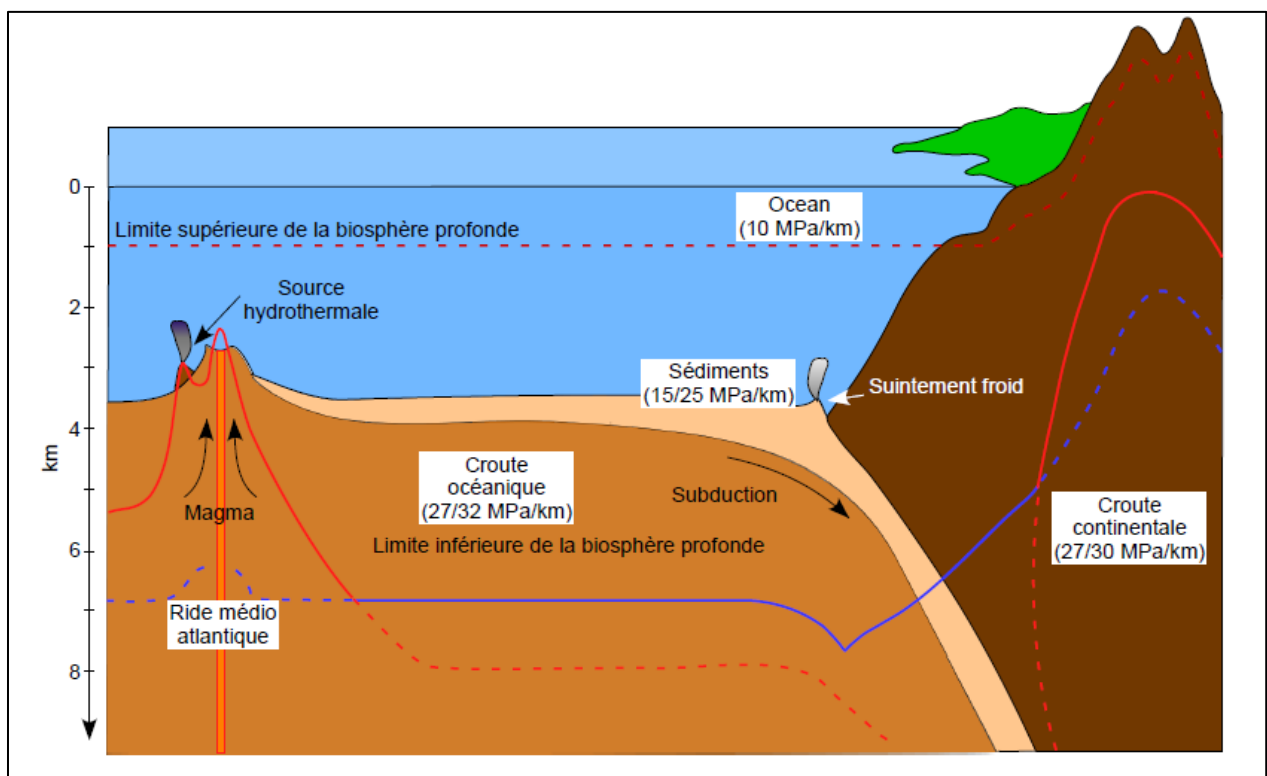


# Introduction

## I. La découverte de la biosphère profonde

### I.a. Les abysses, un environnement aux conditions extrêmes

Les abysses, du grec ancien abyssos « sans fond, d'une profondeur immense », désignent les fonds océaniques qui s'étendent à des profondeurs impressionnantes de plus de 2000 mètres. Ce compartiment abyssal d'une profondeur moyenne de 3800 mètres, recouvre 80% de la superficie des fonds marins, ce qui représente plus de 65% de la surface de « notre planète bleue » (Fang and Bazylinski, 2008)(Jannasch and Taylor, 1984; Oger and Jebbar, 2010) (figure 1).



**Figure 1:** Coupe transversale schématique de la biosphère profonde

(Michoud, 2014; Oger and Jebbar, 2010)

Les lignes rouges et bleues représentent la température et la pression limite pour la vie.

A de telles profondeurs les paramètres physico-chimiques sont différents de ceux connus en surface et apparaissent comme contraignants. Les grands fonds sont caractérisés par une **absence de lumière**, sachant que celle-ci ne pénètre que dans la couche supérieure de la

colonne d'eau, la photosynthèse est donc limitée à une centaine de mètres de profondeur (Vanreusel et al., 2010). « A vingt mètres de profondeur, il n'y a plus d'agitation superficielle. Les couleurs s'estompent peu à peu. A 200 m règne encore une vague clarté crépusculaire. Mais à 300 m, c'est la nuit éternelle- rapporte le témoignage d'une plongée à bord d'un submersible».

Les fonds océaniques sont des milieux **oligotrophes** (Jannasch and Taylor, 1984), où seul 1% du carbone de la production primaire photosynthétique de surface y est retrouvé sous forme particulaire (neige marine). En ce qui concerne les **températures**, elles sont faibles mais relativement constantes avec une stabilisation de 2°C à 3000 m, et une oscillation entre 0,5 et 1°C pour des profondeurs de 5000 m, à l'exception de la méditerranée (13°C) et de la mer rouge (22°C).

Enfin l'un des paramètres physiques majeurs est la forte **pression hydrostatique**, définie comme la force exercée par une colonne liquide sur une surface, et augmentant de 10 MPa (mégapascal) tous les kilomètres (10 MPa.Km<sup>-1</sup>) dans la colonne d'eau et de 20-30 MPa.Km<sup>-1</sup> au niveau des roches et sédiments. La fosse des Mariannes, qui détient actuellement le record de profondeur sous la mer, 11 km de profondeur, est ainsi soumise à une pression de 110 MPa soit 1 tonne par cm<sup>2</sup>. Pour donner un exemple de comparaison imagée cela équivaut à « une voiture sur l'ongle d'un pouce ».

Ainsi, du fait de ces conditions très éloignées des biotopes de surface, l'image associée à ces environnements profonds a pendant longtemps été celle d'un désert, dépourvu de toute forme de vie. En témoigne l'hypothèse formulée en 1841 par le naturaliste anglais Forbes (Anderson and Rice, 2006). Pendant une campagne de dragage en mer Egée, il réalise des prélèvements à des profondeurs croissantes, et remarque une diminution du nombre d'animaux en fonction de la profondeur. La courbe théorique qui découle de ces observations, lui montre que toute vie disparaîtrait au-delà de 550 m.

La réalité est pourtant tout autre, mais il faudra attendre les premières explorations océanographiques pour démontrer que la vie existe en tout point de la planète. Dès 1860, la

découverte de coraux à plus de 1800 m de profondeur par Alphonse Milne Edwards remet en question les découvertes de Forbes. En 1864 le pasteur norvégien Sars remonte au niveau d'un Fjords, 2 fossiles. Les découvertes s'enchainent de 1872 à 1876, les anglais à bord du Challenger parcourent toutes les mers du globe et trouvent de la vie jusqu'à 5500 m de profondeurs. Le navire danois Galathea, rapporte de son expédition de 1950 à 1952, 115 espèces au-delà de 6000 m ; notamment au niveau de la fosse des Mariannes à 10900 m de profondeur, où des animaux invertébrés, des sédiments et des bactéries sont remontés à bord. Ainsi pendant près de 100 ans, des recherches ont été menées pour savoir si la vie existait à toute profondeur ; et encore aujourd'hui les campagnes océanographiques continuent d'explorer la richesse des grands fonds.

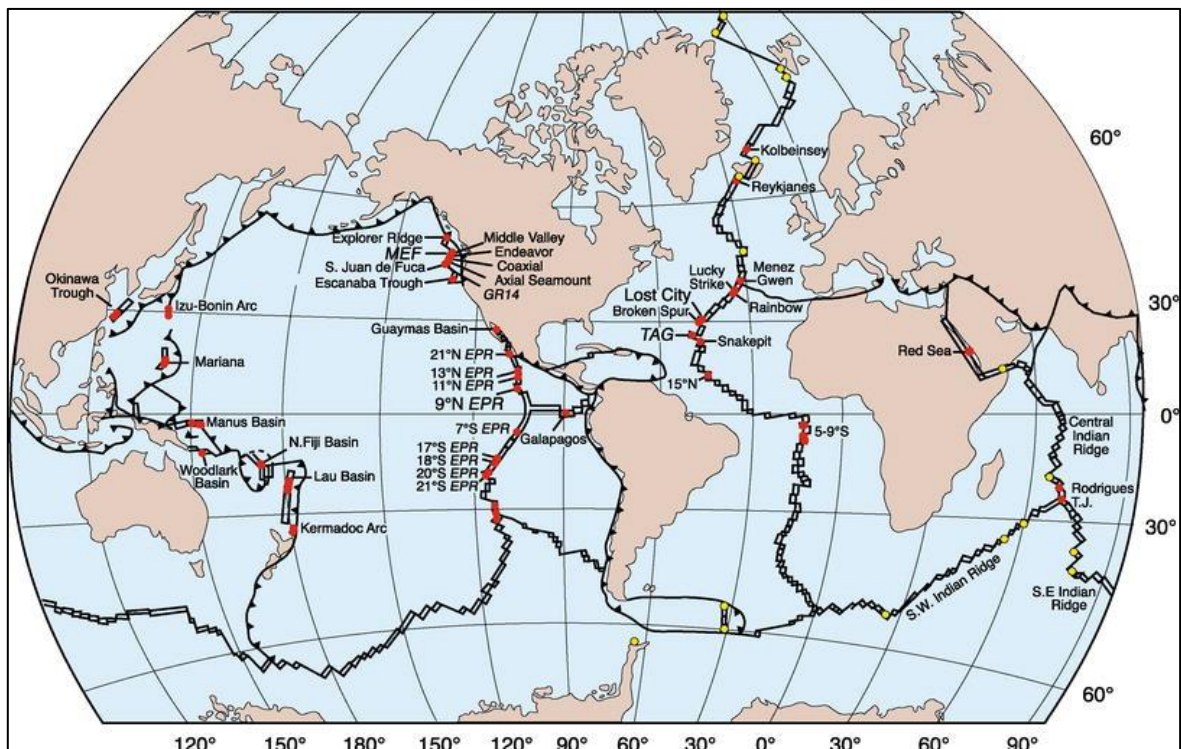
La biosphère profonde est actuellement considérée comme le plus vaste écosystème de la Terre (Colwell and D'Hondt, 2013; Kallmeyer et al., 2012). Cet écosystème immense, abrite une grande diversité d'espèces mais en faible quantité, avec une biomasse de l'ordre de quelques milligrammes de matière organique par m<sup>2</sup> (Cario, 2013).

L'homogénéité quasi parfaite des grands fonds est tout de même à nuancer ; en effet des zones chaudes, anoxiques et chargées de matières organiques réduites : les sources hydrothermales, viennent ponctuer cet environnement. Ces écosystèmes complexes, considérés comme l'un des plus spectaculaires de la Terre, sont de véritables oasis de vie, caractérisés par une faible biodiversité et au contraire une forte biomasse de 10 à 100 kg par m<sup>2</sup> (Corliss et al., 1979; Prieur and Marteinsson, 1998).

### **I.b. La découverte des sources hydrothermales océaniques profondes**

En 1977, des géologues américains embarqués à bord du sous-marin *Alvin*, découvrent au large des îles Galápagos à plus de 2600 m de profondeur une forte activité volcanique, des édifices hydrothermaux aux allures de cheminées, d'où émane un fluide chaud. Cette exploration marque la découverte de la première source hydrothermale active (Corliss et al., 1979; Lonsdale, 1977) (**figure 2**). Des campagnes ultérieures ont permis la découverte de nombreux sites, dispersés à différents endroits du globe avec des profondeurs allant de 700 m à un peu

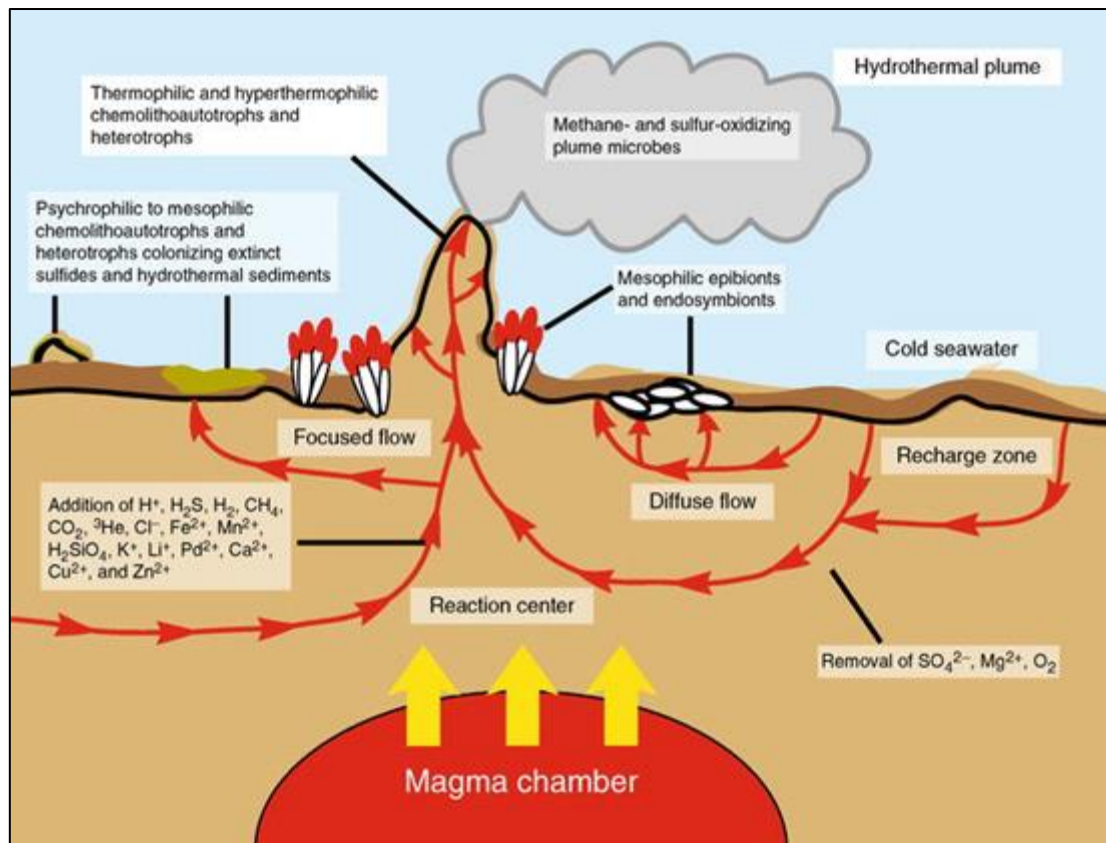
plus de 4000 m. La fosse des Caïmans découverte en 2009, abrite le site Beebe, situé à 4960 m de profondeur (Connelly et al., 2012). Les cheminées hydrothermales se forment au niveau : des zones à forte activité tectonique, des dorsales médio-océaniques (Atlantique, Pacifique Oriental, Océan Indien), près des zones de subduction, au niveau des Bassins arrière-arcs du Pacifique occidental (**figure 2**). Ce sont des régions ponctuelles de fortes activités tectoniques, qui fragilisent la croûte océanique et créent des fissures par lesquelles pénètre l'eau de mer. Celle-ci se réchauffe à proximité de la chambre magmatique, sous l'effet de la température et de la pression, le fluide s'acidifie et dissout des constituants de la roche mère (basalte, péridotite, gabbros). Ce fluide acide d'une température avoisinant les 350°C remonte jusqu'au plancher océanique. Les édifices se forment alors par contact du fluide avec l'eau de mer d'une température proche de 2°C, ce qui entraîne la précipitation des minéraux qui s'accumulent autour des sorties de fluides (Cann et al., 1999) (**figure 3**).



**Figure 2: Localisation des sites hydrothermaux**

(Flores and Reysenbach, 2011)

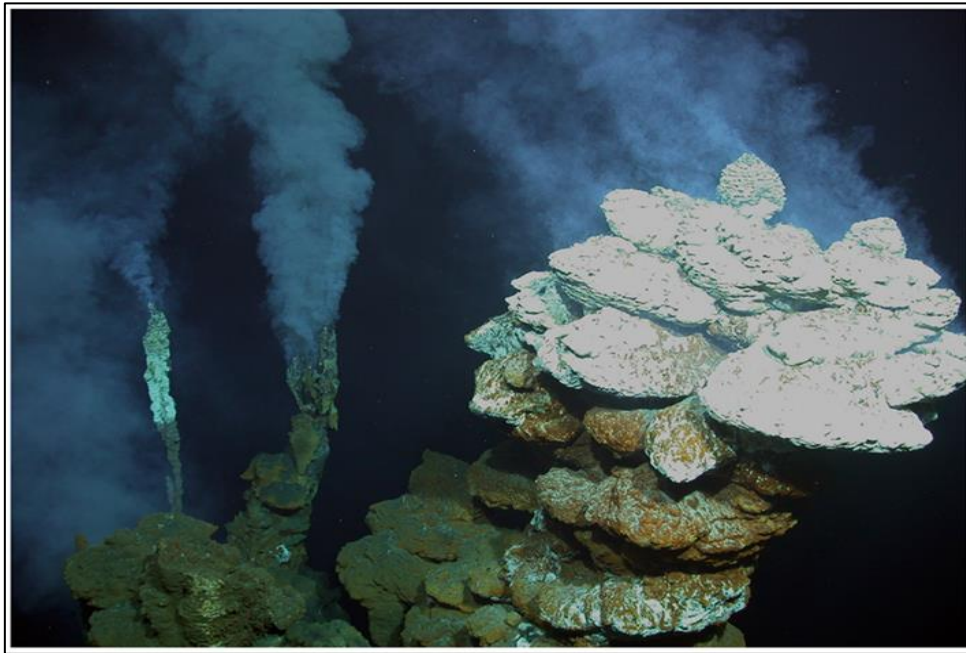
*Les sites hydrothermaux sont localisés au niveau des rides médio-océaniques (Atlantique, Pacifique Oriental, Océan Indien). Les points représentent les zones explorées.*



**Figure 3: Représentation schématique d'une source hydrothermale**  
(Flores and Reysenbach, 2011)

Ces habitats soumis à l'absence totale de lumière, à des pressions élevées, à de forts gradients de température, et à la présence d'éléments toxiques (métaux lourds, méthane, sulfure...) (Gold, 1992) (figure 3 et 4), semblent à première vue inadaptés à l'émergence de la vie (Prieur and Marteinsson, 1998). Un écosystème luxuriant est pourtant présent au niveau de ces cheminées. La survie de cet écosystème repose sur le fluide hydrothermal qui est une source d'énergie et de nutriments, et sur la présence de microorganismes, qui constituent la base de la chaîne alimentaire dans cet environnement. L'énergie nécessaire au développement ne provient pas de la photosynthèse, celle-ci n'étant pas réalisable du fait de l'absence de lumière, le réseau trophique dépend de la production primaire des bactéries. A la place de la lumière c'est une réaction chimique qui fournit l'énergie primaire nécessaire à leurs métabolismes. En effet les fluides sont chargés en métaux lourds (fer, zinc, manganèse, plomb, cuivre) et en éléments réduits (H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) (Jannasch and Taylor, 1984; Martin et al., 2008). Ces composés chimiques réduits représentent des sources d'énergie, des accepteurs et donneurs d'électrons

pour les microorganismes. Ce phénomène porte le nom de chimiosynthèse (Gomez-Saez et al., 2017).



***Figure 4: Photographie d'un fumeur noir  
(Flores et al., 2012)***

***Deux cheminées sont visibles dans le fond, cette photo a été prise par le ROV Jason II au niveau de l' « Eastern Lau Spreading Center » (Woods Hole Oceanographic Institution).***

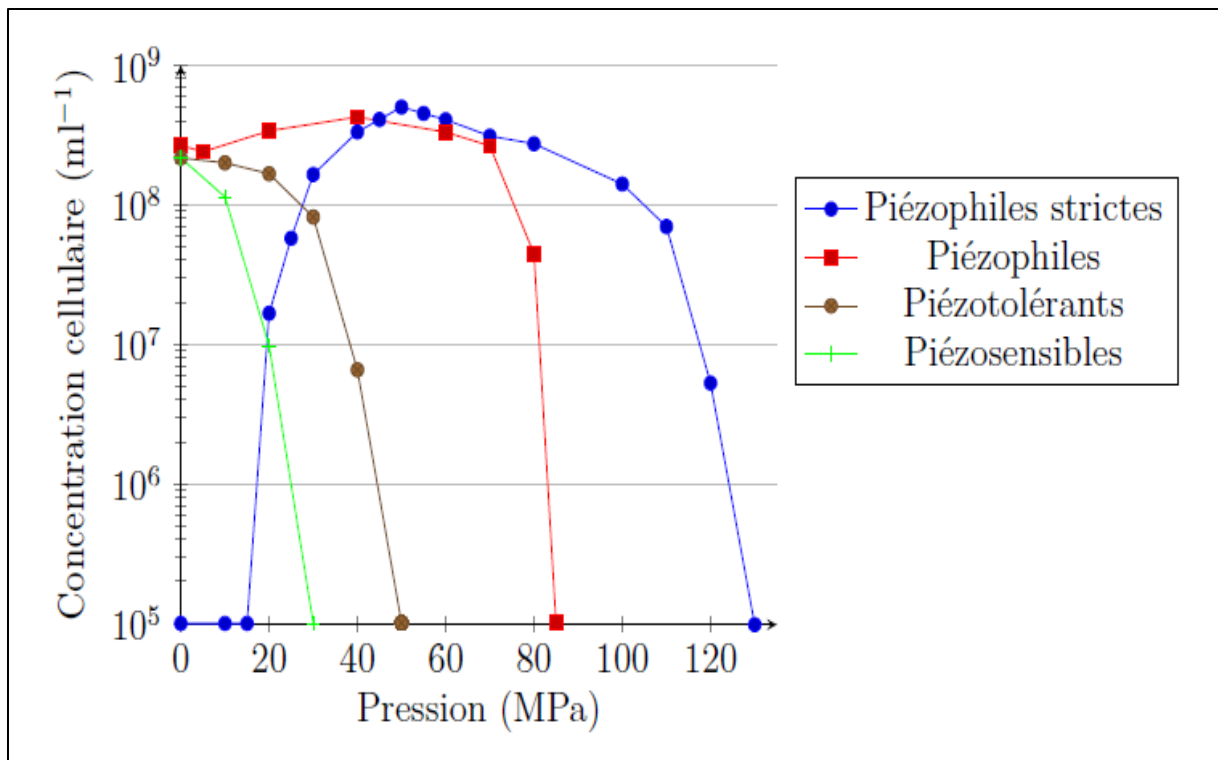
Etudier ces environnements profonds et les espèces associées, permet de rendre compte de la vaste biodiversité qu'ils abritent, ainsi que les mécanismes mis en œuvre par ces organismes pour s'adapter.

La **haute pression hydrostatique** (HPH) constitue le principal paramètre physique qui influence l'activité métabolique et le cycle de vie des organismes marins profonds. Cela nous amène à nous intéresser à ce paramètre physique majeur qu'est la pression hydrostatique ; qui malgré le fait que l'essentiel du volume de la biosphère terrestre soit soumis à des pressions élevées, reste l'un des paramètres le moins étudié. Nous décrirons dans la partie suivante, ce qu'est la pression hydrostatique, la diversité des microorganismes piézophiles (du grec piezo : presser ou serrer ; phile : du grec philo (« ami, qui aime »)), les effets de la pression sur les organismes qui y sont soumis ainsi que les stratégies d'adaptation mises en place par certains microorganismes pour y faire face.

### I.c. La pression: le paramètre physique majeur des grands fonds

La **piézophysologie** désigne l'étude de l'adaptation des organismes vivants aux hautes pressions hydrostatiques (Abe and Kato, 1999). Elle consiste en l'étude des réponses physiologiques mises en place par les cellules pour croître sous pression et la mise en évidence des éléments critiques pour la viabilité cellulaire. La pression hydrostatique constitue l'un des principaux paramètres physiques qui influence l'évolution, et la distribution des macroorganismes et des microorganismes dans les milieux océaniques profonds (Somero, 1990; Yayanos, 1986). La découverte d'organismes piézophiles dans les environnements à hautes pressions tels que les aquifères profonds, les réservoirs de pétroles ou encore les sources hydrothermales profondes, a soulevé des interrogations sur la capacité d'adaptation et la faculté de survie de ces espèces.

Le terme de piézophile a été utilisé pour la première fois par Yayanos en 1995 (Yayanos, 1995). Un organisme piézophile peut être défini comme un organisme dont l'optimum de croissance se trouve à une pression supérieure à la pression atmosphérique (0,1 MPa) (Bartlett, 1992), d'après la définition de Zobell et Morita en 1957 (Zobell and Morita, 1957). En fonction des optima de pression de croissance des microorganismes, on définit les **piézosensibles** qui supportent une augmentation de pression faible jusqu'à 20 MPa, sachant que le taux de croissance diminue avec l'augmentation de pression. Les **piézotolérants** qui se développent jusqu'à 40 MPa, avec une croissance inchangée qu'ils soient à cette pression ou à pression atmosphérique. Enfin les **piézophiles** quant à eux ont besoin de hautes pressions pour croître de manière optimale. Des **piézophiles obligatoires ou stricts** existent également, incapables de se développer à pression atmosphérique et faibles pressions (**figure 5**) (Daniel et al., 2006).



**Figure 5: Evolution de la densité cellulaire des microorganismes en fonction de la pression (Zeng et al., 2009)**

Dans les océans, la pression hydrostatique augmente de 10 MPa tous les 10 mètres. La pression est définie comme la force exercée sur une surface, la pression hydrostatique, correspond donc à la force exercée par l'eau sur un corps immergé ; celle-ci s'exerce selon le principe de Le Châtelier de 1884 (admin, 2013). Selon ce principe : « lorsque les modifications extérieures apportées à un système physico-chimique en équilibre provoquent une évolution vers un nouvel état d'équilibre, l'évolution s'oppose aux perturbations qui l'ont engendrée et en modère l'effet. » Les modifications peuvent être une variation de concentration, température ou pression. Si le volume du système est augmenté, la pression diminue or selon le principe évoqué la pression doit rester constante. Le système réagit donc en favorisant la réaction qui produit le plus de moles de gaz. Les effets de fortes pressions hydrostatiques sur une réaction physico-chimique à l'équilibre sont donc gouvernés par la variation de volume du système sur lequel la pression s'exerce ou  $\Delta V$ .



## **II. Les microorganismes adaptés à la vie sous pression**

Les biotopes de la biosphère profonde oligotrophe, et caractérisés par les hautes pressions hydrostatiques, représenteraient 70% du nombre total de cellules sur Terre. Mais seulement une cinquantaine d'espèces dites piézophiles et piézotolérantes (adaptées aux hautes pressions hydrostatiques) ont été isolées (33 bactéries et 16 archées). Pour la majorité d'entre elles, il s'agit de bactéries psychrophiles hétérotrophes. Seulement très peu de souches sont piézophiles strictes ; sur les 15 souches piézophiles obligatoires isolées, 14 sont des bactéries et une seule archée *Pyrococcus yayanosii* CH1 (Zeng et al., 2009). Ce nombre limité de piézophiles isolés jusqu'à maintenant peut s'expliquer par le fait que remonter des échantillons pressurisés, les maintenir, puis les cultiver, est compliqué et coûteux. Aussi seulement quelques prototypes de bioréacteurs hautes pressions et hautes températures indispensables pour leur étude, sont développés.

### **II.a. Les débuts de la microbiologie abyssale**

Les recherches sur la microbiologie abyssale ont commencé dans les années 1884 avec les campagnes océanographiques du Talisman et du Travailleur menées par les chercheurs français Regnard et Certes. Ils émettent l'hypothèse de la présence de bactéries à plus de 5000 m de profondeur (Minic et al., 2006), et collecte des bactéries jusqu'à 8200 m. C'est également un des premiers à faire des expérimentations sur l'influence de la pression sur des bactéries (Meersman and McMillan, 2014). Mais les découvertes se sont véritablement accentuées avec l'avènement des nouvelles technologies (navires océanographiques, submersibles ROV (Remotely Operated underwater Vehicle)...) et la multiplication de campagnes océanographiques, tel que l'expédition Danish Galathea « Round the world » en 1950-1952. Ainsi durant la décennie suivante, les pionniers de la microbiologie marine : Claude ZoBell, Richard Morita, Holger Jannasch ont démontré une activité microbienne ralentie et l'absence de bactéries adaptées libres aux conditions abyssales. Dès 1949, ZoBell et Morita s'intéressent à l'étude de l'effet de la pression sur les microorganismes, ils isolent à partir de 1957, des

microorganismes sous pression sur des échantillons provenant de sédiments profonds, et ce à l'aide d'incubateurs pressions en titane (Zobell and Morita, 1957). En dépit de leurs efforts, ils isoleront un microorganisme piezotolérant et non piézophile. ZoBell emploie le terme de barophilie, en observant la densité cellulaire en fonction des variations de pression, celle-ci n'étant pas la même à pression atmosphérique que pour des pressions plus élevées. Malgré ces découvertes, le scepticisme règne sur l'existence de microorganismes « aimant » la pression. Il faudra ainsi attendre 1979 pour que le débat soit clos, avec l'isolement du premier microorganisme piézophile obligatoire par Yayanos et son équipe (Yayanos et al., 1979). Ils sont les premiers à obtenir et à maintenir en culture pure un piézophile, qui après identification se révélera être *Psychromonas sp CNTP3*. Par la suite Yayanos continuera les études sur la pression avec notamment la découverte de la souche piézophile obligatoire *Codwellia sp MT41* (Yayanos et al., 1981) ou encore les premières études sur l'influence des hautes pressions hydrostatiques sur les lipides et les protéines (DeLong and Yayanos, 1985; Yayanos, 1986). Ainsi dans les années 1970, de nombreux travaux de Robert Schwarz, Rita Colwell, Jody Deming, Aristides Yayanos ou encore les équipes japonaises du professeur Horikoshi, ont permis de mieux comprendre la vie dans les fonds océaniques et de démontrer l'existence de bactéries piézophiles.

Ces premiers microorganismes étudiés étaient des bactéries psychrophiles hétérotrophes, mais la découverte des sources hydrothermales en 1977 allait constituer un véritable tournant pour les recherches sur la microbiologie abyssale.

Dès lors, des microorganismes hyperthermophiles (>90°C) anaérobies stricts ont pu être isolés de ces écosystèmes particuliers. Nombre d'entre eux appartiennent au domaine des archées, plus particulièrement à l'ordre des *Thermococcales*. Les expériences menées sous pression sur celles-ci ont permis de rendre compte du caractère piézotolérant voir piézophile des souches, en effet pour ces dernières, la croissance est tolérée voir améliorée par les hautes pressions.

## II.b. Diversité des procaryotes psychro-piézophiles

La plupart des psychro-piézophiles ont été isolés entre 2500 m et 11 000 m, au niveau de l'ensemble des océans profonds et des premières couches de sédiments. Issus d'un environnement froid et oligotrophe, leur température optimale ne dépasse pas les 15°C (Morita, 1975) et sont définis par une gamme de pression très large (**tableau 1**)(Lauro et al., 2007). La majorité de ces psychro-piézophiles appartient à la classe des *Gamma-proteobacteria*, avec des représentants dans les cinq genres que comprend ce groupe : *Shewanella*, *Photobacterium* (Nogi et al., 1998), *Colwellia* (Yayanos et al., 1981), *Moritella* (Xu et al., 2003) et *Psychromonas* (Nogi et al., 2002). Les *Shewanella* sont les plus nombreuses à avoir été isolées, cinq *Moritella* ont été isolées et quatre pour les *Psychromonas* et *Colwellia*. Le genre *Photobacterium* comprend trois souches piézophiles modérées, dont la souche SS9 de *P. profundum*, modèle bactérien de l'étude de la piézophilie (mécanismes de régulation de la pression, adaptation des membranes aux HPH, études génomiques et caractérisation phylogénétiques)(Vannier, 2012).

Des exceptions sont à noter avec l'isolement d'une souche piézophile PRT1 appartenant à la famille des *Rhodobacterales* (fosse de Puerto Rico, 8350 m de profondeur), les deux autres sont des bactéries à Gram positif appartenant aux Firmicutes (Fosse Aléoutiennes en Alaska, 2500 m de profondeur).

(D'après Cario, 2013; Vannier, 2012)

**Tableau 1: Les piézophiles psychrophiles isolés**

Nom	Nature de l'échantillon	Lieu de prélèvement	Profondeur	Optimum de pression	Références
<i>Carnobacterium</i> AT12	Eau de mer	Fosse Aleutian	2500 mètres	15 MPa Piézophile	Lauro et al., 2006
<i>Carnobacterium</i> AT7	Eau de mer	Fosse Aleutian	2500 mètres	15 Mpa Piézophile	Lauro et al., 2006
<i>Colwellia hadaliensis</i> BNL-1	-	Fosse du Japon	6278 mètres	93 MPa à 10°C 74 MPa à 2°C Piézophile stricte	Deming et al., 1988
<i>Colwellia piezophila</i>	Sédiments	Fosse du Japon	6278 mètres	602 MPa à 10°C Piézophile stricte	Nogi et al., 2004
<i>Colwellia</i> sp. KT27	Amphipode	Fosse Kermadec	9856 mètres	Piézophile	Lauro et al., 2006
<i>Colwellia</i> sp.	Amphipode	Fosse des	10476 mètres	100 MPa	Yayanos et al.,

<b>MT41</b>		Mariannes		Piézophile stricte	1981 ; Delong et al., 1997
<b>Moritella abyssii</b>	Sédiments	Sierra leone, Océan Atlantique tropical Est	2815 mètres	30 MPa 10°C 19 MPa 6°C Piézophile	Xu <i>et al.</i> , 2003
<b>Moritella japonica DSK1</b>	Sédiments	Fosse du Japon	6356 mètres	50 MPa Piézophile	Lauro <i>et al.</i> , 2006
<b>Moritella PE36</b>		Océan Pacifique		41 MPa Piézophile	Yayanos <i>et al.</i> , 1981 Delong et al., 1997
<b>Moritella profunda</b>	Sédiments	Sierra leone, Océan Atlantique tropical Est	2815 mètres	22 MPa 6°C Piézophile	Xu <i>et al.</i> , 2003
<b>Moritella yayanosii DB21MT-5</b>	Sédiments	Fosse des Mariannes	10898 mètres	80 MPa Piézophile stricte	Kato <i>et al.</i> , 1998 ; Nogi et Kato, 1999
<b>Photobacterium profundum DSJ4</b>	Sédiments	Fosse de Ryuku	5110 mètres	10 MPa Piézophile	Nogi <i>et al.</i> , 1998
<b>Photobacterium profundum SS9</b>	Amphipode	Fosse de Sulu	2551 mètres	28 MPa Piézophile	Delong , 1986 Delong <i>et al.</i> , 1997
<b>Psychromonas kaikoeae</b>	Sédiments	Fosse du Japon	7434 mètres	50 MPa Piézophile stricte	Nogi <i>et al.</i> , 2002
<b>Psychromonas profunda</b>	Sédiments	Océan Atlantique	2770 mètres	15-20 MPa à 6°C 25 MPa à 10°C Piézophile	Xu <i>et al.</i> , 2003
<b>Psychromonas sp. CNPT3</b>	Eau de mer	Océan Pacifique	5672 mètres	52 MPa Piézophile	Delong <i>et al.</i> , 1997 ; Yayanos <i>et al.</i> , 1979
<b>Psychromonas sp. HS11</b>	Sédiments	Côtes Hawaiï	5800 mètres	-	Delong et Yayanos, 1986
<b>Shewanella benthica DB6101</b>	Eau de mer	Fosse de Ryuku	2485 mètres (5110)	50 MPa Piézophile	Kato <i>et al.</i> , 1995
<b>Shewanella benthica DB5501</b>	Eau de mer	Baie de Suruga	2485 mètres	60 MPa Piézophile	Kato <i>et al.</i> , 1995
<b>Shewanella benthica DB6906</b>	Eau de mer	Fosse du Japon	6269 mètres	60 MPa Piézophile	Kato <i>et al.</i> , 1995
<b>Shewanella benthica DB6705</b>	Eau de mer	Fosse du Japon	6356 mètres	60 MPa Piézophile	Kato <i>et al.</i> , 1995
<b>Shewanella benthica DB172F/R</b>	Eau de mer	Fosse Izu-Bonin	6499 mètres	60-70 MPa Piézophile	Kato <i>et al.</i> , 1996
<b>Shewanella benthica DB21MT-2</b>	Sédiments	Fosse des Mariannes	10898 mètres	70 MPa Piézophile stricte	Kato <i>et al.</i> , 1998
<b>Shewanella</b>	Amphipode	Fosse Kermadec	9856 mètres		Lauro <i>et al.</i> ,

<i>benthica</i> KT27				-	2006
<i>Shewanella benthica</i> KT99	Amphipode	Fosse Kermadec	9856 mètres	98 MPa Piézophile	Lauro <i>et al.</i> , 2006
<i>Shewanella benthica</i> PT48	Amphipode	Fosse des Philippines	6163 mètres	62 MPa Piézophile	DeLong et Yayanos, 1986
<i>Shewanella benthica</i> PT99	Amphipode	Fosse des Philippines	8600 mètres	62 MPa Piézophile	DeLong et Yayanos, 1986
<i>Shewanella benthica</i> PT64	-	Pacifique du Nord	-	90 MPa Piézophile	DeLong et Yayanos, 1986
<i>Shewanella benthica</i> DSS12	Sédiments	Fosse de Ryuku	5110 mètres	30 MPa Piézophile	Nogi <i>et al.</i> , 1998

### II.c. Diversité des procaryotes des sources hydrothermales profondes

La découverte des sources hydrothermales a révolutionné les recherches associées à la microbiologie abyssale. Les campagnes océanographiques passées et encore actuelles permettent l'exploration de nouveaux sites sur l'ensemble des océans, et de rendre compte de la biodiversité microbienne associée. Ces environnements qui jalonnent les océans sont des régions chaudes, ainsi de nombreux microorganismes thermophiles (optimum de croissance compris entre 45°C et 70°C) voir hyperthermophiles (optimum de croissance supérieur à 80°C) ont pu être isolés et cultivés en laboratoire (Huber *et al.*, 2002; Miroshnichenko and Bonch-Osmolovskaya, 2006; Reysenbach *et al.*, 2006; Wagner and Wiegel, 2008). La majorité des procaryotes découverts sont des archées hyperthermophiles aux métabolismes très variés (méthanogène lithotrophe, sulfatoréductrice, organotrophe). Quelques bactéries ont également été isolées au niveau de ces sources hydrothermales (**tableau 2**). Avec la température, la pression est également un paramètre caractéristique de ces cheminées, un nombre limité de piézo-(hyper)-thermophiles a été découvert. Pour la majorité, ce sont des archées qui ont été isolées au niveau des sites ; et ces archées piézo-(hyper)-thermophiles appartiennent en grande partie à l'ordre des *Thermococcales* (avec trois genres *Thermococcus*, *Pyrococcus*, *Palaeococcus*) (Godfroy *et al.*, 1996; González *et al.*, 1995; Marteinsson *et al.*, 1999a; Takai and Horikoshi, 2000) (**tableau 2**) :

*Thermococcus barophilus* est une archée isolée à 3550 m de profondeur sur la ride médio-Atlantique. Viggo Marteinsson et son équipe ont pu isoler ce microorganisme anaérobie strict,

se développant à pression atmosphérique à 85°C. Sa culture sous pression hydrostatique se traduit par une augmentation de la température maximale de croissance ainsi que du taux de croissance, son optimum de pression se situe à 40 MPa (Marteinsson et al., 1997, 1999a). De plus des analyses de protéomique, ont permis de révéler lors des cultures à pression atmosphérique, l'expression d'une protéine de stress, traduisant son caractère piézophile.

En 2002, à partir d'un échantillon hydrothermal de la dorsale Pacifique Orientale à 2600 m de profondeur, la bactérie *Marinitoga piezophila* est isolée (Alain et al., 2002). Cette souche se révèle avoir un optimum de pression à 40 MPa alors qu'elle provient d'une profondeur où la pression est de 26 MPa. Comme pour le cas précédent la pression hydrostatique augmente la vitesse de croissance ; et lorsque la pression diminue la morphologie est altérée, avec la formation de filaments bactériens du fait que les cellules ne se divisent plus mais s'allongent. Ce qui rappelle les observations faites sur *Escherichia coli* par Satoshi Ishii et son équipe, mais dans le sens inverse, l'augmentation de pression entraînait une modification de la morphologie de la bactérie, qui en condition de stress développait ces longs filaments (Ishii et al., 2004).

En 2007, lors d'une campagne océanographique Franco-russe, le ROV *victor* du *Pourquoi pas ?* découvre sur la dorsale médio-Atlantique à plus de 4100 m, le site hydrothermal Ashadze. Jean Louis Birrien et Zeng Xiang isolent à partir d'un fragment de cheminée *Pyrococcus yayanosii*, première piézophile obligatoire, celle-ci étant incapable de se développer pour des pressions inférieures à 20 MPa (Birrien et al., 2011).

Plus récemment deux nouvelles espèces piézophiles ont été isolées à partir de sédiments marins profonds hydrothermaux de l'Océan Pacifique : *Palaeococcus pacificus* (Zeng et al., 2013) et *Kosmotoga pacifica* (L'Haridon et al., 2014). *Thermococcus piezophilus* est une archée isolée au niveau de la fosse des Caïmans (golfe du Mexique), sur le site Beebe à 4964 mètres de profondeur. Cette souche piézophile, possède la plus large gamme de pression de croissance. Avec des optima de température et de pression, respectivement de 75°C et 50 MPa, elle a la capacité de se développer de la pression atmosphérique jusqu'au moins 120 MPa (Dalmaso et al., 2016).

(D'après *Cario, 2013; Vannier, 2012*)

**Tableau 2: Les piézophiles thermophiles et hyperthermophiles isolés**

Nom	Nature de l'échantillon	Lieu de prélèvement	Profondeur	Optimum de pression		références
<b><i>Kosmotoga pacifica</i> SLHLJ1<sup>T</sup>, bactérie</b>	Sédiment hydrothermal	Océan Pacifique Est	2891 mètres	30 MPa à 70°C	Thermophile	L'Haridon <i>et al.</i> , 2014
<b><i>Marinitoga piezophila</i>, bactérie</b>	Cheminée hydrothermale	Ride Pacifique Est	2630 mètres	40 MPa à 65°C Piézophile	Thermophile	Alain <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Methanocaldococcus jannaschii</i>, archée</b>	Cheminée hydrothermale	Ride Pacifique Est	2600 mètres	75 MPa à 86°C	Thermophile	Jones <i>et al.</i> , 1983 ; Miller <i>et al.</i> , 1988
<b><i>Methanococcus kandleri</i> 116, archée</b>	Fluide fumeur noire	Site Kairei	2415-2460 mètres	40 MPa à 105°C	Hyperthermophile	Takai <i>et al.</i> , 2004
<b><i>Paleococcus ferrophilus</i>, archée</b>	Cheminée hydrothermale	Arc Ogasawara-Bonin	1338 mètres	30 MPa	Thermophile	Takai <i>et al.</i> , 2000
<b><i>Paleococcus pacificus</i> DY20341<sup>T</sup>, archée</b>	Cheminée hydrothermale	Océan Pacifique Est	2737 mètres	30 MPa	Hyperthermophile	Zeng <i>et al.</i> , 2013
<b><i>Piezobacter thermophilus</i> 108, bactérie</b>	Cheminée hydrothermale	Site TAG (MAR)	3660 mètres	36 MPa	Thermophile	Takai <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Pyrococcus abyssi</i> GE5, archée</b>	fluide	Bassin Nord Fidji	2000 mètres	0,1 MPa	Hyperthermophile	Erauso <i>et al.</i> , 1993
<b><i>Pyrococcus yayanosii</i> CH1, archée</b>	Cheminée hydrothermale	Site Ashadze (MAR)	4100 mètres	52 MPa	Hyperthermophile	Zeng <i>et al.</i> , 2008
<b><i>Thermococcus barophilus</i> MP, archée</b>	Cheminée hydrothermale	Site Snakepit (MAR)	3550 mètres	40 MPa	Hyperthermophile	Marteinsso n <i>et al.</i> , 1999
<b><i>Thiopfundum lithotrophica</i>, bactérie</b>	Cheminée hydrothermale	Site TAG (MAR)	3660 mètres	16 MPa	Thermophile	Takai <i>et al.</i> , 2009
<b><i>Thermococcus piezophilus</i> 106, archée</b>	Echantillons hydrothermaux	Fosse des Caimans	4964 mètres	50 MPa à 75°C	Hyperthermophile	Dalmasso <i>et al.</i> , 2016

En dépit de ces découvertes, les piézophiles décrits à ce jour, reste pour la majorité des bactéries psychrophiles hétérotrophes. Les piézophiles qui ont su s'accommoder et pour certains faire de la pression un caractère obligatoire de développement, ont donc dû s'adapter, mettre en place des mécanismes de survie aux hautes pressions, ce qui nous amène à nous interroger sur ce paramètre physique des grands fonds : la pression hydrostatique et son impact sur les organismes vivants. D'après Yayanos les bactéries des profondeurs ont acquis

par des processus évolutifs des caractéristiques différentes des microorganismes vivants à pression atmosphérique (Yayanos et al., 1979).

### **III. La pression hydrostatique et ses effets**

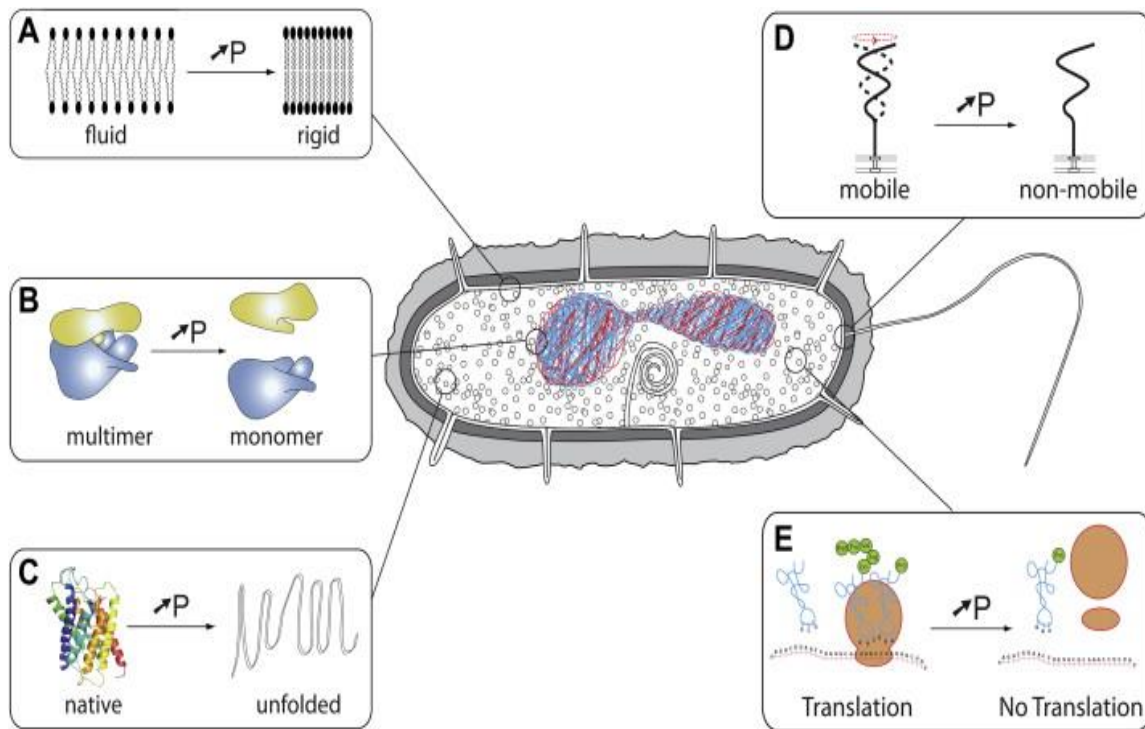
#### **III.a. Les effets de la pression sur les cellules**

La gamme de pression à laquelle sont soumis les organismes sur Terre s'étend de 0 à 200 MPa. La pression ne modifie pas les liaisons covalentes mais agit sur la conformation et les structures formées par les liaisons faibles, seules les fonctions cellulaires et le métabolisme sont donc affectés. Dès 1914, Percy Williams Bridgman, physicien américain, démontre l'effet des HPH sur les structures biologiques, en décrivant la coagulation de l'albumen de l'œuf par la pression (Bridgman, 1914; Cario, 2013). Il observe une coagulation des protéines du blanc d'œuf sous l'effet de la pression donnant à celui-ci un aspect d'œuf cuit. Depuis les progrès d'équipement et l'intérêt de la pression dans différents domaines ont permis d'en apprendre davantage sur l'effet des hautes pressions sur « le caractère structural et la dynamique des molécules biologiques ».

Les bactéries non piézotolérantes, se trouvent en situation de stress à des pressions trop importantes, trop loin de leur optimum de croissance. Les effets de la pression hydrostatique ont été largement étudiés chez les espèces mésophiles modèles en microbiologie comme la bactérie *Escherichia coli* ou encore la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Abe and Kato, 1999; Bartlett, 2002). Soumise à la pression, la membrane par exemple réagit de façon semblable à un stress au froid. Elle se rigidifie, ce qui impacte de nombreuses réactions dépendantes de la fluidité membranaire, et modifie l'homéostasie de la cellule (diminution de la fluidité membranaire, imperméabilité aux ions et autres molécules, diminution des échanges nécessaires au bon fonctionnement de la cellule) (MacDonald, 1984). La membrane n'est pas la seule structure biologique impactée (formation de protéines non dénaturées mais dépliées, la formation de monomères, des problèmes dans la traduction des protéines, ou encore dans la mobilité...) (Oger and Jebbar, 2010) (**figure 6**). L'ensemble des modifications engendrées



par la pression sur les constituants cellulaires fait que soumis à de hautes pressions, les organismes perdent certaines de leurs fonctions, pouvant mener à la mort de la cellule (Wery, 2000).



**Figure 6: Les effets de la pression sur la cellule**  
(Oger and Jebbar, 2010)

### III.a.1. Influence de la pression sur les acides nucléiques

Les HPH stabilisent les ponts hydrogènes et figent les interactions, en augmentant la structure double brin vis-à-vis de la structure simple brin pour une même température. La conséquence de ces changements, est une stabilité de l'ADN augmentée par l'augmentation de pression, et la difficulté de la transition de la forme double brin vers la forme simple brin, nécessaire pour certaines fonctions cellulaires tels que la réplication, la transcription et la traduction (Macgregor, 1998, 2002). La plupart des fonctions est inhibée à de hautes pressions hydrostatiques, par exemple la structure de la double hélice de l'ADN a une pression inhibitrice de 1000 MPa (Abe, 2007).

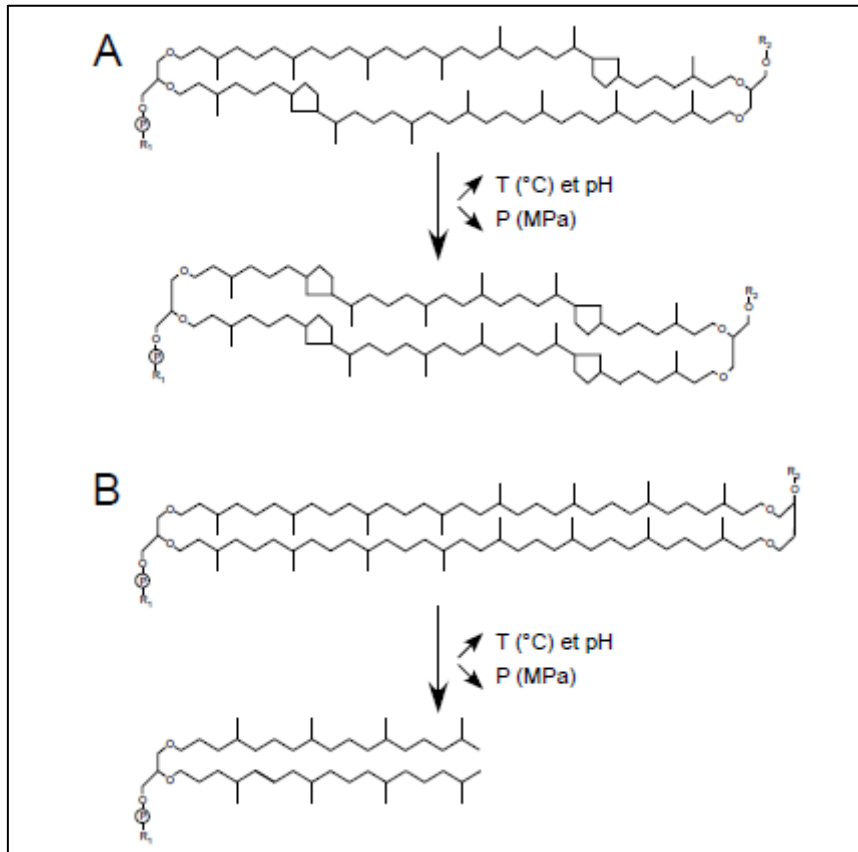
### **III.a.2. Influence de la pression sur la membrane cellulaire**

La membrane cellulaire constituée d'une bicouche lipidique, abritant protéines et sucres, est la structure biologique la plus sensible à la pression. L'homéostasie de cette membrane est indispensable pour assurer les fonctions biochimiques normales et vitales pour les organismes. Dans les conditions physiologiques optimales les membranes sont organisées et liquides. Une augmentation de température ou diminution de pression entraîne une augmentation des mouvements lipidiques conduisant à un désordre membranaire. Au contraire une diminution de la température ou augmentation de la pression sont à l'origine d'une diminution des mouvements lipidiques, ce qui entraîne une rigidification de la membrane (transition liquide/gel) (Oger and Cario, 2013). Cette transition n'est pas immédiate et il peut perdurer dans la membrane des mélanges liquide/gel. Les lipides s'adaptent à la compression en changeant de conformation, l'augmentation de la pression a donc des répercussions sur la membrane, et se traduit par une perte de fluidité membranaire. La membrane devenant rapidement imperméable à l'eau et aux autres molécules, les échanges ainsi que les interactions lipides/protéines pourtant nécessaires au bon fonctionnement de la membrane ne sont plus possibles (Winter and Jeworrek, 2009). La mobilité, la division cellulaire sont inhibées pour des pressions de 10 et 20 MPa (Abe, 2007).

Cependant des changements de la composition lipidique dans les membranes en réponse à un stress (température, pression, pH) sont possibles, et portent le nom d'adaptation homéovisqueuse (Sinensky, 1974).

Chez les bactéries, ce phénomène a été étudié, et a démontré une modification du nombre d'insaturations en cis dans la chaîne lipidique, ou encore une augmentation ou diminution dans les proportions en acides gras, dans la longueur de leurs chaînes, et une modification de la proportion des différentes têtes polaires. La souche modèle SS9 dont l'étude des effets de la pression, a permis de mettre en évidence une accumulation du phosphatidylcholine (PC) et du phosphatidylglycérol (PG) à la place des phosphatidyléthanolamines (PE), ce qui correspond à un passage de lipides saturés à insaturés (Yano et al., 1997). L'adaptation homéovisqueuse existerait aussi chez les archées, et ceci par l'incorporation d'anneaux cyclopentanes dans les

chaînes isoprénoides ou par modification du rapport entre lipides diéthers et tétraéthers (**figure 7**) (Oger and Cario, 2013). Ces réponses sont différentes de celles des deux autres domaines du vivant, où les modifications interviennent principalement sur la longueur et la saturation des chaînes lipidiques.



**Figure 7: Adaptation des lipides archéens aux conditions environnementales chez *M. jannaschii***  
(Oger and Cario, 2013)

**A) Quand la température et le pH augmentent et que la pression diminue, la cellule accumule des anneaux cyclopentanes dans les chaînes isoprénoides. B) Dans les mêmes conditions, le rapport lipides tétra/di éthers diminue.**

### III.a.3. Influence de la pression sur les protéines

Les protéines, et plus particulièrement les protéines multimériques, constituent les macromolécules de la cellule les plus sensibles à la pression. De la même manière que les lipides, les protéines adaptent leur volume suite à la compression, entraînant ainsi des changements de conformation, des problèmes d'encombrement et d'hydratation. Les protéines ne sont pas véritablement dénaturées par la pression, cependant les modifications sont suffisantes pour affecter la stabilité, l'association en multimères, et le bon fonctionnement des

sites catalytiques des enzymes. Le bon fonctionnement des protéines est donc altéré par la compression (Balny et al., 2002; Northrop, 2002). La plupart des protéines étudiées ne sont pas dénaturées à des pressions hydrostatiques entre 0 et 110 MPa, où les microorganismes sont capables de croître mais plutôt à des pressions plus fortes de l'ordre de 300 MPa (Perrett and Zhou, 2002). L'activité de certaines protéines peut même être activée sous certaines pressions, c'est par exemple le cas d'une protéase de la piézophile *Methanocaldococcus jannashii*, qui accroît la vitesse de la réaction qu'elle catalyse à 50 MPa et 125°C (Michels and Clark, 1997). Une peptidase de *Pyrococcus horikoshii* reste stable jusqu'à 300 MPa entre 25 et 90°C ; et à une activité maximale à 180 MPa pour une température de 50°C (Rosenbaum et al., 2012). Or *P. horikoshii* ne se développe que jusqu'à 40 MPa (Zeng et al., 2009), ce qui confirme que les effets des HPH sur les protéines se voient pour des pressions très importantes et souvent au-delà des conditions physiologiques des microorganismes.

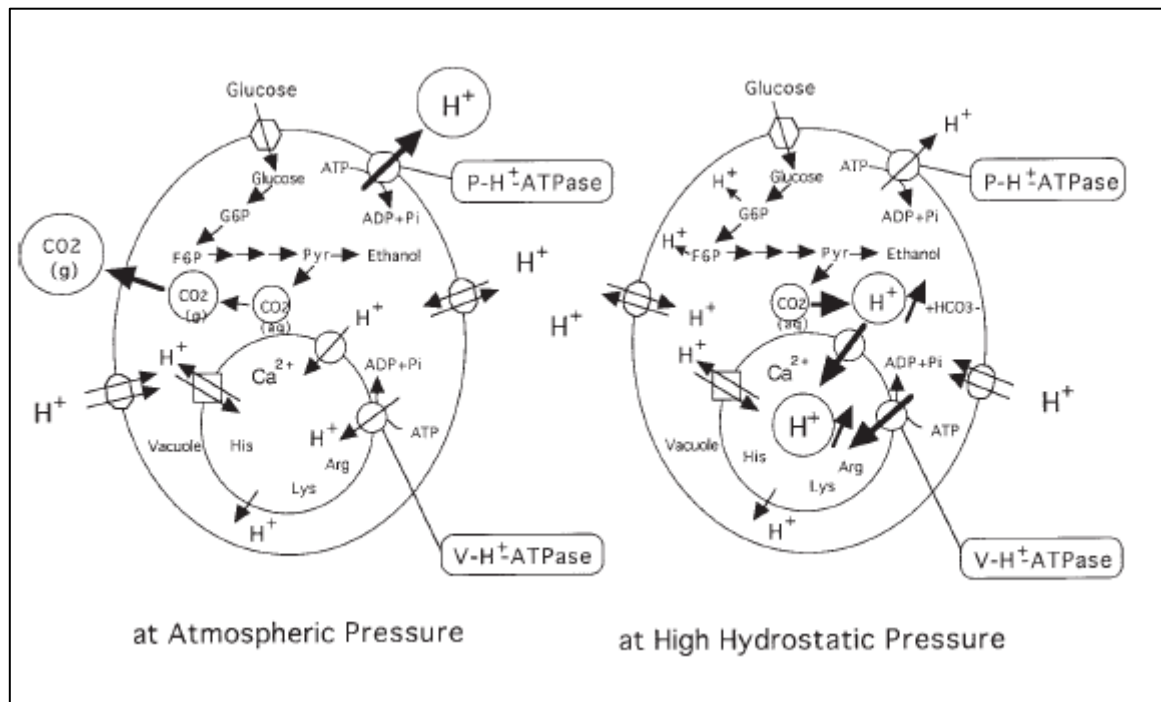
#### **III.a.4. Influence de la pression sur la traduction**

La traduction est le processus cellulaire le plus sensible à la pression. Notamment puisque les ribosomes se dissocient *in vitro* sous hautes pressions (Gross et al., 1993). Les ribosomes associés à de l'ARNm ou de l'ARNt sont stables sous hautes pressions jusqu'à 100 MPa, au contraire les ribosomes non chargés commencent à se dissocier dès 60 MPa. L'assimilation des acides aminés est également sensible aux hautes pressions. Même si les ribosomes ne sont pas affectés à de faibles pressions, il est nécessaire que l'approvisionnement en acides aminés (aa) soit suffisant, pour que la synthèse protéique ait lieu. Comme la membrane plasmique est l'une des premières structures affectées par la pression, le transport des acides aminés ne se fait pas correctement. Les hautes pressions ont donc tendance à limiter le transport et l'assimilation des acides aminés.

#### **III.a.5. Influence de la pression sur le pH intracellulaire**

Le pH cytoplasmique ou vacuolaire doit être régulé pour que les activités enzymatiques fonctionnent normalement. Or les hautes pressions ont tendance à abaisser le pH ; il a été montré chez la levure *S. cerevisiae*, que de 40 à 60 MPa, le pH diminue de 0,3 unités, ce qui a pour conséquence la diminution de certaines activités (Abe and Horikoshi, 1998) (**figure 8**),

c'est le cas de la phosphofructokinase, enzyme intervenant dans la glycolyse.



**Figure 8:** Les effets des HPH sur le métabolisme de *S. cerevisiae* et acidification de la vacuole (Abe and Horikoshi, 1998)

Représentation du modèle proposé pour expliquer les événements cellulaires sous pressions hydrostatiques. L'hydratation et la dissociation du  $\text{CO}_2$  sous hautes pressions conduisent à l'accumulation de protons dans le cytoplasme. Pour maintenir un pH cytoplasmique, les vacuoles des levures vont servir pour retenir les protons pour des hautes pressions hydrostatiques.

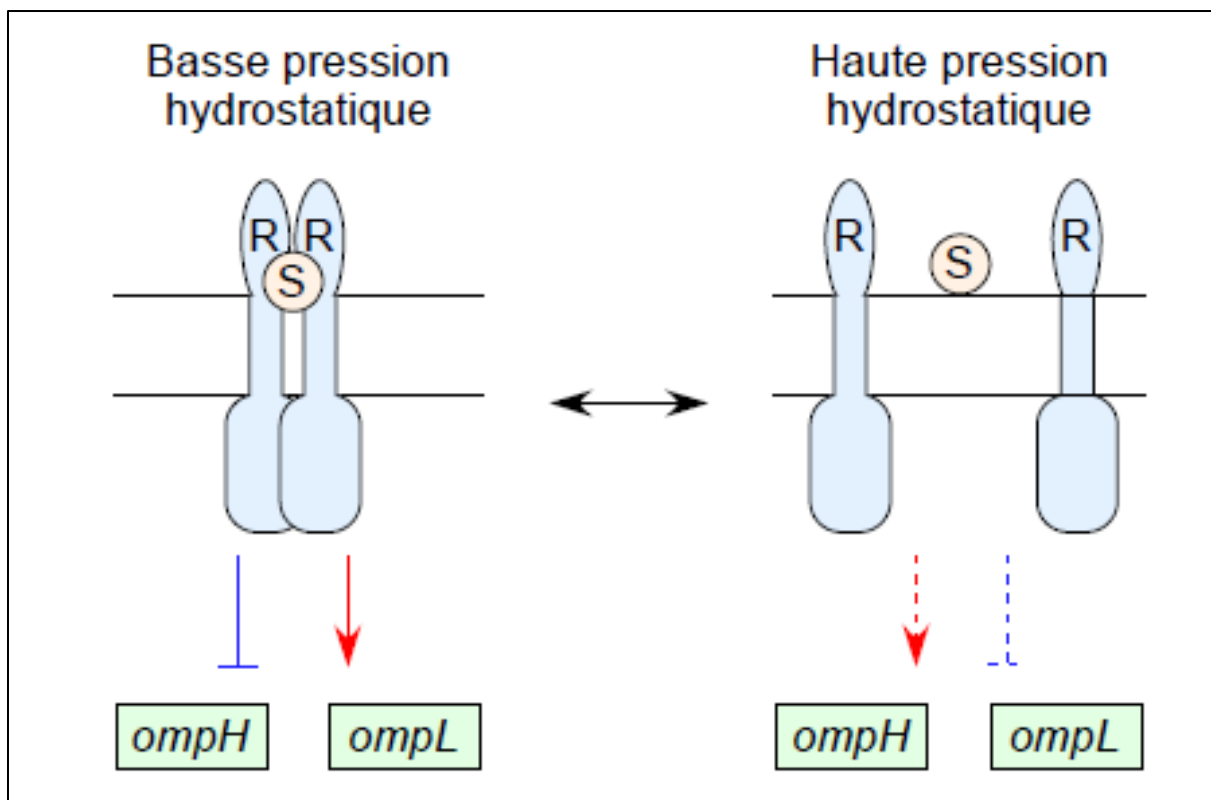
### III.b. Les adaptations aux HPH chez les piézophiles

Cependant des microorganismes, les piézophiles définis précédemment, ne sont pas affectés et au contraire sont capables de se développer sous pression. Les stratégies adoptées par les microorganismes, pour s'adapter aux variations de pression ne sont pas encore complètement définies. Cependant trois mécanismes sont proposés concernant l'adaptation à la pression : ajustement des gènes exprimés pour compenser la perte de l'activité biologique (Campanaro et al., 2005), l'expression de gènes spécifiques aux HPH et l'adaptation structurale des biomolécules pour faire face aux HPH (Kato, 1999; Somero, 1992).

#### III.b.1. Gènes régulés par la pression

L'étude d'un ensemble de gènes « piézophiles » a été rendue possible suite aux avancées dans la description des génomes de piézophiles dites vraies comme *Photobacterium profundum*, *Pyrococcus yamanosii*, ou encore *Shewanella benthica*. Bartlett et son équipe ont étudié les

mécanismes d'adaptation à la pression chez *Photobacterium profundum* SS9 (Chi and Bartlett, 1993; Simonato et al., 2006) ; bactérie piézophile modérée d'origine abyssale (gamme de pression entre 0,1 MPa et 90 MPa, avec un optimum à 28 MPa) (Bidle and Bartlett, 1999; Chi and Bartlett, 1993). Des changements de pression pendant la culture entraînent des changements dans l'expression des gènes *ompH* et *ompL* (Outer membrane protein High/Low pressure), qui codent pour des protéines membranaires. La protéine OmpH de la membrane externe est plus exprimée à 28 MPa (pression optimale de croissance de SS9), tandis que OmpL de la membrane externe est préférentiellement exprimée à 0,1 MPa (Bidle and Bartlett, 1999; Welch and Bartlett, 1998). Ces gènes sont régulés par des protéines trans-membranaires ToxR/ToxS (Welch and Bartlett, 1998) (**figure 9**). La régulation par ToxR/ToxS se fait en fonction des variations, qui se manifestent dans l'environnement (température, salinité, pH) chez des espèces du genre *Photobacterium* ou *Vibrio* (Miller et Mekalanos, 1988). Dans le cas de *P. profundum* SS9, c'est la pression qui a ce rôle de déclencheur environnemental, puisque ToxR et ToxS seraient impliquées dans la perception de la pression. En effet les niveaux d'expression de la protéine ToxR chez la bactérie diminuent à une pression élevée et le mutant ToxR ne produit pas d'OmpL mais maintient un niveau d'OmpH élevé, ce qui suggère que ToxR est nécessaire pour activer OmpL et réprimer OmpH.



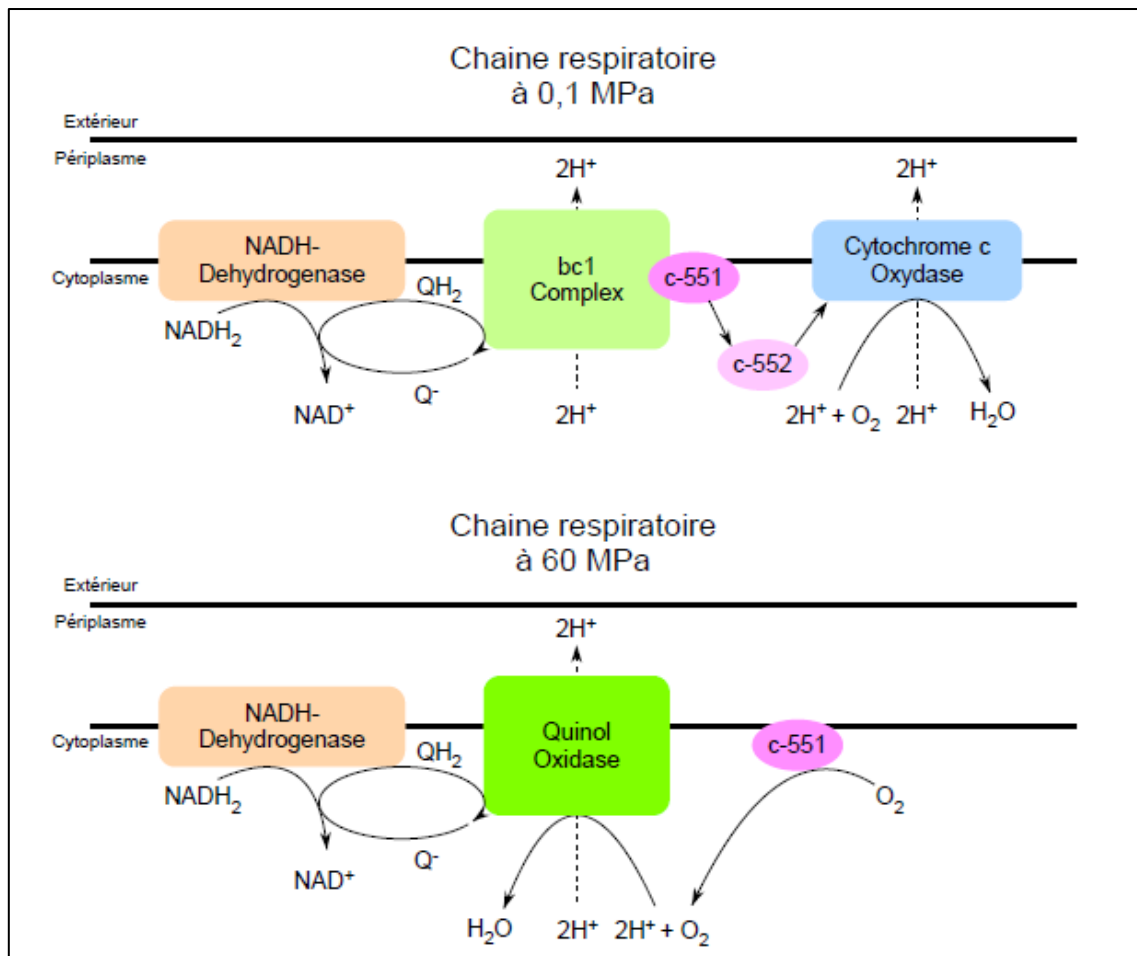
**Figure 9:** Représentation schématique du système ToxR/S chez *P. profundum* SS9  
(Parson et Heal, 2002)

*A basse pression, le système ToxR/S actif, active le gène ompL et réprime ompH, tandis que sous HPH, le complexe ToxR/S est sous forme de monomère ce qui mène la répression du gène ompH et n'active plus le gène ompL.*

Toujours chez cette bactérie SS9, un système flagellaire original a été mis en évidence, or la mobilité flagellaire est un processus cellulaire sensible à la pression. Le génome de la souche contient deux groupes de gènes flagellaires : un groupe de gènes codant pour des flagelles polaires (PF) et un autre groupe de gènes codant des flagelles latéraux (PL). Les mutants de délétion pour les gènes codant pour les flagelles polaires présentent des problèmes de mobilité en toute circonstance, les mutants de délétion des gènes codant pour les flagelles latéraux quant à eux ne sont défectifs que sous des conditions de haute pression ou de haute viscosité. Ce système flagellaire (latéral) permettrait d'assurer la mobilité pour des pressions allant de 30 MPa à 150 MPa (Eloe et al., 2008). Ce système adaptatif semble être commun à plusieurs gamma-protéobactéries, et est retrouvé notamment chez la souche piézotolérante *Shewallena piezotolerans* WP3 (Wang et al., 2008) mais le mécanisme responsable de cette adaptation aux hautes pressions reste encore peu connu.

*Shewanella benthica* DB6705 et *Shewanella violacea* DSS12 sont des souches altérées par la pression (Kato and Hayashi, 1999; Tamegai et al., 1997). Ces deux souches comme de nombreux microorganismes modifient leur système respiratoire de façon à répondre aux stress environnementaux. Chez les *Shewanella*, deux systèmes respiratoires sont présents et fonctionnent selon les hautes et basses pressions (Kato and Hayashi, 1999). Pour étudier la régulation du système respiratoire sous pression, les cytochromes de type c et une quinol oxydase terminale ont été purifiés chez une souche de *Shewanella benthica* DB172F (Qureshi et al., 1998). Deux cytochromes C ont été purifiés (une membranaire c-551 et une cytosolique c-552). Les études ont montré que la quinol oxydase est uniquement induite lors de pressions élevées. Il a également été observé que la c-551 est exprimé à 0,1 MPa et 60 MPa, mais la c-552 ne l'est qu'à 0,1 MPa. Kato a montré en 1998 (Kato et al., 1998), qu'il existait deux types de systèmes respiratoires, l'un fonctionnant à 60 MPa composé de deux complexes où la quinol oxydase est accepteur terminal d'électrons et l'autre fonctionnant à 0,1 MPa où le cytochrome C oxydase est l'accepteur terminal d'électrons. L'hypothèse émise est qu'à 0,1 MPa, le système respiratoire fonctionne à 3 complexes alors qu'à 60 MPa la chaîne respiratoire est plus compacte, seul deux composants fonctionnent (**figure 10**).





**Figure 10: Fonctionnement du système respiratoire de *Shewanella benthica* à 0,1 et 60 MPa (Michoud, 2014) (Kato et al., 1998; Oger and Jebbar, 2010)**  
**Q- : quinone, QH<sub>2</sub>:quinol, C-551 :cytochrome C-551, C-552 : cytochrome C-552**

### III.b.2 Adaptations structurales des biomolécules

Les **lipides membranaires** sont très sensibles aux effets de la pression qui rendent la membrane moins fluide. Les microorganismes des grands fonds maintiennent la fonctionnalité de leur membrane, en modulant la composition de leurs lipides membranaires selon les conditions environnementales auxquelles ils sont contraints. Ce système se nomme l'adaptation homéovisqueuse (Oger and Cario, 2013; Sinensky, 1974). Un grand nombre de piézophiles ne produisent pas juste un taux élevé d'acides gras monoinsaturés dans leurs lipides comme on pourrait le penser. Delong et Yayanos ont observé une corrélation positive entre le nombre d'acide gras mono et polyinsaturés dans les membranes (Allen et al., 1999).

Chez la bactérie *P. profundum SS9*, la proportion d'acides gras mono et poly insaturés augmente avec la pression hydrostatique (Allen et al., 1999; Bartlett, 2002). Des études ont

montré que la proportion d'ester phosphatidylglycérol (PG) augmente avec la pression hydrostatique pour une souche isolée du sédiment. Les PGs semblent jouer un rôle dans la structuration de la membrane en réponse à une croissance sous pression (Mangelsdorf et al., 2005).

La présence dans la membrane de certains acides gras polyinsaturés : AG oméga-3 polyinsaturés (PUFAs : poly unsaturated fatty acid) tels que l'EPA (Acide icosapentaénoïque C<sub>20</sub>:5 ω-3) ou le DHA (Acide docosahexaénoïque C<sub>22</sub>:6 ω-3) auraient un rôle dans le maintien de la membrane fonctionnelle, notamment la fluidité (DeLong and Yayanos, 1985; Kato and Hayashi, 1999; Nogi et al., 2002; O. Wirsen et al., 1986). On remarque une augmentation de PUFAs en fonction de la profondeur chez les espèces piézophiles (DeLong and Yayanos, 1985), mais leur rôle reste encore incertain, et leur utilité et présence semble variable en fonction des souches. Chez *Thermococcus barophilus*, un nouveau modèle de membrane a été mis en évidence; celui-ci permet d'adapter la fluidité membranaire, par une régulation du ratio di/tétraéthers, combinée à la modulation du degré d'insaturation sur les lycopènes (Cario et al., 2013). Les lycopènes sont des tétraterpènes de la famille des caroténoïdes. Les lycopènes sont également retrouvés chez une autre *Thermococcales* des sources hydrothermales profondes *Thermococcus hydrothermalis* (Lattuati et al., 1998).

Certains microorganismes adaptés à de fortes teneurs en sel ou aux hautes températures, ont la capacité de produire des **solutés compatibles** (Yancey, 2005). Ces molécules de bas poids moléculaires (sucres, acides aminés) s'accumulent dans les cellules pour maintenir une pression osmotique stable dans le but de maintenir le volume cellulaire suite au stress (salin, thermique ou du pH)(Brown, 1976; Yancey, 2005). Certaines de ces molécules permettraient aussi de protéger la cellule face aux radicaux libres ou dérivés réactifs de l'oxygène (capacité adsorbante), ou encore de stabiliser les structures de certaines macromolécules (les protéines par exemple). En ce qui concerne le stress engendré par la pression, peu d'études se sont penchées sur l'adaptation par des solutés compatibles. Cependant il semblerait que des piézolytes, définies comme des « molécules retrouvées chez des organismes vivants dans les

grands fonds, leur permettant de faire face aux hautes pressions » existent (Martin et al., 2002). Notamment ceux-ci leur permettraient de maintenir un volume cellulaire et une pression de turgescence suffisante. L'étude servant de référence est celle réalisée chez SS9 ; qui a montré que la souche accumule du glutamate, de la glycine bêtaïne à 0,1 MPa, et au contraire des oligomères du  $\beta$  hydroxybutyrate à 28 MPa (Martin et al., 2002). Chez *Thermococcus barophilus*, le mannosylglycérate serait accumulé à haute température et à haute salinité, cette augmentation est inversement proportionnelle à l'augmentation de la pression. Or le mannosylglycérate interviendrait dans l'équilibre osmotique, le rétablissement de la turgescence et comme chaperonne moléculaire pour aider les protéines à se replier (Cario, 2013). Les piézolytes ont peut-être une importance chez les espèces vivant sous pression.

### **III.b.3. Régulation du stress pression**

Les effets de la pression hydrostatique ont été largement étudiés chez les espèces mésophiles comme *E. coli* et *S. cerevisiae*, pour qui l'expression de protéine de stress pour des augmentations de pression a été mise en évidence. Un phénomène similaire est étudié chez les piézophiles, des gènes de réponse au stress sont surexprimés pour des pressions de 0,1 MPa. Par exemple chez la souche *P. profundum* SS9, une pression de 0,1 MPa constitue un stress, entraînant la surexpression de 4 gènes (*hptG*, *dnaK*, *dnaJ* et *groEL*), qui codent pour des protéine chaperonnes de réponse au stress (Campanaro et al., 2005).

En dépit du fait que des microorganismes piézophiles aient été découverts, très peu d'études se sont intéressées à la résistance de ces microorganismes aux HPH. Quelques études ont cependant commencé à donner des résultats quant aux mécanismes d'adaptation de piézophiles ; c'est par exemple le cas pour *Desulfovibrio hydrothermalis* (Amrani et al., 2014), *T. barophilus* (Vannier et al., 2015) , *Desulfovibrio hydrothermalis* (Pradel et al., 2013), *P. yayanosii* (Michoud and Jebbar, 2016) ou encore chez *Thermococcus piezophilus* (Dalmasso, 2016). Les premières conclusions seraient qu'il n'existe pas d'enzymes ou de gènes spécifiques développés pour vivre sous hautes pressions, mais celles-ci seraient plus en faveur d'un changement du métabolisme pour s'adapter aux variations de pressions.

Ces études ont permis de montrer que des variations de pression chez les archées piézophiles ont un impact sur la fluidité membranaire, sur la composition/les insaturations des lipides de celle-ci (Cario et al., 2015; Oger and Cario, 2013). Elles, entraînent des modifications des voies métaboliques anaérobies (hydrogénases/sulphydrogénases), des changements de transporteurs membranaires notamment au niveau des acides aminés, des inactivations de certaines voies de synthèse trop coûteuses en énergie en condition de stress (tryptophane) et des régulations fines dans la production et la conversion d'énergie (Martinez et al., 2016), ainsi que le rôle de solutés compatibles (import ou synthèse) dans l'adaptation aux fortes pressions (Cario et al., 2015).

Chez *D. piezophilus* C1TLV30 isolée à 1700 mètres en méditerranée, les études ont montré que le transport des acides aminés est affecté par la pression, ainsi que l'activité sulfato-réductrice qui est diminuée pour de fortes pressions (Pradel et al., 2013). Chez une autre sulfato réductrice *D. hydrothermalis* isolée de la dorsale Est Pacifique à 2600 m de profondeur, une analyse du transcriptome (RNA-seq) a été réalisée (26-10-0,1 MPa). 65 gènes ont une expression différente sous pression, notamment ce qui codent pour : les acides aminés aromatiques, ceux impliqués dans le métabolisme énergétique, ceux de la traduction et les gènes sans fonctions connues. En ce qui concerne les acides aminés, une accumulation de glutamate et la biosynthèse de ces acides aminés ont été mises en évidence sous pression. Des résultats similaires ont été montrés chez la bactérie piézophile *P. profundum* SS9, ainsi que chez *S. violacea*, où le gène de la glutamine synthase est positivement régulé sous pression. L'étude a également mis en évidence que les gènes impliqués dans le métabolisme énergétique sont impactés par la pression ; cela vaut aussi pour *P. profundum* et *S. violacea*, où la cytochrome oxydase C terminal et la quinol oxydase ont une expression différente dépendante de la pression (Ohke et al., 2013; Tamegai et al., 2012). Le niveau d'ATP augmente avec la pression, ce qui suggère que la souche module son métabolisme énergétique en fonction de la pression.

Chez SS9 les études transcriptomiques ont montré que le passage de 28 MPa à 0,1 MPa entraîne la surexpression de nombreux gènes, codant pour la plupart pour des transporteurs ou enzymes du métabolisme (Campanaro et al., 2005).

Chez *Pyrococcus yayanosii*, des études comparatives ont été réalisées entre *P. yayanosii* avec une piézosensible *P. furiosus*. Cette souche a été choisie car elle est physiologiquement proche de *P. yayanosii* (température optimale, pH, salinité...) mais les optima de pression sont différents. Cette étude avait pour but de trouver des potentiels marqueurs de la piézophilie. Les résultats tendent à appuyer l'hypothèse que *P. yayanosii* a fortement adapté son génome aux conditions de pressions auxquelles elle est soumise ; notamment au niveau de la biosynthèse des acides aminés, du métabolisme énergétique (hydrogénases/formate). Trois principales fonctions sont concernées: la mobilité par l'intermédiaire de l'archellum, la traduction au niveau de la sous unité 50S des ribosomes et des transporteurs, et au niveau de la conservation de l'énergie.

*P. yayanosii* possède des hydrogénases : Mbh (Membrane bound hydrogenase) (PYCH-11230-360), Mbx (Membrane bound oxydoreductase) (PYCH-11410-530), SHI (Sulphydrogensae I) (PYCH-03370-4F00), SHII (Sulphydrogenase II) (PYCH-0010-40), déterminés par homologie de séquences avec celles de *P. furiosus*.

Mbh est sous-exprimée par la pression (80 MPa), Mbx est quant à elle sur-exprimée par la pression ainsi que Nsr (NAD(P)H linked sulfur reductase) et pdo (protein disulfide oxydoreductase). SHI et SHII sont sous-exprimées à hautes et faibles pressions (20 et 80 MPa).

Chez l'archée *T. barophilus*, une protéine de stress (P60) est induite par les basses pressions (Marteinsson et al., 1999b, 1999a). De plus des études ont été menées pour montrer l'effet des hautes pressions sur la stabilité du protéome de *T. barophilus*. Il a ainsi été démontré que *T. barophilus* ressent les basses pressions comme un stress. Elle accumule des molécules de stress en condition de faible pression hydrostatique; ce qui témoigne d'une adaptation du protéome aux HPH (Cario, 2013).

L'adaptation de *T. barophilus* aux HPH a également été étudiée par comparaison des transcriptomes avec le microorganisme piézosensible le plus proche à savoir *T. kodakarensis*. La régulation des gènes a été comparée à pression atmosphérique, considérée comme une basse pression; à 40 MPa, soit la pression optimale de croissance de *T. barophilus* et sous haute pression, 70 MPa. Les pressions de 40 et 70 MPa permettent d'étudier la réponse des gènes face à une condition de stress, la pression atmosphérique quant à elle permet de voir les gènes régulés par une augmentation de pression.

L'étude a révélé la modification globale de l'expression de 378 gènes lors de la variation de la pression appliquée. Parmi ces 378 gènes, 178 subissent une régulation positive. Ceux-ci sont impliqués dans la production et la conversion d'énergie, dans le transport, et le métabolisme d'ions inorganiques et glucides. 156 gènes sont régulés de façon négative. Ceux-là codent des protéines intervenant dans le transport/le métabolisme des acides aminés et des nucléotides. Des gènes sont activés ou réprimés, le niveau d'expression augmente ou diminue en fonction de l'augmentation de la pression.

Les effets sont principalement observés au niveau de la biosynthèse et du transport des acides aminés qui sont inhibés à HPH, de très nombreux transporteurs et protéines membranaires sont quant à eux sur-exprimés, deux gènes impliqués dans la mobilité cellulaire semblent être surexprimés chez *T. barophilus* à pression optimale pour la souche et des études microscopiques ont montré un nombre de flagelles plus important à 40 MPa qu'à 0,1MPa et 70 MPa. La mobilité de *T. barophilus* semble être fonction de la pression optimale de la souche soit 40 MPa. De plus, 33 protéines hypothétiques, spécifiques de *T. barophilus* sont régulées par les variations de pression et donc potentiellement impliquées dans l'adaptation aux HPH. En ce qui concerne un certain nombre d'hydrogénases et de quinone, ce qui nous intéresse dans la suite de l'étude, elles sont surexprimées en condition de stress pression (Vannier, 2012). Lorsque la souche est cultivée en dessous ou au-dessus de la pression optimale, il n'y a pas de régulation de gènes codant des protéines de stress mais un changement global du métabolisme, affectant la production d'énergie et le métabolisme. Concrètement, face à des hautes pressions, la cellule a besoin de plus d'énergie. Elle réduit la dépense d'énergie en régulant négativement

des gènes codant des voies de biosynthèse coûteuses en énergie, par exemple en favorisant le recyclage de l'histidine ou en utilisant la voie du GTP au lieu de l'histidine pour la synthèse de ses nucléotides. En parallèle elle régule positivement des gènes codant par exemple des **hydrogénases** et des **sulphydrogénases**.

Les gènes codant pour les hydrogénases membranaires Mbh, Mbh-Codh ont une forte expression à 0,1 MPa et 70 MPa, il en est de même pour les hydrogénases cytosoliques SHI (TERMP\_00067) et SHII (TERMP\_00070), qui sont sur-exprimées par le stress induit à 0,1 MPa et 70 MPa.

Ces premières constatations chez *T. barophilus* nous amène à nous interroger sur les hydrogénases et le rôle qu'elles ont dans son adaptation à la pression. Ainsi dans la prochaine partie nous verrons, ce qu'est une hydrogénase, quel est leur rôle et comment fonctionne ce métabolisme de l'hydrogène chez les *Thermococcales*.

## **IV. Métabolisme de l'hydrogène**

### **IV.a. Les hydrogénases**

Les hydrogénases sont des métalloenzymes, qui catalysent la production et la consommation de la molécule d'hydrogène selon la réaction réversible suivante:  $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$  (Adams, 1990; Vignais and Colbeau, 2004). Dès 1900 des organismes capables d'oxyder l'hydrogène ont été découverts; comme *Bacillus pantotrophus* isolé par Kaserer en 1906. En 1930, l'activité des hydrogénases a été découverte par Stephensen et Stickland (Stephenson and Stickland, 1931; Thauer et al., 2010; Wu and Mandrand, 1993). L'ensemble de ces enzymes sont capables de catalyser la réaction dans les deux sens *in vitro*, mais *in vivo* elles privilégient le plus souvent soit la production, soit l'oxydation, de l'hydrogène suivant les besoins de l'organisme. Les premières hydrogénases ont été étudiées chez les procaryotes aérobies et anaérobies, bactéries et archées (Bowien and Schlegel, 1981). Par la suite des hydrogénases de type (Fe-Fe) exclusivement ont été mise en évidence chez des eucaryotes; connues sous le nom d'hydrogénosome chez les protozoaires et de chloroplastes chez les algues vertes (Gaffron and Rubin, 1942).

Les hydrogénases ont un rôle central dans le métabolisme énergétique de la plupart des microorganismes produisant de l'hydrogène. Les bactéries utilisent les hydrogénases pour catalyser la production d'hydrogène ou la réduction de protons au cours d'un processus fermentatif couplé à l'oxydation de substrats carbonés (Adams, 1990; Vignais and Billoud, 2007; Vignais and Colbeau, 2004).

La classification des hydrogénases a d'abord consisté à identifier les donneurs et accepteurs d'électrons : NAD (hydrogénases de la classe EC1.12.1.12), cytochromes (classe 1.12.2.1), coenzymes F<sub>420</sub> (classe 1.12.99.1) ou ferredoxines (classe 1.18.99.1). Puis Voordouw, en 1992, compare les éléments de séquences conservés des régions de fixation du nickel de 16 hydrogénases et créent ainsi des sous-groupes. Wu et Mandrand en 1993, font une classification plus fine qui repose sur la séquence en acides aminés de 30 hydrogénases bactériennes (Wu and Mandrand, 1993). Une centaine d'hydrogénases sont désormais caractérisées génétiquement et/ou biochimiquement. Une classification en comparant la nature de leur site catalytique a permis de différencier trois classes phylogénétiquement distinctes. En effet les hydrogénases peuvent être réparties en trois classes (Vignais and Colbeau, 2004; Vignais et al., 2001), en se basant sur la nature métallique de leur site actif : les (Ni-Fe)-hydrogénases, (Fe-Fe)-hydrogénases ou encore les hydrogénases « sans métaux » (**figure 11**).

#### **IV.a.1. (Ni-Fe)-hydrogénases**

Les (Ni-Fe)-hydrogénases et (NiFeSe)-hydrogénases sont les plus connues et les majoritaires, présentes chez les archées et bactéries. Elles possèdent un atome de nickel et du fer dans leur site actif. Certaines d'entre elles, contiennent un atome de nickel chélaté par un atome de sélénium sous la forme de séléncystéine (He et al., 1989). *In vivo*, elles fonctionnent principalement dans le sens de la consommation d'hydrogène. Elles sont pour la plupart multimériques ou hétérodimériques. Elles sont constituées d'une grande sous-unité alpha et une petite sous-unité bêta, différentes sur le plan immunologique (Kovacs et al., 1989). Ces hydrogénases ont été retrouvées chez les protéobactéries, cyanobactéries ou archées



méthanogènes et *Thermococcales*.

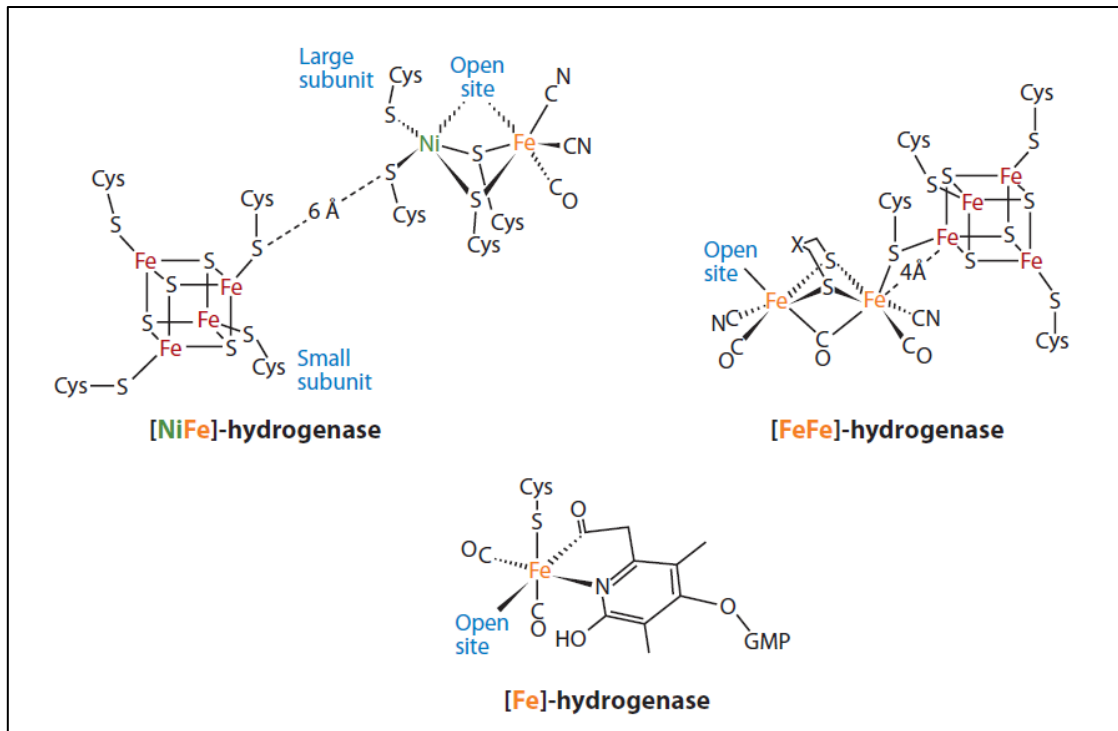
Elles sont retrouvées sous forme cytoplasmique, périplasmique et/ou membranaire. Il existe quatre groupes : **les hydrogénases (Ni-Fe) consommatrices d'hydrogène**, ces enzymes réalisent l'oxydation de l'hydrogène, les électrons de l'hydrogène sont transférés au cytochrome lié à un complexe membranaire de la chaîne respiratoire effectuant la translocation transmembranaire des protons. Elles sont retrouvées chez les protéobactéries réductrices du fumarate ou d'oxydants inorganiques, dans les protéobactéries fixatrices d'azote, chez les microorganismes anaérobies sulfo-réducteurs. Ces hydrogénases nickel-fer sont également trouvées chez des archées méthanogènes sous forme membranaire (Vignais and Colbeau, 2004; Wu and Mandrand, 1993). **Les hydrogénases (Ni-Fe)-senseurs d'hydrogène et utilisant l'hydrogène comme substrat**, les hydrogénases consommatrices d'hydrogène sont retrouvées chez certaines protéobactéries fixatrices d'azote et chez certaines cyanobactéries (Oxelfelt et al., 1998; Vignais et al., 2000). **Les hydrogénases (Ni-Fe)-cytoplasmiques hétéromultimériques réversibles** sont des enzymes capables de lier des cofacteurs solubles comme le  $F_{420}$ ,  $NAD^+$ ,  $NADP^+$  et fonctionnent de façon réversible (Vignais and Colbeau, 2004). Elles sont retrouvées chez les bactéries hyperthermophiles, chez les archées anaérobies méthanogènes telles que *Methanosarcina mazei* (Baumer et al., 2000), *Methanococcus voltae*, *Methanocaldococcus jannaschii* et, *Thermococcales* comme *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus litoralis* et chez certaines cyanobactéries (Schmitz et al., 1995; Schneider and Schlegel, 1976). Enfin **les hydrogénases (Ni-Fe)-membranaires productrices d'hydrogène**, elles associent l'oxydation d'un groupe carbonyle de composés organiques à un carbone (CO, formiate, acétate) à la réduction de protons de l'eau, pour produire de l'hydrogène. Ces enzymes sont retrouvées chez certaines archées comme *Methanosarcina barkeri* (Meuer et al., 1999, 2002), *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Tersteegen and Hedderich, 1999) ou encore *Pyrococcus furiosus* (Sapra et al., 2000; Silva et al., 2000).

#### **IV.a.2. (Fe-Fe)-hydrogénases**

Les (Fe-Fe)-hydrogénases, n'ont pas de nickel dans leur site actif mais uniquement un atome de fer. Elles sont retrouvées chez les microorganismes fermentatifs anaérobies stricts produisant de l'hydrogène. Contrairement aux précédentes *in vivo*, elles fonctionnent préférentiellement dans le sens de la production d'hydrogène. La ferredoxine, flavodoxine, cytochrome réduit sont des donneurs d'électrons physiologiques. Elles sont monomériques, et font 60 kDa, et très sensibles à l'oxygène. Ces hydrogénases ont été découvertes chez des bactéries anaérobies et eucaryotes mais aucune chez les archées. Elles ont été purifiées chez des bactéries (Adams, 1990) et des eucaryotes (Akhmanova et al., 1998; Horner et al., 2000) : des bactéries fermentatives anaérobies strictes (*Clostridia*, *Megasphaera elsdenii*) (Peters et al., 1998), chez certaines bactéries hyperthermophiles *Thermotoga maritima*, chez des bactéries réductrices de sulfates *Desulfovibrio*, chez des eucaryotes comme des algues vertes (*C. reinhardtii*) et des protozoaires (*Trichomonas vaginalis*) (Adams, 1990). Les hydrogénases des bactéries anaérobies et des algues vertes (Happe and Naber, 1993) sont monomériques et situées dans le cytoplasme, celles des bactéries réductrices du sulfate sont dimériques et périplasmiques.

#### **IV.a.3. Hydrogénases sans métaux**

Enfin les hydrogénases sans métaux ont été découvertes pour la première fois par Thauer et son équipe en 1990, chez *Methanothermobacter thermoautotrophium* (Shima and Thauer, 2007). Initialement appelées hydrogénases sans métaux, elles sont devenues les hydrogénases sans centre fer-soufre en 2004 suite à la découverte de la présence d'un atome de fer dans l'enzyme (Zirngibl et al., 1992) ; elles possèdent un cofacteur organique contenant un atome de fer pour site catalytique (Lyon et al., 2004). Elles sont homodimériques, de 38 kDa et minoritaires.



**Figure 11: Structure des sites catalytiques des hydrogénases**  
(Shima and Thauer, 2007)

Les bactéries possèdent majoritairement les deux premières classes d'hydrogénases, tandis que les (Ni-Fe) et les (Fe)-hydrogénases se retrouvent davantage chez les archées, aucune hydrogénase de type (Fe-Fe) n'a été mise en évidence chez les archées (Thauer et al., 2010). Les archées anaérobies qui vivent dans les environnements extrêmes possèdent souvent plusieurs (Ni-Fe)-hydrogénases. Dans ces environnements le métabolisme de l'hydrogène a un rôle essentiel.

#### **IV.b. Le métabolisme de l'hydrogène chez les *Thermococcales***

##### **IV.b.1. Les hydrogénases des *Thermococcales***

Les *Thermococcales* sont des Euryarchées, regroupant les *Thermococcus*, *Pyrococcus* et *Palaeococcus*. Ce sont des hyperthermophiles, avec une croissance pouvant se réaliser à des températures de 100°C, hétérotrophes et anaérobies. Elles utilisent des substrats protéiniques avec la réduction du soufre élémentaire formant du sulfure d'hydrogène (H<sub>2</sub>S). En absence de soufre ces organismes peuvent croître en présence de pyruvate et carbohydate. Dans le

métabolisme, l'hydrogène produit, est le résultat d'utilisation de protons comme accepteurs d'électrons et suggère la présence d'hydrogénases dans ces organismes (Kanai et al., 2011).

Chez les *Thermococcales*, la glycolyse se déroule selon une version modifiée de la voie d'Embden-Meyerhof dans laquelle les enzymes glycolytiques classiques sont remplacées par une enzyme liée à la ferredoxine. La ferredoxine est l'accepteur d'électrons pour toutes les étapes oxydatives de la voie glycolytique chez ces microorganismes et le donneur d'électrons pour la production de l' H<sub>2</sub> (van der Oost et al., 1998).

La première hydrogénase découverte chez les *Thermococcales* est une (Ni-Fe)-hydrogénase cytosolique de *Pyrococcus furiosus* (**Hyh-I; SHI**) (Bryant and Adams, 1989); c'est une enzyme NADPH-dépendante composée de quatre sous unités (hétérotétramère codé par 4 gènes (PF0891-PF0894)(Ma and Adams, 2001). Elle intervient dans la réduction du soufre, d'où l'appellation sulfhydrogénase (Ma et al., 1993). SHI oxyde l'hydrogène et réduit le NADP<sup>+</sup> (régénère le NADPH pour la production d'H<sub>2</sub> par Mbh), elle peut aussi réduire des protons pour former de l'hydrogène en utilisant NADPH comme donneur d'électron (van Haaster et al., 2005; Ma et al., 1994).

Plus tard une deuxième hydrogénase a été trouvée dans le cytoplasme de *Pyrococcus furiosus* (Ma et al., 2000). **Hyh-II (SHII)** (PF1329-PF1332) est une enzyme homologue de Hyh-I (Kanai et al., 2011; Ma and Adams, 2001; Ma et al., 2000). Les deux Hyhs sont très similaires, en ce qui concerne leur aspect moléculaire et leurs activités enzymatiques, à l'exception que Hyh-II semble moins active que Hyh-I. *Pyrococcus furiosus* utilise l'hydrogène comme un métabolite, ces deux enzymes Hyh-s auraient pour rôle d'éliminer les excédents réducteurs sous forme d'hydrogène.

Dans les années 2000, une autre (Ni-Fe)-hydrogénase a été découverte, cette fois ci dans la membrane plasmique de *Pyrococcus furiosus*, et appelée **Mbh** (McTernan et al., 2014; Schut et al., 2013a). Deux protéines MbhL et MbhK ont été identifiées, les gènes codant pour ces deux polypeptides forment un seul opéron (l'opéron *mbh* : *mbhABCDEFGHIJKLMN*). Le produit des huit premiers gènes (*mbhABCDEFGH*) a une forte similarité de structure avec les sous

unités multimériques des transporteurs  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , et ont sûrement un rôle dans le passage des ions  $\text{H}^+$  et  $\text{Na}^+$  à travers la membrane. Les gènes (*mbhIJKLMN*) codent quant à eux des protéines qui ont une forte similarité de séquence avec des sous-unités de la membrane des Ech hydrogénases de la souche *Methanosarcina barkeri* (Künkel et al., 1998; Meuer et al., 1999) et l'hydrogénase CO-induite (Coo) de la souche *Rhodospirillum rubum* (Fox et al., 1996). Par la suite des études sur la membrane de *P. furiosus* ont permis de montrer des fonctions de Mbh; la présentant comme une pompe à ions, générant une force proton-motrice, réduisant les protons et générant ainsi de l'hydrogène, en utilisant une ferredoxine de faible potentiel. La force proton-motrice générée est utilisée pour la synthèse d'ATP conduite par le complexe ATP synthase lié à la membrane (Sapra et al., 2003). Ce qui permet de conclure sur le rôle de conservation d'énergie de l'hydrogénase Mbh.

En plus de ces trois hydrogénases, le génome de *Pyrococcus furiosus* contient un troisième type de (Ni-Fe)-hydrogénase (Silva et al., 2000). L'opéron *mbx* (*mbxABCDEFGHH'MJKLN*) a une structure similaire à celui de l'opéron *mbh*. Cependant le fait que **Mbx** ait une activité hydrogénase est incertain. Sa fonction est analogue à celle de Mbh, en utilisant la ferredoxine comme accepteur d'électrons et conserve l'énergie en formant un gradient d'ions (Bridger et al., 2011; Schut et al., 2007; Silva et al., 2000).

Les trois types d'hydrogénases (Ni-Fe) de *P. furiosus* (Hyhs, Mbh et Mbx) et ont été mises en évidence dans d'autres génomes de *Thermococcales*, comme chez *P. horikoshii* (Kawarabayasi et al., 1998), *P. abyssi* (Cohen et al., 2003), *Thermococcus kodakarensis* (Fukui et al., 2005), *Thermococcus onnurineus* (Lee et al., 2008), *Thermococcus sibiricus* (Mardanov et al., 2009), *Thermococcus gammatolerans* (Zivanovic et al., 2009). Mbh et Mbx sont présentes chez toutes les espèces de *Thermococcales*, les hydrogénases Hyhs également sauf chez *T. gammatolerans* (**tableau 3**). La présence de ces hydrogénases suggèrent du caractère fondamental de leur rôle dans le métabolisme des *Thermococcales*.

D'autres types d'hydrogénases (Ni-Fe) appartenant aux hydrogénases-4 de *E. coli* ont été trouvées chez *P. abyssi*, *T. onnurineus* et *T. gammatolerans*.

**Tableau 3: Les hydrogénases chez les *Thermococcales***

Espèces	Mrp-Mbh	Mrp-Mbh2	Mbh- NAD(P)H	Mrp-Mbh-Fdh1	Mrp-Mbh-Fdh2	Mrp-Mbh-Codh	Mrp-Mbx
<i>Pyrococcus furiosus</i>	PF1423-36						PF1453-41
<i>Pyrococcus Abyssii</i>	PAB1884-94			PAB1389-02			PAB0485-96
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	PH1427-40						PH1456-46
<i>Pyrococcus yamanosii</i>	PYCH_11240-360				PYCH_11030-200		PYCH_11530-410
<i>Thermococcus kodakarensis</i>	TK2080-93						TK1226-14
<i>Thermococcus gammatolerans</i>	TGAM_0047-34				TGAM_0065-48		TGAM_0703-15
<i>Thermococcus onnurineus</i>	TON_1582-95			TON_0281-66 (16cds)	TON_1563-80 (18 CDS)	TON_1017-31	TON_0498-86
<i>Thermococcus barophilus</i>	TERMP_01498-85	TERMP_01484-1471				TERMP_01154-39	TERMP_00865-53
<i>Thermococcus sibiricus</i>	TSIB_1309-96	TSIB_1295-82					TSIB_1917-05
<i>Thermococcus piezophilus</i>	A7C91_04165-04230			A7C91_06945-07020 (16CDS)	A7C91_04325-04240 (18CDS)		

#### IV.b.2. Rôle des différentes hydrogénases

Des études ont été réalisées sur les hydrogénases des *Thermococcales* ; dans le but de mieux comprendre le rôle de chaque hydrogénase ; des manipulations génétiques, avec la création de mutants de délétion ont notamment été entreprises.

Chez *T. kodakarensis*, les trois hydrogénases sont retrouvées : (Hyh) (TK2072 à TK2069) qui correspond au Hyh-I de *P. furiosus* ; Mbh (TK2080 à TK2093) et Mbh (TK1226 à TK1214). Les premiers tests dans des milieux de culture (MA-YT complémenté avec du pyruvate, ou maltodextrine ou soufre) favorisant la production de H<sub>2</sub> ou celle de H<sub>2</sub>S ont permis de montrer par Western Blot, que MbhL et HyhL sont plus exprimées dans les conditions où la production d' H<sub>2</sub> est favorisée et à l'inverse MbhL est surexprimée quand la production d'H<sub>2</sub>S qui est favorisée (Kanai et al., 2011).

Des mutants de délétions ont été construits, tout d'abord le mutant PHY1, mutant ΔHyh. Les caractérisations physiologiques de ce mutant ont permis de montrer que le gène n'est pas essentiel à la croissance, n'est pas responsable de la production d'hydrogène comme cela avait été avancé (Ma et al., 1993, 1994), et jouerait un rôle dans la production d'alanine, en plus du recyclage de l'H<sub>2</sub> pour la synthèse de NADPH.

Deux autres mutants MHD1 (ΔmbhJKL) et MXD1 (ΔmbxJKL) ont été construits, afin de

comprendre le rôle de ces deux autres hydrogénases. L'étude physiologique du mutant MHD1 a montré une diminution de croissance dans des conditions de culture avec pyruvate et avec maltodextrine, ces deux substrats favorisent la production d'H<sub>2</sub>, et permet de conclure du rôle de cette hydrogénase dans la production d'hydrogène. Pour le mutant MXD1, les études physiologiques permettent de conclure sur son fonctionnement en présence de soufre et dans son implication dans la génération d'H<sub>2</sub>S. L'étude a permis de distinguer le rôle de ces trois (NI-Fe)-hydrogénases chez *T. kodakarensis* (Kanai et al., 2011).

Ces analyses génétiques corroborent avec les études réalisées chez *P. furiosus* (Lipscomb et al., 2011).

Des mutants de délétion ont également été construits chez *Pyrococcus furiosus*. Tout d'abord des délétions de SHI et de SHII (mutant SHI et mutant SHII), comme chez *T. kodakarensis*, ces deux hydrogénases cytoplasmiques ne sont pas indispensables à la croissance des cellules (Lipscomb et al., 2011).

Par la suite des analyses de croissance et biochimiques ont été réalisées sur les mutant SHI, SHII et le double mutant SHI /SHII (Schut et al., 2012).

L'activité des hydrogénases est suivie par la réduction du méthylviologène, qui en présence d'H<sub>2</sub> permet de suivre par coloration la consommation de l'H<sub>2</sub>. Il n'y a pas de différence d'activité chez le mutant SHII, l'activité est plus faible pour le mutant SHI et pas de détection pour le double mutant SHI/SHII. SHI est donc responsable de la majorité de l'activité oxydante de ces hydrogénases cytosoliques et confirme que la production d'hydrogène est surtout associée aux membranes (Mbh) (Schut et al., 2012).

La délétion de l'unité mbhL de Mbh, seul ou en combinant avec des délétions de SHI et /ou SHII a montré, qu'il n'y a pas de croissance en absence de soufre. Mais quand la présence de soufre est suffisante, aucun défaut de croissance n'est observé. Il n'y a pas de production d'H<sub>2</sub> détectable quand mbhL est délétée. Ces résultats confirment que Mbh est la seule enzyme à produire de l'hydrogène et qu'il n'existe pas d'alternative en absence de soufre. Un bas niveau de SHI ne peut pas compenser l'absence de Mbh pour permettre la croissance du mutant *mbhL* en absence de soufre (Schut et al., 2012). *shI* peut être délétée chez *Pyrococcus furiosus*; sans

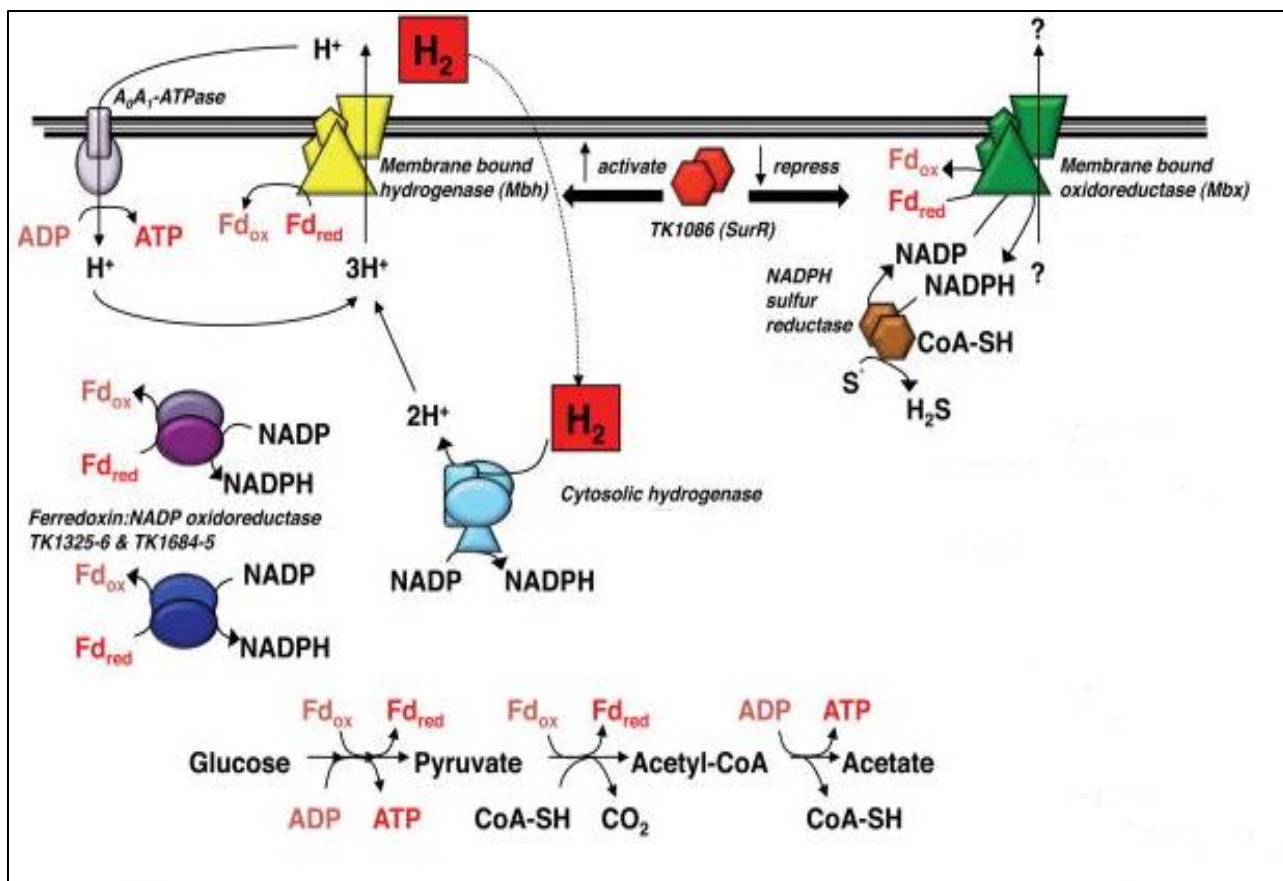
problème de croissance pour la souche. SHI n'est donc pas une enzyme essentielle.

Si l'on résume les différentes informations : L'enzyme responsable de la production de l'H<sub>2</sub> est un complexe hydrogénase lié à la membrane, appelé Mbh (McTernan et al., 2014). Mbh génère de l'hydrogène moléculaire et utilise l'énergie de cette réaction exergonique pour créer un gradient de protons de part et d'autre de la membrane. Ensuite le pompage des ions H<sup>+</sup> se fait vers l'intérieur de la cellule par l'ATP synthase (Sapra et al., 2003), permettant ainsi la synthèse d'ATP et donc la production d'énergie. Cette enzyme fonctionne en absence de soufre. Il ne semble pas exister d'autres voies métaboliques puisque les mutants de délétion de Mbh entraînent la mort cellulaire (Chou et al., 2007; Sakuraba et al., 2004).

La ferredoxine est le seul accepteur d'électrons pour l'oxydation des glucides. Par conséquent, un mécanisme de production de NADPH est également nécessaire pour produire des équivalents réducteurs pour la biosynthèse. Ainsi, deux sulfhydrogénases cytosoliques appelées SHI et SHII sont retrouvées chez les *Thermococcales* (Bryant and Adams, 1989; Ma et al., 2000). Celles-ci permettent de fournir du NADPH en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électrons.

Le génome des *Thermococcales* contient également un complexe d'oxydoréductases lié à la membrane nommé Mbx, qui présente une similarité de séquence élevée avec Mbh (homologue de Mbh) (Silva et al., 2000). Mbx réduit NADP avec la ferredoxine comme donneur d'électrons et permet la conservation d'énergie en pompant des ions H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup>. Cette enzyme fonctionne en présence de soufre (Schut et al., 2007)(**figure 12**).





**Figure 12: Métabolisme des hydrogénases**  
(Santangelo et al., 2008)

Le transfert d'électrons de l'hydrogénase Mbh (en jaune), génère de l' $H_2$ . L'activité de Mbh produit aussi un gradient de protons utilisé pour la production d'ATP. Les hydrogénases cytoplasmiques (en bleu clair) consomment l' $H_2$  et génèrent du NADPH. Mbx (en vert) prend le relais de Mbh, quand du soufre est présent. Le régulateur transcriptionnel redox SurR (en rouge), sous sa forme réduite active l'opéron Mbh.

#### IV.b.3. Influence du soufre dans le métabolisme

Le soufre est un facteur important dans la compréhension du métabolisme des hydrogénases (Schicho et al., 1993); en effet chez plusieurs *Thermococcales*, leurs enzymes sont régulées en fonction de la présence ou de l'absence de soufre dans le milieu de culture (Adams et al., 2001). Ainsi des études génétiques et physiologiques chez *T. kodakarensis* ont montré que Mbh est essentielle à la croissance en absence de soufre, ainsi que chez *P. furiosus*. Les sulfhydrogénases SHI et SHII ont également été démontrées comme sous-exprimées en présence de soufre, mais surexprimées lorsqu'il n'y a pas de soufre dans le milieu (Adams et al., 2001; Schut et al., 2007). A l'opposé, le complexe Mbx est impliqué dans la réduction du soufre, puisque la délétion du complexe impacte négativement la croissance de *P. furiosus* en

présence de soufre (Brigder et al., 2011). Les mêmes observations ont été faites chez *T. onnurineus* et cette espèce possède aussi une hydrogénase Mbh-Codh permettant l'oxydation du monoxyde de carbone (CO) pour la production d'H<sub>2</sub> (Lee et al., 2008). Il semble donc se produire en présence de soufre un phénomène de sous-régulation des hydrogénases (SHI, SHII, Mbh) et au contraire une régulation positive des gènes impliqués dans la réduction du soufre. Les résultats illustrent que Mbh et Mb<sub>x</sub>, sont deux complexes analogues dont la fonction est de réoxyder la ferredoxine réduite produit du métabolisme énergétique respectivement en absence et présence de soufre. En présence de soufre, un shift métabolique se produit, il y a utilisation de soufre élémentaire comme accepteur d'électrons, mais quand le soufre n'est plus disponible, il y a une diminution de l'expression des 3 opérons des hydrogénases Mbh, SHI, SHII, et une augmentation de Mb<sub>x</sub> et Nsr (NADPH sulfur reductase).

#### **IV.b.4. Le régulateur transcriptionnel SurR**

Un régulateur transcriptionnel redox a été caractérisé pour la première fois chez *P. furiosus* (Lipscomb et al., 2009; Schut et al., 2012, 2013a). Ce régulateur porte le nom de **SurR** (Sulfur response regulator) (Lipscomb et al., 2017; Yang et al., 2010), c'est une protéine composée de 232 acides aminés (locus PFO095) ; c'est un homodimère, chaque monomère étant composé de 3 domaines distincts. SurR est une protéine hélice/tour/hélice, avec un motif CxxC, c'est un commutateur redox contrôlant son degré d'affinité à l'ADN. Ainsi quand SurR est sous forme réduite, il est capable de se lier à l'ADN, au contraire sous forme oxydée (sous sa forme disulfide, c'est-à-dire la formation du pont disulfure entre 2 cystéines du motif CxxC), SurR ne peut s'attacher à l'ADN (**figure 13**).

SurR interviendrait dans la régulation des hydrogénases, chez *Pyrococcus furiosus*, il apparait comme conservé chez les *Thermococcales*, et il ne semble pas exister de proches homologues chez d'autres espèces (Schut et al., 2013a).

Dans son état réduit, SurR active la transcription de gènes qui codent pour les hydrogénases solubles Hyh I et II, et Mbh, ainsi que de nombreux autres gènes impliqués dans le métabolisme de l'hydrogène (Schut et al., 2007). Au même moment SurR réprime l'expression

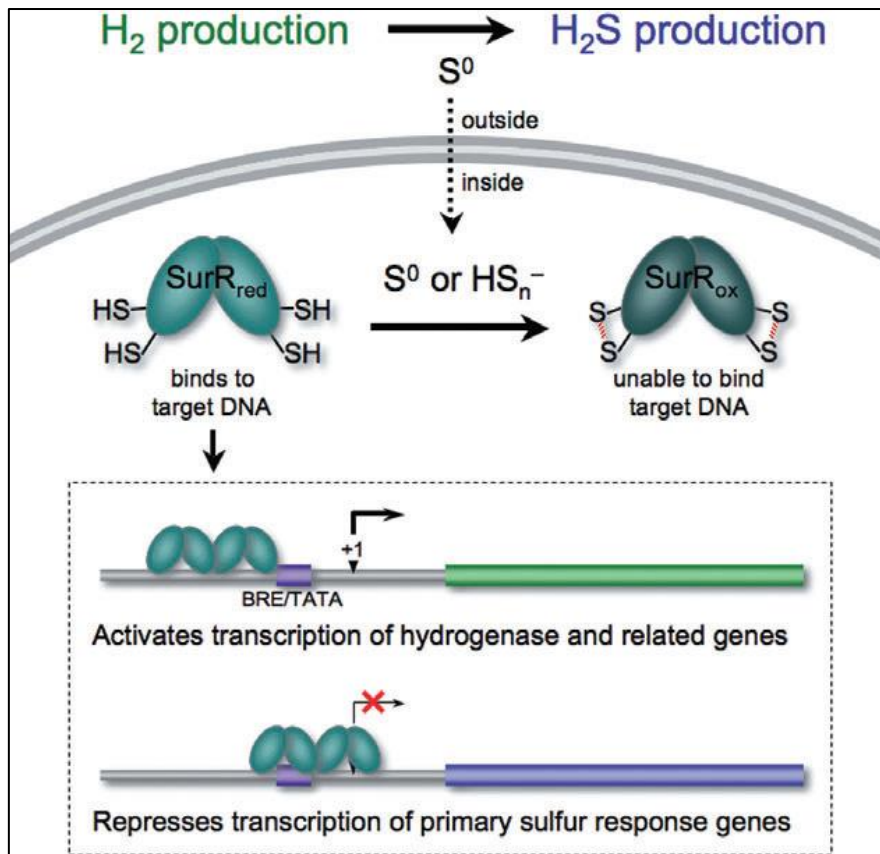
de gènes impliqués dans la réduction du soufre : Nsr (NADPH sulfur reductase), Mbx, pdo (protein disulfide oxydoreductase) (Bridger et al., 2011).

Ce changement d'état du régulateur est sous la dépendance du soufre, en effet *in vitro* le soufre inactiverait SurR via l'oxydation du motif CxxC. Cela serait possiblement dû au fait que SurR est privé de protons car le soufre se réduit et empêche indirectement SurR de se réduire. L'oxydation des résidus cystéines entraîne un changement de conformation dans le domaine d'attachement à l'ADN (Yang et al., 2010).

Au niveau des régions promotrices; ceci entraîne une modification de la régulation (activation ou repression) des gènes cibles du régulateur SurR (Lipscomb et al., 2017).

Quand du soufre est ajouté au milieu de culture pour *P. furiosus*, un changement rapide se produit, et une diminution de la production d'H<sub>2</sub> est observée, et au contraire dans le même temps, de l'H<sub>2</sub>S est produit. Ce changement est bref, puisqu'il a lieu en une dizaine de minutes. Au niveau transcriptionnel, la réponse au soufre, entraîne une diminution « dramatique » de l'expression des trois hydrogénases (Schut et al., 2007). Tandis que l'oxydoréductase Mbx, prend la place de Mbh, et est à l'origine de la production d'H<sub>2</sub>S, possiblement en lien avec un autre complexe Nsr (Bridger et al., 2011).

Ce phénomène de réponse au soufre, n'est pas un cas unique de *P. furiosus* ; puisque le même phénomène est observé chez *T. kodakarensis*, sur un milieu pyruvate et par ajout de soufre (Jäger et al., 2014).



**Figure 13: Le régulateur transcriptionnel SurR**

(Lipscomb et al., 2009; Yang et al., 2010)

**En absence de soufre, SurR est dans un état réduit (SurR<sub>red</sub>), il se lie alors à l'ADN et déclenche la transcription : activation des hydrogénases productrices d'H<sub>2</sub> probablement en recrutant l'appareil de transcription basal du promoteur, et réprime les gènes de la réponse au soufre. Mais quand du soufre est disponible, les cellules passent de la production d'H<sub>2</sub> à l'H<sub>2</sub>S, en raison de la désactivation de SurR (SurR<sub>ox</sub>) du fait d'une oxydation du régulateur par le soufre ou des polysulfures de la cellule.**

Des mutants de délétion ont été entrepris chez *T. kodakarensis* (TKsurR, TK1086), la délétion de ce gène SurR a entraîné une diminution de la croissance de *T. kodakarensis* en absence de soufre alors que la croissance en présence de soufre, reste inchangée (Santangelo et al., 2011). Avec le développement de la génétique chez *P. furiosus* (Lipscomb et al., 2011), des mutants de *surR* ont été construit afin de comprendre la régulation de l'expression des gènes sous son contrôle.

La mutation de *surR* a un effet sur la production d'hydrogène. Sans soufre on observe que les souches délétées présentent une croissance modérée et une diminution de la production d'H<sub>2</sub>, sûrement due à une perte d'activation de Mbh par SurR.

#### IV.c. Les hydrogénases chez *Thermococcus barophilus*

*T. barophilus* possède des orthologues des hydrogénases et des oxydoréductases membranaires, respectivement appelés Mbh (Membrane-bound hydrogenase) et Mbx (Membrane-bound oxydoreductase) (Vannier et al., 2011). Elle possède 7 complexes hydrogénases différents : Mbx, Mbh, Hyg 4-1, Hyg 4-II, Hyg 4-III, SulFI et SulFII.

Comme *T. onnurineus* et *T. gammatolerans*; *T. barophilus* possède la voie de la carboxydrotrophie.

Les gènes codant sept sous unités Mbx sont présentes sur le génome de la souche MP dont certaines sont codées par plusieurs gènes (Vannier et al., 2011). Les gènes codant 9 sous unités *mbh* sont présentes sur le génome de *T. barophilus* (Vannier et al., 2011).

D'autres hydrogénases sont retrouvées : une sous unité H de l'hydrogénase IV (HyDH) codée par *TERMP\_01147*, une Ni-Fe hydrogénase de type III (Hyh 3) codée par la *TERMP\_01148* et une sous unité B de l'hydrogénase IV (HyhDB). Ces Ni-Fe serviraient au recyclage de l'hydrogène et réduirait le NADPH (Ma and Adams, 2001; Silva et al., 2000).

Des gènes codant pour des homologues aux protéines de bactéries ont été retrouvées : *HypA*, *HypC*, *HypD*, *HypE* et *HypF*, elles sont impliquées dans l'insertion d'un centre Ni-Fe hydrogénases.

Les études transcriptomiques chez *T. barophilus*, ont montrés que certains gènes en rapport avec la production et la conversion d'énergie sont surexprimés suite à des variations de pression, comme la souche est piézophile cela peut s'expliquer par le fait de la nécessité d'un apport accru d'énergie pour se développer sous pression. Pour des pressions qui constituent un stress pour la souche, soit 0,1 MPa et 70 MPa, les gènes des hydrogénases et des quinones sont surexprimés. Les gènes codant pour les hydrogénases membranaires Mbh et Mbh-Codh sont surexprimés, ainsi que ceux codant pour les hydrogénases cytosoliques SHI et SHII comme nous pouvons le voir dans le tableau (d'après les résultats obtenus par Pauline Vannier) (**tableau 4**). Le gène codant pour le régulateur SurR quant à lui, a une expression inchangée en fonction de la pression (**tableau 4**).

**Tableau 4: Expression des gènes codant pour les hydrogénases de *T. barophilus*, en fonction des variations de pression**

	Nom du gène	Fonction	Moyenne d'expression		
			0,1MPa	40MPa	70MPa
<b>SHI</b>	TERMP_00067	sulfhydrogenase II subunit b	809	326	526
	TERMP_00068	sulfhydrogenase II subunit g	2 125	1 033	2 228
	TERMP_00069	sulfhydrogenase II subunit d	713	347	711
	TERMP_00070	sulfhydrogenase II subunit a	1 325	719	1 335
<b>SHII</b>	TERMP_00536	sulfhydrogenase II subunit a	5 892	940	8 752
	TERMP_00537	sulfhydrogenase II subunit d	5 886	901	9 462
	TERMP_00538	sulfhydrogenase II subunit g	8 695	2 001	11 892
	TERMP_00539	sulfhydrogenase II subunit b	6 797	1 665	10 325
<b>Mbh-Codh</b>	TERMP_01146	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B	772	201	2 339
	TERMP_01147	hydrogenase-4 component H	370	94	1 394
	TERMP_01148	Ni-Fe-hydrogenase III large subunit	1 604	551	4 980
	TERMP_01149	hypothetical protein	654	225	2 612
	TERMP_01150	hydrogenase-4 component B	699	300	2 697
<b>Mbh</b>	TERMP_01471	NADH-quinone oxidoreductase subunit I	2 911	1 636	3 859
	TERMP_01472	hypothetical protein	790	370	1 123
	TERMP_01473	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	2 450	1 264	2 988
	TERMP_01474	membrane bound hydrogenase beta (NADH dehydrogenase)	2 178	1 240	3 182
	TERMP_01475	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B	1 576	889	2 301
	TERMP_01476	hypothetical protein	764	351	1 374
	TERMP_01477	Na <sup>(+)</sup> H <sup>(+)</sup> antiporter subunit D	750	187	1 316
	TERMP_01478	hypothetical protein	978	279	1 427
	TERMP_01479	Na <sup>(+)</sup> /H <sup>(+)</sup> antiporter MnhB subunit-like protein	1 027	231	1 399
	TERMP_01480	membrane bound hydrogenase MbhE-like subunit	2 575	515	3 180
	TERMP_01481	hypothetical protein	1 621	180	1 806
	TERMP_01482	membrane bound hydrogenase MbhC-like subunit	2 650	363	2 882
	TERMP_01483	multiple resistance and pH regulation protein	1 464	100	1 276
	TERMP_01484	membrane bound hydrogenase MbhA-like subunit	728	17	515
	TERMP_01485	Fe-hydrogenase subunit beta	7 127	4 395	9 623
	TERMP_01486	membrane bound hydrogenase MbhM-like subunit	6 494	3 374	9 822

	TERMP_01487	membrane bound hydrogenase NiFe-hydrogenase large subunit 2	6 718	3 743	9 693
	TERMP_01488	energy-conserving NiFe-hydrogenase (ferredoxin) subunit beta	6 342	3 140	8 717
	TERMP_01489	membrane bound hydrogenase NiFe-hydrogenase small subunit	10 146	6 451	12 200
	TERMP_01490	membrane bound hydrogenase Mbhl-like subunit	9 205	5 982	11 669
	TERMP_01491	membrane bound hydrogenase MbhH-like subunit	9 040	5 900	11 313
	TERMP_01492	membrane bound hydrogenase MbhG-like subunit	9 518	6 611	11 737
	TERMP_01493	membrane bound hydrogenase MbhF-like subunit	7 203	4 595	8 436
	TERMP_01494	membrane bound hydrogenase MbhE-like subunit	6 661	3 465	7 819
	TERMP_01495	hypothetical protein	9 711	6 121	10 693
	TERMP_01496	membrane bound hydrogenase MbhC-like subunit	7 603	4 909	8 946
	TERMP_01497	membrane bound hydrogenase MbhB-like subunit	11 576	8 797	12 691
	TERMP_01498	membrane bound hydrogenase MbhA-like subunit	5 319	3 042	6 122
SurR	TERMP_00656	heat shock regulator	7 433	7 176	5 920
Mbx	TERMP_00853	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit I	12 121	13 002	12 998
	TERMP_00854	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit D	10 624	11 452	11 113
	TERMP_00855	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit C	7 903	9 127	8 143
	TERMP_00856	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit B	13 224	14 384	13 612
	TERMP_00857	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit H	8 623	9 945	8 916
	TERMP_00858	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit M	9 334	11 148	10 053
	TERMP_00859	PH adaptation potassium efflux system protein	9 030	10 782	10 540
	TERMP_00860	hypothetical protein	8 453	10 003	9 905
	TERMP_00861	Na(+) H(+) antiporter subunit B	7 207	8 544	8 645
	TERMP_00862	hypothetical protein	3 851	4 873	5 503
	TERMP_00863	Na(+) H(+) antiporter subunit G	9 959	11 127	11 892
	TERMP_00864	Na(+) H(+) antiporter subunit F	4 632	5 369	6 538
	TERMP_00865	Na(+) H(+) antiporter subunit E	10 968	10 963	13 011

Afin de mieux comprendre ce métabolisme de l'hydrogène chez *T. barophilus*, le rôle de ces hydrogénases et leur implication dans l'adaptation à la pression, il a été nécessaire à l'instar des travaux réalisés chez *T. kodakarensis* (Santangelo et al., 2011) ou encore chez *P. furiosus*

(Bridger et al., 2011; Lipscomb et al., 2017) de recourir à la génétique. Un outil de génétique inverse (Thiel et al., 2014) que nous détaillerons par la suite a permis l'obtention des mutants de délétions des gènes codant ces hydrogénases et la compréhension de ce métabolisme chez cette souche piézophile. Dans la prochaine partie nous aborderons le développement et l'intérêt de la génétique des archées, et nous terminerons par une présentation de l'outil génétique utilisé au laboratoire.

## **V. Etudes physiologiques par des approches de génétiques**

La biologie moléculaire regroupe un ensemble de techniques, utilisées pour les analyses biologiques des organismes vivants et la compréhension des mécanismes de la cellule à l'échelle des molécules ; identifier la fonction et/ou révéler le caractère essentiel d'un gène.

Les archées possèdent des propriétés uniques, liées à leur capacité à se développer dans des environnements extrêmes (pH, salinité, température, pression hydrostatique...)(Jarrell et al., 2011). Ces propriétés sont biologiquement et biochimiquement intéressantes, et font des archées une des plus importantes ressources pour des applications biotechnologiques et industrielles. Mais ces ressources restent encore difficiles à valoriser, et ce malgré l'ère de la génomique, de la génétique et de la biologie synthétique. La publication du génome de *Methanocaldococcus jannaschii* en 1996 (Bult et al., 1996), a marqué le début de la génomique des archées et a notamment permis d'envisager de nombreuses perspectives. Les génomes des archées sont annotés pour la majorité par les connaissances des processus chez les eucaryotes et bactéries (supposition, transfert, analogie), ce qui entraîne un fort taux de gènes pour qui les fonctions biochimiques ne sont pas assignées (fonctions non connues) ; le taux de gènes de fonctions connues n'excède pas 60% chez certaines familles comme les *Thermococcales*.

L'exploration de la physiologie des archées reste limitée par le fait du manque de connaissances sur ce troisième domaine du vivant. En particulier chez les espèces dites extrémophiles dont les conditions extrêmes de croissance, empêchent ou rendent plus difficile la mise en place ou encore l'utilisation d'outils génétiques, utilisés de manière plus routinière chez des espèces mésophiles ; et rend les marqueurs de sélection couramment utilisés dans d'autres cas,



inefficaces ici (Allers and Mevarech, 2005). Si l'on s'intéresse plus précisément aux procaryotes piézophiles hyperthermophiles notamment de type archée, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'adaptation, est actuellement limitée par le manque d'outils génétiques disponibles.

Afin de mieux comprendre la génétique chez les archées et l'intérêt de développer des outils génétiques chez ces microorganismes, nous redéfinirons plus loin ce qu'est une archée, les intérêts de mieux les connaître et les outils génétiques qui ont émergés.

### **V.a. La découverte du troisième domaine du vivant**

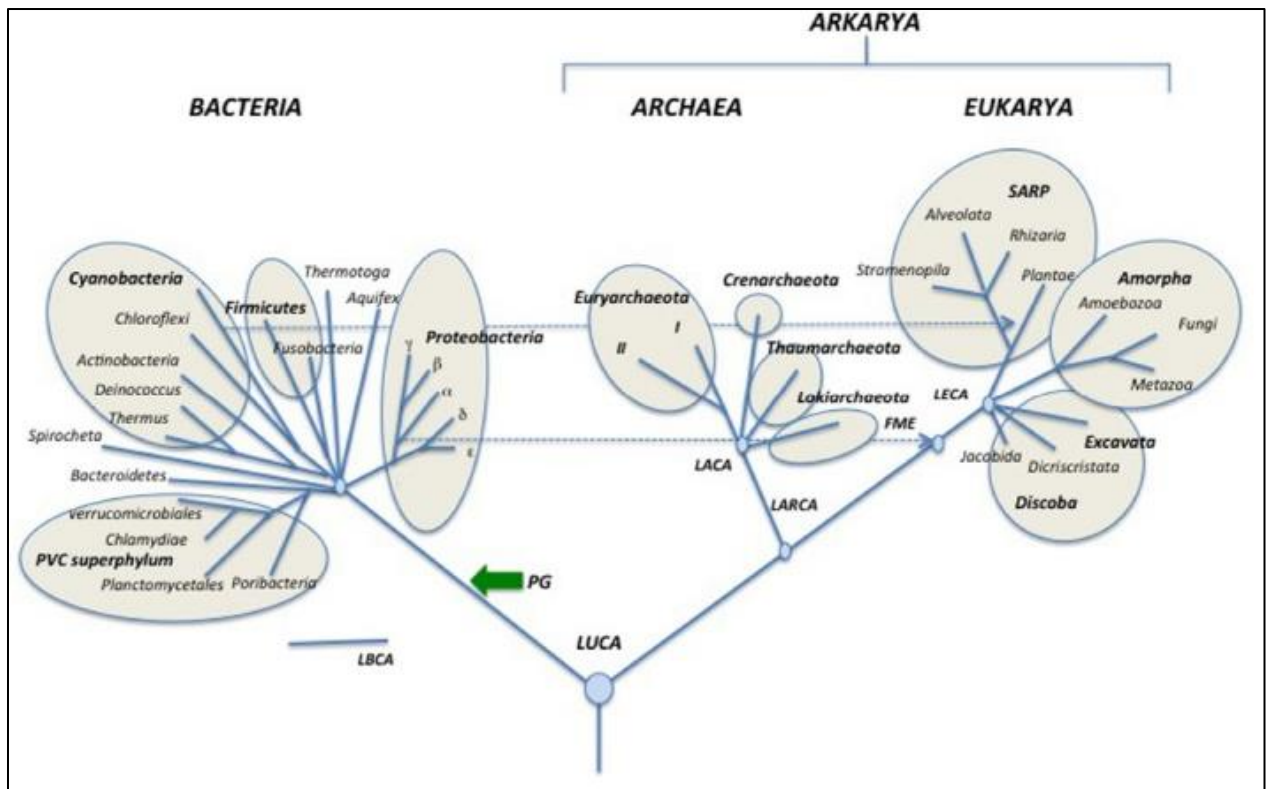
La biodiversité terrestre a fait l'objet d'une volonté constante de classification ; très rapidement les observations macroscopiques distinguent les espèces animales des végétaux. Le développement de la microscopie au 17<sup>ème</sup> siècle a ensuite permis de définir les organismes uni et pluricellulaires, puis de distinguer les cellules présentant un noyau (eucaryote) de celle qui n'en ont pas (procaryote). Mais en 1970 une découverte va bouleverser les idées reçues, en présentant le troisième domaine du vivant : les archées.

C'est en comparant les séquences de l'ARNr, molécule essentielle à la lecture du code génétique, que Carl Woese, va proposer cette hypothèse. Il base ses analyses phylogénétiques sur un caractère universel facilement identifiable : les acides nucléiques de la petite sous unité des ribosomes (Woese and Fox, 1977), en réalisant un découpage enzymatique très précis de cet ARNr. Il démontre que deux espèces eucaryotes présentent des motifs très similaires et sont donc proches phylogénétiquement, de même pour deux bactéries comparées ensemble. La théorie de la distinction entre procaryote et eucaryote va dans un premier temps être renforcée en réalisant que les motifs des bactéries et eucaryotes sont différents. Mais l'étude d'une bactérie connue pour son métabolisme original : anaérobie stricte, productrice de méthane ; va révolutionner cette classification. Il réalise son étude sur cette méthanogène, et comme prévu des différences sont notables avec les eucaryotes, mais contre toute attente, des différences sont également observées avec les autres bactéries. Cette souche constituerait donc un groupe à part, qu'il appellera dans un premier temps : « les archéobactéries » (Woese et al.,

1978). Ce terme fait référence au caractère *a priori* ancien des méthanogènes, du fait que leurs conditions de vie, semblent proches de celles qui régnaient sur la Terre primitive. Par la suite de nombreuses souches qui semblaient être des bactéries se sont révélées être des archéobacteria : halophiles (Magrum et al., 1978), thermophiles (Woese et al., 1990)... La nomenclature a évolué puisque le terme bacteria portait à confusion, les archéobacteria sont ainsi devenues les archaea. En 1980 la communauté scientifique a admis l'existence de ce troisième groupe du vivant (**figure 14**).

Les archées ressemblent morphologiquement aux bactéries, par leur taille, leur forme, leur mode de division, la formation de biofilms ; mais sont plus proche au niveau moléculaire et biochimique des eucaryotes notamment au niveau des mécanismes informationnels (réplication de l'ADN par exemple) ; cependant des caractères uniques non retrouvés au sein des deux autres groupes en font un groupe distincts (la présence d'éthers d'acide gras et non d'esters, lipides à deux têtes qui forment une monocouche lipidique) (Farkas et al., 2013).

Les archées sont omniprésentes sur Terre. Elles sont capables de se développer dans des endroits inhabituels, avec des conditions extrêmes de pression, de salinité, de température, de pH ou la combinaison de plusieurs de ces paramètres (Farkas et al., 2013). Même si toutes les archées ne sont pas extrémophiles, à l'instar des archées mésophiles vivant dans des marais, eaux usées, ou encore les sols... cependant un grand nombre de recherches sont menées sur les espèces évoluant dans des conditions flirtant avec les limites de la vie. L'intérêt est double, mettre en lumière le rôle des archées dans ces environnements, et l'utilité de leurs enzymes thermostables pour les applications industrielles.



**Figure 14: Les trois domaines du vivant**  
(Forterre, 2015)

*L'arbre universel du vivant où apparaissent les trois grands domaines : Archées, Bactéries et Eucaryotes.*

### V.b. Les intérêts des archées

L'étude des archées a plusieurs intérêts, tout d'abord la question des **origines de la vie**, puisque la découverte des archées a remis en cause le concept que les bactéries ont été les pionnières et, ont donné naissance aux eucaryotes. La comparaison des 3 domaines du vivant (Eukarya, Bacteria, Archaea) permet d'établir un portrait-robot de LUCA, qui n'est pas la première cellule mais le dernier ancêtre commun universel (Last Universal Common Ancestor), ayant donné naissance à l'ensemble des êtres vivants actuels. Mais l'origine de chaque règne à partir de LUCA n'est pas encore totalement définie. Deux scénarii ont été proposés : le premier qui propose que deux lignées ont émergé de LUCA, l'une a donné les bactéries et l'autre les archées et eucaryotes (hypothèse de Woese) et d'autres suggèrent que les eucaryotes ont émergés des archées (hypothèse eocyte)(Da Cunha et al., 2017; Lake, 2015).

Un autre intérêt, est leur **ressemblance moléculaire (réplication, transcription et traduction) avec les eucaryotes**. Dans ce cas, les archées sont des modèles biologiques

plus adaptés que les bactéries. Même si le contraire a été admis pendant longtemps, avec la mise en évidence de l'universalité du code génétique et des mécanismes de bases de la traduction, transcription et réplication. *E. coli* a été l'organisme modèle, permettant d'étudier les mécanismes moléculaires informationnels et d'extrapoler les résultats aux eucaryotes. Si certaines conclusions se sont avérées exactes, dans les années 1970 de nombreuses différences ont été mises en évidence entre la biologie moléculaire des eucaryotes et des bactéries. La biologie moléculaire des archées est très proche de celle des eucaryotes, notamment en ce qui concerne la réplication de l'ADN. Par exemple l'enzyme Spo11, ayant pour fonction la formation de cassures des doubles brins de l'ADN afin de déclencher la recombinaison méiotique, a d'abord été découverte et caractérisée chez les archées, est aussi également présente chez les eucaryotes. Cela a également été le cas pour de nombreuses protéines de la réplication, etc (Farkas et al., 2013; Luo and Wasserfallen, 2001) .

En plus de leur proximité phylogénétique avec les eucaryotes, les archées possèdent également des **enzymes inédites**, du fait notamment de la diversité de leurs lieux de vie. Par exemple pour la technique de la PCR ; l'utilisation de la pfu de *P. furiosus* (Kim et al., 2008). De nombreuses autres enzymes résistantes produites par des archées hyperthermophiles et acidophiles pourraient être exploitées pour l'industrie ou dans les biotechnologies. Ces enzymes nécessitant de fortes températures et des pH acides peuvent être utilisées dans des procédés industriels, où les enzymes classiques ne pourraient pas fonctionner. C'est par exemple le cas pour la transformation de l'amidon en sucreS par les amylases. Les enzymes issues d'archées, sont en pleine émergence et intéressent les industriels, par exemple les estérases pour l'industrie du papier, les lipases ou protéases pour les détergents, dans l'industrie du textile qui essaie de limiter les traitements chimiques. Toujours dans un souci de respect de l'environnement, et à l'heure des énergies renouvelables, ces dérivés intéressent le secteur de l'énergie : la recherche de bio-carburants, de gaz naturels comme le bio-hydrogène (Farkas et al., 2013).

Les archées sont également des **acteurs écologiques intéressants**, impliqués dans les grands cycles biogéochimiques comme les processus de nitrification, le cycle de l'azote, le cycle

du carbone. De plus elles interagissent avec d'autres organismes (symbioses). Il est également à noter qu'à ce jour, qu'aucune des archées décrites n'est pathogène (Reeve and Schleper, 2011).

Afin de comprendre la biochimie, la physiologie, les mécanismes de transcription/traduction ou encore d'adaptations (Waage et al., 2010) et les potentiels intérêts biotechnologiques, des approches génétiques sont couramment réalisées. Cependant les systèmes sont moins connus chez les archées que chez les deux autres domaines du vivant (eucaryotes et bactéries). Le développement de la génétique chez les archées doit faire face à de nombreux défis en termes de culture en laboratoire, de développement de stratégies génétiques spécifiques et de méthodes de criblages (Farkas et al., 2013).

#### V.c. Les transferts génétiques chez les archées

Des méthodes de génétiques ont été entreprises chez les quatre groupes d'archées (Rother and Metcalf, 2005) : méthanogènes (*Methanococcus* et *Methanosarcina*) (Tumbula and Whitman, 1999), Halophiles (*Halobacterium salinarum* et *Haloferax volcanii*) (Soppa, 2006), *Thermococcales* (*T. kodakarensis*, *T. onnurineus* et *T. barophilus* et chez *P. furiosus* et *P. abyssi*) ou encore chez les *Sulfolobales* (*Sulfolobus solfataricus* et *Sulfolobus acidocaldarius*) (Berkner and Lipps, 2008; Wagner et al., 2009) (Luo and Wasserfallen, 2001).

Les manipulations se font davantage chez les Euryarchées (Méthanogènes, Haloarchées et *Thermococcales*) que chez les Crenarchées (*Sulfolobales*). Pour certaines les modifications génétiques ne sont pas possibles, et ceux en dépit des informations potentielles en terme de physiologie, d'organisation du génome et de l'importance environnementale. C'est le cas pour des crenarchées, notamment des espèces *Pyrobaculum* et *Thermoproteus*, ainsi que les euryarchées des genres *Archaeoglobus* et *Thermoplasma*; ces quatre espèces sont génétiquement inaccessibles (Farkas et al., 2013).

Les manipulations génétiques sont couramment utilisées pour déterminer le rôle physiologique des gènes, déléter ou au contraire sur-exprimer un gène entraîne une réponse différente, un changement de phénotype. Les techniques de génétique se sont mises en place

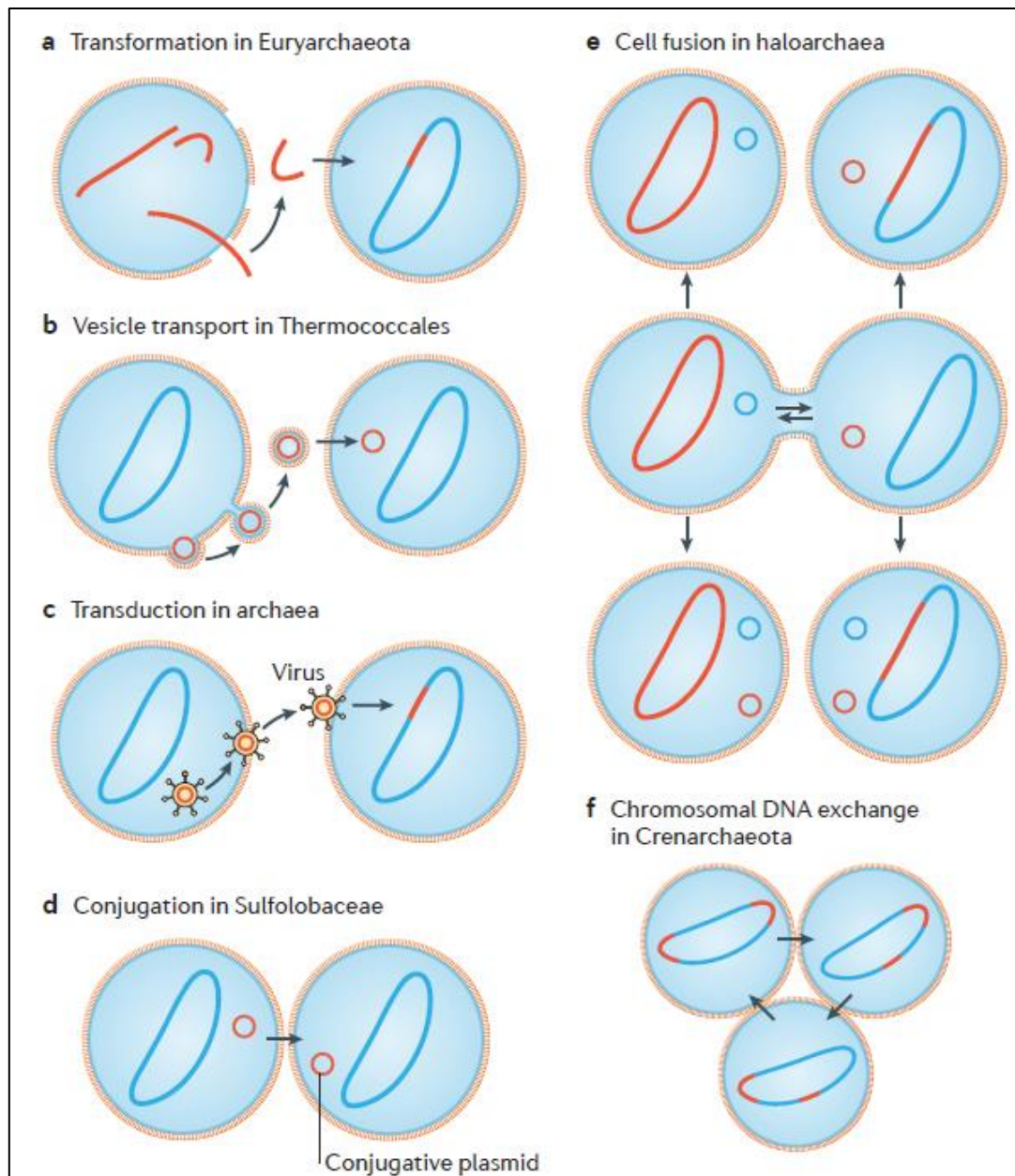
chez des archées modèles pour étudier notamment la traduction, ou encore la réplication et réparation de l'ADN, mais aussi les divisions cellulaires, les processus liés à l'ARN, certains aspects du métabolisme...(Atomi et al., 2012)

Les approches génétiques appliquées aux Euryarchées ont permis d'identifier et de mieux caractériser les gènes impliqués dans la méthanogénèse (Guss et al., 2005) et dans la fixation du carbone inorganique (Waage et al., 2010), décrypter les mécanismes d'adaptation des protéines halophiles aux fortes concentrations en potassium dans leur cytoplasme (Hutcheon et al., 2005). Chez *T. kodakarensis*, la génétique a permis d'étudier certains aspects physiologiques comme la transcription, la réplication de l'ADN, le métabolisme en général. Les expériences de génétique chez les Méthanogènes se sont davantage concentrées sur les voies de la méthanogénèse, mais aussi des études de biologie moléculaire et de physiologie des archées (transcription, osmorégulation, étude de protéines de structure). Les champs d'exploration sont dépendants des souches étudiées.

Pour les Crenarchées, des dispositifs génétiques ont été développés chez les *Sulfolobales* (She et al., 2009). Les mutants de délétion ont permis de voir le rôle des gènes *cdv* (formation de vésicules) dans la division cellulaire (Samson et al., 2008), les réponses au stress oxydatif (Maaty et al., 2009), les régulateurs de la transcription (Peeters et al., 2009; Schelert et al., 2006; Zheng et al., 2012), la formation de pilis (Fröls et al., 2008; Szabó et al., 2007).

Les transferts génétiques réalisés chez les archées sont limités, et pourtant les échanges génétiques sont fréquents chez ces microorganismes (**figure 15 et tableau 5**). De nombreux plasmides, virus, séquences d'insertion, transposons et autres éléments génétiques ou encore les éléments CRISPR, sont présents chez les archées. Les CRISPR, par exemple, sont retrouvés pratiquement dans tous les génomes d'archées, contre 40% chez les bactéries. Les halophiles et les *sulfolobales* sont connus pour avoir une abondance et une diversité importante de virus et d'éléments extra-chromosomiques. Chez les Thermophiles par exemple, on peut citer la particule virale SSV1 de *sulfolobus shibatei*. La production de cette particule virale est induite

par les radiations UV (Martin et al., 1984) et son génome à la particularité de se sur-enrouler positivement aussi bien dans les cellules de *Sulfolobus* que dans les particules virales elles-mêmes (Nadal et al., 1986). Des plasmides ont été retrouvés dans des souches couvrant toutes les branches génétiques des archées (Brown et al., 1989). Chez les archées halophiles de nombreux plasmides et bactériophages ont été isolés. Le plasmide PHH1 de *Halobacterium halobium* contient l'information génétique de la formation des vacuoles à gaz (Weidinger et al., 1979) et le plasmide pL confère l'immunité contre l'infection par le phage  $\Phi$ H de cette même souche (Schnabel, 1984). Le plasmide pHV2 (6,35 Kb) de *H. volcanii* (Charlebois et al., 1987), le plasmide pGRB-1 (1,7 Kb) de *H. halobium* utilisé pour tester l'effet de drogues agissant au niveau de la topologie de l'ADN (Forterre et al., 1989) et le bactériophage  $\Phi$ H de *H. halobium* (Gropp et al., 1989), sont parmi les mieux caractérisés. Quelques souches de Méthanogènes hébergent des plasmides ou d'autres types d'éléments extrachromosomiques. Le plasmide PME2001 (4,5 Kb) de *Mb. thermoautotrophicum Marburg* fut le premier à être mis en évidence (Meile et al., 1983). D'autres plasmides de petites tailles ont été identifiés chez des méthanogènes PURB500 (8,7 Kb) isolés à partir d'une souche mésophile marine du genre *Methanococcus* (Wood et al., 1985) et le plasmide pC2A (5,1 Kb) isolé de *Methanosarcina acetivorans* (Sowers and Gunsalus, 1988).



**Figure 15:** Les transferts génétiques chez les archées

(Wagner et al., 2017)

Différents mécanismes de transfert d'ADN ont été décrits chez les archées. Ceux-ci incluent l'absorption de l'ADN par transformation chez les membres des Euryarchaeota (a), le transport de vésicules membranaires contenant un plasmide ou un ADN viral chez des membres des Thermococcales (b), le transfert et l'incorporation d'ADN par transduction (c), le transfert de plasmides conjuguatifs entre les membres des Sulfolobaceae (d), le transfert bidirectionnel et l'incorporation d'ADN génomique et plasmidique par fusion cellulaire entre les haloarchaea (e), et l'échange bidirectionnel d'ADN chromosomique chez les crenarcheota. du système d'ADN (f).

(Possot, 1990) (Farkas et al., 2013)

**Tableau 5:** Exemple de vecteurs présents chez certaines archées

Souche	Nom de l'élément	référence
<b>Plasmides</b>		



<i>Methanococcus</i> sp. C5	PURB500	Wood <i>et al.</i> , 1985 Gardner <i>et al.</i> , 1999
<i>Methanococcus jannaschii</i>	PURB800	Zhao <i>et al.</i> , 1988
<i>Methanococcus jannaschii</i>	PURB801	Zhao <i>et al.</i> , 1988
<i>Methanococcus</i> sp. AG 86	PURB900	Zhao <i>et al.</i> , 1988
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum Marburg</i>	PURB2001	Meile <i>et al.</i> , 1983
<i>Methanolobus volcanii</i>	pMP1	Thomm <i>et al.</i> , 1983
<i>Methanosarcina acetivorans</i> sp. 2A	pC2A	Sowers et Gunsalus, 1988 Metcalf <i>et al.</i> , 1997
<i>Haloferax volcanii</i>	pKV2	Lam <i>et al.</i> , 1989
	pHK2	Holmes <i>et al.</i> , 1994 ; Holmes <i>et al.</i> , 1991
	pHV1/4 <i>oriC</i>	Norais <i>et al.</i> , 2007
	<i>oriC</i>	Norais <i>et al.</i> , 2007
<i>Halobacterium salinarum</i>	pHH1	Blaseio <i>et al.</i> , 1990
	pGRB1	Krebs <i>et al.</i> , 1991
	pNRC100	Ng <i>et al.</i> , 1993
	<i>oriC</i> et <i>orc7</i>	Berquist <i>et al.</i> , 2003
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	SSV1	Cannio <i>et al.</i> , 1998 ; Jonuscheit <i>et al.</i> , 2003 ; Soopa <i>et al.</i> , 2006
	pSSVx	Aucelli <i>et al.</i> , 2006
	<i>oriC</i>	Contursi <i>et al.</i> , 2004
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	pRN1	Berkner <i>et al.</i> , 2007
<i>Sulfolobus islandicus</i>	pRN2	Deng <i>et al.</i> , 2009
<i>Thermococcus koadakarensis</i>	pTN1	Santangelo <i>et al.</i> , 2008
<i>Pyrococcus furiosus</i>	pGT5	Wage <i>et al.</i> , 2010
	<i>oriC</i>	Farkas <i>et al.</i> , 2011
<i>Pyrococcus abyssi</i>	pGT5	Lucas <i>et al.</i> , 2011
<b>VLP (Virus Like Particle)</b>		
<i>Methanococcus voltae</i> sp. A3	PURB600/VLP	Wood <i>et al.</i> , 1989
<i>Methanococcus voltae</i> PS	VTA	Bertani, 1989
<b>Phages</b>		
<i>Methanobacter smithii</i>	PG	Bertani et Baresi, 1986
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum Marburg</i>	M1	Meile <i>et al.</i> , 1989
<i>Methanococcus</i> sp. Nov.	aucun	Zillig <i>et al.</i> 1988b

Différentes techniques de génétique sont utilisées, mais l'étape principale et commune reste la

délivrance de l'ADN exogène. La découverte du premier plasmide archéen constitue la première étape de développement d'outil génétique chez les archées (Farkas et al., 2013).

Les deux premiers systèmes génétiques développés chez les archées ont été mis en place chez une halophile (*Haloarcula hispanica*) et une méthanogène (*Methanosarcina acetivorans*).

La délivrance d'ADN chez les archées par différentes méthodes se base sur l'électroporation, la transformation chimique, la transformation par sphéroplaste, liposome ou conjugaison avec *E.coli*. Ces méthodes sont couramment utilisées (Allers and Mevarech, 2005; Dodsworth et al., 2010; Guschinskaya et al., 2016) (**tableau 6**).

(Farkas et al., 2013)

**Tableau 6: Méthodes de délivrance de l'ADN chez certaines archées**

Organism	Method	CFU/ $\mu\text{g}$ DNA	Advantages and disadvantages	References
<i>Methanococcus</i>	Natural competence	$\sim 10$	Very low efficiency, inconsistent reproducibility	20, 44
	PEG-mediated transformation	$\sim 2 \times 10^5$	High efficiency, <i>Pst</i> I-like restriction system	172
	<i>E. coli</i> conjugation	$\sim 150^b$	Easy and rapid protocol, low efficiency	44
<i>Methanosarcina</i>	Liposome-mediated transformation	$\sim 2 \times 10^8$	High efficiency, expensive	111
<i>Haloferax volcanii</i> , <i>Halobacterium salinarum</i>	PEG spheroplasting	$\sim 10^7$	Restriction systems are common	34, 35
<i>Sulfolobus solfataricus</i> , <i>S. acidocaldarius</i> , <i>S. islandicus</i>	Electroporation	$\sim 10^3-10^6$	Restriction systems are common	42, 87, 155
<i>Thermococcus kodakarensis</i> , <i>Pyrococcus furiosus</i> COM1	Natural competence	$\sim 10^2-10^5$	Easy, efficient, rapid protocol	39, 51, 52, 100, 151, 152
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638	CaCl <sub>2</sub> , heat shock	$\sim 5 \times 10^2$	Low efficiency, inconsistent reproducibility	100, 176
<i>Pyrococcus abyssi</i>	PEG spheroplasting	$10^2-10^3$	Low efficiency	102

<sup>a</sup>Abbreviations: CFU, colony-forming unit; PEG, polyethylene glycol.

<sup>b</sup>Efficiency refers to the actual number of conjugant colonies and is not related to DNA amount.

### V.c.1. La transformation

La **transformation** est la capacité des bactéries à acquérir un fragment d'ADN d'origine extérieur, l'exogène. Celui-ci est le plus souvent d'origine plasmidique ou chromosomique ; provenant d'autres bactéries ou d'autres organismes vivants, qui auraient de l'ADN dans le milieu (**tableau 7**). On distingue deux types de transformation : la **transformation artificielle**, où l'on fait rentrer de l'ADN (circulaire ou linéaire) de force dans la cellule. Certaines bactéries possèdent la capacité de prendre de l'ADN du milieu extérieur, c'est la

**compétence naturelle**, mais toutes les bactéries ne sont pas capables de le faire. Une soixantaine de bactéries sont naturellement compétentes, aucune compétence n'a été mise en évidence chez des bactéries se développant à des températures proches de 90°C (Han et al., 2014). Cependant cette capacité est retrouvée chez des archées hyperthermophiles. Certaines méthanogènes comme *M. voltae* P5, *Methanobacter thermoautotrophicum* Marburg, ou encore des *Thermococcales* comme *T. kodakarensis* ou encore *P. furiosus* COM1, sont naturellement compétentes, ce qui facilite les manipulations mais cela reste limité (Lipscomb et al., 2011). Les archées halophiles sont les premières à être manipulées génétiquement après la découverte de la technique de transformation (du fait de la facilité de la manipulation et de leur bonne vitesse de croissance) (Charlebois et al., 1987; Cline and Doolittle, 1987) et pour qui les systèmes génétiques sont les plus sophistiqués (Leigh et al., 2011). Les méthanogènes ont une composition saline très proche des cytoplasmes bactériens, ce qui a rendu possible le développement de leur génétique en s'inspirant directement des techniques et méthodes préexistantes chez les bactéries.

Une transformation a été obtenue chez *Methanococcus voltae*, *Methanobacterium*, *Haloferax volcanii*, par de l'ADN génomique libre et chez *Halobacterium* et *H. volcanii* par de l'ADN plasmidique. Doolittle et son équipe en 1987, ont réussi à mettre au point une méthode de transformation pour les archées halophiles. La transformation ou la transfection de *H. halobium* et *H. volcanii*, sous forme de sphéroplastés (Charlebois et al., 1987; Cline and Doolittle, 1987; Cline et al., 1989). Cette maîtrise du transfert de matériel génétique chez les halophiles a permis de construire et d'introduire chez *H. volcanii*, un vecteur navette dont la sélection de transfert est basée sur la résistance à la mévinoline, un inhibiteur de la 3-hydroxy-3-méthylglutarateCoA (HMG-CoA), qui est une enzyme intervenant dans la voie du mevalonate (Lam and Doolittle, 1989). En 1987, Bertani et son équipe publie pour la première fois l'obtention d'archées recombinantes méthanogènes ; après transformation par de grands fragments d'ADN génomique. Cette transformation de *M. voltae*, démontrée par des mutants d'auxotrophie His- (sans Histidine) et Pur- (sans Purine), ne fait appel à aucun traitement préalable des cellules, elles sont simplement mises en contact avec de l'ADN de type sauvage,

en milieu liquide (Bertani and Baresi, 1987). En 1988, Worrell démontre qu'une autre souche méthanogène *M. thermoautotrophicum*, peut aussi être transformée (Worrell et al., 1988). Cette transformation a été mise en évidence en utilisant des fragments d'ADN de hauts poids moléculaires du mutant résistant au 5-fluorouracile. Les fréquences de transformation de ces deux archées méthanogènes sont faibles.

Pour augmenter le nombre d'espèces modèles, qui ne sont pas naturellement compétentes, des méthodes physiques et chimiques ont été pensées. Plusieurs systèmes de transformation reposant sur des éléments génétiques naturels ont été développés utilisant des transposons, plasmides cryptiques ou encore des virus pour délivrer l'ADN, c'est le cas chez certaines *Sulfolobales*. Chez beaucoup de méthanogènes et d'halophiles, l'introduction de l'ADN repose sur une transformation médiée par un liposome ; un sphéroplaste est généré et permet la transformation par des protocoles utilisant des polyéthylène glycol (PEG) ou des liposomes. L'électroporation est une autre méthode souvent requise chez les *Sulfolobales* aérobies ou encore chez des *Thermococcales* anaérobies, un traitement chimique est souvent nécessaire pour assurer la transformation.

(Leigh et al., 2011; Luo and Wasserfallen, 2001)

**Tableau 7: Exemple de système de transformation chez les quatre groupes d'archées**

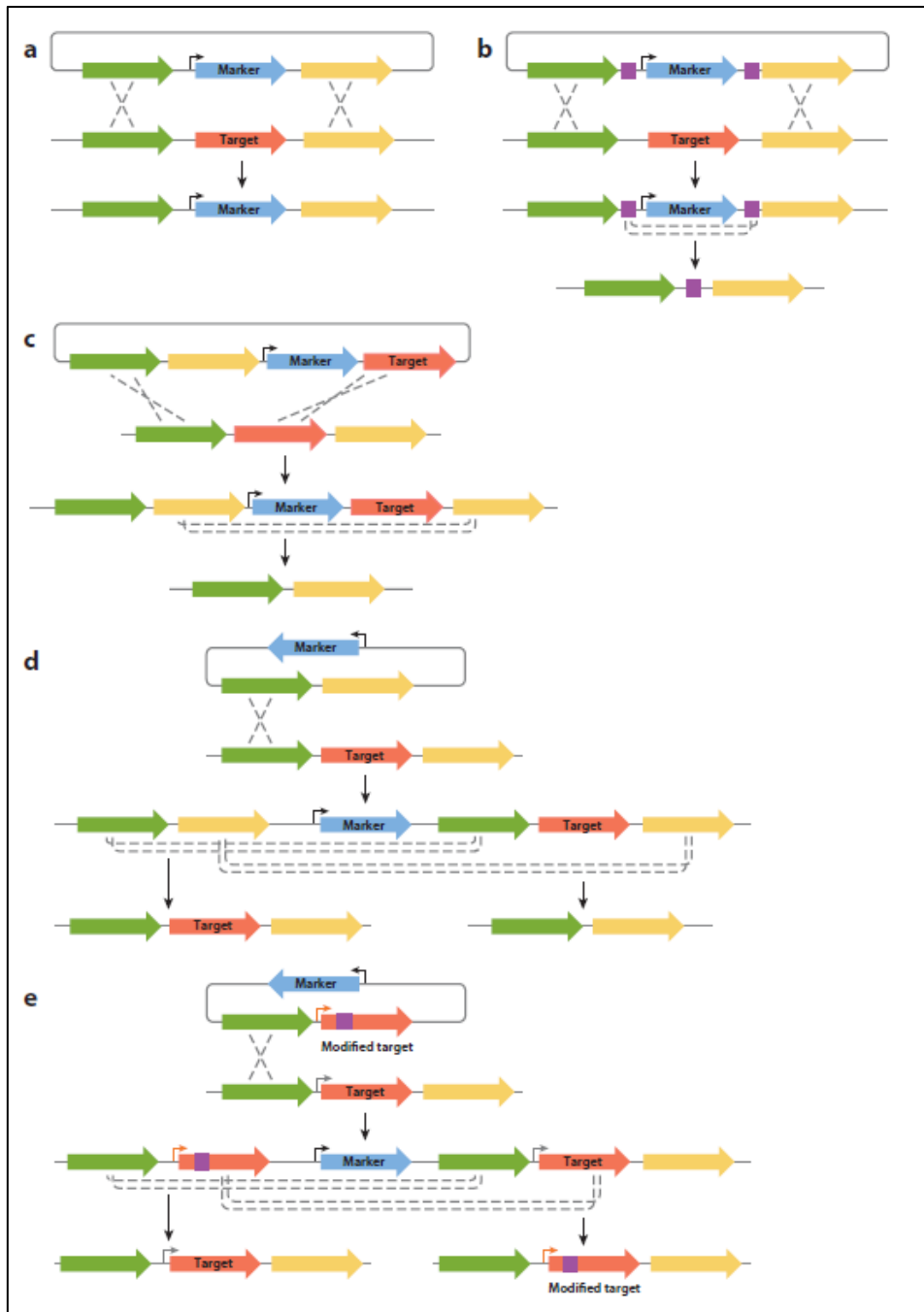
Mécanisme : transformation				
Organisme	ADN impliqué	Marqueur(s)	Méthode	Référence
<b><i>Sulfolobales</i></b>				
<i>S. solfataricus</i>	PRN1 et PRN2		Electroporation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Zillig et al., 1994</li> <li>Schelper et al., 1995</li> <li>Prangishvili et al., 1998</li> </ul>
<i>S. solfataricus</i> <i>PH1</i>	pNOB8, dérivé de PRN1	lacS	Electroporation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Elferink et al., 1996</li> <li>Zillig et al., 1996</li> </ul>
<i>S. acidocaltaricus</i>	pGT5 et son dérivé pCSV1 dérivé pGT5	ADH-alcohol deshydrogenase	CaCl <sub>2</sub> et heat shock Electroporation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aaggard et al., 1996</li> <li>Aravalli et Garrett, 1997</li> </ul>
	pCV1 et pAG	5-FOA	Electroporation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aagaard et al., 1996</li> <li>Aravalli et Garrett, 1997</li> </ul>
	pCmalLacS	5-FOA	Electroporation	Berkner et al., 2010

<i>S. solfataricus</i>	Phage SSV1		Infection, Electroporation	Schleper <i>et al.</i> , 1992
<i>S. solfataricus</i> Gθ ou <i>S. solfataricus</i> PBL2025	pEXSs	Hydromycin B résistance	Electroporation	Cannio <i>et al.</i> , 1998
	Dérivé de SSV1		Electroporation	Stedman <i>et al.</i> , 1999
	pKSDM48	lacS	Electroporation	Stedman <i>et al.</i> , 1999
	pMSS	lacS	Electroporation	Aucelli <i>et al.</i> , 2006
	pJlacS	lacS	Electroporation	Berkner <i>et al.</i> , 2007
	pMJ0503	lacS	Electroporation	Jonuscheit <i>et al.</i> , 2003
<i>S. islandicus</i> £322S	PRN2	Uracil, 5-FOA	Electroporation	Deng <i>et al.</i> , 2009
<b>Méthanogènes</b>				
<i>M. voltae</i>	ADN génomique	Auxotrophie (purine, histidine) ou Auxotrophie (HSCoM, histidine, purine), BES résistance, puromycine résistance	Transformation naturelle ou Electroporation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bertani et Ba- resi, 1987</li> <li>Micheletti <i>et al.</i>, 1991</li> </ul>
	Mip1	Puromycine résistance	Transformation naturelle ou protoplaste ou électroporation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gernhardt <i>et al.</i>, 1990</li> <li>Patel <i>et al.</i>, 1994</li> </ul>
<i>M. maripuladis</i>	pKAS102	Puromycine résistance	Transformation naturelle ou PEG-mediated transformation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sandbeck et Leigh, 1991</li> <li>Tumbula <i>et al.</i>, 1994</li> </ul>
	pDLT44	Puromycine résistance	PEG-mediated transformation	Tumbula <i>et al.</i> , 1997
<i>Methanosarcina</i> <i>sp.</i>	pWN307	Puromycine résistance	Liposome- mediated transformation	Metcalf <i>et al.</i> , 1997
<b>Thermococcales</b>				
<i>Thermococcus</i> <i>kodakarensis</i>	pLC70	Simvastine, 5- FOA, 6-MP	Transformation	Santangelo <i>et al.</i> , 2008 a, b
<i>Pyrococcus</i> <i>abyssi</i>	pYS2		PEG mediated transformation	Lucas <i>et al.</i> , 2002
<i>Pyrococcus</i> <i>furiosus</i>	pYS3	Simvastatine	Transformation	Waeger <i>et al.</i> , 2010
<i>Thermococcus</i> <i>barophilus</i>		Simvastatine, 5- FOA	Transformation	Thiel <i>et al.</i> , 2014
<b>Halophiles</b>				
<i>H. salinarum</i>	pGRB1	Mevinolin, novobiocin, uracil, 5-FOA	PEG-mediated transformation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Blaseio et Pfei- fer, 1990</li> <li>Krebs <i>et al.</i>, 1991</li> </ul>
	pHH1	Mevinolin, novobiocin,	PEG-mediated transformation	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dassarma, 1995</li> </ul>

		uracil, 5-FOA		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Berquist <i>et al.</i>, 2006</li> </ul>
	pNRC	Mevinolin, novobiocin, uracil, 5-FOA	PEG-mediated transformation	
<i>H. volcanii</i>	pHK2	Mevinolin, novobiocin, uracil, leucine, thymidine, tryptophane, 5-FOA	PEG-mediated transformation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lam et Doolittle, 1989</li> <li>• Holmes <i>et al.</i>, 1994</li> <li>• Allers <i>et al.</i>, 2004</li> <li>• Allers et Mevarech, 2005</li> <li>• Norais <i>et al.</i>, 2007</li> </ul>
	pHV2	Mevinolin, novobiocin, uracil, leucine, thymidine, tryptophane, 5-FOA	PEG-mediated transformation	
	pHV1/4	Mevinolin, novobiocin, uracil, leucine, thymidine, tryptophane, 5-FOA	PEG-mediated transformation	

Comme évoqué précédemment de nombreuses archées possèdent des éléments extrachromosomiques, e.g phages, virus et plasmides (**tableau 5**), ainsi beaucoup de vecteurs d'archées sont dérivés de plasmides endogènes.

Les vecteurs construits ne sont pas capables de réplication autonome ; et pour la plupart des outils génétiques utilisés, les vecteurs plasmidiques portent un ou deux marqueurs de sélection, en plus des régions d'homologies pour s'intégrer au locus désirés (**figure 16**). En ce qui concerne les marqueurs de sélection chez les halophiles, *Sulfolobales* et *Thermococcales*, ils sont souvent basés sur l'auxotrophie/la prototrophie à l'uracile et la sensibilité à l'acide 5-fluorotique (Farkas et al., 2013).



**Figure 16: Méthode de disruption de gène**

(Farkas et al., 2013)

a) Un événement de double recombinaison entre un plasmide et un chromosome, avec un marqueur de sélection à la place du gène cible. b) Une simple recombinaison est possible, avec de l'ADN linéaire, en plus des sites de recombinaison (mauve) peuvent être utilisés pour la contre sélection (excision du marqueur). c) Événement de double recombinaison, où le marqueur est intégré ainsi que la région d'homologie du gène à déléter. La contre sélection permet de sélectionner la suppression sans le marqueur. d) Un événement de simple recombinaison permet l'intégration du plasmide, ce qui génère une forme intermédiaire. La contre sélection permet d'obtenir une forme mutée avec excision du marqueur et du gène cible ou la forme sauvage. e) Toutes ces stratégies pourraient s'adapter avec un promoteur swap ou échange allélique. La sélection génère une forme intermédiaire avec le plasmide intégré dans le chromosome. La contre sélection permet de restaurer soit la forme sauvage ou la forme génétiquement modifiée

## **V.c.2. La conjugaison**

La conjugaison bactérienne est un mécanisme qui nécessite deux bactéries qui vont se mettre en contact direct, physique et temporaire, établir un pont entre elles pour transférer du matériel génétique. La conjugaison a été mise en évidence pour la première fois par deux scientifiques en 1946 Lederberg et Tatum (Lederberg and Tatum, 1946).

Des transferts ont été réalisés par **conjugaison** chez des Halophiles ou encore chez des *Sulfolobales* (**tableau 8**). Chez la souche *H. volcani*, une conjugaison naturelle a été observée (Mevarech and Werczberger, 1985). Elle est différente de la conjugaison connue chez les bactéries car les deux parents peuvent être à la fois donneur et receveur, et ce transfert génétique bidirectionnel est également différent de la fusion cellulaire chez les eucaryotes car il n'implique pas la fusion des cellules. Des ponts cytoplasmiques, par l'intermédiaire desquels le matériel génétique passerait d'une souche à l'autre avaient à l'époque été observé en microscopie électronique à balayage (Rosenshine et al., 1989). Ces mêmes auteurs étaient également parvenus à réaliser la fusion de protoplastes chez *H. volcanii*. Elle est différente de la conjugaison connue chez les *Sulfolobus*, des plasmides conjugatifs ont également été isolés en particulier le plasmide PNOB8 (45 Kpb) (Schleper et al., 1995; She et al., 1998; Zillig et al., 1998).

La conjugaison a été entreprise entre différentes souches et également entre différents domaines : bactérie-archée, entre la bactérie *E. coli* et des *Methanococci* (*Methanococcus maripuladis*). Ce processus est souvent moins efficace mais plus rapide. L'efficacité de cette conjugaison interdomaine est de 0,2 à  $2 \times 10^{-6}$  par cellule reverse. Le processus requiert les fonctions oriT et les gènes *tra* portés par le plasmide du donneur (Possot, 1990).

Chez *Mb. thermoautotrophicum* et *Ms. barkei*, des méthodes pour préparer les protoplastes avaient été décrites mais aucune régénération de la paroi de ces bactéries n'a été obtenue (Kiener et al., 1987).



(Luo and Wasserfallen, 2001)

**Tableau 8: Exemples de mécanismes de conjugaison chez les Sulfolobales**

Mécanisme : conjugaison				
Organisme	ADN impliqué	Marqueur(s)	Méthode	Référence
<b>Sulfolobales</b>				
<i>Sulfolobus sp.</i>	Plasmide conjugatif			<ul style="list-style-type: none"><li>• Schleper <i>et al.</i>, 1995</li><li>• Prangishvili <i>et al.</i>, 1998</li></ul>
<i>S. acidocaldarius</i>	Vecteur d'intégration basé sur de l'ADNr mobile			<ul style="list-style-type: none"><li>• Aagaard <i>et al.</i>, 1995</li><li>• Aagaard <i>et al.</i>, 1995</li></ul>
	ADN génomique	Auxotrophie		<ul style="list-style-type: none"><li>• Grogan <i>et al.</i>, 1996</li><li>• Schmidt <i>et al.</i>, 1999</li></ul>

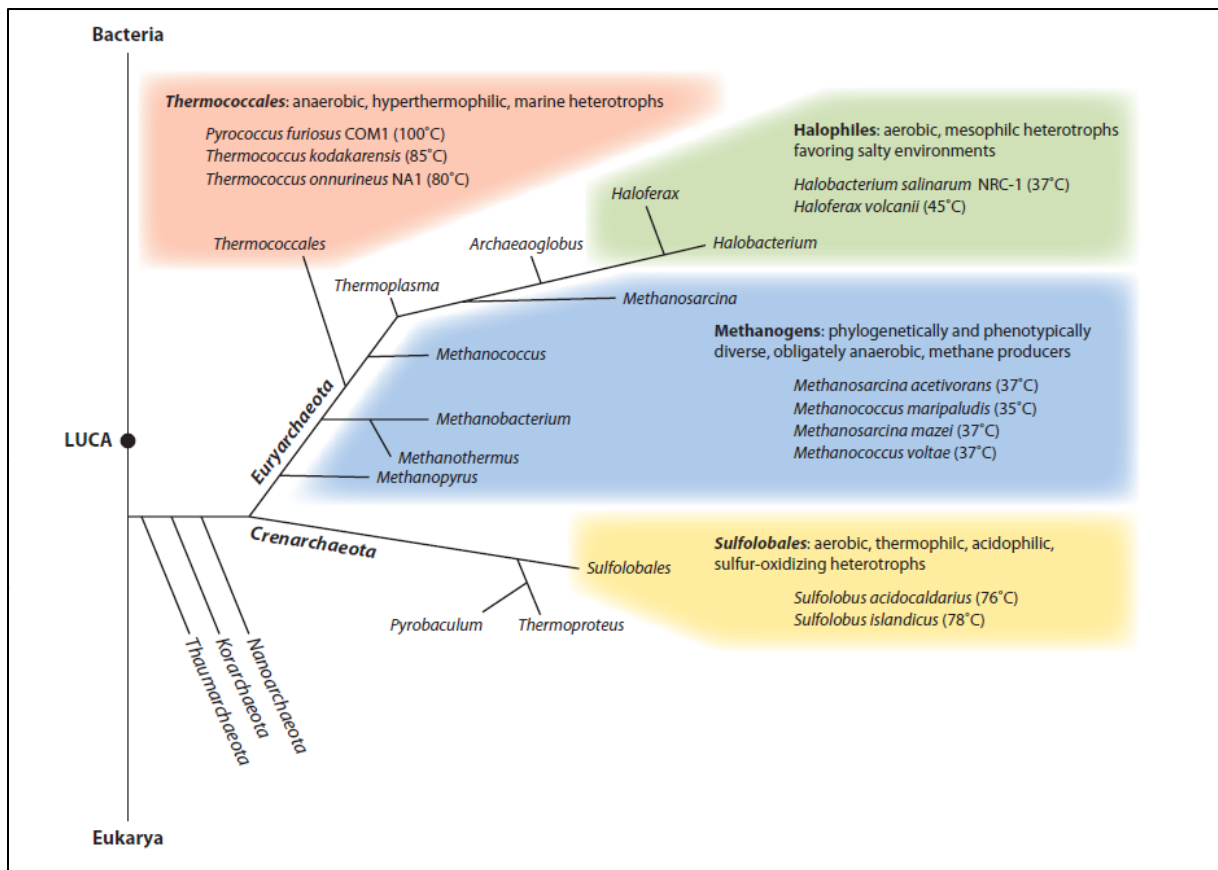
### V.c.3. La transduction

La transduction est le dernier mécanisme permettant l'apport de diversification génétique. Lederberg a donné son nom à ce mécanisme en 1951, qui fait appel à un autre type d'agent infectieux, notamment les virus. Ils vont transférer du matériel génétique d'une bactérie à une autre.

Chez le genre *Methanococcus*, la **transduction** a été décrite, chez *M. voltae* notamment. G. Bertani a identifié en 1989, un élément filtrable chez cette souche (Possot, 1990). Cette particule isométrique de 40 nm de diamètre, résistant à la DNase, appelé VTA (Voltae transfert agent) porteuse d'un fragment d'ADN de 4400 pb susceptible d'être transduit chez des sous clones de cet organisme.

### V.d. Les défis de la génétique des archées

De nombreuses barrières technologiques du fait des conditions de vie particulières des archées constituent un frein à ces études et à l'émergence d'outils génétiques (**figure 17**). Chaque groupe présente des avantages et des désavantages, en plus de la difficulté commune de culture des archées en laboratoire.



**Figure 17: Les challenges à surpasser pour étudier les archées**  
 (Farkas et al., 2013)

**Arbre phylogénétique des archées, avec les différents taxons et une description de leurs principales caractéristiques.**

Les *Thermococcales* et *sulfolobales* sont hyperthermophiles, il est donc nécessaire d'établir des milieux de sélection adaptés aux hautes températures, plus de 70°C. De plus en ce qui concerne les *Sulfolobales*, les techniques doivent tenir compte du faible pH. Pour les Méthanogènes et les *Thermococcales* c'est l'oxygène qui constitue un élément toxique, étant donné que ceux sont des souches anaérobies (Farkas et al., 2013).

Un autre challenge est de trouver des marqueurs de sélection et de contre-sélection, pour vérifier le résultat de la manipulation génétique. Les antibiotiques ont pour cibles les ribosomes bactériens ou la machinerie intervenant dans la synthèse de la membrane cellulaire (Cammarano et al., 1985; Possot et al., 1988). Le problème est que les archées sont pour la plupart résistantes aux antibiotiques utilisés en routine chez les bactéries. La thermostabilité et la volatilité des composés doivent également être prises en compte (Atomi et al., 2012; Noll

and Vargas, 1997).

Un des moyens de sélection consiste au développement de marqueurs d'auxotrophie correspondant à des souches auxotrophiques qui seront complétées par transformation (leucine, tryptophane, Thymidine, agmatine) (Allers et al., 2004; Ortenberg et al., 2000; Santangelo et al., 2010) ((**tableau 9**)). L'uracile et le 5-FoA sont utilisés comme marqueurs de sélection/contre-sélection chez de nombreuses Halophiles. Chez les Méthanogènes, des méthodes de sélection et contre-sélection sont développées en utilisant auxotrophie/prototrophie de l'Histidine, utilisant le gène *hisA* comme marqueur, ou en utilisant le 6-azauracil et 8-azahypoxanthine chez la souche *M. maripaludis*. Chez *Sulfolobus*, l'établissement de méthode de manipulation génétique utilise toujours des marqueurs de sélection, la croissance sur lactose par exemple pour *S. solfataricus* avec une souche délétée du gène *lacS* ; codant pour la  $\beta$ -galactosidase. La sélection peut aussi se faire par résistance à l'hygromycine B, butanol ou l'alcool benzyl via le gène de l'alcool déshydrogénase ou plus communément par auxotrophie à l'uracyl. Chez les *Thermococcales* comme *T. kodakarensis*, quelques marqueurs prototrophiques sont utilisés comme l'arginine/citrulline, le tryptophane, l'agmatine ou l'uracile (Atomi et al., 2012).

Une autre solution est d'utiliser des antibiotiques actifs contre la cellule (**tableau 9**). Pour les Méthanogènes, la sélection se fait via différents antibiotiques comme la puromycine et ses dérivés avec le gène (*pac*) de la bactérie *Streptomyces alboniger* (Gernhardt et al., 1990), la néomycine ou l'acide pseudomonique. Quelques archées synthétisent des lipides dérivés isopropanoïdes, utilisant la voie du mévalonate, et les statines (mévinoline, Simvastatine). La mévinoline a tout d'abord été utilisée chez les haloarchées (Lam and Doolittle, 1989; Peck et al., 2000). Aujourd'hui ces composés sont couramment utilisés pour les *Thermococcales* (*T. kodakarensis*, *P. furiosus*) (Matsumi et al., 2007; Waege et al., 2010), *Sulfolobales*. La Mévinoline et Simvastatine inhibent la coenzyme A (HMG-CoA) réductase (première étape de la biosynthèse des lipides chez les archées, elle inhibe aussi la synthèse des stérols chez les eucaryotes). La novobiocine inhibe la DNA gyrase, une drogue utile pour la sélection des

halophiles (Atomi et al., 2012).

(Atomi et al., 2012)

**Tableau 9: Exemples de méthodes de sélection et contre-sélection efficaces chez les archées**

	Marker gene	Host requirements	Medium requirements	Demonstrated in			
				H	M	S	T
<b>SELECTION CRITERION</b>							
Novobiocin resistance	<i>gyrB</i> mutant	-	-	0	-	-	-
Mevinolin/simvastatin resistance	<i>hmgR</i> overexpression	-	-	0	-	0	0
Puromycin resistance	<i>pac</i>	-	-	-	0	-	-
Neomycin resistance	APH3'III	-	-	-	0	-	-
Hygromycin B resistance	Thermostable <i>hph</i> mutant	-	-	-	-	0	-
Butanol/benzyl alcohol resistance	<i>adh</i>	-	-	-	-	0	0
Uracil prototrophy	<i>pyrE</i> , <i>pyrF</i>	<i>pyrE</i> <sup>-</sup> , <i>pyrF</i> <sup>-</sup> , <i>upp</i> <sup>+</sup>	Pyrimidine-free	0	-	0	0
Leucine prototrophy	<i>leuB</i>	<i>leuB</i> <sup>-</sup>	Leucine-free	0	-	-	-
Tryptophan prototrophy	<i>trpE</i> , <i>trpAB</i>	<i>trpE</i> <sup>-</sup> , <i>trpAB</i> <sup>-</sup>	Tryptophan-free	0	-	-	0
Histidine prototrophy	<i>hisA</i>	<i>hisA</i> <sup>-</sup>	Histidine-free	-	0	-	-
Lactose prototrophy	<i>lacS</i>	<i>lacS</i> <sup>-</sup>	Lactose as major carbon/energy source	-	-	0	-
Agmatine prototrophy	<i>pdaD</i>	<i>pdaD</i> <sup>-</sup>	Applicable with tryptone/yeast extract	-	-	-	0
<b>COUNTERSELECTION CRITERION</b>							
5-Fluoroorotic acid resistance	<i>pyrE</i> , <i>pyrF</i>	<i>pyrE</i> <sup>-</sup> , <i>pyrF</i> <sup>-</sup>	-	0	-	0	0
6-Azauracil/8-azahypoxanthine/8-aza-2,6-diaminopurine resistance	<i>hpt</i>	Resistant w/o <i>hpt</i>	-	-	0	-	-
6-Methylpurine resistance	<i>hpt</i>	Resistant w/o <i>hpt</i>	-	-	-	-	0

*H*, halophiles; *M*, methanogens; *S*, *Sulfolobus*; *T*, *Thermococcales*. Details are described in the text and referred publications.

### V.e. L'outil génétique développé chez *Thermococcus barophilus*

Les gènes constituent une source d'information, il est donc nécessaire d'avoir des outils génétiques pour les caractériser et étudier leurs fonctions cellulaires et physiologiques. Parmi ces outils, la génétique inverse permet de mesurer les effets de la délétion d'un ou plusieurs gènes sur la physiologie de l'organisme. Déleter des gènes a permis plusieurs études : rôles de facteurs de transcription, protéines impliquées dans l'initiation de la réplication, l'élongation de l'ADN, enzymes métaboliques, les hydrogénases, et enzymes impliquées dans la méthanogénèse, les études sur les protéines des histones et de la chromatine, recombinaison et réparation de l'ADN, assemblage et mobilité des flagelles, modification de la surface cellulaire, modification des ARNt...(Luo and Wasserfallen, 2001)

Depuis 2013, le LM2E dispose d'un système génétique pour son organisme modèle *T.*

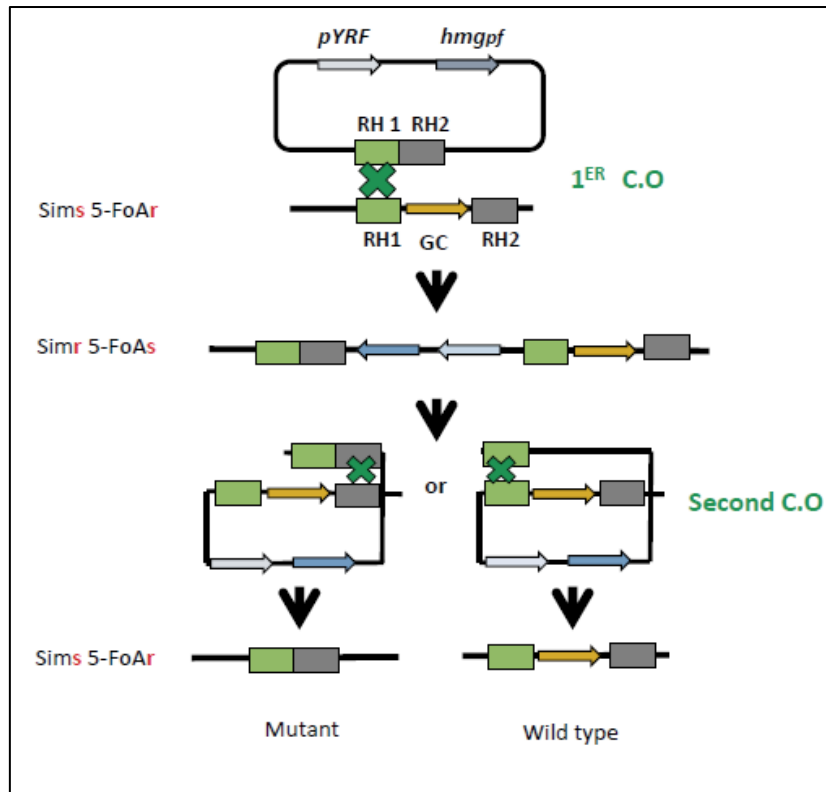
*barophilus* MP (Thiel et al., 2014).

Cet outil permet de déléter un ou plusieurs gènes cibles par recombinaison homologue à l'aide d'un plasmide intégratif (non réplcatif) et peut être utilisé pour l'étude des gènes d'adaptation aux HPH. *T. barophilus* est un bon organisme modèle pour des approches de génétique, du fait de ces nombreuses propriétés et avantages : sa capacité à se développer à pression atmosphérique, le fait qu'elle soit cultivable au laboratoire, et que son génome soit entièrement séquencé (Vannier et al., 2011).

La mise en place de cet outil a été inspirée par les recherches en génétique menées chez *T. kodakarensis* (Atomi et al., 2004; Morikawa et al., 1994) (Hileman and Santangelo, 2012; Sato et al., 2003).

Le principe de l'outil génétique est celui de la double recombinaison homologue : une première recombinaison permet l'intégration du plasmide dans le génome de *T. barophilus*, et la deuxième, l'excision de celui-ci (**figure 18**) (Thiel et al., 2014).

Le plasmide intégratif comprend les marqueurs de sélection suivants : le gène *hmg<sub>pf</sub>* codant pour la HMG-CoA (Santangelo et al., 2008) apportant la résistance à l'antibiotique Simvastatine qui est utilisé comme marqueur de sélection positif lors de la première recombinaison ; le gène *pyrF* (voie de l'auxotrophie à l'uracile) qui est responsable d'une sensibilité au 5-FOA (acide fluoorotique) et qui sert de marqueur de sélection négatif pour le deuxième événement de recombinaison. Ce plasmide porte également une région issue de la fusion des deux régions d'ADN qui encadrent le gène cible que l'on souhaite déléter. A la fin des deux « crossing over », deux possibilités de configuration sont possibles : (1) la forme ne possédant plus le gène cible, et (2) la configuration sauvage. Toutes les deux sont Simvastatine sensible et 5-FOA résistant. Bien que l'outil ait permis la délétion de plusieurs gènes, le problème majeur réside dans la faible sensibilité de la souche au 5-FOA apporté par le gène *pyrF*, qui entraîne une absence de contre sélection ; se manifestant par l'apparition d'une troisième configuration à la fin de la seconde étape de recombinaison : des souches doublement résistantes, puisqu'elles possèdent le plasmide dans leur génome. Elles sont appelées « faux positifs », et leur origine reste à ce jour non élucidée.



**Figure 18:** Schéma du principe de l'outil génétique chez *T. barophilus* (Thiel et al., 2014)

*Sim<sub>r</sub>* : Simvastatine résistant, *Sim<sub>s</sub>* : Simvastatine sensible, *5-FoA<sub>r</sub>* : 5-FoA résistant, *5-FoA<sub>s</sub>* : 5-FoA sensible, *RH* : région d'homologie, *PyrF* : gène de sélection au 5-FoA, *hmg<sub>pr</sub>* : gène de sélection à la Simvastatine, *GC* : gène cible, *C.O* : crossing over

## VI. Objectifs de la thèse

Au laboratoire, l'archée *T. barophilus* est un modèle étudié depuis une dizaine d'années, notamment afin de comprendre l'adaptation de la souche aux hautes pressions hydrostatiques. Des études transcriptomiques ont récemment montré une sur-expression de certains gènes corrélée à des variations de pression, notamment les hydrogénases (Vannier et al., 2015). Ce qui suppose une possible implication de ces hydrogénases dans l'adaptation de *T. barophilus* aux HPH.

Afin d'étudier ces hydrogénases, de comprendre leur fonctionnement, et leur rôle dans le mécanisme adaptatif de *T. barophilus* sous pression, des mutants de délétion ont été construits. Pour cela un outil génétique précédemment décrit, a été développé au laboratoire. Bien que l'outil ait été utilisé pour des expériences de délétion des gènes, celui-ci présente un défaut de sensibilité du marqueur de contre-sélection.

Le premier objectif de la thèse a donc été de travailler sur l'amélioration de l'outil génétique, dans le but de diminuer ces faux positifs liés au 5-FoA.

Un nouveau système de contre-sélection a donc été pensé et développé, en utilisant un nouveau marqueur : la 6-méthylpurine (6-MP). Les résultats de cette première étude sont présentés dans le chapitre 1.

*T. barophilus*, cultivée à des pressions inférieures et supérieures (0,1 et 70 MPa) à sa pression optimale, sur-exprime des clusters de gènes codant pour les hydrogénases membranaires et cytoplasmiques, et ceci en présence de soufre. Le facteur soufre doit être pris en compte et a son importance, puisqu'il intervient dans le métabolisme des hydrogénases. Son absence favorise celles qui produisent de l'H<sub>2</sub>, sa présence celles impliquées dans la production de l'H<sub>2</sub>S. Dans ces études transcriptomiques, le soufre pourtant présent dans le milieu de culture, ne semble pas avoir d'effet sur l'expression des hydrogénases, puisque en condition de stress pression, même les hydrogénases qui ne devraient pas être activées en sa présence, sont sur-exprimées.

Ainsi une fois l'outil amélioré, nous avons pu l'utiliser afin de répondre à nos problématiques : comment fonctionne le métabolisme de l'hydrogène chez *T. barophilus* ? Le fonctionnement et le rôle des hydrogénases sont-ils identiques aux hydrogénases des autres *Thermococcales* ? Quel est l'importance du soufre dans ce métabolisme ? Les hydrogénases ont-elles un rôle dans l'adaptation de *T. barophilus* aux HPH ?

Nous avons donc construits les mutants hydrogénases. Les résultats de l'obtention des mutants de délétion sont présentés dans la première partie du chapitre 2.

Une fois les principaux mutants obtenus, nous avons entrepris une caractérisation de ceux-ci afin de vérifier le fonctionnement de la souche sans ces gènes. Deux approches ont été choisies: tout d'abord, des cultures sous pression dans des incubateurs de hautes pressions et hautes températures (0,1, 40 et 70 MPa) à la fois en présence et en absence de soufre. Ce qui nous a permis de voir les effets de la délétion de gènes sur la croissance de *T. barophilus*, et d'étudier le facteur soufre, mais également le facteur pression, la combinaison de ces deux facteurs, et leur influence sur le métabolisme des hydrogénases chez *T. barophilus*. Dans un deuxième

temps toujours dans le but de caractériser ces mutants, de comprendre le rôle et le fonctionnement des gènes, des dosages de l'hydrogène ont été réalisés par chromatographie en phase gazeuse. Les résultats de ces manipulations sont présentés dans la seconde partie du chapitre 2.



# Matériel et Méthodes

## I. Outil génétique

### I.a. Matériel biologique

***Thermococcus barophilus* MP (T.b)** est une archée isolée d'un fragment de cheminée hydrothermale du site Snakepit (39.827170° ; 75.454690°), à une profondeur de 3550 m, sur la ride médio-Atlantique lors de la campagne MAR93 (Marteinsson et al., 1999a). Ce sont des coques de 0,8-2 µm de diamètre mobiles, avec pour optimum de croissance une température de 85°C, une pression de 40 MPa, un pH de 7 et une concentration en sel aux alentours de 20-30 g/L.

La souche type de *T. barophilus* MP sauvage a permis à l'aide de l'outil génétique (Thiel et al., 2014) de construire un certain nombre de mutants (**tableau 10**). La liste de ces mutants est présentée dans le tableau ci-dessous.

La souche utilisée au cours de cette thèse est *T. barophilus*  $\Delta$ TERMP\_00517 qui dérive de la souche sauvage. Le gène TERMP\_00517 est homologue au gène TKO064 qui code pour l'hypoxanthine transferase responsable de la sensibilité au 6-MP chez *T. kodakarensis* (Santangelo et al., 2012). Cette dernière correspond à la souche *T. barophilus* transformée par délétion du gène  $\Delta$ TERMP\_00517, qui présente 80% d'analogie avec le gène TKO064 (gène de sensibilité à la 6-MP). Nous décrirons cette souche et son utilisation lors de la partie sur l'amélioration de l'outil génétique.

**Tableau 10: Tableau récapitulatif des souches de l'étude**

Souche	Souche parent	Génotype	Région(s) génomique(s) délétée(s)	Chapitre de référence
--------	---------------	----------	---	--------------------------

<i>Thermococcus barophilus</i> MP UBOCC-M-3203		Wild type		Amélioration de l'outil génétique
Tb $\Delta$ TERMP_00517 UBOCC-M-3300	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant $\Delta$ TK0664 $\Delta$ TERMP_00517	Amélioration de l'outil génétique
Tb $\Delta$ TERMP_00517 + pUPH1 UBOCC-M-3301	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant TK0664 $\Delta$ TERMP_00517	Amélioration de l'outil génétique
Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ Mbh	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant $\Delta$ TERMP_01471 to $\Delta$ TERMP_01498	Utilisation de l'outil génétique
Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ Co-Mbh	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant $\Delta$ TERMP_01146 to $\Delta$ TERMP_01150	Utilisation de l'outil génétique + caractérisation des mutants
Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ Mbx	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant $\Delta$ TERMP_00853 to $\Delta$ TERMP_00865	Utilisation de l'outil génétique + caractérisation des mutants

Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ SHI	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant  <i><math>\Delta</math>TERMP_00067</i> to <i><math>\Delta</math>TERMP_00070</i>	Utilisation de l'outil génétique + caractérisation des mutants
Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ SHII	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant  <i><math>\Delta</math>TERMP_00536</i> to <i><math>\Delta</math>TERMP_00539</i>	Utilisation de l'outil génétique + caractérisation des mutants
Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ SurR	<i>Thermococcus barophilus</i> MP	T.b muté	Simple mutant  <i><math>\Delta</math>TERMP_00656</i>	Utilisation de l'outil génétique
Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ Mbh/ $\Delta$ Co-Mbh	Tb $\Delta$ TERMP_00517 $\Delta$ Mbh  $\Delta$ Co-Mbh	T.b muté	Double mutant  <i><math>\Delta</math>TERMP_01471 à <math>\Delta</math>TERMP_01498</i>  <i><math>\Delta</math>TERMP_01146 à <math>\Delta</math>TERMP_01150</i>	Utilisation de l'outil génétique

***Thermococcus kodakarensis* (T.k)**, est une archée isolée d'échantillon issu d'un solfatare de surface sur l'île Kodara au large du Japon. Initialement décrite comme appartenant au genre *Pyrococcus* (Morikawa et al., 1994), des études réalisées en 2004 ont permis une reclassification de la souche dans le genre *Thermococcus* (Atomi et al., 2004). Cette archée hyperthermophile a un optimum de croissance à 85°C, à un pH de 6,5 et à faible pression

hydrostatique. (UBOCC-3205).

La souche **d'*Escherichia coli* DH5α** (Stratagene) a été utilisée pour la création des plasmides. Ce sont des cellules compétentes qui ont donc la capacité d'intégrer les plasmides.

## **I.b. Milieu de culture**

### **I.b.1. Milieu TRM**

Le milieu de culture principalement utilisé lors de cette étude est le **milieu TRM** (*Thermococcales Rich Medium*) (Zeng et al., 2009). Sa composition pour 1 L d'eau déminéralisée est de 23 g de NaCl, 5 g de MgCl<sub>2</sub>, 3,3 g de PIPES, 4 g de Tryptone, 1 g d'extrait de levure, 0,7 g de KCl, 0,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,05 g de NaBr, 0,01 g de SrCl<sub>2</sub>, 2 gouttes de Résazurine 1% qui est l'indicateur coloré pour vérifier l'absence d'oxygène, le pH est ajusté à 6,6-6,7.

Le milieu de culture est ensuite transféré dans un flacon Schott de 1L, et autoclavé 20 mn à 121°C. Après refroidissement du milieu, 1 ml des composés suivants est ajouté stérilement :

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5%, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2%, Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (10 mM), FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (25 mM).

Le milieu est réparti dans des fioles Pénicillines stériles de 50 ou 100 mL, le soufre élémentaire Tyndallisé est rajouté (2g/L). Les fioles sont fermées hermétiquement (bouchons stériles) puis des vides-gaz sont réalisés à l'aide d'une rampe à gaz. Lors de cette étape l'oxygène est remplacé par un gaz inerte, le diazote N<sub>2</sub>. Ensuite la phase liquide est réduite par le Na<sub>2</sub>S 5% (0,1% en concentration finale) afin d'éliminer l'oxygène présent.

Après transformation, les transformants sont étalés sur milieu TRM solide. La solidification du milieu se fait par l'ajout de Phytigel (Sigma) à une concentration de 10 g/L de milieu.

Lors de la transformation, le milieu TRM est supplémenté par différentes substances : la Simvastatine à 2,5 µg/mL (Sigma) (milieu solide et liquide), qui est un inhibiteur de l'enzyme HMG-CoA catalysant la première étape de biosynthèse des lipides chez les archées, de

l'antibiotique 6-MP ou 6-méthylpurine (Sigma) qui sera décrit par la suite (utilisé de 0 à 250  $\mu\text{M}$  dans le milieu de culture liquide ou solide) ou le 5-FOA à 8 mg/mL (Euromedex) (milieu solide uniquement).

### **I.b.2. Milieu LB**

Des souches d'*E. coli* DH5 $\alpha$ , sont utilisées pour les manipulations de l'ADN et ces cultures sont réalisées sur milieu LB (liquide ou solide) à 37°C. La présence du plasmide est vérifiée par l'ajout de 100  $\mu\text{g/mL}$  d'Ampicilline et d'IPTG dans le milieu. La composition du milieu **LB** (Luria-Bertani) (Bertani, 1951) pour 1 L d'eau déminéralisée est de 5 g d'extrait de levure, 10 g de tryptone, 10 g de NaCl. Pour un milieu de LB gélosé de l'agar bactériologique est rajouté à hauteur de 1%.

## **I.c. Construction des plasmides**

### **I.c.1. pUPH**

Ce plasmide est construit par digestion/ligation. Le plasmide (plasmide pUFH (Thiel et al., 2014) et l'insert (*TKO664*) sont digérés par les enzymes de restriction XhoI (sites de restriction : C/TCGAG ; GAGCT/C ; 2H à 37°C) et SmaI (Sites de restriction : CCC/GGG ; GGG/CCC ; à 25°C sur la nuit).

Après chaque étape de digestion, une vérification sur gel d'agarose 0,9% et une purification sur colonne afin d'éliminer les tampons respectifs des deux enzymes sont réalisées.

La ligation des produits digérés (plasmide et insert) est effectuée à température ambiante sur la nuit (T4, DNA ligase, promega). Le plasmide obtenu est nommé pUPH1.

L'étape suivante est la transformation par choc thermique d'*E. coli* (DH5 $\alpha$  compétentes conservées à -80°C) par pUPH1 : une incubation de 30 min à 4°C (glace), puis une induction de 5 min à 37°C, et une incubation de 10 min à 4°C. Puis 1 mL de LB liquide est ajouté dans chaque tube, suivi d'une incubation de ceux-ci 1 h à 37°C, suivi d'une centrifugation de 5 min à 5000 *g*. Le culot cellulaire obtenu est resuspendu dans 100  $\mu\text{L}$  de LB puis 50  $\mu\text{L}$  est déposé

sur des milieux LB solides complétés en Ampicilline et IPTG (100 µg/mL). Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant la nuit.

Le lendemain, 10 colonies/boîtes sont striées sur milieu LB agar complété avec de l'Ampicilline (Ampi) et de l'IPTG (100 µg/mL), puis incubé à 37°C pendant la nuit.

Pour les cinq premières colonies sélectionnées, une PCR est réalisée directement sur colonie : pour chacune des stries, le bâtonnet en bois utilisé est plongé dans un tube PCR contenant 100 µL d'eau stérile. Ensuite, les tubes PCR sont placés à 95°C pendant 10 min (thermocycleur) afin de lyser les cellules. Les tubes sont préparés selon le protocole suivant : 5 µL de colonies, 33,5 µL d'eau, 10 µL de tampon goTaq 5X, 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL d'amorces sens *TK0664*, 0,5 µL d'amorces antisens *TK0664* (*TK0664* up: AAA AAA CTC GAG CCC GTC CA AGC TAC CAC TCC C (20 µM); *TK0664* do: AAA AAA CCC GGC TTC AAA ACC CAG CCA AAC AAC ACC C (20µM)) et 0,5 µL de goTaq (5 U/µL). Les tubes sont homogénéisés et une PCR est réalisée (thermocycleur : 94°C 5 min (30 cycles), 94°C 40 sec, 52°C 40 sec, 72°C 2 min, 72°C 5 min, 4°C). Les produits PCR sont révélés sur gel d'électrophorèse 0,9%, pour vérifier que l'insert *TK0664* est bien présent dans le plasmide construit. La migration s'est faite à 90 V pendant 30 min.

Après vérification de la présence ou l'absence du plasmide dans nos colonies par PCR, une strie contenant bien notre plasmide d'intérêt est utilisée pour ensemençer 5 mL de LB + Ampicilline (100 µg/mL). Après incubation à 37°C sous agitation à 250 RPM pendant la nuit, une extraction plasmidique est réalisée, et les tubes contenant les cultures d'*E. coli* avec le plasmide à extraire sont centrifugés 6 min à 6000 xg. Le culot cellulaire est resuspendu avec 250 µL de solution de resuspension et transférés dans un eppendorf. Ensuite en utilisant le kit d'extraction plasmidique (kit, geneJET, ThermoFischer), le plasmide pUPH1 est extrait, en utilisant le protocole suivant : dans chaque tube 250 µL de solution de lyse sont ajoutés, les tubes sont mélangés par inversion des tubes 5 à 6 fois. 350 µL de solution de neutralisation sont ajoutés, les tubes sont mélangés par inversions répétées du tube 4-6 fois. Les tubes sont ensuite centrifugés 5 min à 12000 g. Le surnageant est transféré dans une colonne (kit, geneJET,

ThermoFisher). Les colonnes sont centrifugés 1 min à 12000 g, puis deux lavages avec 500 µL de tampon de lavage sont réalisés (centrifugation 1 min, 12000 g). Les colonnes ont ensuite été centrifugées à vide pour enlever toute trace d'éthanol (3 min, 12000 g). Puis la colonne est placée dans un tube propre, 100 µL d'eau stérile sont ajoutés et après 2 min, une centrifugation de 2 min à 12000 g a été réalisée. Les préparations sont vérifiées sur un gel d'agarose à 0,9%. Les tubes contenant le plasmide sont conservés à -20°C.

## I.c.2 Liste des plasmides construits

La délétion de gènes avec l'outil génétique précédemment décrit nécessite l'utilisation du plasmide pUPH dans lequel sont insérées les régions flanquantes du gène cible. Pour cela, dans un premier temps, deux PCR ont été réalisées afin d'amplifier les régions flanquantes dans le génome de *T. barophilus*. La composition du mix PCR, pour chaque échantillon, est la suivante : 41,5 µL d'eau, 5 µL de tampon 10X, 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL d'amorce sens (20 mM), 0,5 µL d'amorce antisens (20 mM), 0,5 µL de Taq PFU (5 U/mL) et 1 µL d'ADN matrice. Le programme d'amplification utilisé est 5 min à 94°C, puis 30 cycles comprenant 1 min à 94°C, 1min à 55°C, 2 min 30 à 72°C puis 72°C pendant 7 min et 4°C en température finale (**tableau 11**).

**Tableau 11: Liste des amorces**

Hydrogénases	Séquence (5'-3')	Tm (°C)
Co_Mbh_1Up	AAAAAAGGTACCCAACCTCCGGGCTTTTGCT GAGTAA	61
Co_Mbh_1Do	TTTGGGTGAACAGCAGAGCCAGTTTTTCTTT TGATGAAATTTGTTATTC	60
Co_Mbh_2Up	AGAAAAAAGTGGCTCTGCTGTTCCACCAAATT TTTCTTAATTTGTCTTG	60
Co_Mbh_2Do	AAAAAAAGATCTCACGAAATGAAAAGCTTGC GGAGGAAA	61
Mbh_1Up	AAAAAAGGTACCATAAGAATCTTGCCATAAGG GC	55
Mbh_1Do	CAAATCAAGAGATGAGGTGAGAAAACCTTCC GCTTTAAGTTTCTTTTATAATAA	54
Mbh_2Up	TTATTATAAAAAGAACTTAAAGCGGAAAGTT TTCTCACCTCATCTCTGATTG	53
Mbh_2Do	AAAAAAAGATCTTTCTGCAAGCTCAATAGCT TC	54
SHI_1Up	AAAAAAGGTACCGGCTCTCTGGAGTTGGAA CCCTCT	65
SHI_1Do	GAGAAATTTGAATAGACGGGATCATCACCCG AAAGATTGCTTCTC	60
SHI_2Up	ATCTTTCCGGTGATGATCCCGTCTATTCAAAAT TTCTCTATCTATTTTGTAAATC	57
SHI_2Do	AAAAAAAGATCTTCCATTTTGTCTCGAGCATT	59

	AAAGCAACAA	
SHII_1Up	AAAAAAGGTACCCCAATAAAATAAGCTCATT ATGGCAGCG	61
SHII_1Do	GGGGAGGGGATCTATTCTCTTTCTAAATTT TATCTCTGGTGGTTTTATGA	58
SHII_2Up	TTTAGAAAAGAGAATAGAGATCCCCTCCCAT GAACATCAT	63
SHII_2Do	AAAAAAGATCTAAAGACATTTTCGAGCTCCT CATACCC	61
Mbx_1Up_KpnI	AAAAAaggtaccACGTCAACATTATGAAGTAA AACGCTATCCT	61
Mbx_1DO	CTTGGAGGGTTGGTATTATCTTTTCTCTTTCT TAGGCTTTTCTTACATGAGAAAAA	60
Mbx_2Up	AAGAGAAAAGATAATACCAACCCTCCAAGAG TTTAACTTGAAG	60
Mbx_2Do_BamHI	AAAAAAGGATCCGGGAAAGATTGAGCATTAC TTTGATGAATATCCT	60
<b>T.bΔTERMP_00517</b>	<b>Séquence (5'-3')</b>	<b>Tm(°C)</b>
6MPb_1Up	AAAAAACGTACCAAGAAAACGGAGTTTTAG TGAATACACC	58.4
6MPb_1Do	TTCATGGAACATTTAAATGGTGTGGTATCT TGGACAAGAAGAAAA	59.5
6MPb_2Up	TTGTCCAAGATACCACAACCATTTAAATGTTTC CATGAGAAAATGAAATGCAAAAA	60.3
6MPb_2Do	AAAAAAGATCTCTCGCTCTAAAGGAGCTTTC AACA	56.0

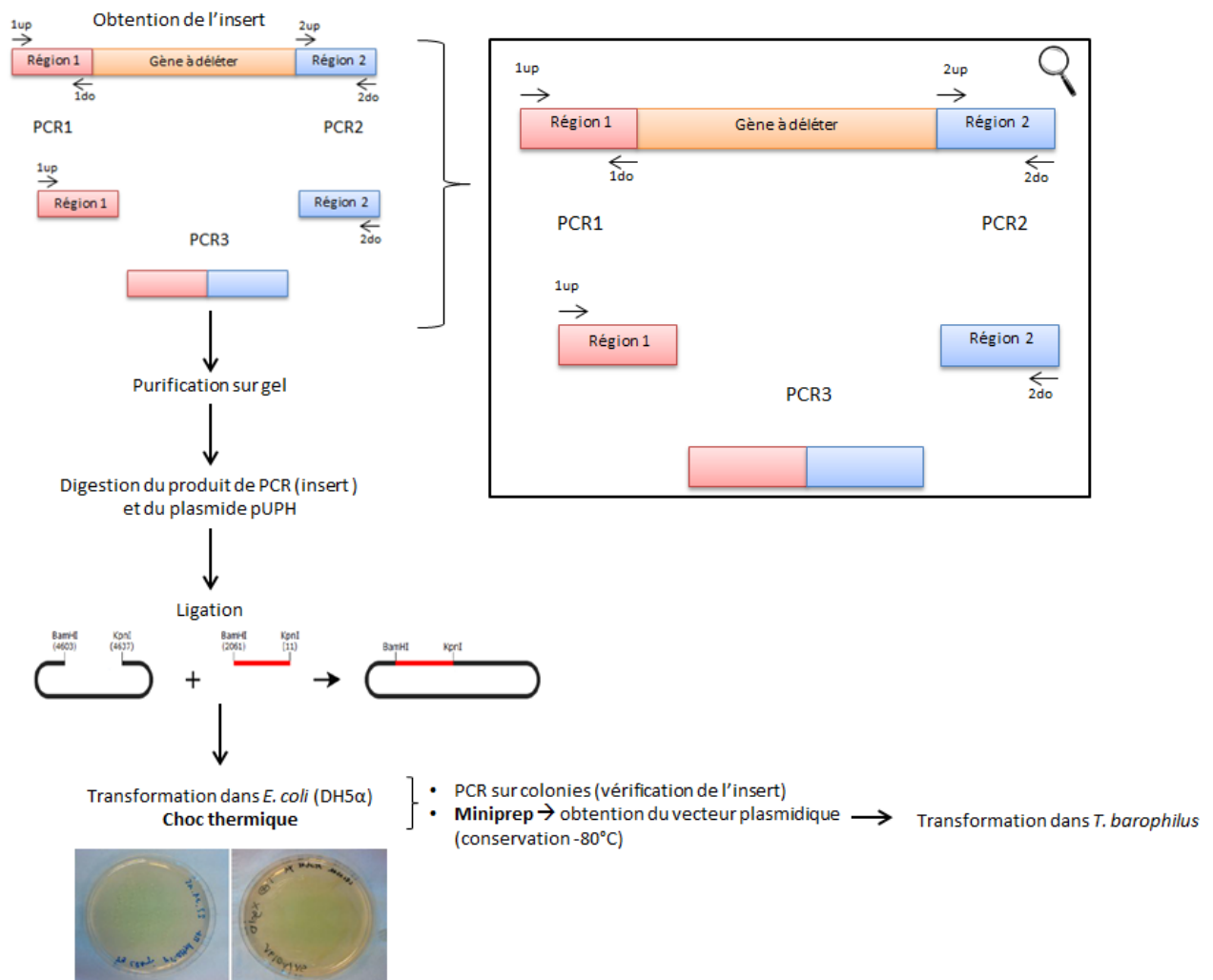
Après cette étape, 2 fragments d'environ 1 kb ont été obtenus. Ceux-ci ont été utilisés comme matrice pour une seconde PCR avec comme amorces par exemple Mbx\_1Up\_KpnI et Mbx\_2Do\_BamHI. Le mix PCR était composé de 40,5µL d'eau, 5 µL de tampon 10x, 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL de chaque amorce (20 µM), 0,5 µL de Taq PFU (5 U/mL) et 1 µL des deux produits PCR précédents, avec un programme PCR équivalent au précédent mais avec une élongation à 72°C pendant 4 min 30. La taille du produit PCR a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 0,9%.

Le fragment d'ADN correspondant à l'insert a ensuite été extrait et purifié à partir du gel d'électrophorèse sur colonne avec le kit Gel extraction Thermo Scientific.

Le fragment correspondant à la fusion des régions flanquantes du gène à déléter a été inséré dans le plasmide pUPH par digestion/ligation. Le plasmide et l'insert ont été digérés par les enzymes de restriction KpnI et BamHI (3h à 37°C). Une vérification sur gel d'agarose et une purification sur colonne, permettant l'élimination des tampons respectifs des deux enzymes, ont été réalisées après chaque étape de digestion. La ligation des produits de digestion (plasmide et insert) a été réalisée pendant 3h à température ambiante et permis l'obtention du plasmide pPΔ(gène à déléter). Les plasmides ont été transformés dans *E. coli* comme évoqué



précédemment puis dans *T. barophilus* (figure 19).



**Figure 19:** Schéma récapitulatif de l'étape d'obtention des vecteurs plasmidiques

## I.d. Transformation dans *Thermococcus barophilus*

### I.d.1. Etape de transformation

Pour la transformation, les cellules ont été inoculées à 1% en milieu TRM avec soufre pendant 16h à 85°C et à pression atmosphérique; puis le lendemain un aliquot de 0,6 mL de la culture de nuit a été transféré dans 30 mL de TRM sans soufre et incubé 6 h à 85°C à pression atmosphérique. Les cellules ont ensuite été centrifugées (8000 g, 8 min) et concentrées dans 600 µL de TRM soufré puis placées sur glace pendant 30 min, en enceinte anaérobie (enceinte de type COY, Laboratory product). Un aliquot de 25 µL contenant 4 à 5 µg d'ADN plasmidique

a été ajouté à 200 µL du concentrât de cellules, et le mélange a été incubé 1 h sur glace. Un choc thermique a été appliqué pendant 10 min à 85°C, suivi par une incubation sur glace pendant 10 min. 225 µL des cellules transformées ont été inoculés dans 20 mL de TRM soufré suivi d'une incubation de 18 h à 85°C.

### **I.d.2. Sélection des mutants**

Après incubation, les cellules ont été centrifugées à 8000 g pendant 8 min. En enceinte anaérobie, le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans le surnageant restant, soit environ 100 µL. Un isolement par la méthode des cadrans a été réalisé avec cette suspension sur milieu solide de TRM avec du soufre colloïdal (0,5 g/L) contenant de la Simvastatine à une concentration finale de 2,5 µg/mL. La solidification du milieu a été réalisée avec du Phytigel (Sigma) à une concentration de 10 g/L puis les boîtes ont été incubées 5 jours à 85°C, en jarre anaérobie.

Après incubation, 2 à 3 colonies ont été inoculées chacune dans 20 mL de TRM soufré additionné de 2,5 µg/mL de Simvastatine (10 µL). Les fioles ont été incubées pendant 16 h à 85°C. Ces cultures ont ensuite été utilisées pour inoculer, à 1%, 2 fioles de 20 mL de milieu TRM soufré + Simvastatine, l'une pour l'extraction d'ADN génomique, et la seconde pour la deuxième étape de sélection. Ces ensemencements ont été incubés 16 h à 85°C.

Pour l'étape de sélection sur 6-MP, les cultures de nuit ont été centrifugées puis, en enceinte anaérobie, le surnageant a été éliminé et le culot resuspendu dans le reste du surnageant (environ 100 µL). Cette suspension a ensuite été utilisée pour réaliser un isolement par la méthode des cadrans sur milieu TRM solide avec soufre colloïdal (0,5 g/L) et 6-MP à une concentration finale de 100 µM. Comme précédemment, le milieu a été solidifié avec du Phytigel (Sigma) à une concentration de 10 g/L, et les boîtes ont été incubées 5 jours à 85°C. De nouveau, 2 à 3 colonies ont été repiquées chacune dans 20 mL de TRM soufré en enceinte anaérobie et incubées 16h à 85°C. Puis une fiole de 20 mL de TRM soufré a été inoculée à 1%

avec cette culture et incubée 16h à 85°C pour réaliser ensuite l'extraction d'ADN génomique.

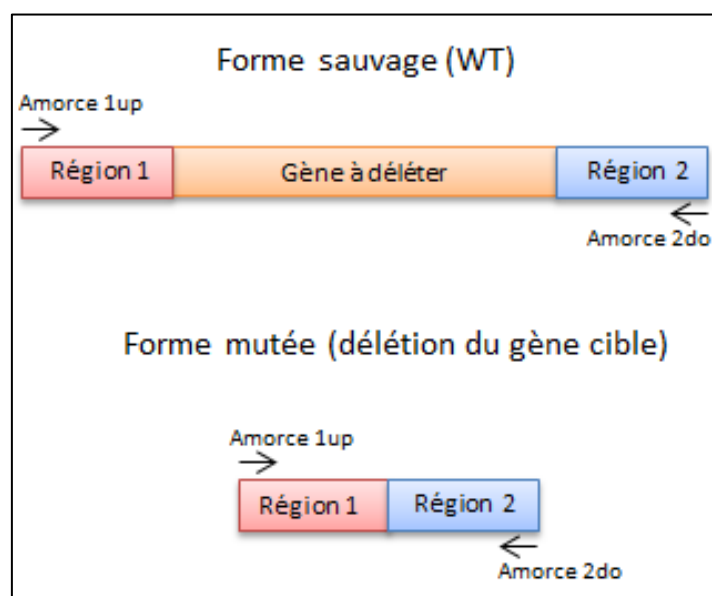
### **I.d.3. Extraction/purification de l'ADN génomique et vérification des mutants**

Une extraction de l'ADN génomique (Kit Genejet, ThermoFisher) a été réalisée sur les intermédiaires, entre les deux étapes de sélection pour vérifier l'intégration du plasmide; et sur les cellules obtenues à l'étape finale pour vérifier l'obtention des mutants. Pour cela, les cellules ont été inoculées à 1% dans du TRM avec du soufre et incubées 16h à 85°C. Après incubation, les cellules ont été centrifugées (8000 g, 8 min), et le culot a été repris dans 300 µL de TE (Tris HCl 100 mM, pH 8, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8), 40 µL de SDS 10% (dodécylsulfate de sodium), 40µL de sarkosyl 10% et 20 µL de protéinase K (20 mg/mL). Les tubes ont été incubés 1h à 55°C. Puis 200 µL de tampon de lyse et 20 µL de RNase (50 mg/mL) ont été ajoutés et les échantillons ont été laissés à température ambiante pendant 5 min. Le mélange a ensuite été versé dans une colonne de purification et centrifugé 1 min à 6000g. 500 µL du tampon de lavage I ont été ajoutés suivi d'une centrifugation 1 min 8000 xg. Après élimination de l'éluant, 500 µL du tampon de lavage II ont été ajoutés et les tubes ont été centrifugés 1 min à 12000g. L'éluant a été jeté et une nouvelle centrifugation à vide 3 min à 12000 g a été réalisée pour éliminer les traces d'éthanol. La colonne a ensuite été placée dans un tube de 1,5 mL, 200 µL d'eau stérile ont été ajoutés et le tube centrifugé 1 min à 8000 g. Enfin, la colonne a été éliminée et les échantillons ont été conservés à 4°C, avant la réalisation des PCR de vérification d'obtention des mutants.

La PCR à la fin de la première sélection permet de vérifier l'intégration du plasmide, en utilisant les amorces de vérification du gène *Tk0064* (*TK0664* up: AAA AAA CTC GAG CCC GTC CA AGC TAC CAC TCC C (20 µM); *TK0664* do: AAA AAA CCC GGC TTC AAA ACC CAG CCA AAC AAC ACC C (20µM)).

La PCR à la fin de la deuxième transformation permet de vérifier que le mutant a bien été obtenu grâce à une différence de la taille des amplicons pour la forme sauvage et mutée, par l'utilisation d'amorces spécifiques des régions homologues permettant la double

recombinaison plasmidique (**figure 20**) (**tableau 12**). La composition du mix PCR est la suivante, pour chaque échantillon : 40,5 µL d'eau, 5 µL de tampon (5X Green GoTaq ReactiOn Buffer, Promega), 1 µL de dNTP (10 mM), 0,5 µL de chaque amorce sens et antisens (20 µM), 0,5 µL de Taq polymérase (5 U/mL) (GoTaq DNA Polymerase, Promega) et 2 µL d'ADN matrice. Le programme d'amplification utilisé est le suivant : 95°C pendant 5 min, 30 cycles comprenant 40s à 95°C, 40 s à 53°C, 2min30 à 72°C, puis 7 min à 72°C et 4°C pour la température finale. Les produits d'amplification ont ensuite été observés après électrophorèse sur gel d'agarose à 0,9%, contenant du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 mg/mL (tampon de migration : Tris 40 mM, pH 8, acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8, TAE 1X). La migration a été réalisée à 90 V pendant 30 min, avec deux marqueurs de taille : 1-kb ladder et 100 bp-ladder (Promega).



**Figure 20:** Principe de la PCR de vérification de l'obtention des mutants

**Tableau 12:** Séquence des amorces utilisées pour la vérification des mutants

Nom	Séquence (5'-3')	Tm (°C)
<b>Hydrogénases</b>		
Co_Mbh_Up	ATGTAAATGTCCAGCAGGTAAGCCCA	57
Co-Mbh_Do	CAAGGTTTATTTGAGACTTTCTGTTTGATAC TC	61
Mbh_Up	GAGGTGCATGTTCTGTGCCCTATGT	54
Mbh_Do	CATTTTAAAAAGTGCAATATACTGTGAAGA ACT	54
SHI_Up	GATTAATCCCTGGAGCTAATTTTTCTTTACG	60

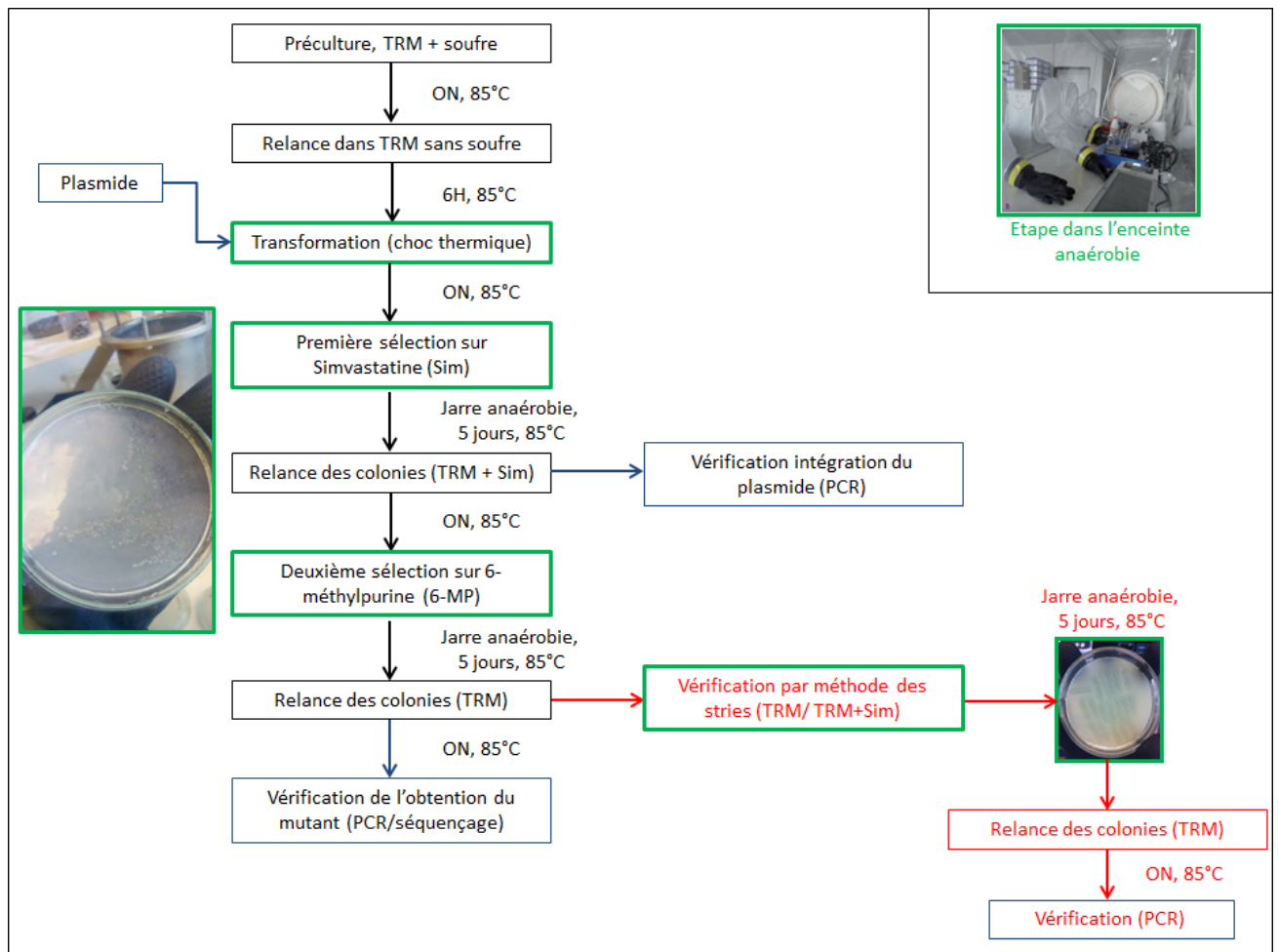
SHI_Do	CGGGAATTAATGATTCATATATTAACAGTAC AG	60
SHII_Up	CCGGGCTAAATTTTTCACTTAGAATG	57
SHII_Do	CAATGAACATCATTTGCTTCGCCAC	57
Mbx_Up	CTTCATATACCTGCACCTCAGCGT	60
Mbx_Do	GGCTGTAACCTCTGTGGCCAGA	60
<b>T.bΔTERMP_00517</b>		
6MPb_Up	ACCTCAGACATCTCTGCTGCTTG	60
6MPb_Do	GCCCCGATAAGTGCTGAAAGATACA	60

Les mutants ont également été vérifiés par séquençage (méthode de Sanger), le séquençage a été réalisé par la société Beckman Coulter Genomics (UK).

#### **I.d.4. Réalisation de stries sur TRM complémenté en Simvastatine**

Après obtention de colonies sur milieu de sélection contenant le 6-MP, des stries sont réalisées sur milieu TRM, soufre colloïdal (0,5 g/L), complémenté en Simvastatine (2,5 µg/mL) et milieu TRM sans antibiotique. Ceci dans le but de vérifier que l'on a bien eu la double recombinaison et que le plasmide apportant la résistance à la Simvastatine a bien disparu. Les boîtes striées sont placées dans des jarres anaérobies et incubées à 85°C pendant 5 j (**figure 21**).

Après les 5 j d'incubation les colonies qui se sont développées uniquement sur TRM sont repiquées dans 30 mL de TRM complémenté en soufre, et placées à 85°C pendant une nuit. Ensuite des extractions d'ADN génomique (Kit Genejet, ThermoFisher) suivi d'une PCR avec les amorces des gènes à déléter (**tableau 12**) sont réalisées afin de vérifier si la délétion a bien eu lieu (même méthode que précédemment dans la partie **I.d.3. Extraction/purification de l'ADN génomique et vérification des mutants**)



**Figure 21: Schéma récapitulatif de la transformation chez *T. barophilus***  
**Encadré vert : étapes réalisées dans l'enceinte anaérobie, Encadré bleu : étapes de biologie moléculaire, encadré rouge : étapes de screening des mutants sur TRM et TRM + Sim (avec la méthode de contre-sélection avec le 6-MP, cette étape n'est plus indispensable)**

### I.e. Tests de croissance en milieu liquide

Des tests de croissance en milieu TRM liquide sont entrepris afin de vérifier la sensibilité au 6-MP des souches *T. kodakarensis*, *T. barophilus*, *T. barophilus* intermédiaire (pUPH1 intégré), *T. barophilus* muté (*TERMP\_00517* délété) et *T. barophilus* muté intermédiaire (*TERMP\_00517* délété et pUPH1 intégré). Les concentrations utilisées ont été choisies dans un premier temps en se référant aux travaux de la publication de Santangelo (Santangelo et al., 2010), selon lesquels la concentration inhibitrice de 6-MP en milieu solide chez *T. kodakarensis* est de 10  $\mu\text{M}$ .

A partir de pré-cultures des souches à étudier incubées toute la nuit à 85°C en milieu TRM, des fioles contenant le milieu TRM (10 mL) et les différentes concentrations de 6-MP testées

(0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (témoin), 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 250  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) sont ensemencées à 0,1% (triplicat). Les fioles inoculées sont placées à l'étuve 85°C, le suivi de croissance va se faire à différents temps (toh, t3h, t6h, t9h, t12h) en prélevant à chaque fois 450  $\mu\text{L}$  de milieu qui seront ajoutés au 50  $\mu\text{L}$  de produit de fixation PFA 5% (Paraformaldéhyde). L'étape de fixation correspondant à l'arrêt de la croissance est indispensable, le dénombrement se faisant par cytométrie de flux (Cyflow Space partec). La cytométrie de flux est une technique qui permet notamment de faire défiler des particules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, afin de les dénombrer. Le marquage des cellules pour cette approche de comptage se fait au Sybergreen (intercalant de l'ADN ayant la capacité de fluorescer sous UV). Des dilutions sont réalisées quand cela est nécessaire (dilution en cascade jusqu'au millième : 990  $\mu\text{L}$  d'eau salé, 10  $\mu\text{L}$  de cellules fixées, 1  $\mu\text{L}$  de Sybergreen).

## **II. Caractérisation des mutants hydrogénases**

### **II.a. Suivi de croissance des mutants hydrogénases sous pression**

#### **II.a.1. Préparation des seringues**

Les courbes de croissance sont réalisées en triplica d'échantillon. Pour réaliser les cinétiques pressions, le laboratoire dispose de 5 incubateurs hautes pressions et hautes températures. Des précultures des mutants et témoins sont préparés, 20 mL de TRM inoculé par 0,2 mL de culture incubée à 85°C sur la nuit. Le lendemain une culture fraîche est préparée à partir de TRM inoculé à 10% par la culture de la veille, les seringues sont préparées à partir de cette culture fraîche qui correspond au temps toh. Préalablement les seringues sont plantées dans des fioles fermées hermétiquement et flushées à la rampe à gaz, de façon à enlever l'oxygène. Les seringues sont préparées stérilement à proximité de la flamme en condition stérile, et fermées hermétiquement par un bouchon en propylène. Les seringues sont placées dans des incubateurs pression pour des pressions de 0,1, 40 ou 70 MPa, et une température de 85°C, pendant 12 h. Un suivi est réalisé par fixation des cellules dans des tubes de paraformaldéhyde 2% (50  $\mu\text{L}$  de paraformaldéhyde pour 450  $\mu\text{L}$  de culture). Les tubes sont analysés au cytomètre

de flux (dilution au dixième dans une solution de NaCl 20 g/L).

### **II.a.2. Mise en pression des incubateurs**

Le LM2E possède cinq incubateurs hautes pressions et hautes températures (**figure 22**), ils sont en acier inoxydable et sont entourés d'une étuve haute température (Top Industrie). Le système de contrôle de la température est automatisé par un boîtier électronique tandis que le système de contrôle de la pression est manuel grâce à une valve de sortie.

Pour leur utilisation, un joint torique est placé dans la gorge de l'incubateur. Un système de flotteur est utilisé pour les seringues de 2,5 mL contenant les cultures, de façon à les récupérer plus facilement.

De l'eau déionisée est utilisée pour remplir les incubateurs ; en faisant bien attention que de l'eau ne coule pas dans le four.

Le couvercle de l'incubateur est positionné correctement et vissé avec les 6 écrous à l'aide d'une clé dynamométrique et de la tige métallique de maintien.

L'incubateur fermé est descendu doucement dans le four en le maintenant au niveau de la vanne de l'incubateur et pas au niveau du manomètre.

Le boîtier électrique est mis sous tension, et les réglages de la température de consignes sont réalisés au niveau du régulateur maître.

Les incubateurs sont ensuite mis sous pression, pour cela une pompe manuelle est connectée à la vanne de l'incubateur (vérifier le niveau d'eau de la pompe). La pompe est actionnée doucement avec le levier (en prenant appui sur le réservoir d'eau et non sur le manomètre) de façon à faire monter la pression en surveillant le manomètre de l'incubateur.

Avec le chauffage la pression va augmenter d'environ 1 MPa pour 1°C, il est nécessaire d'anticiper cette augmentation.

Le robinet vanne de l'incubateur est ensuite fermée. La pompe est déconnectée de l'incubateur.

Le bouton chauffage du boîtier électrique est actionné. La montée en pression est surveillée, et si nécessaire des diminutions de pression sont réalisées en ouvrant la vanne de l'incubateur.

Une fois le suivi cinétique terminé, les incubateurs sont dépressurisés progressivement et



ouverts. Le chauffage est éteint, l'incubateur est soulevé au niveau de la vanne et déposé sur une clé plate. La vanne de l'incubateur est ouverte très doucement pour contrôler la descente de pression. L'incubateur est ouvert avec la clé dynamométrique et la tige de maintien en dévissant les 6 écrous. La partie supérieure de l'incubateur est sortie et positionnée en équilibre sur un tirant fileté. Le boîtier électrique est mis hors tension. Les seringues sont retirées en faisant attention à l'eau chaude. Ensuite l'incubateur est positionné sur les 6 tirants filetés.

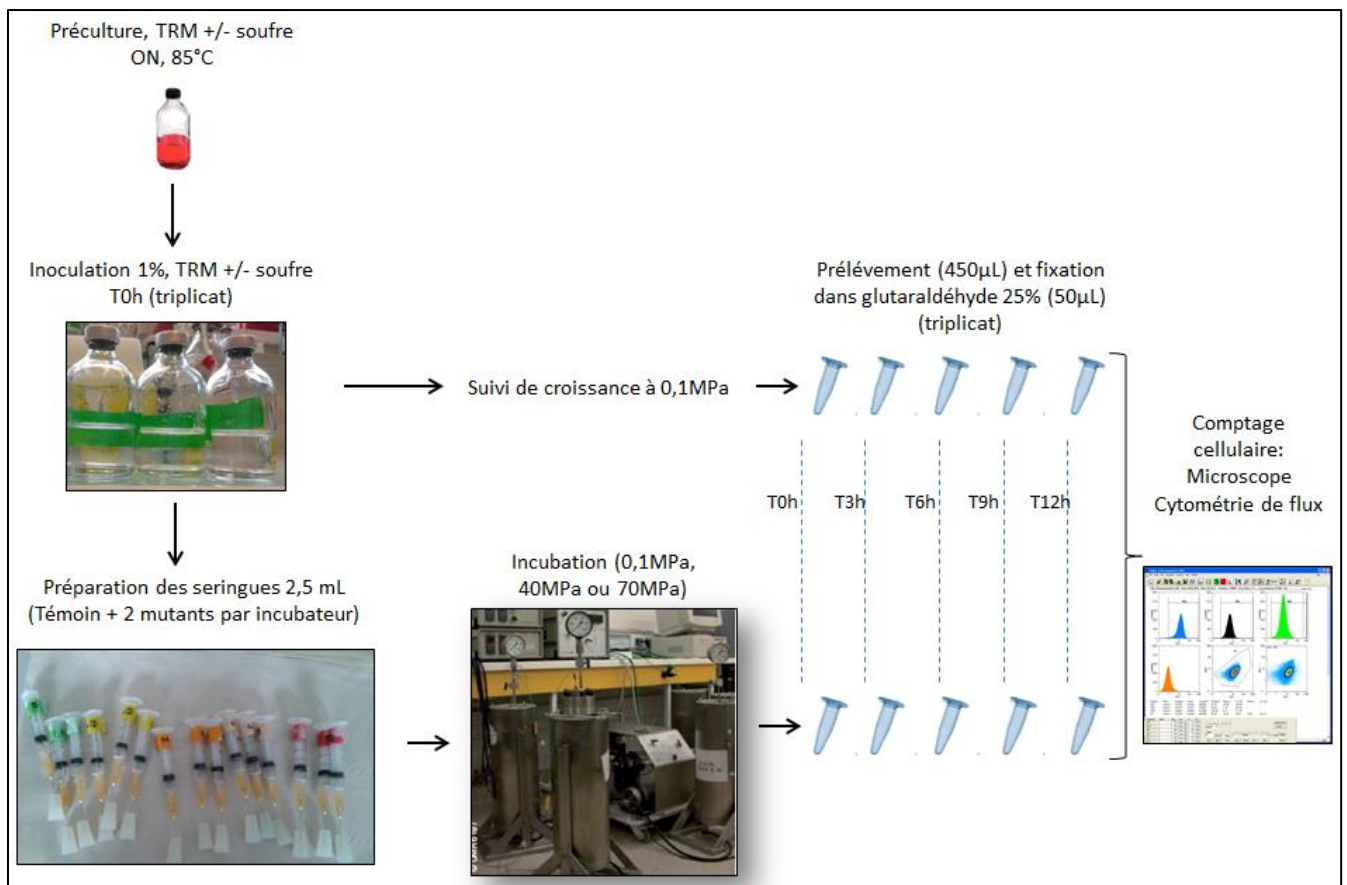


**Figure 22: Incubateurs hautes pressions/hautes températures (Top Industrie)**

### **II.a.3. Dénombrement cellulaire**

Le dénombrement des cellules a été réalisé par cytométrie de flux (Cyflow Space, Partec). Cet appareil est un dispositif permettant notamment de réaliser des comptages cellulaires par détection des cellules avec un laser. Le marquage des cellules a été réalisé avec un agent intercalant de l'ADN, qui fluoresce sous UV, le SYBR Green (Promega). Pour l'analyse les échantillons ont été dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans une solution de H<sub>2</sub>O + NaCl (20 g/L) et 1 µL de SYBR Green a été ajouté. Parallèlement, les cellules ont été dénombrées par comptage au microscope

en cellule de THOMA, sans dilution (**figure 23**).



**Figure 23:** Schéma récapitulatif des étapes de suivi de croissance sous pression

#### II.a.4. Contraintes liées à la pression

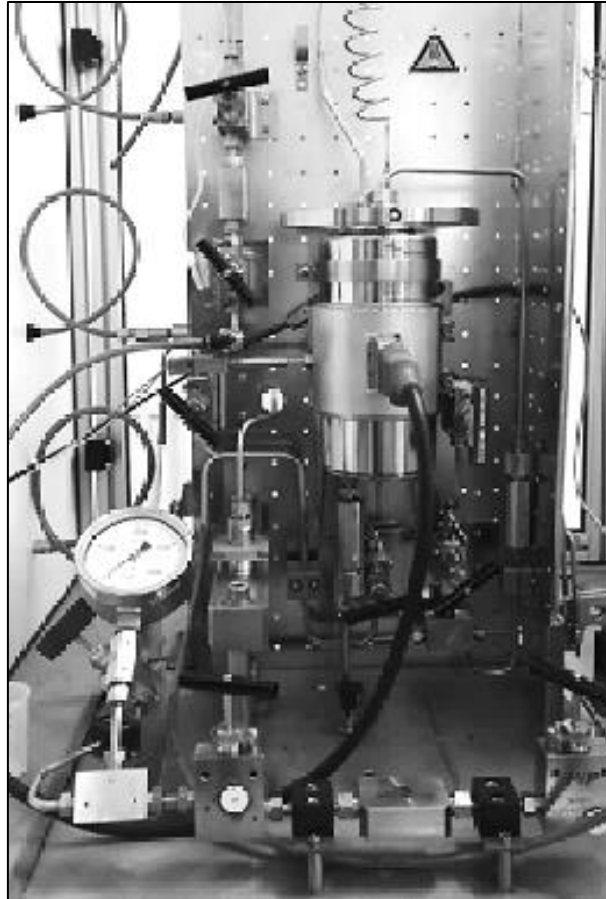
La culture sous hautes pressions induit de nombreuses contraintes techniques. En effet les incubateurs hautes pressions utilisés ne permettent pas de réaliser les cultures dans les mêmes conditions que pour une incubation en étuve à pression atmosphérique.

Tout d'abord, les cultures doivent être réalisées en seringue puisque c'est l'action du piston de cette dernière qui permet l'élévation de la pression dans le milieu. Ce mode de culture n'est cependant pas idéal pour les microorganismes anaérobies obligatoires comme *T. barophilus* puisque des échanges de gaz ont lieu à travers la paroi en plastique des seringues et au niveau du piston. Il y a donc des risques d'oxygénation du milieu pendant l'incubation. Ce type d'échange est cependant nécessaire pour éliminer les gaz toxiques, comme l'  $H_2S$  produits par les microorganismes pendant la culture.

Ensuite il est impossible de réaliser un prélèvement en cours d'incubation. En effet une étape de dépressurisation est nécessaire pour récupérer les seringues et effectuer un prélèvement. Les cellules ne peuvent pas être à nouveau mises sous pression et incubées par la suite, pour la réalisation d'un suivi de croissance par exemple, puisque la dépressurisation a un impact sur les cellules. Pour réaliser des cinétiques de croissance, il est donc nécessaire d'utiliser un incubateur différent pour chaque temps de prélèvement, ce qui implique que les différents points de la cinétique correspondent à des cellules qui n'ont pas été incubées exactement dans les mêmes conditions puisque l'incubateur était différent.

Enfin le nombre de seringues par incubateur en même temps est limité à cause de la structure du cylindre d'un diamètre de 5 cm et de 50 cm de profondeur de la chambre d'incubation. Ainsi seules 6 seringues de 1 mL ou de 2,5 mL ou 2 seringues de 20 mL peuvent être incubées dans un même réacteur. De plus le laboratoire dispose uniquement de 5 incubateurs. Cela limite donc le nombre d'essais et de réplicas réalisables pour une même expérience.

Un nouvel outil hyperbare a été développé au LM2E, en collaboration avec l'industriel HP systems (**figure 24**). Un biréacteur d'un volume de 350 mL, supportant une pression maximale de 1200 bar et une température de 100°C, et fonctionne en anaérobie. Il est doté d'une chambre d'observation *in situ* chambre d'incubation, et permet de faire des cultures en continu sous pression et de prélever directement les cultures. Le système est encore en phase d'optimisation. Une fois l'appareil optimisé il permettrait de pallier aux quelques inconvénients des incubateurs Top industrie et faciliter les cultures sous hautes pressions réalisées au LM2E.



**Figure 24:** *Bioréacteur HP systems*

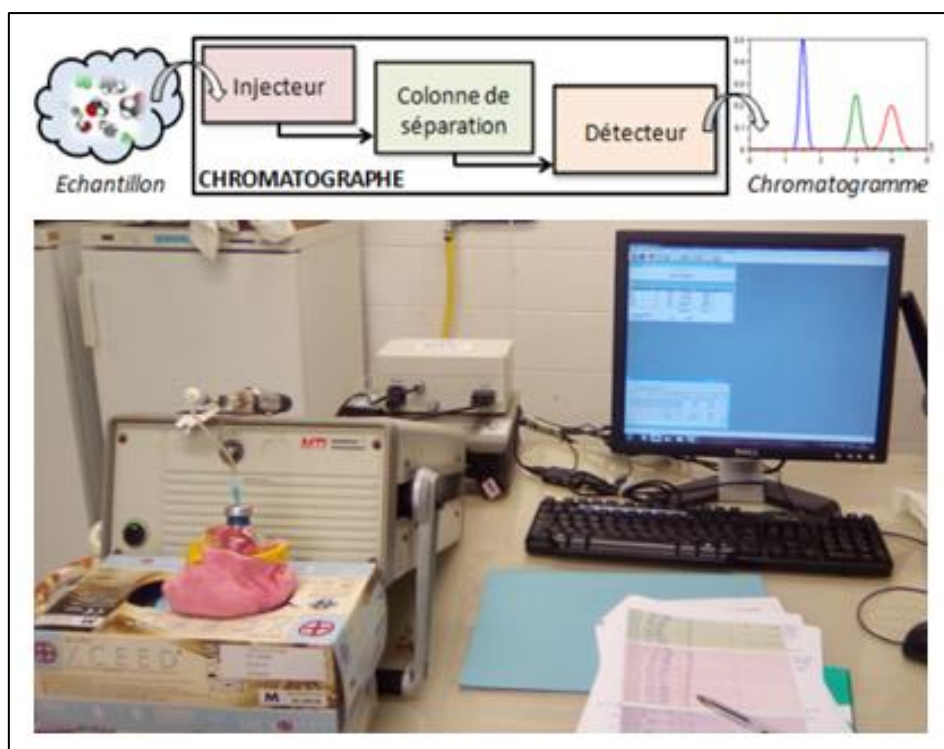
## **II.b. Mesures d'hydrogène**

### **II.b.1. Préparation des fioles**

Des fioles de préculture du témoin et des différents mutants sont préparées avec ou sans soufre. Les fioles contiennent 20 mL de TRM, sont réduites par flush d'azote et pour la phase liquide par du Na<sub>2</sub>S 10% (1%). Le lendemain deux séries de fioles sont inoculées, un triplicat servira au suivi de croissance cellulaire (85°C pendant 72 h, avec des prélèvements toutes les 3 h jusqu'à 12 h puis toutes les 24 h jusqu'à 72 h), 450 µL sont prélevées et fixées dans 50 µL de glutaraldéhyde. Les comptages se feront par cytométrie de flux. L'autre triplicat sont des fioles de 20 mL de TRM, avec ou sans soufre selon la condition testée, préparée de la même façon à l'exception de la pression dans la fiole, qui doit être contrôlée pour être à la fois suffisante pour être détectée au micro-GC, et à la fois pas trop élevée pour ne pas l'endommager. La pression dans la fiole doit se situer entre 1000 et 2000 MBAR.

## II.b.2. Mesures au micro-GC

Le laboratoire dispose d'un microchromatographe en phase gazeuse (micro-GC, MTI M200, Agilent) (**figure 25**). C'est une technique de chimie analytique permettant la détection et la quantification de composés présents dans un échantillon gazeux. Un chromatographe peut être décrit comme composé de 3 unités fonctionnelles de base interconnectées par des capillaires assurant le transport du gaz le long du système. Les unités permettent l'**injection** d'une quantité donnée d'échantillon, la **séparation** des espèces chimiques présentes et la **détection** en aval du système. Le micro-GC est équipé de deux voies et de deux détecteurs à conductivité thermique TCD (SRA instruments, Marcy l'Etoile, France) couplé à un capteur de pression. Les voies A et B sont composées de colonnes chauffées à 100°C et 80°C pour lesquelles les gaz vecteurs sont l'argon et l'hélium. Le gaz vecteur utilisé dans cette analyse, est l'argon. Celui-ci permet de pousser les composés présents dans la phase gazeuse vers le détecteur. Le temps d'injection est de 30 s pour un temps d'analyse de 160 s (Jean Pierre Donval, REM/GM). Le logiciel de pilotage et d'acquisition est SOPRANE (SRA instruments).



**Figure 25:** Mesures au micro-GC

# Résultats

## Chapitre I : Amélioration de l'outil génétique

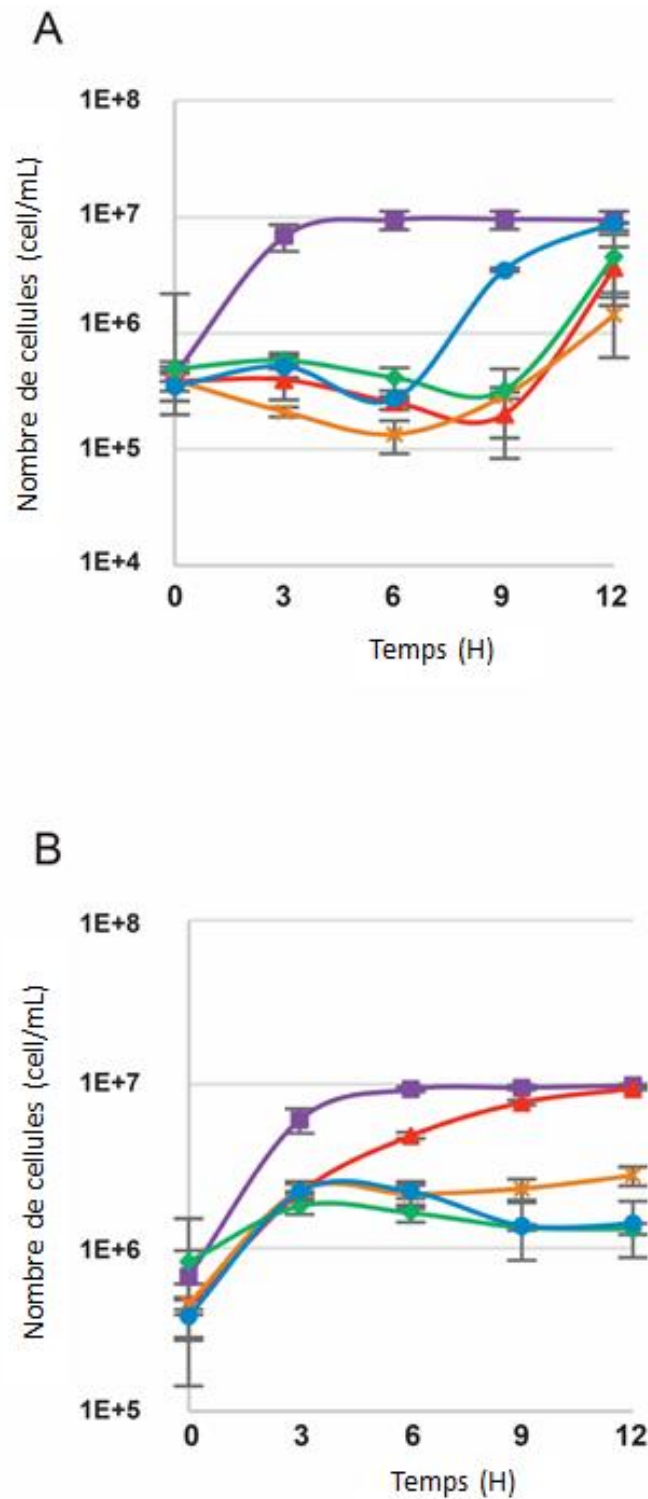
### I.a. Contexte de l'étude

Bien que l'outil développé au laboratoire ait permis l'obtention de mutants (Thiel et al., 2014), l'apparition à la fin de la seconde étape de recombinaison d'une troisième forme, appelée « faux positifs », probablement dû à un manque d'efficacité de l'antibiotique de contre-sélection, pose problème. Ces faux positifs correspondent à une double résistance ( $Sim_r$  et  $5-FoA_r$ ), alors que la perte du plasmide lors du deuxième événement de recombinaison, fait que les souches devraient être  $Sim_s$  et  $FoA_r$ . Dans le but de diminuer ce taux de faux positifs (60-90%) et de s'absoudre de l'étape de screening de ces faux positifs, qui est une étape chronophage (5 jours); un nouveau système de contre-sélection a été pensé en utilisant un autre marqueur : la 6-méthylpurine ou 6-MP. La 6-MP est un analogue des purines, qui empêche la formation d'acide guanylique à partir de l'acide adénylique, ce qui diminue l'incorporation d'adénine dans l'acide ribonucléique, inhibant ainsi la synthèse du ribosome (Lallier, 1965; Miller and Kempner, 1963). Chez *T. kodakarensis*, la 6-MP est connue comme inhibiteur de croissance efficace, lié à la présence du gène *TKO664* (Santangelo et al., 2010). Ce gène code pour l'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase. D'où notre choix dans cette étude de remplacer le gène *pyrF* par le gène *TKO664* dans le vecteur navette et de tester l'efficacité de la 6-MP sur la croissance de plusieurs souches de *T. barophilus*. Nous nous sommes demandé comment réagir la souche face à la 6-MP (sensible ou non) ? Si elle est sensible, comment la rendre non sensible ? Le nouveau moyen de contre-sélection est-il plus efficace ? L'outil sera-t-il utilisable en routine ?

### I.b. Tests de sensibilité de *T. barophilus* MP sauvage à la 6-MP

Dans un premier temps, des cinétiques de croissance ont été réalisées à différentes concentrations de 6-MP ; afin de vérifier la sensibilité de notre modèle d'étude *T. barophilus* à la 6-méthylpurine. Les cinétiques ont été réalisées sur 12 h pour la souche *T. barophilus* MP et

comparées à celles de la souche *T. kodakarensis* KOD1 (possédant le gène *TKO664*) sensible à cette drogue.



**Figure 26:** Tests de sensibilité à la 6-MP des souches *T. kodakarensis* et *T. barophilus*  
 Courbes de croissance: *T. kodakarensis* KOD1 (A); et de *T. barophilus* MP (B). Les souches ont été cultivées à 85 °C et 0.1 MPa dans du TRM contenant différentes concentrations de 6-MP: 0 μM (■),

10  $\mu\text{M}$  ( $\blacktriangle$ ), 50  $\mu\text{M}$  ( $\times$ ), 100  $\mu\text{M}$  ( $\blacklozenge$ ) and 250  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ )

Les tests de croissance ont été réalisés dans du milieu TRM complétement avec différentes concentrations de 6-MP allant de 0 à 250  $\mu\text{M}$  de 6-MP (**figure 26-B**). La croissance de *T. barophilus* est très peu impactée à 10  $\mu\text{M}$ . Dès 50  $\mu\text{M}$  de 6-MP, un effet inhibiteur est visible avec un arrêt de la croissance de 3 h à 12 h mais une reprise à partir de 24 h (données non montrées). Le même effet est observé pour des concentrations de 6-MP plus importante (100 et 250  $\mu\text{M}$ ).

Pour *T. kodakarensis* KOD1, la croissance sans 6-MP dans le milieu sert de témoin, et permet d'apprécier l'allure de la courbe de croissance de *T. kodakarensis*, avec ses différentes phases (latence, exponentielle, stationnaire) (**figure 26-A**). Pour une concentration de 50  $\mu\text{M}$  de 6-MP ajoutée dans le milieu, une densité cellulaire plus faible est alors observée en comparaison avec le témoin. Cependant à partir du temps t10h la croissance reprend. A des concentrations de 100 et 250  $\mu\text{M}$  de 6-MP, un arrêt de croissance cellulaire est observé, la densité cellulaire est inchangée et faible les 6 premières heures ; mais comme précédemment une reprise de croissance est observée à t 10h. La molécule agit et semble dose dépendant. En effet la croissance de *T. kodakarensis* est plus faible plus la concentration en 6-MP ajoutée dans le milieu de culture est importante. La souche *T. kodakarensis* est donc bien sensible à la 6-MP, mais l'antibiotique qui bloque la croissance cellulaire dans un premier temps ne semble plus agir à partir d'un certain moment.

Nous savons que la sensibilité à la 6-MP de la souche *T. kodakarensis* est liée au gène *TKO664* qui code pour l'hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase.

*T. barophilus* n'est pas aussi sensible à la 6-méthylpurine, même si le séquençage du génome de la souche a mis en évidence le gène *TERMP\_00517* codant comme *TKO664* pour l'hypoxanthine guanine phosphosyltransferase (Vannier et al., 2011). Le gène *TKO664* possède 214 aa alors que *TERMP\_00517* en possède 215 aa, il existe entre eux 80,5% d'identité et 90,2% de séquence protéique similaire, il est donc possible que ce gène *TERMP\_00517* donne cette

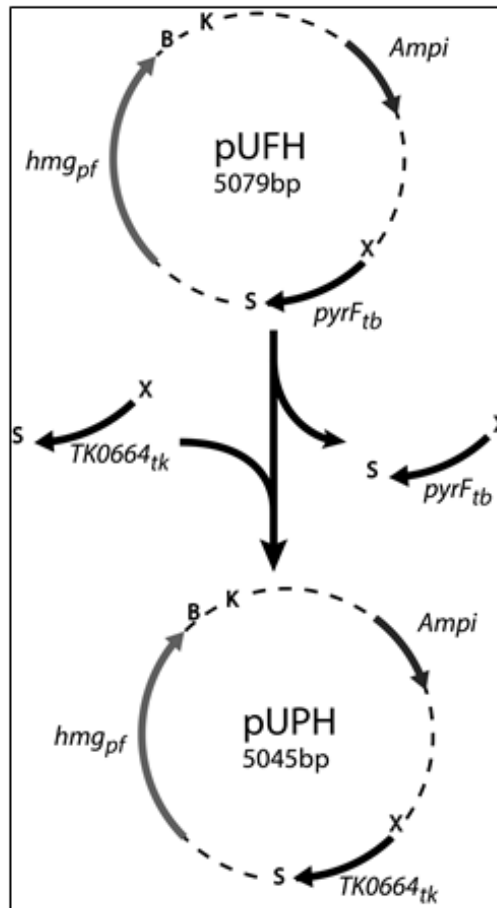


relative sensibilité à *T. barophilus*. Pour que la contre-sélection fonctionne de manière optimale, il faut une souche non sensible à la 6-MP ; c'est pourquoi la délétion du gène a été réalisée. Une première étape de construction du plasmide portant le gène *TK0664* a été réalisée (pUPH), puis la transformation de *T. barophilus* par ce plasmide portant en plus les régions homologues du gène à déléter (gène *TERMP\_00517*). Les *T. barophilus* muté ( $\Delta$ *TERMP\_00517*) et *T. barophilus* muté intermédiaire ( $\Delta$ *TERMP\_00517*::pUPH-1) permettront de conclure quant à l'impact du gène *TERMP\_00517* sur le 6-MP.

### I.c. Construction de *T. barophilus* $\Delta$ *TERMP\_00517*

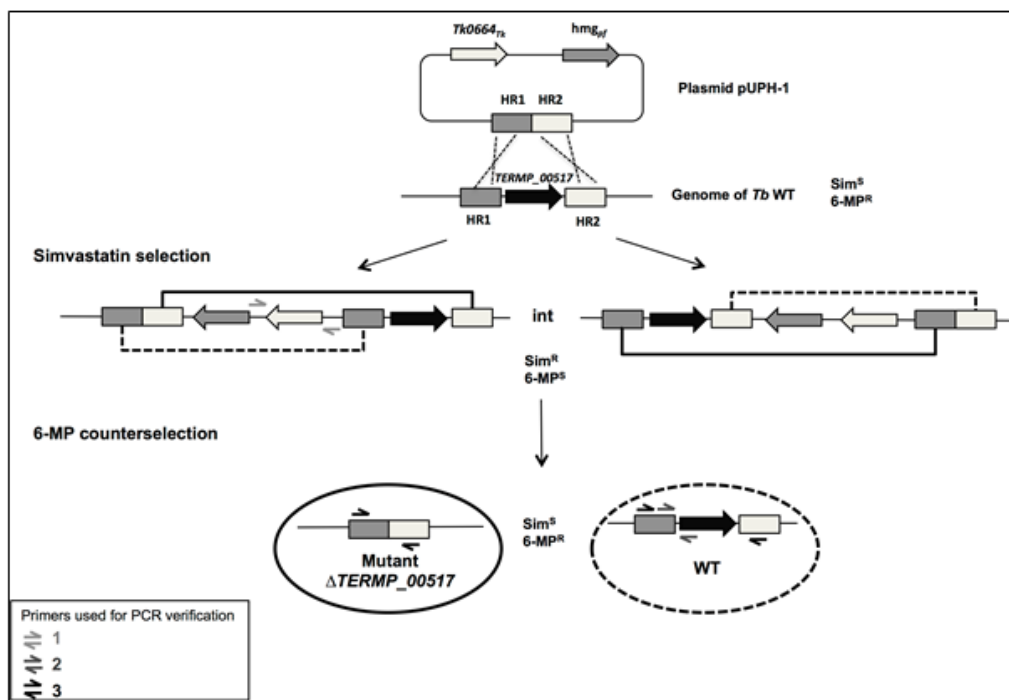
La construction du plasmide pUPH1 (**figure 27**) a été obtenue, celui-ci contient bien le gène de sensibilité à la 6-MP de *T. kodakarensis* : *Tk0664* (contrôle par PCR de vérification), le gène HMG-CoA et les régions d'homologies des régions flanquantes du gène à déléter, ici *TERMP\_00517*. La transformation de *T. barophilus* wt par celui-ci a donc pu être entreprise (**figure 28**).

Ce premier travail a consisté à obtenir les souches *T. barophilus* muté et *T. barophilus* muté intermédiaire (construction *T. barophilus* muté  $\Delta$ *TERMP\_00517* transformé par pUPH1). *T. barophilus* muté ( $\Delta$ *TERMP\_00517*) obtenu lors de la deuxième étape de sélection ne possède plus le plasmide, la délétion du gène homologue à *Tk0664* de *T. barophilus* : *TERMP\_00517* a eu lieu; ce qui a permis de voir si le fait d'enlever ce gène a des répercussions sur la croissance en présence de 6-MP. Enfin la construction *Tb* muté ( $\Delta$ *TERMP\_00517*) intermédiaire où le plasmide pUPH1 a été intégré dans le chromosome, permet de voir l'effet de *TK0664* seul.



**Figure 27: Construction du plasmide pUPH**

Construction du plasmide pUPH. Les amorces *XhoI*-6MPK\_Up et *SmaI*-6MPK\_Do ont été utilisées pour amplifier *TK0664* du génome de *T. kodakarensis* KOD1. Puis, *TK0664* et le vecteur pUFH ont été digérés par *SmaI* (S) et *XhoI* (X) et, après l'étape de purification sur gel, il y a eu une étape de ligation du plasmide pUPH où *pyrF* a été remplacé par *TK0664*. Les sites de restriction *BamHI* (B) et *KpnI* (K) ont été conservés pour permettre de cloner les régions homologues dans pUPH.



**Figure 28: Schéma explicatif de l'outil génétique amélioré**

**Exemple de la délétion du gène TERMP\_00517.** Le plasmide pUPH-1 a été construit par ligation des régions flanquantes en amont et en aval du gène TERMP\_00517 dans pUPHet utilisé pour transformer *T. barophilus* MP. Après le premier événement de recombinaison (pop-in), les cellules contenant le plasmide intégré ont été sélectionnées sur un milieu avec de la Simvastatine (int). La première paire d'amorces 1 a été utilisée pour vérifier l'intégration du plasmide à cette étape. Ensuite les cellules intermédiaires ont été étalées sur un milieu complété en 6-MP pour permettre le deuxième événement de recombinaison (pop-out), correspondant à l'excision du plasmide. Entraînant ainsi deux formes possibles la délétion du gène ou le génotype WT, dépendant du site de recombinaison. Les amorces 2 et 3 ont été utilisées pour valider les mutants obtenus.

#### **I.d. Résultats de la transformation de *T. barophilus* MP par le plasmide pUPH1**

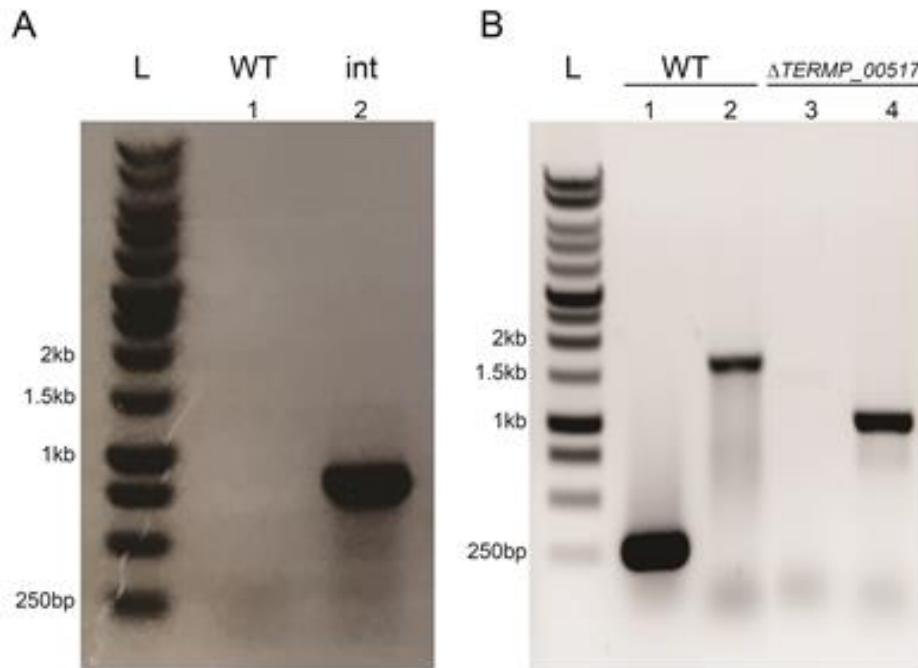
A la fin de la transformation **une première sélection** positive par la Simvastatine a lieu, ainsi un étalement sur milieu TRM complété en Simvastatine est réalisé. A cette étape si les souches ont intégré le plasmide ; **elles doivent être Simvastatine résistantes et 6MP sensibles (figure 28)**. Des colonies (environ une trentaine) ont été obtenues après les 5 jours d'incubation et ont été remis une nuit en culture liquide. Les gels de vérification (**figure 29-A**) effectués à la suite des extractions d'ADN génomiques et de la PCR avec les amorces de TKO664, à partir de ces colonies ont montré que le plasmide avait bien été intégré dans le chromosome des transformants; une bande est observée à 819 pb, ce qui correspond bien à la taille du gène TKO664 (819 pb). Les mutants *T. barophilus* intermédiaires ont bien été obtenus et ont été utilisés pour les études de cinétique afin de voir si le gène apporté à *T. barophilus* wt confère une sensibilité au 6-MP.

Après la première sélection, 50  $\mu$ L des cultures liquides ont été ensemencés sur un milieu TRM solide complété par 100  $\mu$ M de 6-MP. Les étalements sur 6-MP qui correspondent à **la deuxième étape de la sélection** et qui remplacent l'utilisation du 5-FOA, ont été concluants, avec un nombre de clones obtenus importants (100 colonies). En effet les souches qui poussent à cette étape sur 6-MP sont **6-MP résistante** ce qui vient d'être démontré et normalement **Simvastatine sensible** ; puisqu'elles ont normalement perdu le plasmide.

Afin de vérifier que le plasmide est bien absent et que le gène *TERMP\_00517* a bien été délété, **des stries** ont été réalisées sur TRM et TRM/Sim. Des colonies ont été obtenues sur TRM et TRM/Sim, ceux sont donc des faux positifs (30%), elles sont résistantes à la Simvastatine alors qu'une fois le plasmide perdu elle devrait redevenir sensible à la Simvastatine comme elles ne possèdent plus le gène *HMG-CoA*. On ne s'intéresse qu'aux colonies s'étant développées sur TRM et pas sur Simvastatine (70%). Mais après vérification, des ADN génomiques entreprises pour vérifier si on obtient la forme sauvage possédant toujours le gène cible, ou au contraire la forme délétée attendue, les PCR réalisées avec les amorces du gène *TK0664* n'ont pas montré d'amplification de celui-ci pour la souche transformée obtenue (aucune bande n'est visualisée à 819 pb) et par contre le résultat de la vérification avec les amorces du gène *TERMP\_00517* ont révélé une bande à 1000 pb et sans amplification respectivement pour les deux paires d'amorces utilisées pour la vérification, (**figure 29-B**) pour la souche transformée, ce qui correspond à la taille des régions d'homologies utilisées pour déléter le gène ; ce qui indique que le gène a bien été délété. Sinon la taille du fragment amplifié aurait été de 1693 pb et de 250 pb respectivement pour les deux paires d'amorces; ce que nous avons pu obtenir avec le témoin positif de *T. barophilus* wt qui possède le gène *TERMP\_00517* (**figure 29-B**).

La souche *T. barophilus* transformée ne possédant plus le gène *TERMP\_00517* a bien été obtenue, les cinétiques de croissance ont donc pu être entreprises sur cette souche afin de vérifier sa sensibilité à la 6-MP. De plus elle pourra être utilisée pour les délétions de gènes d'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques sans craindre une interférence du gène

homologue à *TK0664*.



**Figure 29: Gel de vérification de la transformation**

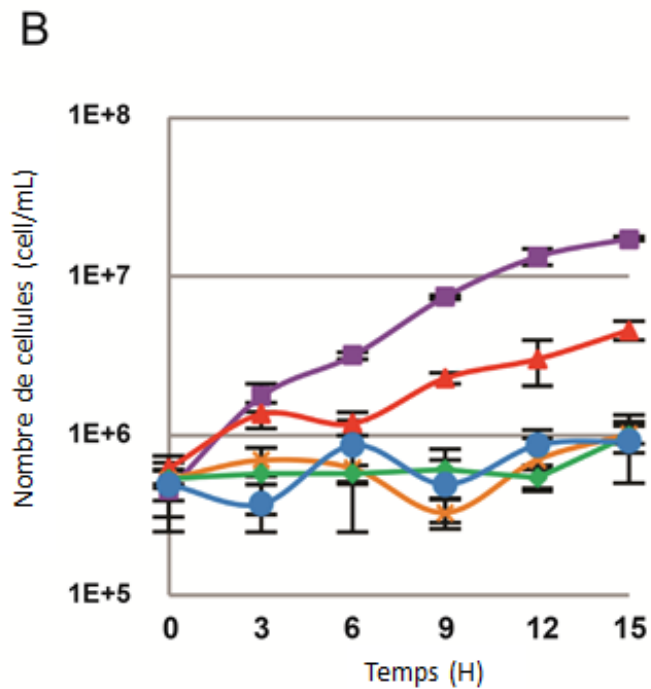
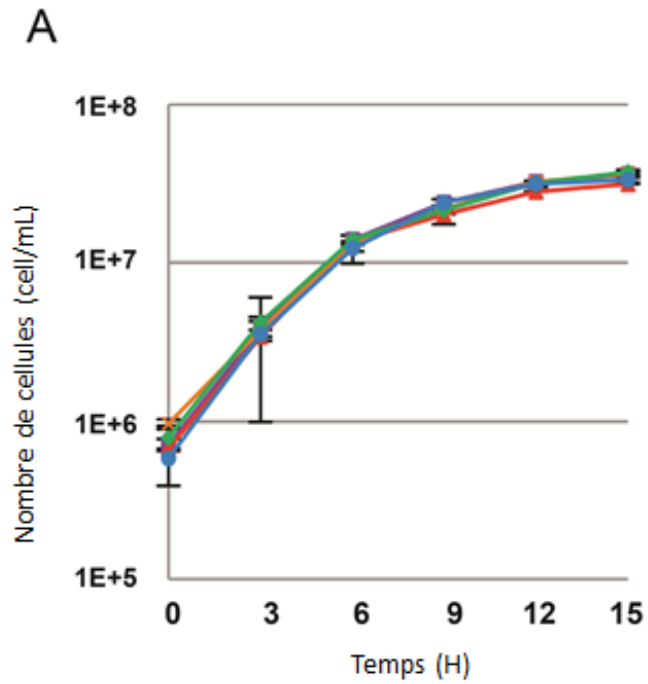
Migration sur gel des produits PCR des souches mutantes construites. (A) Amplification du gène *TK0664* réalisé avec les amorces *XhoI-6MPK\_Up* et *SmaI-6MPK\_Do* (Primer pair 1, Figure 29-A) pour vérifier le génotype de *pUPH* après intégration dans le génome de *T. barophilus* (*int*, 819bp). (B) L'amplification du gène *TERM\_00517* a été réalisée avec les amorces de vérification *Verif-Δ6MPB\_Up* et *Verif-Δ6MPB\_Do* (puits 1 et 3) et des amorces *6MPB\_verif\_YM\_Up* and *6MPB\_verif\_YM\_Do* (puits 2 et 4).

### I.e. Tests de sensibilité des souches mutées

Le même protocole que pour les premiers tests de sensibilité au 6-MP, a été effectué sur les deux mutants obtenus : *T. barophilus*  $\Delta$ *TERM\_00517* et  $\Delta$ *TERM\_00517* ::*pUPH-1*.

Une culture dans du TRM complété avec des concentrations de 0 à 250  $\mu$ M de 6-MP.

*T. barophilus* mutée a été obtenue suite au second screening par le 6-MP, ces souches ne possèdent plus le plasmide, elles ne sont donc plus sensibles à la 6-MP, de plus suite à la transformation par le plasmide *pUPH1*, elles ne possèdent plus le gène homologue à *TK0664* : *TERM\_00517* celui-ci ayant été délété. Ce qui permet de voir si ce gène a une influence sur la croissance en présence de 6-MP.



**Figure 30: Tests de sensibilité des mutants obtenus**

**Courbes de croissance: *T. barophilus* ΔTEMP\_00517 (A); and *T. barophilus* ΔTEMP\_00517::pUPH-1 (B). Les souches sont cultivées à 85 °C et 0.1 MPa dans du TRM Contenant différentes concentration de 6-MP: 0 μM (■), 10 μM (▲), 50 μM (×), 100 μM (◆) and 250 μM (●).**

La croissance n'est pas influencée par la 6-MP. Les résultats sont différents de ceux obtenus avec la souche *T. barophilus* wt (**figure 30-A**) qui elle possède le gène *TERMP\_00517*, où un petit effet dose était observé, la densité cellulaire était plus faible en fonction de la concentration de 6-MP ajoutée au milieu de culture. Ainsi le gène *TERMP\_00517* induirait une légère sensibilité à la 6-MP. Les travaux à venir de délétion des gènes d'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques, seront donc réalisés avec cette souche *T. barophilus* mutée rendue insensible à la 6-MP.

*T. barophilus* muté intermédiaire est obtenu par transformation de *T. barophilus* muté par pUPH1. La souche ne possède plus le gène *TERMP\_00517*, mais à la fin de la première recombinaison, elle possède le gène *Tk0664* (intégration du plasmide). *T. barophilus* mutée intermédiaire est donc rendu sensible à la 6-MP. Aucune croissance n'est observée pour les fortes concentrations de 6-MP ajoutées dans le milieu (50 µM, 100 µM et 250 µM), pour 10 µM de 6-MP le profil de croissance est différent. Malgré le fait que le gène *TERMP\_00517* ne soit plus présent la sensibilité semble plus importante qu'en présence de ce gène. Pourtant ce gène qui est un homologue de *Tk0664* avait montré d'après les résultats précédents un certain effet de sensibilité de la souche à la 6-MP (effet dose lors de la cinétique de *T. barophilus* wt) (**figure 26-b**).

#### **I.f. Efficacité du nouveau marqueur de sélection**

A la fin des deux étapes de recombinaison, deux possibilités sont à envisager, la forme sauvage, où la mutation n'a pas eu lieu, ou la souche délétée sans le gène d'intérêt. Des PCR sont réalisées afin de vérifier que le gène a bien été délété. Or avec la sélection au 5-FoA, une troisième forme appelée faux positifs est possible. Cette forme contient toujours le plasmide, et est donc doublement résistante, il est donc nécessaire de vérifier l'absence du plasmide dans le génome. Une dernière étape était donc réalisée avec l'ancienne méthode, un screening sur TRM et TRM complémenté par de la Simvastatine. Les souches qui ne contiennent plus le plasmide sont sensibles à la Simvastatine, elles ne se développent que sur le TRM non complémenté. Seuls les faux positifs se développent sur les deux milieux.

Nous avons donc afin de valider ou non, l'efficacité de la nouvelle méthode, comparé les taux de FP obtenus: avec le 5-FoA sur les 726 clones testés, 625 sont des faux positifs. Les premières manipulations décrites précédemment (obtention de *T.b* $\Delta$ *TERMP\_00517*) ont donné un taux de faux positifs de 37%. Avec les constructions réalisées avec le nouvel outil ( $\Delta$ *TERMP\_00517* et 6-MP) sur 326 clones testés, aucun FP ne sont obtenus.

### I.g. Conclusion de l'étude

L'objectif de cette étude était de trouver une alternative au marqueur de contre sélection 5-FoA qui présentait de nombreux désavantages sur le plan pratique : forte concentration dans le milieu (0,8%), non solubilité dans le milieu à température ambiante, diminution du pH une fois celui-ci dissout dans le milieu, sans oublier notre inconvénient majeur dans la contre sélection le fort taux de faux positifs (Sim résistant et 5-FoA résistant).

Tout d'abord les transformations sur *T. barophilus* par le plasmide pUPH-1, portant le gène de sensibilité à la 6-MP : *TK0664*, ont permis de rendre sensible à la 6-MP la souche, puisque seule une légère sensibilité avait été mise en évidence sur la souche WT lors des premiers tests de sensibilité. Cette sensibilité a pu être mise en évidence par le suivi de croissance effectuée avec différentes concentrations de 6-MP.

Ainsi pour la suite des manipulations sur *T. barophilus*, la 6-MP peut être utilisée comme marqueur de contre-sélection.

Ces cinétiques et la création du mutant *T. barophilus*  $\Delta$ *TERMP\_00517* ont également permis de supposer l'implication du gène *TERMP\_00517* (homologue de *TK0664* chez *T. barophilus*) dans la sensibilité de la souche au 6-MP. Puisque une fois délété, *T. barophilus* devient complètement insensible à la 6-MP et ce peu importe la dose d'antibiotique présente dans le milieu. Ainsi pour les études à venir, la souche de *T. barophilus* muté (*T. barophilus*  $\Delta$ *TERMP\_00517*) sera utilisée pour éviter toute interférence de ce gène lors de la contre-sélection.



Enfin en ce qui concerne l'efficacité de cette nouvelle méthode, à la fin des événements de sélection par la Simvastatine puis par la 6-MP, le taux de faux positifs n'est que de 37% contre 60-90% obtenu par le 5-FoA. L'objectif premier est donc rempli puisque le taux de faux positif est nettement diminué.

L'outil est actuellement utilisé en routine au laboratoire. Celui-ci est utilisé dans d'autres projets, notamment pour l'ANR CASPAR, dont le but est de décrypter le rôle physiologique de deux ribonucléases majeures de type  $\beta$ -CASP, aCPSF1 et aRNaseJ conservés chez les archées, en travaillant sur deux modèles *P. abyssi* et *T. barophilus*.

La délétion des gènes d'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques. Les délétions de clusters de gènes à effectuer se sont appuyer sur les résultats de transcriptomique de Pauline Vannier lors de sa thèse (Vannier, 2012) où certains gènes étaient sur/sous exprimés en fonction des variations de pression.

## Chapitre 2 : Obtention et caractérisation des mutants hydrogénases

### II.a. Construction des mutants hydrogénases

#### II.a.1. Contexte de l'étude

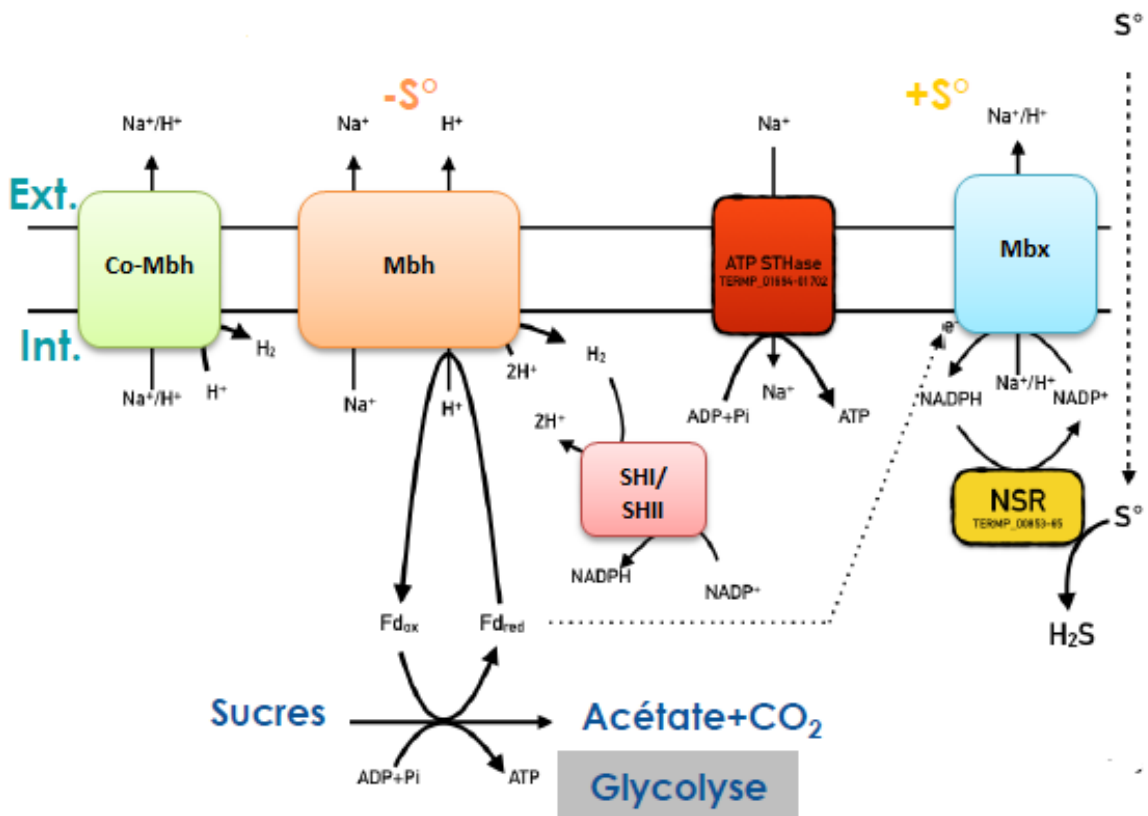
Par la suite, nous avons utilisé l'outil génétique décrit dans le chapitre 1, afin d'approfondir une thématique liée à la souche piézophile *T. barophilus*, à savoir les mécanismes mis en œuvre par cette souche pour s'adapter à la pression hydrostatique. Le travail s'est focalisé sur les hydrogénases, puisque les études de transcriptomique préliminaires ont montré des variations de l'expression de ces gènes en fonction de la pression (Vannier, 2012). Un certain nombre de mutants ont été obtenus : trois hydrogénases membranaires : mutant de *mbh* ( $\Delta mbh$ ), mutant de Mbh-Codh ( $\Delta co-mbh$ ) et mutant de Mbx ( $\Delta mbx$ ), et deux cytosoliques : mutant de SHI ( $\Delta shI$ ) et mutant de SHII ( $\Delta shII$ ), ainsi qu'un double mutant délété pour *mbh* et *mbh-codh* ( $\Delta mbh/\Delta co-mbh$ ). La construction des mutants se poursuit afin de comprendre au mieux le fonctionnement de ces hydrogénases et leur possible intervention dans l'adaptation à la pression.

Les différents types d'hydrogénases sont codés par des clusters de gènes identifiés dans le génome de *T. barophilus* suite à son séquençage complet (Vannier, 2012; Vannier et al., 2011).

Les hydrogénases ciblées lors de cette étude sont :

Mrp-Mbh (Membrane bound hydrogenase) codée par deux clusters *TERMP\_01498-85* et *TERMP\_01484-71*, Mrp-Mbx (Membrane bound oxidoreductase) codée par *TERMP\_00965-53*, SHI (Sulphydrogenase I) codée par *TERMP\_00539-36*, SHII (Sulphydrogenase II) codée par *TERMP\_0067-70* et Mrp-Mbh-Codh (monoxyde de carbone hydrogénase), capable d'oxyder le monoxyde de carbone, codée par *TERMP\_01154639* (**tableau 13**).

L'utilisation de l'outil génétique décrit dans le premier chapitre a permis la délétion de plusieurs clusters et la création de mutants (**figure 31 et tableau 13**).



**Figure 31:** Les hydrogénases ciblées dans cette étude

d'après (Moon et al., 2015; Schut et al., 2012; Vannier, 2012)

Les hydrogénases membranaires Mbh (en orange) et Mbh-Codh (en vert) ont été ciblées, l'oxidoréductase Mbx (en bleu), et les deux hydrogénases cytosoliques SHI et SHII (en rouge).

**Tableau 13:** Clusters hydrogénases étudiés dans cette étude

Hydrogénase	Gènes codants	Gènes délétés
Mrp-Mbh	TERMP_01498-85 TERMP_01484-71	TERMP_01498-71
SHI	TERMP_00539-36	TERMP_00539-36
SHII	TERMP_0067-70	TERMP_00070-67
Mrp-Mbh-Codh	TERMP_01154-39	TERMP_01150-46
Mrp-Mbx	TERMP_00865-53	TERMP_00865-53

Des PCR sont réalisées afin de vérifier, que les mutants obtenus ont bien subi la délétion des gènes cibles et qu'ils ne contiennent pas le plasmide utilisé lors de la transformation. La taille des amplicons attendue avec l'utilisation des amorces est présentée dans le tableau (tableau 14).

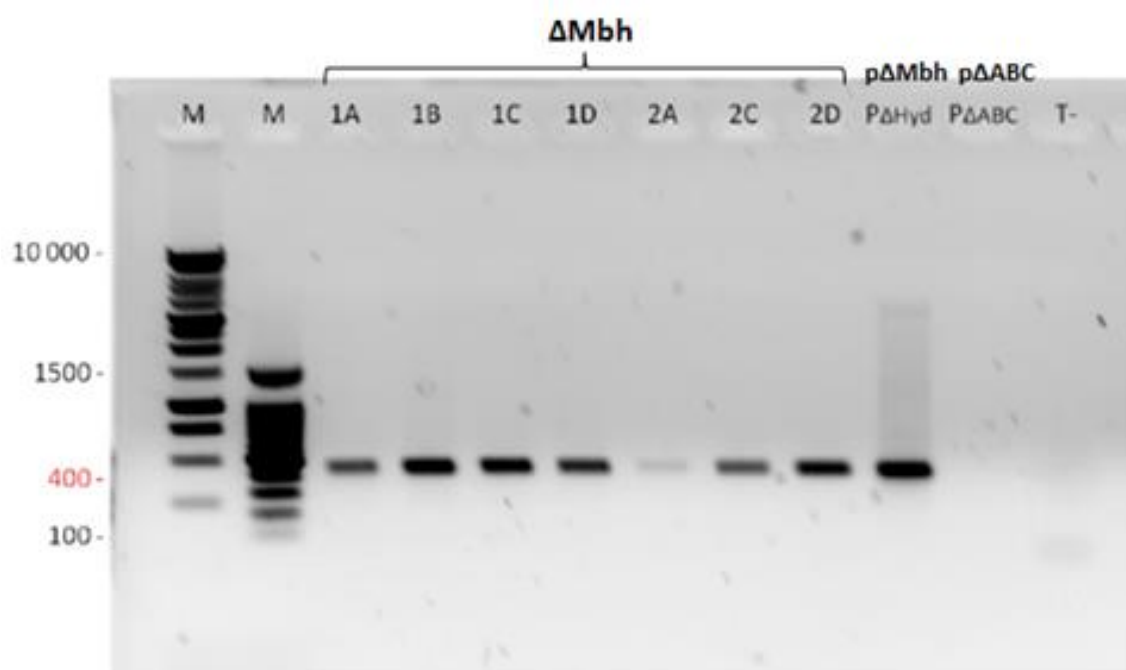
**Tableau 14: Taille des amplicons attendus**

Mutants	Taille WT (pb)	Taille mutant (pb)
Mutant <i>mbh</i> ( $\Delta mbh$ )	4525	466
Mutant <i>mbh-codh</i> ( $\Delta co-mbh$ )	4420	367
Mutant <i>shI</i> ( $\Delta shI$ )	5975	480
Mutant <i>shII</i> ( $\Delta shII$ )	17040	458
Mutant <i>mbx</i> ( $\Delta mbx$ )	10688	1008

Les résultats attendus par électrophorèse des produits PCR sont présentés ci-après.

## II.a.2. Obtention des mutants

### II.a.2.a. Obtention du mutant *mbh* ( $\Delta mbh$ )



**Figure 32: Gel de vérification des mutants  $\Delta mbh$**

Le gel d'électrophorèse obtenu après migration des produits PCR pour la vérification des mutants *mbh* ( $\Delta mbh$ ) est présenté sur la figure (**figure 32**).

Afin de valider la PCR, plusieurs témoins ont été réalisés. Un premier témoin négatif, dans lequel l'ADN a été remplacé par de l'eau, permet de vérifier l'absence d'amplification en absence d'ADN et donc l'absence de contaminants dans les produits utilisés pour réaliser la PCR. Le second témoin négatif contient de l'ADN plasmidique utilisé pour la délétion du complexe ABC, impliqué dans le transport du maltose. Ce témoin permet de valider l'absence

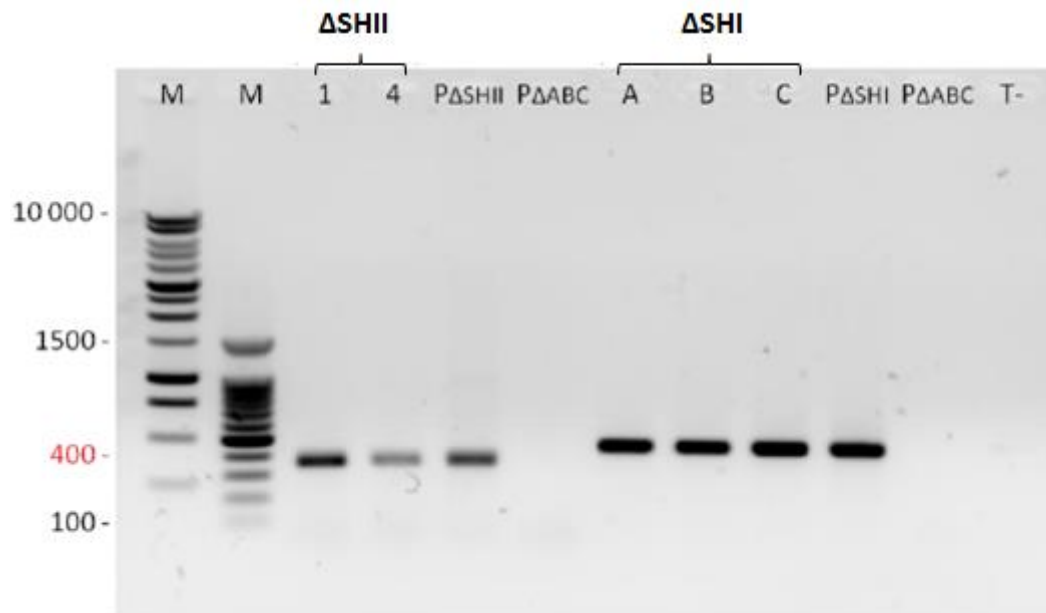
d'amplification aspécifique, c'est-à-dire l'amplification de gènes non ciblés par les amorces utilisées.

Un témoin positif a également été réalisé. Il contient de l'ADN plasmidique utilisé pour la création de mutants. Il permet ainsi de vérifier que les amorces sont spécifiques et permettent bien d'amplifier les gènes ciblés, c'est-à-dire la séquence correspondante à la fusion des régions flanquantes situées de part et d'autres du cluster de gène délété.

L'absence de bandes, et ainsi l'absence de produits d'amplification pour les témoins négatifs, et un amplicon correspondant à la taille attendue pour le témoin positif de chaque mutant. Les témoins sont donc validés et les résultats obtenus peuvent être interprétés.

Pour chacun des mutants testés, on constate la présence d'une bande correspondant à un amplicon d'une taille globalement comprise entre 400 et 500 pb, par comparaison avec les marqueurs de taille. Cela correspond bien au produit d'amplification attendu pour la forme mutante qui est de 458 pb, donc les cellules obtenues sont bien des mutants  $\Delta mbh$ .

### **II.a.2.b. Obtention des mutants *shI* ( $\Delta shI$ ) et *shII* ( $\Delta shII$ )**



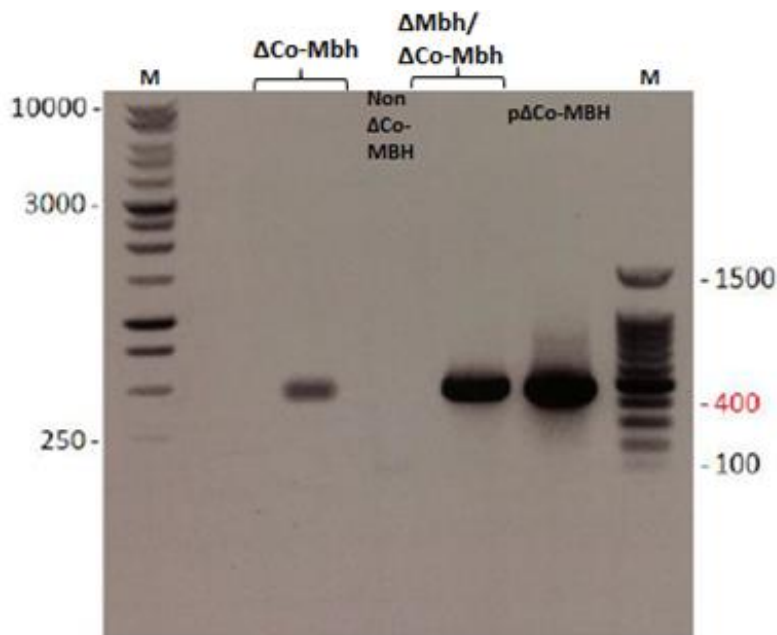
***Figure 33: Gel de vérification des mutants  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$***

La figure montre les résultats obtenus après migration pour la vérification de l'obtention des

mutants  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$  (**figure 33**). Les témoins sont identiques à ceux utilisés pour les mutants  $\Delta mbh$  et ils sont validés de la même façon. Les résultats sont donc exploitables.

Pour chaque mutants  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$ , une bande est observée, située à 400 pb. De plus, on voit que les bandes  $\Delta shII$  sont plus basses sur le gel et correspondent à un fragment plus court, par rapport à  $\Delta shI$ . Cela coïncide bien avec les tailles de fragments attendus puisque la taille des amplicons attendue pour les mutants  $\Delta shII$  est de 367 pb et de 466 pb pour  $\Delta shI$ . Ces résultats confirment l'obtention des mutants  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$ .

### **II.a.2.c.Obtention du mutant $\Delta mbh-codh$ ( $\Delta co-mbh$ ) et du double mutant $\Delta mbh/\Delta mbh-codh$ ( $\Delta mbh/\Delta co-mbh$ )**



**Figure 34:** Gel de vérification du mutant  $\Delta co-mbh$  et du double mutant  $\Delta mbh/\Delta co-mbh$

Les résultats de la PCR de vérification du mutant  $\Delta co-mbh$  et du double mutant  $\Delta mbh/\Delta co-mbh$  sont présentés sur la figure (**figure 34**).

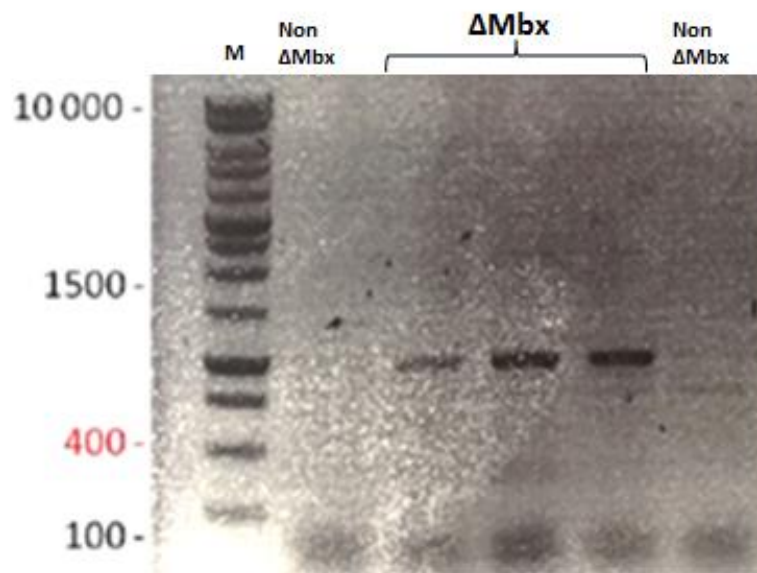
Les témoins négatifs pour cette PCR sont différents des précédents. Le témoin contient de l'ADN de cellules préalablement utilisées pour faire la mutation mais ayant été identifiées comme non mutantes, il y a donc bien absence d'amplification. Comme précédemment, le témoin positif est réalisé avec l'ADN plasmidique utilisé pour la transformation. Une

amplification est observée, le témoin est donc valide et le résultat interprétable.

Pour le mutant  $\Delta co-mbh$ , une bande est présente à environ 400 pb, ce qui correspond à la taille attendue de 480 pb. Les cellules ont donc bien subi la mutation.

Un double mutant a également été créé par l'utilisation de cellules mutantes  $\Delta mbh$  transformée avec le plasmide  $\Delta co-mbh$ . On observe l'amplification d'un fragment de même taille que pour  $\Delta co-mbh$  et pour le témoin positif, l'obtention du double mutant  $\Delta mbh/\Delta co-mbh$  est donc confirmée.

#### II.a.2.d. Obtention du mutant $\Delta mbx$ ( $\Delta mbx$ )



**Figure 35:** Gel de vérification de l'obtention du mutant  $\Delta mbx$

Les résultats de la PCR de vérification du mutant  $\Delta mbx$  sont présentés sur la figure (**figure 35**). Les témoins négatifs pour cette PCR sont différents des précédents. Le témoin contient de l'ADN de cellules préalablement utilisées pour faire la mutation mais ayant été identifiées comme non mutantes, il y a donc bien absence d'amplification. Ici, le témoin positif n'a pas été réalisé avec l'ADN plasmidique utilisé pour la transformation. Une amplification a été observée pour les trois mutants testés, avec une taille de 1000 pb, ce qui correspond bien à la taille attendue pour la souche mutante.

### **II.a.3. Vérification de l'absence du plasmide**

Par ailleurs, l'absence du plasmide à l'intérieur des cellules a également été vérifiée en réalisant une PCR avec des amorces spécifiques du gène *Tk0664* pour tous les mutants. Ces résultats ne sont pas présentés ici mais l'absence d'amplification a confirmé que le plasmide n'était pas présent.

L'ensemble de ces résultats confirme que les mutants  $\Delta mbh$ ,  $\Delta shI$ ,  $\Delta shII$ ,  $\Delta Co-Mbh$  et le double mutant  $\Delta mbh/\Delta co-mbh$  ont bien été obtenus.

L'étape suivante a consisté à caractériser ces mutants en réalisant des cinétiques de croissance et des dosages d' $H_2$ , afin d'étudier le rôle des gènes délétés.

### **II.a.4. Conclusion de l'étude**

L'ensemble des mutants ciblés ont été obtenus, vérifiés par PCR dans un premier temps comme l'ont montré les résultats précédents, puis par séquençage (méthode de Sanger, Beckman Coulter Genomics (UK)).

Les premiers mutants obtenus à savoir  $\Delta mbh$ ,  $\Delta co-mbh$ ,  $\Delta shI$ ,  $\Delta shII$  ont été caractérisés par des cultures sous pression à 0,1MPa, 40MPa et 70MPa, ainsi que par un dosage d'hydrogène à pression atmosphérique. Les premiers résultats obtenus seront présentés dans la deuxième partie du chapitre 2.

En ce qui concerne les mutants obtenus à savoir  $\Delta mbx$  et le double mutant  $\Delta mbh/\Delta co-mbh$ , les mêmes travaux de caractérisation seront à réaliser afin d'avoir une réponse complète du métabolisme des hydrogénases à 0,1 MPa et sous pression. Le but étant de pouvoir comparer ce métabolisme avec d'autres *Thermococcales* où des études semblables ont été menées, mais également dans le cas de notre souche piézophile d'étudier leur rôle sous pression et leur éventuel implication dans l'adaptation à la pression.

Mais le travail de construction de mutants dans cette partie : hydrogénases et implication de celles-ci dans l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques reste à compléter. En effet concernant le mutant  $\Delta mbx$ , ce cluster contient deux fois 14 gènes, la totalité a été délétée dans cette étude mais il serait intéressant de déléter séparément les deux parties afin de voir le rôle



de chaque cluster indépendamment. Pour les autres mutants  $\Delta co-mbh$ ,  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$  les 16 gènes et 4 gènes respectivement ont été délétés.

Il pourrait également être intéressant de continuer à construire des doubles mutants comme il a été fait pour le double mutant  $\Delta mbh/\Delta co-mbh$ . Ainsi les doubles mutants  $\Delta shI/\Delta shII$ ,  $\Delta shI/\Delta mbh$ ,  $\Delta shI/\Delta co-bh$ ,  $\Delta shII/\Delta mbh$ ,  $\Delta shII/\Delta co-mbh$  sont à envisager pour compléter l'étude.

Enfin le régulateur transcriptionnel SurR est également ciblé. Des tentatives d'obtention du mutant ont été réalisées, mais pour le moment elles sont restées infructueuses. Il est probable que le problème soit lié à l'organisation du génome autour de l'ORF *surR* avec une zone de chevauchement entre les gènes. Un autre plasmide a donc été construit pour une délétion partielle de SurR.

Une fois le nouveau plasmide obtenu, il sera utilisé pour transformer *T. barophilus*. Etant donné l'importance du soufre dans le métabolisme des hydrogénases, et le fait que SurR soit à l'origine de cette régulation, de ce basculement entre les hydrogénases productrices H<sub>2</sub> et celles productrices d'H<sub>2</sub>S, l'obtention de ce mutant serait intéressant pour voir si le métabolisme des hydrogénases fonctionne similairement aux autres *Thermococcales* chez notre souche modèle. Les croissances sous pression permettraient d'étudier le fonctionnement de ce régulateur sous pression.

## II.b. Caractérisation des mutants hydrogénases

### II.b.1. Contexte de l'étude

Une fois les mutants obtenus, nous avons décidé de les caractériser physiologiquement par deux approches, dans le but de comprendre le fonctionnement des hydrogénases chez *T. barophilus*, mais également d'en apprendre davantage sur leur possible implication dans l'adaptation aux HPH.

Tout d'abord **des cultures sous pression** ont été réalisées, avec les incubateurs de hautes pressions et hautes températures. Une période de mise au point des cultures a été nécessaire (utilisation d'un réducteur pour éviter l'oxygène dans le milieu, taille des seringues, méthode de comptage), afin d'obtenir des résultats les plus répétables possibles.

Pour une même température (85°C), différentes conditions de pressions ont été testées : 0,1 MPa, 40 MPa et 70 MPa, en se référant aux études transcriptomiques antérieures (Vannier, 2012; Vannier et al., 2015). 40 MPa correspond à la pression optimale de la souche, celle-ci ayant été découverte au niveau de la dorsale médio-Atlantique à 3550 m de profondeur. 0,1 et 70 MPa sont des pressions où la souche se développe, mais qui peuvent engendrer un stress, et possiblement une réponse métabolique différente, permettant à la souche de s'adapter.

Les gènes ciblés sont ceux codant pour les hydrogénases, dont l'expression est modulée par les variations de pression, notamment sur-exprimés pour des conditions de pressions éloignées de son optimum (Vannier, 2012). Nous voulions voir si le fait d'avoir délété ces gènes, allait avoir une influence sur la croissance de la souche en fonction de la pression; et ainsi en déduire une possible implication d'un ou plusieurs clusters de gènes dans l'adaptation à la pression. Comme le soufre a une influence certaine sur le métabolisme des hydrogénases, les cultures ont été réalisées dans les deux conditions : avec ou sans soufre.

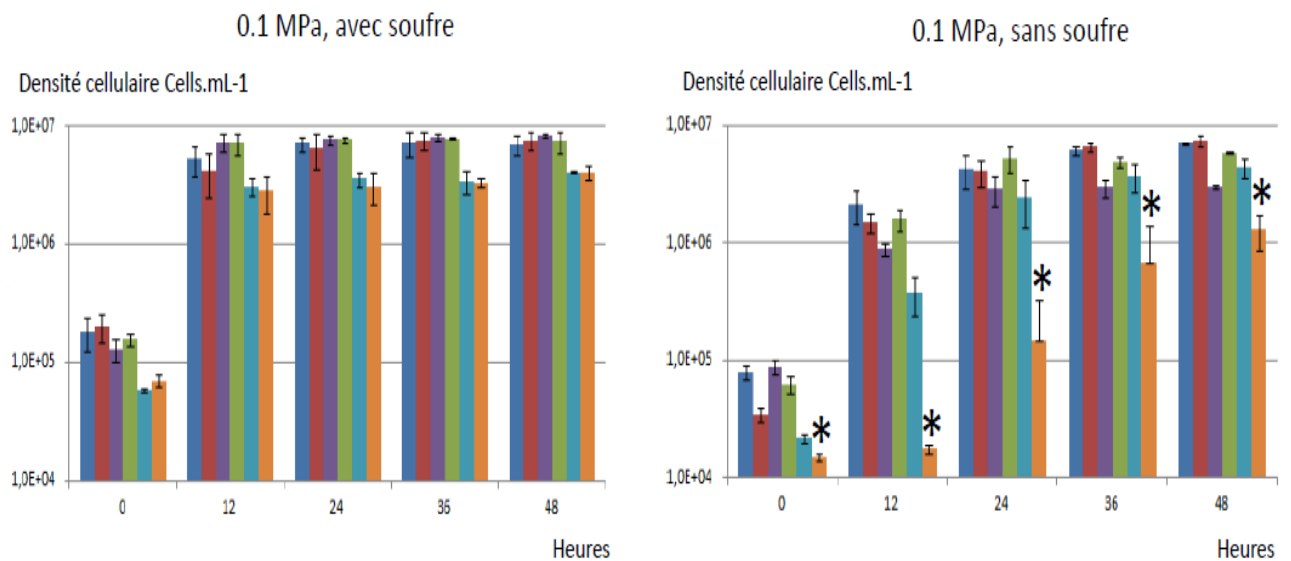
Dans un deuxième temps, **des mesures de la production d'hydrogène** ont été entreprises. Une période de mise au point de la méthode a également été nécessaire, où des cultures avec/sans soufre ont été réalisées.

### II.b.2. Résultats des croissances des mutants hydrogénases sous pression

### II.b.2.a. Croissances à 0,1 MPa

Dans un premier temps, nous voulions voir la croissance des mutants à pression atmosphérique (0,1 MPa) (figure 36).

Les souches *T. barophilus* sauvage et le mutant (*T.b* $\Delta$ *TERMP\_00517*), nous servent de témoin pour apprécier une croissance standard de *T. barophilus*, et constitue un élément de comparaison avec les croissances obtenues pour les mutants ( $\Delta$ *mbh*,  $\Delta$ *co-mbh*,  $\Delta$ *shI*,  $\Delta$ *shII*).



**Figure 36:** Croissance des mutants hydrogénases à 0,1 MPa avec et sans soufre

Les souches étudiées pendant le suivi de croissance :  $\Delta$ *co-mbh* (bleu clair),  $\Delta$ *mbh* (orange), Témoin  $\Delta$ *TERMP\_00517* (rouge),  $\Delta$ *shI* (mauve),  $\Delta$ *shII* (vert), Témoin *T. barophilus* WT (bleu foncé)

\* : retard de croissance et diminution de la densité cellulaire pour le mutant *mbh*

A 0,1 MPa et en présence de soufre, les croissances sont semblables pour l'ensemble des mutants et des témoins, on observe une croissance exponentielle et un plateau atteint au alentours de 12 h de culture avec une concentration cellulaire finale proche de  $10^7$  cell/mL. A 0,1 MPa avec soufre, les croissances des mutants *mbh* et *co-mbh* sont légèrement plus faibles, mais les taux de croissance sont de 2,3 et 2,1 h respectivement ; et de 2,5 h pour la souche sauvage. On peut donc dire que les croissances sont similaires pour les différentes souches. Cet histogramme prouve qu'à pression atmosphérique et avec soufre, les hydrogénases délétées n'entraînent pas de différence significative et n'entrent pas dans le développement de *T. barophilus*.

Les cultures présentées dans l'histogramme de droite, **sans soufre**, sont différentes, la

croissance est plus lente. En effet le plateau est atteint seulement au bout de 36 h, contre 12 h avec soufre dans le milieu. En revanche si le développement est ralenti, la concentration cellulaire finale est semblable à celle obtenue précédemment.

Ces souches présentent donc un développement cellulaire initial plus lent en absence de soufre, et atteignent finalement le même taux de croissance. Par ailleurs, la différence est due uniquement au paramètre soufre, et non pas aux mutations, puisque les mutants présentent une croissance d'allure similaire aux témoins.

Cette observation ne s'applique pas au mutant *mbh* ( $\Delta mbh$ ). Ces cellules présentent un temps de latence de 12 h, pendant lequel il n'y a pas de développement, puis la croissance est exponentielle mais plus faible que pour la souche sauvage et les autres mutants.

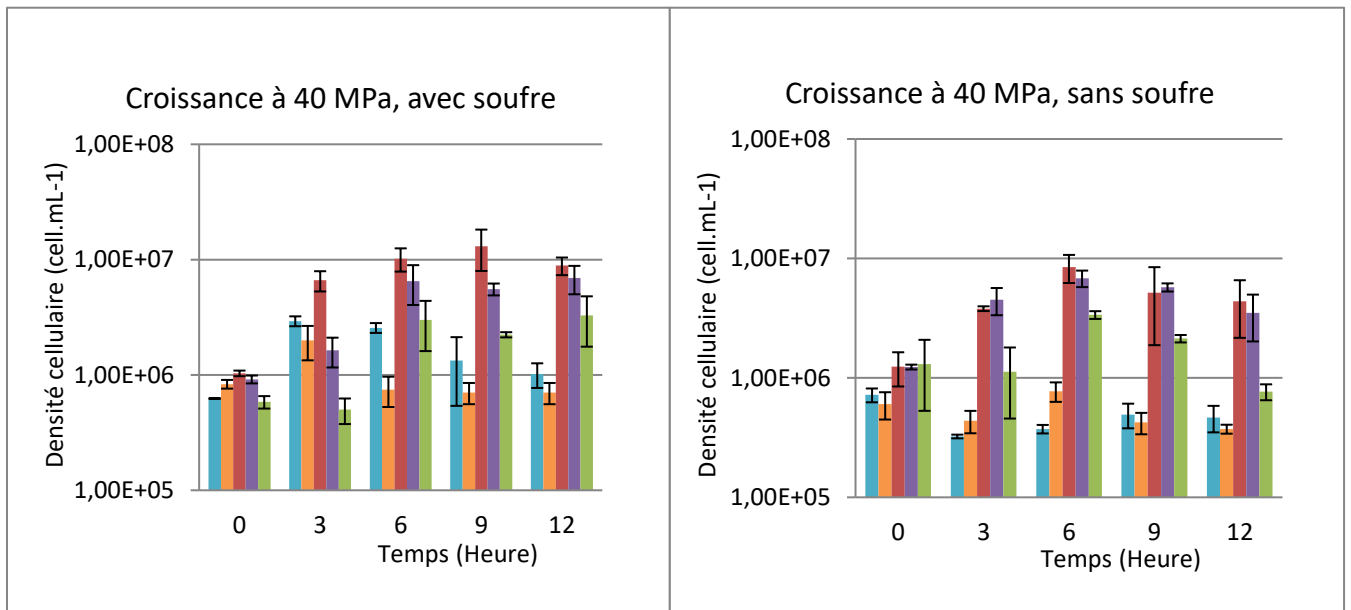
**Il semble que les deux clusters *mbh* délétés de *Mbh* soient impliqués dans la croissance de *T. barophilus* à 0,1 MPa, en absence de soufre.**

#### **II.b.2.b. Croissances à 40 MPa et 70 MPa**

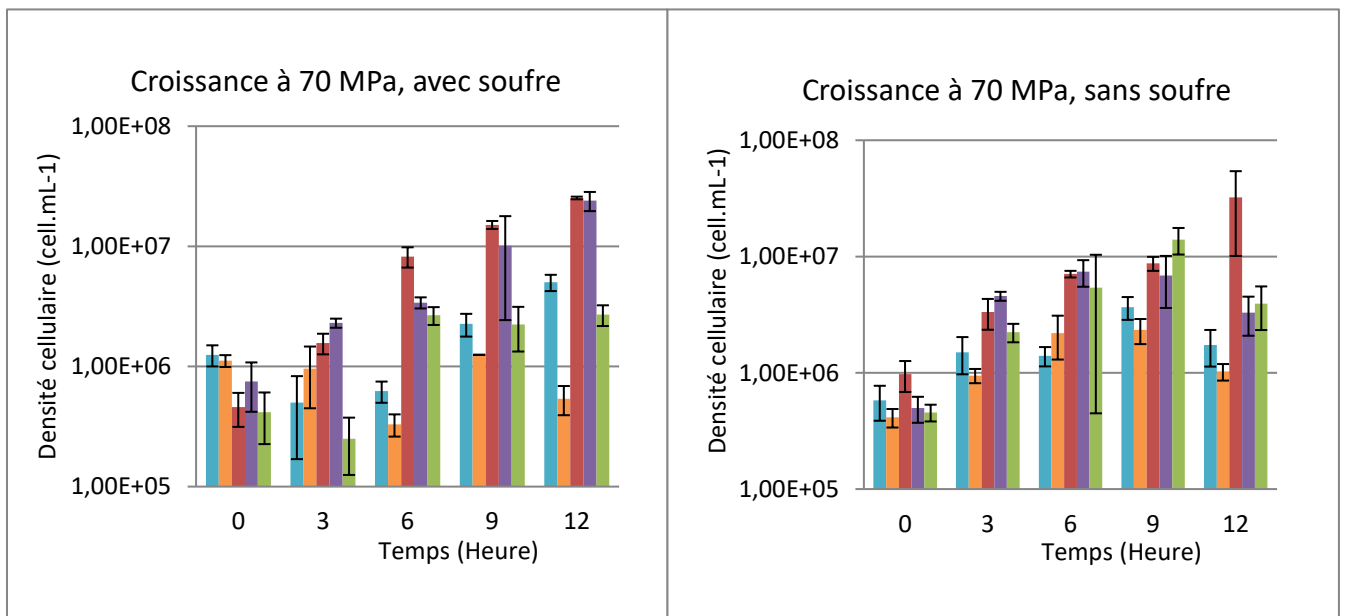
Nous avons testé la croissance sous pression des mêmes souches afin de comparer, mais sur des temps plus courts: un suivi de croissance de 12 h avec des points de cinétique réalisés tous les 3 h. Un seul témoin est réalisé ici, il s'agit de la souche  $\Delta TERMP\_00517$ , placé dans chaque incubateur pour toutes les croissances entreprises. Dans les cas où aucune croissance n'est obtenue pour le témoin, la manipulation n'est pas valable.

Rappelons que 40 MPa, correspond à la pression optimale de croissance de la souche *T. barophilus*, et que 70 MPa est une pression supra-optimale. Les croissances obtenues à 40 MPa, reflètent donc normalement le fonctionnement « optimal » du métabolisme de *T. barophilus*,

et 70 MPa à l'instar de la pression de 0,1 MPa, une condition de stress.



**Figure 37:** Croissance des mutants hydrogénases à 40 MPa, avec et sans soufre *Aco-mbh* (bleu clair), *Ambh* (orange), Témoin *ΔTERMP\_00517* (rouge), *ΔshI* (mauve), *ΔshII* (vert)



**Figure 38:** Croissance des mutants hydrogénases à 70 MPa, avec et sans soufre *Aco-mbh* (bleu clair), *Ambh* (orange), Témoin *ΔTERMP\_00517* (rouge), *ΔshI* (mauve), *ΔshII* (vert)

A 40 MPa et 70 MPa en présence et en absence de soufre, on observe une croissance du mutant *ΔTERMP\_00517* (figure 37 et 38), présent dans toutes les manipulations sous pression que nous avons entreprises, il sert de témoin de croissance.

Pour les deux pressions testées, **en présence de soufre (figure 37)**, on remarque une croissance proche de celle du témoin pour les mutants des hydrogénases cytosoliques ( $\Delta shI$  et  $\Delta shII$ ), et au contraire une croissance plus faible pour les hydrogénases membranaires ( $\Delta mbh$  et  $\Delta co-mbh$ ). **En absence de soufre** pour les deux pressions testées (**figure 38**), les mêmes conclusions peuvent être faites, les mutants hydrogénases cytosoliques présentent une croissance, même si le mutant *shII* (qui correspond au *shI* de *P. furiosus*) a une croissance plus faible que le mutant *shI* (qui correspond au *shII* de *P. furiosus*), et les mutants hydrogénases membranaires  $\Delta mbh$  et  $\Delta co-mbh$ , ont une croissance très faible à 40 MPa et 70 MPa sans soufre.

**L'hydrogénase membranaire Mbh a possiblement un rôle pour la croissance de *T. barophilus*, pour toutes les pressions testées, que ce soit l'optimum (40 MPa) ou les conditions sub et supra-optimales (0,1 et 70 MPa).** La différence notable est que pour la pression de 0,1 MPa, en présence de soufre, le mutant *mbh* n'est pas impacté, mais pour des plus fortes pressions de 40 et 70 MPa, le mutant a une croissance impactée avec et sans soufre. Il serait donc intéressant de voir le comportement du mutant de l'hydrogénase Mbh pour les différentes pressions. Mbh fonctionne peut être seulement en présence de soufre, pour de faible pression.

Alors que le mutant *co-mbh* présente une croissance non impactée à 0,1 MPa, on remarque que pour des pressions plus élevées, la présence de l'hydrogénase Mbh-Codh semble plus importante pour la croissance de *T. barophilus*.

Pour l'hydrogénase SHII, son absence ne semble pas importante à 0,1 MPa, pourtant pour des pressions plus élevées, notamment à 40 et 70 MPa sans soufre, son absence semble entraîner un défaut de croissance.

L'hydrogénase SHI ne semble pas quant à elle, avoir de rôle dans la croissance de la souche et ce pour toutes les conditions de pression et de soufre testées.

### **II.b.3. Résultats de la production d'hydrogène des mutants hydrogénases**

Des suivis de la production d'H<sub>2</sub> par les mutants ont été réalisés par chromatographie en phase

gazeuse. En parallèle un suivi de croissance a été effectué. A chaque temps, sont donc réalisés: une mesure de la production d'H<sub>2</sub> et un prélèvement de cellules qui sera fixée et comptée. Des cinétiques sur 12 h ont tout d'abord été réalisées sur le témoin et les mutants; mais aucune production de gaz n'était détectée, nous avons donc augmenté le temps de cinétique, avec la réalisation de points de cinétique, à partir du temps t 24 h. En ce qui concerne l'ajout de soufre dans le milieu, nous avons au préalable réalisé des mesures du témoin ( $\Delta TERMP\_00517$ ) avec une concentration de 1 g/L de soufre et sans soufre. Les résultats de production d'H<sub>2</sub> ont donné de meilleurs résultats avec du soufre dans le milieu. Ce qui est étonnant puisque la production d'hydrogène par les hydrogénases, se fait normalement sans soufre. Nous avons donc réalisé une gamme de soufre (0 à 1,5 g/L), afin d'optimiser la quantité de soufre à utiliser. La quantité de 0,5 g/L a été choisie puisqu'elle donnait le meilleur taux de production et le meilleur rendement cellulaire. Mais il sera nécessaire de réaliser, des mesures de la production d'H<sub>2</sub> et également d'H<sub>2</sub>S sur le témoin et l'ensemble des mutants, avec des quantités de soufre de 0, 0,5, 1 et 2 g/L. Dans un premier temps en suivant le même protocole à pression atmosphérique et si possible par la suite sous pression (40 et 70 MPa).

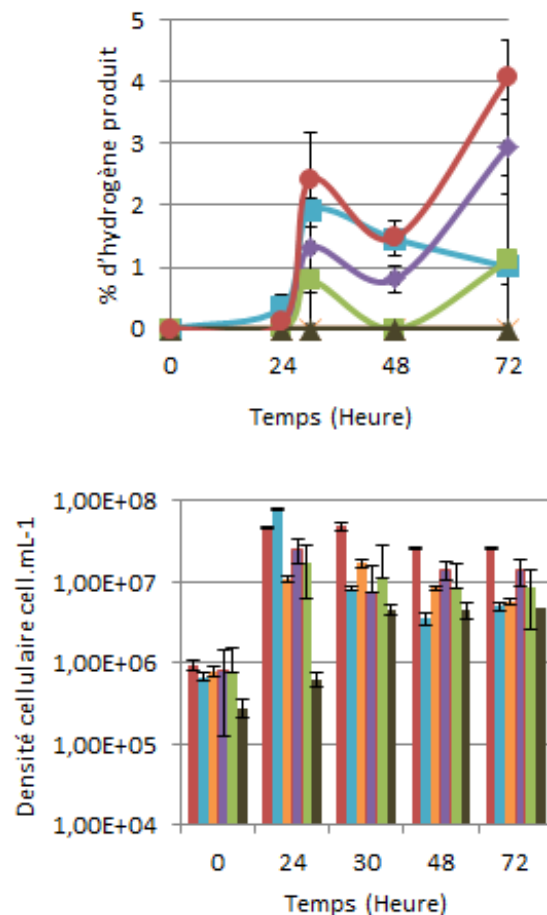
Pour le moment la condition testée est un suivi de croissance et de production d'H<sub>2</sub> du témoin  $\Delta TERMP\_00517$  et des mutants ( $\Delta mbh$ ,  $\Delta co-mbh$ ,  $\Delta shI$ ,  $\Delta shII$  et  $\Delta mbx$ ) sur 72h, avec soufre (0,5 g/L), à pression atmosphérique.

➤ Graphique 0,1 MPa avec soufre (figure 39)

Les résultats obtenus montrent un léger retard de croissance et de rendement cellulaire pour le mutant  $\Delta mbx$  (figure 39). La croissance des témoins et des autres mutants est semblable, ce résultat est en accord avec la précédente croissance obtenue à 0,1 MPa et avec du soufre (figure 36). Cela peut s'expliquer par le fait que l'hydrogénase la plus importante dans la croissance sans soufre est Mbh, ce qui explique que le mutant  $\Delta mbh$  présente un défaut de croissance sans soufre mais pas les autres mutants; et avec soufre, c'est Mbx qui est l'hydrogénase la plus importante, ce qui explique qu'avec du soufre, seul le mutant  $mbx$  présente un défaut de croissance. Ces hypothèses sont en accord avec la régulation du

métabolisme de l'hydrogène par le soufre.

En ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub>, celle-ci est inexistante pour les mutants *mbh* et *mbx*. Une production d'H<sub>2</sub> (de t 0h à t 72h) est mise en évidence pour le témoin,  $\Delta shI$ ,  $\Delta shII$  et  $\Delta co-mbh$  (production plus faible) (**figure 39**); cela peut s'expliquer par une production basale d'H<sub>2</sub>, peut-être produite par l'hydrogénase Mbh. Mais dans ce cas le mutant *mbx*, devrait également produire une quantité semblable d'hydrogène, ce qui n'est pas le cas ici. De plus normalement en présence de soufre, c'est une production d'H<sub>2</sub>S qui se met en place, par l'activation de Mbx. Mais comme nous sommes ici dans une condition de pression sub-optimale peut être que le métabolisme fonctionne différemment en raison de ce stress.



**Figure 39:** Pourcentage de production d'hydrogène par les mutants et suivi de leurs croissances Témoin  $\Delta TERMP\_00517$  (rouge)  $\Delta co-mbh$  (bleu clair),  $\Delta mbh$  (orange),  $\Delta shI$  (mauve),  $\Delta shII$  (vert),  $\Delta mbx$  (marron)



## **II.b.4. Discussion et conclusion de l'étude**

### **II.b.4.a. Croissance des mutants hydrogénases et production d'H<sub>2</sub> à 0,1MPa**

En fonction des conditions de culture avec/sans soufre, chez de nombreuses *Thermococcales*, un shift a été mis en évidence. Sans soufre les hydrogénases Mbh, SHI et SHII permettent la production d'hydrogène. Un shift rapide, de quelques minutes, se produit quand du soufre est ajouté en faveur des hydrogénases impliquées dans la formation d'H<sub>2</sub>S, notamment Mbx. La réponse serait contrôlée par le régulateur transcriptionnel SurR (Lipscomb et al., 2009).

#### ➤ **Sans soufre**

**En absence de soufre**, la croissance est ralentie et diminuée pour **le mutant *Δmbh***. Mbh est l'hydrogénase membranaire principale qui permet la production d'H<sub>2</sub>. Il semble que les deux clusters *mbh* délétés chez le mutant *Δmbh* soient impliqués dans la croissance de *T. barophilus* à 0,1 MPa en absence de soufre. De précédentes études ont montré l'importance des Mbh chez les *Thermococcales* (*P. furiosus* (Sapra et al., 2000, 2003), *T. kodakarensis* (Kanai et al., 2005; Santangelo et al., 2011)) pour le développement en absence de soufre (pas de croissance et production diminuée d'hydrogène). Par exemple le mutant TSS1103 (délété pour Mbh *TK2080-2093*) de *T. kodakarensis* (Santangelo et al., 2011) où Mbh est indispensable pour la production d'H<sub>2</sub> et pour une croissance sans soufre. Chez *P. furiosus*, des mutants *mbhL*, *SHI/SHII*, *SHI/SHII/mbhL* ont été réalisés (Schut et al., 2012), en absence de soufre il a été montré que les mutants *mbhL* et *SHI/SHII/mbhL* ne présentaient pas de croissance, par contre le mutant *SHI/SHII* a une croissance similaire au témoin ; et en présence de soufre, une croissance semblable pour toutes les souches est obtenue. Ce qui confirme le rôle de Mbh dans la croissance en absence de soufre et le fait que la compensation par les hydrogénases cytosoliques en ce qui concerne la croissance cellulaire ne soit pas possible; l'inverse est pourtant vrai.

Comme chez *T. kodakarensis* et *P. furiosus*, nos résultats suggèrent le rôle important de l'hydrogénase Mbh et possiblement son rôle dans l'adaptation de *T. barophilus* quand la pression est sub-optimale. Aucune autre hydrogénase fonctionnant sans soufre ne semble prendre le relais et compenser la perte de *mbh*.

En ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub>, le mutant *TSS1103* de *T. kodakarensis* ne produit pas d'H<sub>2</sub> sans soufre (Santangelo et al., 2011), le même constat a été fait chez *P. furious* (Schut et al., 2012) où sans soufre dans le milieu, les mutants de délétion *mbhL/SHI/SHII* et *mbhL* ne produisent pas d'hydrogène par contre le mutant *SHI/SHII* produit une quantité d'H<sub>2</sub> comparable au témoin. Il serait intéressant de tester la production d'H<sub>2</sub> du mutant *mbh* de *T. barophilus*, les tests sont à refaire avec soufre mais surtout en condition sans soufre.

Chez *T. barophilus*, l'étude de *Mbh* nous permet donc de conclure de son importance dans la culture sans soufre, puisque un retard de croissance est observé pour le mutant *mbh*. Cependant l'importance chez d'autres *Thermococcales* comme *P. furious* et *T. kodakarensis* semble plus marquée, puisqu'aucune croissance n'est observée quand *Mbh* est délété, et la production d'H<sub>2</sub> est inexistante chez ces souches mutées (Santangelo et al., 2011; Schut et al., 2012).

L'étude devra être complétée par une étude de la production d'H<sub>2</sub> des souches mutées sans soufre et à pression atmosphérique, notamment de *mbh*, et si possible des mutants *mbh/shI*, *mbh/shII*, voir *mbh/shI/shII* afin de vérifier si les mesures de la production d'H<sub>2</sub> par *Mbh* confirment son importance et sont similaires aux études réalisées chez d'autres *Thermococcales*. Il est également important de noter que 0,1 MPa, n'est pas la pression optimale de la souche, nous pouvons donc supposer que *Mbh* en plus de son rôle dans le métabolisme de l'H<sub>2</sub> en absence de soufre, semble avoir un rôle dans l'adaptation aux basses pressions.

**Les mutants  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$**  ne présentent pas de retard de croissance, la croissance est équivalente à celle du témoin à 0,1 MPa, sans soufre. Ce qui confirme les premières hypothèses quant à l'importance de l'hydrogénase membranaire *Mbh* et le rôle secondaire des hydrogénases cytosoliques. Chez *P. furious* aucune des deux enzymes n'est indispensable pour la viabilité (Lipscomb et al., 2011). Des mutants des hydrogénases cytosoliques de *P. furious* : *SHI* et *SHII*, ont été réalisés (Lipscomb et al., 2011). Aucune différence de croissance n'a été montrée dans les conditions testées (avec/sans soufre). Les mutants de délétions *SHI/SHII*, *mbhL/SHI/SHII* et du mutant *mbhL* que nous avons décrits précédemment

montrent que la production d'H<sub>2</sub> n'est pas réalisée par ces deux hydrogénases cytosoliques chez *P. furiosus* (Schut et al., 2012).

Des études complémentaires afin de tester l'activité des hydrogénases dans le cytoplasme ont été réalisées (Schut et al., 2012), sur les mutants *SHI*, *SHII* et le double mutant *SHI/SHII*. L'activité n'est pas affectée pour le mutant *SHII*, par contre pour le mutant *SHI* l'activité est plus faible (10%) et pour le double mutant pas d'activité détectée. Ce qui confirme que la majorité de l'activité des hydrogénases cytoplasmiques est due à *SHI* et que *Mbh* intervient principalement au niveau de la membrane (Sapra et al., 2000; Silva et al., 2000). Dans notre étude *SHI* et *SHII* sont respectivement la *SHII* et la *SHI* de *P. furiosus*, et même si leur activité respective n'a pas été testée, notre *SHII* est beaucoup plus exprimée que *SHI*, selon les données transcriptomiques, et en accord avec ce qui est obtenu chez *P. furiosus*.

Chez *T. kodakarensis* un seul homologue sulfhydrogénase a été découvert (*TK2069-72*) (Fukui et al., 2005). Le mutant construit croit au même taux que le témoin dans un milieu avec du soufre et sans soufre, mais la densité cellulaire finale est plus faible pour le mutant. En dépit de la plus faible densité cellulaire, la production d'H<sub>2</sub> est plus importante pour le mutant que pour la souche sauvage. Une explication serait que le mutant  $\Delta$ *SHI* est incapable de consommer l'H<sub>2</sub> produit par *Mbh* (Santangelo et al., 2011).

Les résultats à 0,1 MPa sur les hydrogénases cytosoliques de *T. barophilus*, nous donnent des informations similaires aux autres *Thermococcales*. Elles ne sont pas indispensables à la croissance ni à la production d'H<sub>2</sub>. Cependant si on se réfère aux études transcriptomiques chez *T. barophilus* et *P. yayanosii*, il a été montré que ces sulfhydrogénases avaient un niveau d'expression qui variait pour de basses pressions. Chez *T. barophilus*, une sur-expression des gènes codant pour les hydrogénases cytosoliques à 0,1 et 70 MPa, et pour *P. yayanosii* une sous-expression de celles-ci, pour de faibles et hautes pressions. Or dans notre étude les sulfhydrogénases ne semblent pas impliquées dans la croissance pour de faibles pressions (0,1 MPa).

En ce qui concerne le **mutant  $\Delta$ *mbx***, réaliser une croissance sans soufre de ce mutant est à envisager. Le résultat attendu de la délétion de cette hydrogénase, quand il n'y a pas de soufre

serait une croissance non impactée. Ce qui confirmerait que son activité est naturellement inhibée par le régulateur SurR quand le soufre est absent. Des mutants de délétions de l'hydrogénase Mbx (*TS1105*) ont été réalisés chez *T. kodakarensis* (Santangelo et al., 2011), la croissance du mutant sans soufre est identique à celle du témoin, et il en est de même pour la production d'hydrogène. Une étude de délétion de *mbx* a également été réalisée chez *P. furiosus* (Bridger et al., 2011) qui ne montre pas de différence de croissance en absence de soufre, mais les résultats s'avèrent plus intéressants en présence de soufre ce que nous allons évoquer par la suite. Réaliser ces croissances sans soufre à 0,1 MPa chez *T. barophilus* permettrait un complément d'information, mais l'étude de ce mutant reste plus enrichissante en présence de soufre.

Les études transcriptomiques chez *P. yayanosii*, ont montré que *mbx* était sur-exprimée pour des stress de pression, mais ceci n'est pas vrai chez *T. barophilus*, où il n'y a pas de changement de l'expression de *mbx* à 0,1 MPa et 70 MPa. Les résultats de transcriptomiques sont tout de même à nuancer, puisqu'elles ont été réalisées en présence de soufre, et cette sur-expression des gènes *mbx* chez *P. yayanosii* peut également être liée à ce facteur soufre ; ainsi réaliser les études de transcriptomiques sans soufre permettrait de vérifier quelle est la part de l'influence du soufre dans ces résultats de transcriptomiques (Michoud, 2014; Michoud and Jebbar, 2016). Pour le moment un retard de croissance et un rendement cellulaire légèrement plus faible du mutant à 0,1 MPa et avec soufre, ont été observés, mais il serait intéressant de refaire un suivi de croissance de  $\Delta mbx$  aux différentes pressions, pour voir si l'oxidoréductase Mbx permet une croissance sous pression.

#### ➤ Avec soufre

En **présence de soufre**, une croissance est observée pour les mutants *mbh*, *co-mbh*, *shI*, *shII*. Ces hydrogénases pour cette pression et avec soufre, ne semblent pas nécessaires à la croissance de la souche. L'hypothèse apportée par la littérature serait que Mbx assure la croissance en présence de soufre dans le milieu. Mbx est un homologue de la sous unité du complexe Mbh. L'expression de cet opéron est rapidement et sensiblement augmentée par la

présence de soufre. Le complexe Mbx remplace fonctionnellement le complexe Mbh quand du soufre est disponible (Chou et al., 2007; Schut et al., 2007). Il est à noter qu'une faible mais détectable quantité d'H<sub>2</sub> est produite par toutes les souches contenant l'opéron *mbh* (sauf pour *Δmbx*) quand du soufre est présent, ce qui peut être vu comme le niveau d'expression basal de Mbh (Santangelo et al., 2011).

L'étude de la croissance du **mutant *Δmbx*** permettrait de voir le comportement du mutant en présence et en absence de soufre. En se référant à la littérature en présence de soufre, on pourrait s'attendre à une croissance plus faible voir pas de croissance pour ce mutant *mbx*, étant donné que c'est l'hydrogénase qui fonctionne avec du soufre (nos premiers résultats de suivi de croissance de *Δmbx* avec soufre, montrent un retard de croissance et un rendement cellulaire légèrement plus faible).

Chez *T. kodakarensis*, un mutant de délétion *mbx* (*TS1105*) (*TK1214-1226*), a été construit. Avec du soufre dans le milieu la souche pousse plus lentement et la densité cellulaire est 25% moins importante que celle du témoin (Santangelo et al., 2011). Dans un milieu sans soufre, la croissance du mutant *mbx* et la production d'H<sub>2</sub> est la même que pour la souche témoin (*T. kodakarensis*), ce qui prouve que l'expression de Mbh est suffisante pour les réoxydations de cofacteur.

Des mutants de délétions ont également été obtenus chez *P. furiosus* (Bridger et al., 2011), la délétion de *mbxL* en présence de soufre, a entraîné un défaut de croissance mais la délétion de cette hydrogénase n'est pas létale contrairement à son homologue Mbh. L'hypothèse est qu'en présence de soufre d'autres mécanismes interviennent.

En ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub>S, les études de délétion de certaines hydrogénases ont permis de rendre compte que ni Mbh, ni SHI, ni SHII ne sont responsables de la production d'H<sub>2</sub>S. Chez *P. furiosus* (Schut et al., 2012) la production de gaz a été réalisée, sur les doubles mutants SHI/SHII et sur SHI/SHII/*mbhL* ainsi que sur le mutant *mbhL*, pour différentes quantités de soufre (sans soufre, 0,5 g/L et 2 g/L). En ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub>S aucune production n'est observée, en condition sans soufre. Mais pour les autres conditions (0,5 g/L et 2 g/L) il y a production d'H<sub>2</sub>S pour toutes les souches testées, les valeurs sont quasi

équivalentes.

Cependant le mutant de *mbx*, *mbxL* a montré une production d'H<sub>2</sub>S en présence de soufre, ce qui suggère que d'autres mécanismes soient impliqués dans la réduction du soufre (Bridger et al., 2011).

L'étude du mutant *mbx* serait intéressante afin de comparer à la littérature, ce qui se passe chez *T. barophilus* quand du soufre est présent en terme de croissance et de production d'H<sub>2</sub>S de ce mutant  $\Delta mbx$ .

De plus comme nous l'avons évoqué un peu plus haut, Mbx est sur-exprimée chez *P. yayanosii* en condition de hautes et basses pressions, ce qui suggère peut être un rôle de cette oxydoréductase dans l'adaptation à la pression, mais vu que les études de transcriptomiques sont réalisées avec du soufre, le doute de son influence dans cette étude n'est pas à écarter, puisqu'on le sait Mbx est activé en présence de soufre. Les cultures du mutant  $\Delta mbx$  avec et sans soufre et pour les différentes conditions de pression, permettraient d'apporter des éléments de réponses complémentaires. Si par exemple à 0,1 MPa et 70 MPa, en condition de soufre et sans soufre, on obtient un retard de croissance du mutant  $\Delta mbx$ , qui n'est pas observé à 40 MPa, cela confirmerait les données de transcriptomique.

En ce qui concerne les mesures de la production d'H<sub>2</sub> à l'0,1 MPa, afin de compléter l'étude, il serait intéressant de réaliser :

Un suivi de croissance, dosage d'H<sub>2</sub>S et H<sub>2</sub> en présence de soufre:

- Refaire cette croissance des mutants avec la même quantité de soufre (0,5 g/L), mais également en réalisant une gamme soufre (0,5 g/L, 1g/L et 2g/L qui sont des quantités de soufre retrouvées dans la littérature).
- Faire le dosage d'hydrogène en parallèle par chromatographie en phase gazeuse.
- Mais aussi vérifier la production d'H<sub>2</sub>S (la détection par le micro-GC ne permet pas de mesurer l'H<sub>2</sub>S, tester avec un dosage colorimétrique), puisque en présence de soufre, le métabolisme en faveur de la production d'H<sub>2</sub>S est favorisé. Cela est lié à une levée d'inhibition du complexe Mbx du fait de la dérégulation du régulateur SurR et au

contraire une perte d'activation des hydrogénases productrices d'H<sub>2</sub>.

- Enfin le fait de faire une gamme de soufre permettrait de voir si la quantité de soufre a une influence sur la production d'H<sub>2</sub>S. Les productions d'H<sub>2</sub>S sont-elles soufre dépendantes ?

#### Un suivi de croissance, dosage d'H<sub>2</sub>S et H<sub>2</sub> en absence de soufre:

- Faire une croissance des mutants en absence de soufre dans le milieu, devrait nous apporter plus d'informations sur la production d'H<sub>2</sub> en fonction des délétions entreprises. En se référant au suivi de croissance réalisé précédemment, les mutants ont une croissance semblable au témoin, sauf le mutant  $\Delta mbh$  qui sans soufre présente un retard de croissance; ce qui confirme l'importance de cette hydrogénase membranaire. Dans les conclusions précédentes Mbh semblait pallier et permettre la croissance des autres mutants. Ce qui confirme les données de la littérature. Dans le suivi de croissance précédent le mutant Mbx n'avait pas été suivi, il serait intéressant de voir sa croissance ici.
- Faire en parallèle un suivi de la production d'H<sub>2</sub> qui pourrait en absence de soufre nous donner plus d'information, puisque c'est dans ces conditions que le métabolisme est enclenché. On pourrait s'attendre pour les mutants  $\Delta co-mbh$ ,  $\Delta shI$ ,  $\Delta shII$  et  $\Delta mbx$  à une production d'H<sub>2</sub>. Pour *mbx* la production devrait être maximale au moins équivalente à celle des témoins. Les suppositions ne sont pas aussi sûres pour les mutants  $\Delta shI$ ,  $\Delta shII$  et  $\Delta co-mbh$ , qui rappelons-le, sont des hydrogénases également activées en absence de soufre dans le milieu, il est possible que leurs délétion affectent plus ou moins la production d'H<sub>2</sub>.
- En parallèle un dosage de l'H<sub>2</sub>S pourrait être intéressant, normalement sans soufre le métabolisme de l'H<sub>2</sub>S est inhibé mais peut-être qu'une production basale sera détectée. Des différences en absence du complexe MbX seront peut-être notées.

### Pour compléter l'étude:

- L'étude d'autres mutants construits comme le double mutant  $\Delta mbh/co-mbh$  ou en cours de construction comme le régulateur *surR* pourrait également être intéressant. Il pourrait être intéressant de voir ce qui se passe quand le régulateur SurR est absent dans les différentes conditions déjà testées.

Si SurR est absent en condition sans soufre, il y aura-t-il une croissance du mutant avec et sans soufre ? La perte du régulateur SurR aura-t-elle un impact sur la quantité d'H<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>S produite dans les deux conditions avec ou sans soufre ?

- Enfin, les mesures de gaz sous pression pourraient compléter les études de croissance sous pression des mutants. Tout d'abord sur la souche témoin, on pourrait comparer les productions d'H<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>S, 40 MPa est la pression optimale pour *T. barophilus*, est ce que les productions seront changées pour des variations de pressions. Peut être que pour des stress pression, les productions de gaz seront diminuées si la souche est en difficulté, ou au contraire augmentée pour s'adapter au mieux à ces changements. Chez *T. barophilus*, les études transcriptomiques ont montré que le stress pression engendre une sur-expression des gènes impliqués dans la production d'énergie, les hydrogénases notamment ; par exemple *mbh*, *mbh-codh*, *shII* ou encore *shI* sont surexprimées à 0,1 et 70 MPa. Est ce que le fait que les gènes soient sur-exprimés va faire que leur activité sera également plus importante ?

Les premières cinétiques de croissance et production d'H<sub>2</sub>, dont nous venons de parler, ont été réalisées à pression atmosphérique. Il est important de rappeler que *T. barophilus* est une archée piézophile, isolée à 3550 m de profondeur. Son optimum de pression est à 40 MPa, aussi les conditions que nous venons de voir à pression atmosphérique, sont possiblement une condition de stress pour *T. barophilus*. Il est donc possible que l'hydrogénase Mbh soit indispensable pour la croissance dans cette condition de pression sub-optimale mais à 40 MPa, les résultats différeront peut-être. A 40 MPa, la souche étant à son optimum de pression, le métabolisme énergétique est optimal, du fait d'un nombre de cellules important et donc d'une



production d'énergie suffisante. Aussi pour une condition de 70 MPa qui correspond à une pression supra-optimale, les résultats seront peut-être semblables à un stress à 0,1 MPa, ou au contraire, une autre façon de réguler le métabolisme de l'H<sub>2</sub> se met en place pour de fortes pressions. D'après les études de transcriptomique chez *T. barophilus*, les gènes des hydrogénases sont sur-exprimés en condition de stress pression (0,1 et 70 MPa), les clusters *mbh*, *mbh-codh* sont sur-exprimés à 0,1 et 70 MPa et les gènes codant pour les hydrogénases cytosoliques *shI* et *shII* également. Au contraire le régulateur SurR et Mbx ne sont pas impactés, rappelons que ces études ont été réalisées en présence de soufre (Vannier, 2012). Le métabolisme de l'hydrogène semble donc modifié en condition de stress pression pour la souche. Les analyses de croissance ont donc également été réalisées sous pression à 40 MPa et 70 MPa, en présence et absence de soufre.

Il faut donc prendre en considération que le métabolisme est *a priori* impacté par les variations de pression, en plus du facteur soufre qui influence le métabolisme.

#### **II.b.4.b. Croissance des mutants hydrogénases sous pression**

##### **➤ Avec soufre**

**En présence de soufre**, on s'attend à ce que les mutants qui ne fonctionnent pas avec soufre ne soient pas impactés, puisque selon la littérature ils ne sont pas activés par le régulateur dans cette condition; ne serait impacté à 40 MPa et 70 MPa, avec soufre que le mutant de Mbx. Puisque en présence de soufre c'est la seule hydrogénase étudiée potentiellement active, résultat que nous attendons également à pression atmosphérique (Bridger et al., 2011).

Nous ne pouvons que supposer le résultat que nous pourrions avoir, sachant qu'aucune autre étude de suivi de croissance de mutants hydrogénases de *Thermococcales* sous pression n'a été réalisée. Nous pouvons cependant nous appuyer sur les études transcriptomiques réalisées chez *T. barophilus*.

Soit comme attendu en présence de soufre, un défaut de croissance du mutant  $\Delta mbx$ , ce qui irait dans la théorie de sa régulation positive en présence de soufre du fait d'une inhibition du

régulateur SurR. Si au contraire une croissance est observée soit il y a un phénomène de compensation par un autre système qui fonctionne également à cette pression ou une dérégulation du régulateur SurR. En effet on pourrait imaginer que la pression influence l'état redox du régulateur, ainsi au lieu d'être dans son état oxydé, il serait dans un état réduit (capable de se fixer au promoteur), ce qui inactiverait *mbx* et au contraire permettrait l'activation des gènes codant les autres hydrogénases sous pression. Afin de valider cette hypothèse les cultures de cette souche  $\Delta mbx$  sous pression à 40 et 70 MPa, avec du soufre, seraient à réaliser.

Or ici deux profils se dessinent, un premier profil pour les mutants  $\Delta mbh$  et  $\Delta co-mbh$  qui confirment cette hypothèse. A 40 et 70 MPa, avec du soufre, la délétion de *mbh* et également celle de *co-mbh* entraînent un défaut de croissance de la souche, ce qui suppose que dans cette condition leur présence a une importance alors que cela n'est pas observé à pression atmosphérique (0,1 MPa, avec du soufre).

- Chez les autres *Thermococcales*, à l'0,1 MPa, Mbx fournit l'énergie suffisante pour la croissance. Les deux hydrogénases Mbh et Co-Mbh ne sont pas censées être fonctionnelles en présence de soufre. Mbh et Co-Mbh ont-elles de l'importance dans la culture sous hautes pressions avec du soufre ? La création et l'étude de double mutants  $\Delta mbx/\Delta mbh$  et  $\Delta mbx/\Delta co-mbh$ , permettrait également de mieux comprendre le phénomène.
- Mbx est-il inactivé sous pression ? La croissance du mutant  $\Delta mbx$  sous pression et en condition de soufre permettrait de répondre à ces hypothèses, ce qui supposerait un changement de fonctionnement du régulateur SurR.
- SurR serait-il impacté par la pression ? Son état redox est-il impacté sous pression ? L'étude du mutant  $\Delta surR$  sous pression en condition avec et sans soufre pourrait être intéressante.

En ce qui concerne les mutants  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$ , ils ont une croissance attendue, avec du soufre, ils n'interviennent peu (SHII) ou pas (SHI) dans la croissance. Ce qui est similaire à ce qui est

obtenu à 0,1 MPa mais va à l'encontre des hypothèses précédentes notamment celles sur le régulateur SurR. Mbx jouerait ici son rôle. La construction de mutant  $\Delta mbx/\Delta shI$  et  $\Delta mbx/\Delta shII$  seraient intéressants, pour voir si avec du soufre il y a croissance ou non, normalement non, et permettrait de conclure sur l'importance de Mbx sous pression. S'il n'y a pas de croissance cela confirmerait le fonctionnement normal de SurR sous pression et le fonctionnement de Mbx. Au contraire s'il y a croissance alors Mbh et Mbh-Codh ont possiblement une implication sous pression et avec soufre, cela serait en faveur d'une dérégulation de SurR par la pression. Ce qui pourrait expliquer les résultats de transcriptomiques et le fait que pour des stress pressions et avec soufre, il y ait une sur-expression des gènes normalement sur-exprimés par le régulateur en condition sans soufre (*mbh*, *mbh-codh*, *shI* et *shII*) (Vannier et al., 2015).

➤ **Sans soufre**

**En absence de soufre**, Mbx n'intervient pas normalement sauf si changement d'état réduit/oxydé du régulateur sous pression ; mais normalement un mutant de délétion *mbx* devrait présenter une croissance standard (semblable au témoin), car les autres hydrogénases sont activées sans soufre par SurR.

Les trois autres hydrogénases devraient présenter un défaut de croissance, plus important pour  $\Delta mbh$  et  $\Delta co-mbh$ , et légèrement pour  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$ . Ici la croissance des mutants  $\Delta mbh$  et  $\Delta co-mbh$  est réduite, fortement impactée, à 40 MPa et 70 MPa, sans soufre, alors qu'à 0,1 MPa seule  $\Delta mbh$  avait un retard, il y a donc ici un effet pression qui confirme l'importance de Mbh et implique Mbh-Codh. Pour  $\Delta SHI$  et  $\Delta SHII$  la croissance est légèrement plus faible, ces deux autres hydrogénases pour les mêmes conditions semblent moins impactées.

Dans ce cas-ci, il ne semble pas avoir de dérégulation du SurR par la pression, mais il pourrait être intéressant de tester la croissance du mutant  $\Delta mbx$  dans cette condition (40 ou 70 MPa, sans soufre) pour voir la réponse du mutant. S'il y a croissance, cela est en faveur d'une réponse normale du régulateur, mais si sans soufre et sous pression, la croissance du mutant  $\Delta mbx$  est

impactée, cela serait en faveur d'une dérégulation de SurR par la pression. Mais cette hypothèse ne semble pas valide au vu de nos résultats de croissance sans soufre et sous pression.

**Si l'on résume l'hydrogénase Mbh semble importante pour la croissance de la souche à 0,1 MPa en absence de soufre et sous pressions à 40 et 70 MPa, et ce peu importe la présence ou l'absence de soufre.**

**La carboxyhydrogénase Mbh-Codh n'a pas d'influence à 0,1 MPa que ce soit en absence ou présence de soufre, mais pour de fortes pressions, cette hydrogénase semble avoir un impact sur la croissance de *T. barophilus*, dans les deux conditions avec et sans soufre.**

**Les Sulhydrogénases SHII (SHI de *P. furiosus*) et SHI (SHII de *P. furiosus*) ne semblent pas influencer la croissance, pour de faibles pressions, mais il semblerait que SHII soit quand même impliquée dans la croissance sous hautes pressions, avec et sans soufre.**

**Le soufre semble avoir un impact sur la croissance à 0,1 MPa, et réguler le métabolisme de manière semblable à ce qui est connu pour les autres *Thermococcales*. Mais pour de hautes pressions sa présence ou absence, ne semble pas influencer le métabolisme de la même manière (du moins en présence de soufre).**

## Discussion générale et conclusion

En terme d'adaptation de nombreuses études sont réalisées sur la température, la salinité, l'acidité, et en dépit du fait que l'essentiel du volume de la biosphère terrestre est soumis à des pressions élevées, la pression reste l'un des paramètres le moins étudié.

Les hautes pressions hydrostatiques ont pourtant des effets sur les macromolécules et le métabolisme cellulaire.

Les effets de la pression hydrostatique ont été majoritairement étudiés chez les espèces mésophiles, tel que *E. coli* ou encore *S. cerevisiae*.

Des travaux ont commencé sur les espèces piézophiles et ont montré des réponses similaires face au stress engendré par la pression. En ce qui concerne les acides aminés par exemple, un certain nombre d'acides aminés aromatiques ne peuvent être synthétisés sous hautes pressions, leur synthèse étant trop coûteuse en énergie (histidine/tryptophane) (Cario et al., 2015). Un changement global dans l'expression génique des diverses voies métaboliques a été observé lorsque la pression change (Vannier et al., 2015). De nombreuses modifications (augmentation des insaturations, incorporation de lycopènes) au niveau de la membrane quand la pression augmente. Enfin la mise en évidence de la production de molécules d'adaptation à la pression hydrostatique (solutés compatibles) (Cario et al., 2016).

Des travaux ont émis l'hypothèse que des gènes codant pour les hydrogénases, ont une expression modulée en fonction de la pression, et pourraient jouer un rôle dans l'adaptation à la pression chez les *Thermococcales*, comme chez *T. barophilus* (Vannier et al., 2015), *P. yayanosii* (Michoud and Jebbar, 2016) et plus récemment chez *T. piezophilus* (Dalmasso, 2016). Ces travaux réalisés au laboratoire ont constitué un point de départ dans notre étude de compréhension d'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques chez *T. barophilus*. Nous avons donc décidé de nous intéresser à ces hydrogénases et à leur métabolisme.

Chez les *Thermococcales* comme *T. onnurineus*, *T. kodakarensis*, *P. furiosus*, *T. paralvinellae* (Hensley et al., 2016; Kim et al., 2010; Lipscomb et al., 2011; Moon et al., 2015; Santangelo et al., 2011), les hydrogénases sont impliquées dans un système respiratoire simple où elles lient

l'oxydation de la ferredoxine à la formation d'hydrogène, et stockent l'énergie sous la forme d'un gradient d'ions transmembranaire (Schut et al., 2013b).

L'enzyme responsable de la formation de l'H<sub>2</sub> est un complexe hydrogénase lié à la membrane, appelé Mbh (McTernan et al., 2014). Mbh génère de l'hydrogène moléculaire et utilise l'énergie de cette réaction exergonique pour créer un gradient de protons de part et d'autre de la membrane. Ensuite le pompage des ions Na<sup>+</sup> se fait vers l'intérieur de la cellule par une ATP synthase (Sapra et al., 2003), permettant ainsi la synthèse d'ATP et donc la production d'énergie. Cette enzyme fonctionne en absence de soufre. Il ne semble pas exister d'autres voies métaboliques puisque les mutants de délétion de *mbh* entraînent la mort cellulaire (Chou et al., 2007; Sakuraba et al., 2004).

La ferredoxine est le seul accepteur d'électrons pour l'oxydation des glucides. Par conséquent, un mécanisme de production de NADPH est également nécessaire pour produire des équivalents réducteurs pour la biosynthèse. Ainsi, des sulfhydrogénases cytosoliques sont retrouvées chez les *Thermococcales* (Bryant and Adams, 1989; Ma et al., 2000). Celles-ci permettent de fournir du NADPH en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électrons.

Le génome des *Thermococcales* contient également une oxidoréductase liée à la membrane nommé Mbx, qui présente une similarité de séquence élevée avec Mbh (homologue de Mbh) (Silva et al., 2000). Mbx réduit le NADP avec la ferredoxine comme donneur d'électrons et permet la conservation d'énergie en pompant des ions H<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup>. Cette enzyme fonctionne en présence de soufre (Schut et al., 2007). Ce métabolisme est sous la dépendance du soufre et du régulateur transcriptionnel SurR (Lipscomb et al., 2017; Yang et al., 2010). Dans son état réduit, SurR active la transcription de gènes qui codent pour les hydrogénases solubles Hyh I (SHI) et II (SHII), et Mbh, ainsi que de nombreux autres gènes impliqués dans le métabolisme de l'hydrogène (Schut et al., 2007). Au même moment SurR réprime l'expression des gènes impliqués dans la réduction du soufre : Nsr, Mbx, pdo (Bridger et al., 2011).

Des études transcriptomiques chez deux modèles de *Thermococcales* ont permis de mettre en évidence une modulation de l'expression des gènes en fonction de la pression. En effet chez *P. yayanosii*, il a été observé aux pressions inférieures et supérieures à la pression optimale de croissance, une sous-expression des hydrogénases membranaires (Mbh), ainsi qu'une sous-expression des hydrogénases cytosoliques SHI et SHII, mais une sur-expression des oxidoréductases (Mbx) (Michoud, 2014). Chez *T. barophilus*, la réponse des hydrogénases face aux variations de pression est différente, les hydrogénases membranaires sont sur-exprimées en condition de stress pression, il en est de même pour les hydrogénases cytosoliques qui sont sur-exprimées à 0,1 MPa et 70 MPa (Vannier et al., 2015). Chez *T. piezophilus*, de nombreux clusters d'hydrogénases et de sulfhydrogénases ont été mis en évidence dans le génome, les analyses du transcriptome sont encore en cours, mais les grandes tendances déjà observées dans le transcriptomes des autres *Thermococcales* piézophiles semblent se confirmer, les mécanismes de production et conversion d'énergie sont affectés par les variations de pression (Moalic et al., en préparation).

Afin d'étudier les gènes supposés d'adaptation à la pression et notamment ceux impliqués dans le métabolisme des hydrogénases, des mutants de délétions ont été réalisés chez *T. barophilus*. Le but de l'étude des mutants hydrogénases est double, comprendre le fonctionnement de ce métabolisme chez *T. barophilus*, et pouvoir le comparer avec d'autres modèles, ainsi que d'étudier ce métabolisme sous pression et essayer de faire un lien avec les études transcriptomiques.

Pour réaliser ces mutants de délétion, un outil génétique a été développé au laboratoire. La mise en place de cet outil a été inspirée par les recherches en génétique menées chez *T. kodakarensis* (Atomi et al., 2004; Morikawa et al., 1994) (Hileman and Santangelo, 2012; Sato et al., 2003).

Ce système utilise un plasmide navette pour déléter des gènes par recombinaison homologue. L'outil présent au début de ma thèse, reposait sur l'auxotrophie à l'uracile et la résistance à la Simvastatine, un antibiotique ; par la méthode dite « pop in/ pop out ». L'intégration du plasmide navette dans la région d'intérêt est maintenue par la présence du gène de résistance

à la Simvastatine et la deuxième recombinaison, conduisant à la perte du plasmide ainsi que du gène cible, est réalisée en utilisant le 5-FoA comme agent de sélection.

Bien que l'outil soit fonctionnel et ait permis la délétion de plusieurs gènes, le problème majeur réside dans la faible sensibilité de la souche au 5-FOA apporté par le gène *pyrF*, qui entraîne une absence de contre-sélection dans certain cas; se manifestant par l'apparition d'une troisième configuration à la fin de la seconde étape de recombinaison : des souches doublement résistantes appelées « faux positifs », qui possèdent encore le plasmide navette, et dont l'origine reste à ce jour non élucidée.

La première partie du travail de thèse a donc consisté à améliorer l'outil génétique, en développant une nouvelle voie de contre-sélection. Un nouveau marqueur de sélection, la 6-méthylpurine ou 6-MP, a été choisi comme alternative au 5-FoA. L'étude a permis d'obtenir un outil optimisé. Les conclusions de l'étude sont que la 6-MP peut être utilisée comme marqueur de contre-sélection chez *T. barophilus*, et son utilisation apporte certains avantages : il est plus pratique à manipuler, plus efficace puisque le nombre de faux positif a été fortement diminué (37% contre 80%) et a permis de réduire le temps de manipulation. L'outil génétique amélioré est actuellement utilisé dans de nombreux projets au laboratoire sur la maintenance génomique et a permis la suite de ce travail de thèse: la construction de mutants de délétion pour comprendre l'adaptation de *T. barophilus* aux HPH.

La suite du travail s'est focalisée sur les hydrogénases, puisque les études transcriptomiques préliminaires ont montré des variations de l'expression de ces gènes en fonction de la pression, comme nous avons pu le voir précédemment. Un certain nombre de mutants ont été obtenus : trois pour les hydrogénases membranaires :  $\Delta mbh$  (mutant *mbh*),  $\Delta co-mbh$  (mutant *mbh-codh*) et  $\Delta mbx$  (mutant *mbx*), et deux pour les hydrogénases cytosoliques :  $\Delta shI$  et  $\Delta shII$  (mutant *shI* et *shII*), ainsi qu'un double mutant  $\Delta mbh/\Delta co-mbh$ . Actuellement la construction des mutants hydrogénases se poursuit afin de comprendre au mieux le fonctionnement de ces hydrogénases et leur possible intervention dans l'adaptation à la pression.

Après vérification de l'obtention de ces mutants (par PCR et séquençage), un début de



caractérisation a été entrepris, avec des cultures de croissance à pression atmosphérique (0,1 MPa) et sous pression dans des incubateurs hautes pressions/hautes températures (40 et 70 MPa). Il est important de rappeler que *T. barophilus* est une archée piézo-hyperthermophile, isolée à 3550 m de profondeur (Marteinsson et al., 1999a). Elle est capable de se développer sur une gamme de pression allant de 0,1 à 85 MPa, avec un optimum de pression de 40 MPa pour une température de 85°C (Marteinsson et al., 1999a). Ainsi les manipulations à 40 MPa représentent la condition optimale pour la souche, tandis que les manipulations réalisées pour les pressions sub et supra optimales de 0,1 MPa et 70 MPa, sont des conditions de stress pour celle-ci. Dans cette étude et par la suite, il sera donc intéressant de pouvoir comparer les différences observées en terme de croissance et de production d'hydrogène pour ces différentes conditions.

Un autre facteur a été pris en considération lors de ces manipulations, c'est le soufre. En effet celui-ci est un facteur influençant le métabolisme de l'hydrogène, et il entraîne des réponses des hydrogénases différentes, ainsi l'ensemble des cultures ont été réalisées à la fois en absence et présence de soufre.

Des dosages d'hydrogène par chromatographie en phase gazeuse, ont également été réalisés pour caractériser la réponse physiologique des mutants, et ce à pression atmosphérique et en présence de soufre.

Très peu d'études ont été réalisées sur l'influence de la pression sur les hydrogénases, hormis celles que nous avons citées précédemment ; cependant les hydrogénases de certaines *Thermococcales* ont été étudiées, et ce métabolisme et son fonctionnement est maintenant bien connu. Des approches similaires à notre étude, à savoir des délétions de certaines hydrogénases chez *T. kodakarensis* ou encore chez *P. furiosus*, nous ont donné des éléments de comparaison pour l'interprétation de nos résultats (Bridger et al., 2011; Lipscomb et al., 2017; Santangelo et al., 2011).

Les premiers résultats de croissance à pression atmosphérique, permettent de conclure sur

l'importance de l'hydrogénase Mbh. La délétion de ce gène entraîne un retard de croissance de la souche sans soufre. Ce premier résultat est en accord avec les études réalisées sur Mbh, SHI ou encore SHII chez d'autres *Thermococcales*, où Mbh apparaît comme nécessaire à la croissance et à la production d'H<sub>2</sub> en absence de soufre. Les sulfhydrogénases apparaissent comme secondaires, ne pouvant pallier à la perte de Mbh, la délétion de ces gènes n'impactant pas la croissance de la souche ni la production d'H<sub>2</sub> (Santangelo et al., 2011; Schut et al., 2012). Cependant afin de compléter cette étude sur les hydrogénases fonctionnant sans soufre, il serait intéressant de réaliser des mesures de la production d'H<sub>2</sub> sans soufre, des tests avaient été entrepris au micro-GC mais les résultats sans soufre n'ont pas été concluants.

Aussi si le mutant *surR* est obtenu, il serait intéressant de voir si sa délétion a un effet. Chez *P. furiosus* (Lipscomb et al., 2017) et *T. kodakarensis* (Santangelo et al., 2011), des mutants de *surR* ont été obtenu ; et sans soufre, la croissance du mutant est impactée ainsi que la production d'H<sub>2</sub>. Il pourrait être intéressant d'étudier le rôle et le fonctionnement de ce régulateur chez *T. barophilus*.

Ce régulateur transcriptionnel décrit chez *P. furiosus* (Lipscomb et al., 2009; Yang et al., 2010), fonctionne de la manière suivante en absence de soufre, SurR est sous forme réduite et active la transcription de *mbh*, parallèlement il réprime la transcription des gènes impliqués dans la production d'H<sub>2</sub>S. En présence de soufre, SurR est dans un état oxydé et est dérégulé, ainsi la production d'H<sub>2</sub> est inhibée alors que celle d'H<sub>2</sub>S est enclenchée. Chez *T. kodakarensis*, un homologue codé par *TK1086* (Fukui et al., 2005) a été décrit. Pour décrire son action un mutant de délétion a été construit celui-ci est incapable de synthétiser le complexe Mbh, le mutant ne régénère pas l'H<sub>2</sub> dans aucun milieu, et est incapable de se développer sans soufre dans aucun milieu. Par contre la croissance de ce mutant avec du soufre peu importe le milieu reste intacte.

Si l'on s'intéresse au régulateur SurR chez *P. furiosus* (Lipscomb et al., 2017), le mutant  $\Delta$ *surR* ne permet pas la croissance sans soufre, en présence de soufre une croissance du mutant est observée. En ce qui concerne la production d'H<sub>2</sub> celle-ci est plus faible pour le mutant  $\Delta$ *surR*, mais quand la quantité d'H<sub>2</sub> est normalisée à la croissance les valeurs d'H<sub>2</sub> sont équivalentes

entre le mutant et le témoin.

Les études transcriptomiques de *T. barophilus*, n'ont pas montré de variation d'expression du gène *surR* sous pression (Vannier, 2012) et pour le moment nos tentatives d'obtention du mutant  $\Delta surR$  n'ont pas abouti. L'obtention de ce mutant et la caractérisation de celui-ci permettrait de voir si les faibles ou hautes pressions entraînent un changement d'état de ce régulateur, semblable à ce que l'on obtient avec/sans soufre. Et si l'on observe une dérégulation du métabolisme des hydrogénases sous pression. Avec un shift semblable à ce que l'on observe pour le soufre mais engendré ici par le facteur pression.

Si une dérégulation est vraiment engendrée par la pression, qu'en est-il du facteur soufre, celui-ci intervient-il ou non, et si oui de quelle manière ? Rétablit-il le fonctionnement normal ou augmente-t-il la dérégulation du métabolisme ? Ce shift engendré par le stress pression à supposer qu'il existe, est-il un mécanisme d'adaptation ou un stress subit par la cellule ? Mais ce ne sont que des hypothèses qui se doivent d'être vérifiées. Surtout qu'au vue de nos premier résultat sans soufre à 0,1 MPa le mutant  $\Delta mbh$  est impacté, et en présence de soufre et à 0,1 MPa c'est la croissance du mutant  $\Delta mbx$  qui est impactée, ce qui révèle un fonctionnement « normal » ou du moins semblable à ce qui est connu du métabolisme de l' $H_2$ .

Un suivi de croissance du mutant  $\Delta mbx$  en absence et présence de soufre serait également à envisager. Notre mutant *mbx* semble se développer avec soufre, avec un léger retard et un rendement plus faible. Ce qui est en accord avec la littérature *Mbx* ne semble pas nécessaire à la viabilité de *P. furiosus*, contrairement à son homologue *Mbh*, mais la croissance du mutant *mbx* avec du soufre est légèrement impactée (Bridger et al., 2011). Le dosage de l' $H_2S$  avec du soufre et sans soufre, serait intéressant pour ce mutant. Chez *P. furiosus*, la perte de *Mbx* n'entraîne pas de différence de production d' $H_2S$ , en condition soufre ce qui suggère que d'autres acteurs interviennent (Bridger et al., 2011).

En ce qui concerne la production d' $H_2$ , les études sont à compléter, avec et sans soufre pour l'ensemble des mutants, et un dosage de la production d' $H_2S$ , est à envisager pour l'ensemble

des mutants et dans les deux conditions, afin d'obtenir une réponse globale du fonctionnement du métabolisme de l'H<sub>2</sub> chez *T. barophilus* à pression atmosphérique.

D'autres mutants ont été construits où sont en cours de construction. La construction de mutants de *mbh* afin de séparer les deux unités du cluster, des mutants de Mbh-Codh, et le mutant du régulateur *SurR* font actuellement parti du projet d'un stage de Master 2, leur obtention permettrait de compléter cette étude. Ces manipulations permettront de véritablement conclure sur le métabolisme des hydrogénases à pression atmosphérique chez *T. barophilus* et de voir si celui-ci fonctionne de manière similaire à d'autres *Thermococcales* ou si des différences sont observées.

Cette condition de croissance à pression atmosphérique constitue une condition de stress pour *T. barophilus*, puisqu'inférieure à sa pression optimale. Il est donc possible que les observations faites à cette pression ne soient pas les mêmes pour une pression de 40 MPa. D'après cette étude il semble que l'hydrogénase membranaire Mbh intervienne dans l'adaptation de la souche aux faibles pressions. Ce qui est en accord avec les données de transcriptomiques de *T. barophilus* puisque pour de faibles pressions les gènes *mbh* sont sur-exprimés (Vannier et al., 2015). Par contre les hydrogénases cytosoliques SHI et SHII ne semblent pas avoir de rôle ici, les études transcriptomiques ont montré que les gènes les codant sont pourtant sur-exprimés en condition de faibles et fortes pressions. On aurait donc pu s'attendre à ce que la croissance des mutants *ΔshI* et *ΔshII* soient également impactées à 0,1 MPa. Pour *Pyrococcus yayanosii*, au contraire c'est une partie du cluster *mbx* codant pour les oxidoréductases, qui est sur-exprimée pour des stress pressions, alors que *mbh* est sous-exprimé; mais ces résultats chez *P. yayanosii* sont à nuancer du fait que les analyses ont été faites avec du soufre dans le milieu de culture, or celui-ci influence le métabolisme de l'hydrogène (Michoud and Jebbar, 2016).

Les analyses montrent cependant que les fonctions cellulaires affectées sont souvent équivalentes que les cellules soient placées sous hautes ou basses pressions. Il est donc possible que les observations faites à 0,1 MPa soient proches de celles à 70 MPa.

D'après nos résultats, les différences ne sont pas marquées entre la pression optimale de 40

MPa, et les deux autres pressions de stress testées. En effet on aurait pu s'attendre aux mêmes réponses à 0,1 et 70 MPa, c'est-à-dire en condition de stress, et au contraire un profil totalement différent à 40 MPa. Au contraire nous obtenons des profils de croissance des hydrogénases proches à 40 et 70 MPa.

D'après nos résultats les hydrogénases membranaires, Mbh et Mbh-Codh semblent être importantes pour une croissance sous hautes pressions (40 et 70 MPa), par rapport aux hydrogénases cytosoliques, qui semblent avoir moins d'influence sur la croissance sous pression.

Ce qui est étonnant c'est que le soufre ne semble pas avoir le même impact sur le métabolisme sous hautes pressions qu'à 0,1 MPa, puisque les réponses à 40 et 70 MPa, en condition avec ou sans soufre sont assez proche comme si celui-ci n'intervenait pas dans la régulation sous hautes pressions; alors qu'à pression atmosphérique nous avons pu noter des différences entre la condition soufre et sans soufre (notamment pour Mbh et Mbx).

D'après les études transcriptomiques chez *T. barophilus*, à 70 MPa, *mbh*, *mbh-codh* sont sur-exprimées, ainsi que les hydrogénases cytosoliques (Vannier, 2012). Pour le moment suite à ces travaux de thèse, Mbh semble avoir un rôle dans l'adaptation aux faibles et basses pressions. Mbh-Codh semble également impliquée mais uniquement pour des hautes pressions (40 et 70 MPa). Le rôle des sulfhydrogénases est quant à lui moins visible peu importe la pression testée.

Mais avant de conclure sur l'importance de certaines hydrogénases pour la croissance de *T. barophilus* sous pression, des cultures sous pression complémentaires sont à réaliser notamment sur les mutants hydrogénases que nous n'avons pas encore testés (comme  $\Delta mbx$ ); et pourquoi pas en utilisant le bioréacteur HP/HT de HP system, afin de faire un suivi de croissance en continu. Il serait également intéressant de faire un suivi de la production d'H<sub>2</sub> et d'H<sub>2</sub>S sous pression (40 et 70 MPa) afin de pouvoir comparer à ce qui sera obtenu à pression atmosphérique et pour aller plus loin dans l'analyse des mutants sous pressions. Cependant la mise en place du protocole va nécessiter un travail de mise au point avant d'être complètement opérationnel.

Pour conclure sur ce travail de thèse, le premier objectif a été rempli en permettant d'obtenir un outil génétique plus efficace, cette étude a fait l'objet d'une publication (Birien et al., 2018). L'utilisation de l'outil a permis d'obtenir un certain nombre de mutants, ciblés suite aux études transcriptomiques réalisés sur *T. barophilus*. La caractérisation des mutants hydrogénases obtenus par culture à pression atmosphérique et sous pression, ainsi que les dosages d'H<sub>2</sub> ne nous permettent pas encore de conclure quant à l'importance du rôle des hydrogénases ciblés dans l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques. Cependant l'hydrogénase membranaire Mbh, semble avoir une importance certaine dans le métabolisme de *T. barophilus* pour l'ensemble des pressions testées. Des perspectives sont envisagées afin de continuer cette étude : continuer les cultures de croissance sous pression, les mesures de l'H<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub>S aux différentes pressions ainsi que les analyses de PCR quantitatives en temps réel sur les mutants (RT-PCR) après extraction de l'ARN afin de quantifier l'expression des gènes ciblés aux différentes conditions testées.

## Bibliographie

- Abe, F. (2007). Exploration of the effects of high hydrostatic pressure on microbial growth, physiology and survival: perspectives from piezophysiology. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *71*, 2347–2357.
- Abe, F., and Horikoshi, K. (1998). Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in baro- (piezo-) physiology. *Extrem. Life Extreme Cond.* *2*, 223–228.
- Abe, F., and Kato, C. (1999). Barophysiology (Piezophysiology). pp. 227–248.
- Adams, M.W. (1990). The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* *1020*, 115–145.
- Adams, M.W.W., Holden, J.F., Menon, A.L., Schut, G.J., Grunden, A.M., Hou, C., Hutchins, A.M., Jenney, F.E., Kim, C., Ma, K., et al. (2001). Key Role for Sulfur in Peptide Metabolism and in Regulation of Three Hydrogenases in the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* *183*, 716–724.
- admin (2013). La loi de Le Chatelier (1884).
- Akhmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M., and Hackstein, J.H. (1998). A hydrogenosome with a genome. *Nature* *396*, 527–528.
- Alain, K., Marteinsson, V.T., Miroschnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., Prieur, D., and Birrien, J.-L. (2002). *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *52*, 1331–1339.
- Allen, E.E., Facciotti, D., and Bartlett, D.H. (1999). Monounsaturated but not polyunsaturated fatty acids are required for growth of the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 at high pressure and low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* *65*, 1710–1720.
- Allers, T., and Mevarech, M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 58–73.
- Allers, T., Ngo, H.-P., Mevarech, M., and Lloyd, R.G. (2004). Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* *70*, 943–953.
- Amrani, A., Bergon, A., Holota, H., Tamburini, C., Garel, M., Ollivier, B., Imbert, J., Dolla, A., and Pradel, N. (2014). Transcriptomics reveal several gene expression patterns in the piezophile *Desulfovibrio hydrothermalis* in response to hydrostatic pressure. *PloS One* *9*, e106831.
- Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M., and Imanaka, T. (2004). Description of *Thermococcus kodakaraensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archaeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea* *1*, 263–267.
- Atomi, H., Imanaka, T., and Fukui, T. (2012). Overview of the genetic tools in the Archaea.

Front. Microbiol. 3.

Balny, C., Masson, P., and Heremans, K. (2002). High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 3–10.

Bartlett, D.H. (1992). Microbial life at high pressures. *Sci. Prog.* 76, 479–496.

Bartlett, D.H. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 367–381.

Baumer, S., Ide, T., Jacobi, C., Johann, A., Gottschalk, G., and Deppenmeier, U. (2000). The F420H2 dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a Redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 275, 17968–17973.

Berkner, S., and Lipps, G. (2008). Genetic tools for *Sulfolobus* spp.: vectors and first applications. *Arch. Microbiol.* 190, 217–230.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293–300.

Bertani, G., and Baresi, L. (1987). Genetic transformation in the methanogen *Methanococcus voltae* PS. *J. Bacteriol.* 169, 2730–2738.

Bidle, K.A., and Bartlett, D.H. (1999). RecD function is required for high-pressure growth of a deep-sea bacterium. *J. Bacteriol.* 181, 2330–2337.

Birien, T., Thiel, A., Henneke, G., Flament, D., Moalic, Y., and Jebbar, M. (2018). Development of an Effective 6-Methylpurine Counterselection Marker for Genetic Manipulation in *Thermococcus barophilus*. *Genes* 9.

Birrien, J.-L., Zeng, X., Jebbar, M., Cambon-Bonavita, M.-A., Quérellou, J., Oger, P., Bienvenu, N., Xiao, X., and 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.

Bowien, B., and Schlegel, H.G. (1981). Physiology and biochemistry of aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 405–452.

Bridger, S.L., Clarkson, S.M., Stirrett, K., DeBarry, M.B., Lipscomb, G.L., Schut, G.J., Westpheling, J., Scott, R.A., and Adams, M.W.W. (2011). Deletion strains reveal metabolic roles for key elemental sulfur-responsive proteins in *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 193, 6498–6504.

Bridgman, P.W. (1914). The Coagulation of Albumen by Pressure. *J. Biol. Chem.* 19, 511–512.

Brown, A.D. (1976). Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40, 803–846.

Brown, J.W., Daniels, C.J., and Reeve, J.N. (1989). Gene structure, organization, and expression in archaeobacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 16, 287–338.



- Bryant, F.O., and Adams, M.W. (1989). Characterization of hydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* *264*, 5070–5079.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., et al. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* *273*, 1058–1073.
- Cammarano, P., Teichner, A., Londei, P., Acca, M., Nicolaus, B., Sanz, J.L., and Amils, R. (1985). Insensitivity of archaeobacterial ribosomes to protein synthesis inhibitors. Evolutionary implications. *EMBO J.* *4*, 811–816.
- Campanaro, S., Vezzi, A., Vitulo, N., Lauro, F.M., D’Angelo, M., Simonato, F., Cestaro, A., Malacrida, G., Bertoloni, G., Valle, G., et al. (2005). Laterally transferred elements and high pressure adaptation in *Photobacterium profundum* strains. *BMC Genomics* *6*, 122.
- Cann, J.R., Elderfield, H., and Laughton, A.S. (1999). *Mid-Ocean Ridges: Dynamics of Processes Associated with the Creation of New Oceanic Crust* (Cambridge University Press).
- Cario, A. (2013). Adaptations à la vie sous haute pression hydrostatique chez les microorganismes piézophiles, l’exemple de *Thermococcus barophilus* (Lyon, École normale supérieure).
- Cario, A., Grossi, V., Schaeffer, P., and Oger, P.M. (2015). Membrane homeoviscous adaptation in the piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Front. Microbiol.* *6*, 1152.
- Cario, A., Jebbar, M., Thiel, A., Kervarec, N., and Oger, P.M. (2016). Molecular chaperone accumulation as a function of stress evidences adaptation to high hydrostatic pressure in the piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Sci. Rep.* *6*, 29483.
- Charlebois, R.L., Lam, W.L., Cline, S.W., and Doolittle, W.F. (1987). Characterization of pHV2 from *Halobacterium volcanii* and its use in demonstrating transformation of an archaeobacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 8530–8534.
- Chi, E., and Bartlett, D.H. (1993). Use of a reporter gene to follow high-pressure signal transduction in the deep-sea bacterium *Photobacterium* sp. strain SS9. *J. Bacteriol.* *175*, 7533–7540.
- Chou, C.-J., Shockley, K.R., Connors, S.B., Lewis, D.L., Comfort, D.A., Adams, M.W.W., and Kelly, R.M. (2007). Impact of substrate glycoside linkage and elemental sulfur on bioenergetics of and hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 6842–6853.
- Cline, S.W., and Doolittle, W.F. (1987). Efficient transfection of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* *169*, 1341–1344.
- Cline, S.W., Schalkwyk, L.C., and Doolittle, W.F. (1989). Transformation of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *J. Bacteriol.* *171*, 4987–4991.
- Cohen, G.N., Barbe, V., Flament, D., Galperin, M., Heilig, R., Lecompte, O., Poch, O., Prieur, D., Quérellou, J., Ripp, R., et al. (2003). An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.* *47*, 1495–1512.

- Colwell, F.S., and D'Hondt, S. (2013). Nature and Extent of the Deep Biosphere. *Rev. Mineral. Geochem.* 75, 547–574.
- 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., Grindlay, N., et al. (2012). Hydrothermal vent fields and chemosynthetic biota on the world's deepest seafloor spreading centre. *Nat. Commun.* 3, 620.
- Corliss, J.B., Dymond, J., Gordon, L.I., Edmond, J.M., von Herzen, R.P., Ballard, R.D., Green, K., Williams, D., Bainbridge, A., Crane, K., et al. (1979). Submarine thermal springs on the galapagos rift. *Science* 203, 1073–1083.
- Da Cunha, V., Gaia, M., Gadelle, D., Nasir, A., and Forterre, P. (2017). Lokiarchaea are close relatives of Euryarchaeota, not bridging the gap between prokaryotes and eukaryotes. *PLOS Genet.* 13, e1006810.
- Dalmasso, C. (2016). Approches physiologiques et génomiques d'une archée thermopiezophile *Thermococcus piezophilus* (Brest).
- Dalmasso, C., Oger, P., Selva, G., Courtine, D., L'Haridon, S., Garlaschelli, A., Roussel, E., Miyazaki, J., Reveillaud, J., Jebbar, M., et al. (2016). *Thermococcus piezophilus* sp. nov., a novel hyperthermophilic and piezophilic archaeon with a broad pressure range for growth, isolated from a deepest hydrothermal vent at the Mid-Cayman Rise. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 440–444.
- Daniel, I., Oger, P., and Winter, R. (2006). Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chem. Soc. Rev.* 35, 858–875.
- DeLong, E.F., and Yayanos, A.A. (1985). Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* 228, 1101–1103.
- Dodsworth, J.A., Li, L., Wei, S., Hedlund, B.P., Leigh, J.A., and de Figueiredo, P. (2010). Interdomain conjugal transfer of DNA from bacteria to archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5644–5647.
- Eloe, E.A., Lauro, F.M., Vogel, R.F., and Bartlett, D.H. (2008). The deep-sea bacterium *Photobacterium profundum* SS9 utilizes separate flagellar systems for swimming and swarming under high-pressure conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6298–6305.
- Fang, J., and Bazylinski, D.A. (2008). Deep-Sea Geomicrobiology. 237–264.
- Farkas, J.A., Picking, J.W., and Santangelo, T.J. (2013). Genetic techniques for the archaea. *Annu. Rev. Genet.* 47, 539–561.
- Flores, G.E., and Reysenbach, A.-L. (2011). Hydrothermal Environments, Marine. In *Encyclopedia of Geobiology*, (Springer, Dordrecht), pp. 456–467.
- Flores, G.E., Wagner, I.D., Liu, Y., and Reysenbach, A.-L. (2012). Distribution, Abundance, and Diversity Patterns of the Thermoacidophilic “Deep-Sea Hydrothermal Vent Euryarchaeota 2.” *Front. Microbiol.* 3.
- Forterre, P. (2015). The universal tree of life: an update. *Front. Microbiol.* 6, 717.

- Forterre, P., Elie, C., Sioud, M., and Hamal, A. (1989). Studies on DNA polymerases and topoisomerases in archaeobacteria. *Can. J. Microbiol.* *35*, 228–233.
- Fox, J.D., Kerby, R.L., Roberts, G.P., and Ludden, P.W. (1996). Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* *178*, 1515–1524.
- Fröls, S., Ajon, M., Wagner, M., Teichmann, D., Zolghadr, B., Folea, M., Boekema, E.J., Driessen, A.J.M., Schleper, C., and Albers, S.-V. (2008). UV-inducible cellular aggregation of the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* is mediated by pili formation. *Mol. Microbiol.* *70*, 938–952.
- Fukui, T., Atomi, H., Kanai, T., Matsumi, R., Fujiwara, S., and Imanaka, T. (2005). Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res.* *15*, 352–363.
- Gaffron, H., and Rubin, J. (1942). FERMENTATIVE AND PHOTOCHEMICAL PRODUCTION OF HYDROGEN IN ALGAE. *J. Gen. Physiol.* *26*, 219–240.
- Gargaud, M., Martin, H., and Claeys, P. (2007). *Lectures in Astrobiology* (Springer Science & Business Media).
- Gernhardt, P., Possot, O., Foglino, M., Sibold, L., and Klein, A. (1990). Construction of an integration vector for use in the archaeobacterium *Methanococcus voltae* and expression of a eubacterial resistance gene. *Mol. Gen. Genet.* *MGG 221*, 273–279.
- Godfroy, A., Meunier, J.R., Guezennec, J., Lesongeur, F., Raguénès, G., Rimbault, A., and Barbier, G. (1996). *Thermococcus fumicolans* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent in the north Fiji Basin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *46*, 1113–1119.
- Gold, T. (1992). The deep, hot biosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6045–6049.
- Gomez-Saez, G.V., Pop Ristova, P., Sievert, S.M., Elvert, M., Hinrichs, K.-U., and Bühring, S.I. (2017). Relative Importance of Chemoautotrophy for Primary Production in a Light Exposed Marine Shallow Hydrothermal System. *Front. Microbiol.* *8*.
- González, J.M., Kato, C., and Horikoshi, K. (1995). *Thermococcus peptonophilus* sp. nov., a fast-growing, extremely thermophilic archaeobacterium isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Arch. Microbiol.* *164*, 159–164.
- Gropp, F., Palm, P., and Zillig, W. (1989). Expression and regulation of *Halobacterium halobium* phage phi H genes. *Can. J. Microbiol.* *35*, 182–188.
- Gross, M., Lehle, K., Jaenicke, R., and Nierhaus, K.H. (1993). Pressure-induced dissociation of ribosomes and elongation cycle intermediates. *Eur. J. Biochem.* *218*, 463–468.
- Guschinskaya, N., Brunel, R., Tourte, M., Lipscomb, G.L., Adams, M.W.W., Oger, P., and Charpentier, X. (2016). Random mutagenesis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* using in vitro mariner transposition and natural transformation. *Sci. Rep.* *6*, 36711.
- Guss, A.M., Mukhopadhyay, B., Zhang, J.K., and Metcalf, W.W. (2005). Genetic analysis of

- mch mutants in two *Methanosarcina* species demonstrates multiple roles for the methanopterin-dependent C-1 oxidation/reduction pathway and differences in H<sub>2</sub> metabolism between closely related species. *Mol. Microbiol.* *55*, 1671–1680.
- van Haaster, D.J., Hagedoorn, P.-L., Jongejan, J.A., and Hagen, W.R. (2005). On the relationship between affinity for molecular hydrogen and the physiological directionality of hydrogenases. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 12–14.
- Han, D., Xu, H., Puranik, R., and Xu, Z. (2014). Natural transformation of *Thermotoga* sp. strain RQ7. *BMC Biotechnol.* *14*, 39.
- Happe, T., and Naber, J.D. (1993). Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* *214*, 475–481.
- He, S.H., Woo, S.B., DerVartanian, D.V., Le Gall, J., and Peck, H.D. (1989). Effects of acetylene on hydrogenases from the sulfate reducing and methanogenic bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *161*, 127–133.
- Hensley, S.A., Moreira, E., and Holden, J.F. (2016). Hydrogen Production and Enzyme Activities in the Hyperthermophile *Thermococcus paralvinellae* Grown on Maltose, Tryptone, and Agricultural Waste. *Front. Microbiol.* *7*.
- Hileman, T.H., and Santangelo, T.J. (2012). Genetics Techniques for *Thermococcus kodakarensis*. *Front. Microbiol.* *3*.
- Horner, D.S., Foster, P.G., and Embley, T.M. (2000). Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Mol. Biol. Evol.* *17*, 1695–1709.
- Huber, J.A., Butterfield, D.A., and Baross, J.A. (2002). Temporal Changes in Archaeal Diversity and Chemistry in a Mid-Ocean Ridge Subseafloor Habitat. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 1585–1594.
- Hutcheon, G.W., Vasisht, N., and Bolhuis, A. (2005). Characterisation of a highly stable alpha-amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extrem. Life Extreme Cond.* *9*, 487–495.
- Ishii, A., Sato, T., Wachi, M., Nagai, K., and Kato, C. (2004). Effects of high hydrostatic pressure on bacterial cytoskeleton FtsZ polymers in vivo and in vitro. *Microbiol. Read. Engl.* *150*, 1965–1972.
- Jäger, D., Förstner, K.U., Sharma, C.M., Santangelo, T.J., and Reeve, J.N. (2014). Primary transcriptome map of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *BMC Genomics* *15*, 684.
- Jannasch, H.W., and Taylor, C.D. (1984). Deep-sea microbiology. *Annu. Rev. Microbiol.* *38*, 487–514.
- Jarrell, K.F., Walters, A.D., Bochiwal, C., Borgia, J.M., Dickinson, T., and Chong, J.P.J. (2011). Major players on the microbial stage: why archaea are important. *Microbiol. Read. Engl.* *157*, 919–936.

- Kallmeyer, J., Pockalny, R., Adhikari, R.R., Smith, D.C., and D'Hondt, S. (2012). Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 16213–16216.
- Kanai, T., Imanaka, H., Nakajima, A., Uwamori, K., Omori, Y., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2005). Continuous hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Biotechnol.* *116*, 271–282.
- Kanai, T., Matsuoka, R., Beppu, H., Nakajima, A., Okada, Y., Atomi, H., and Imanaka, T. (2011). Distinct physiological roles of the three [NiFe]-hydrogenase orthologs in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* *193*, 3109–3116.
- Kato, C. (1999). Barophiles (Piezophiles). pp. 91–111.
- Kato, M., and Hayashi, R. (1999). Effects of high pressure on lipids and biomembranes for understanding high-pressure-induced biological phenomena. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *63*, 1321–1328.
- Kato, C., Li, L., Nogi, Y., Nakamura, Y., Tamaoka, J., and Horikoshi, K. (1998). Extremely Barophilic Bacteria Isolated from the Mariana Trench, Challenger Deep, at a Depth of 11,000 Meters. *Appl. Environ. Microbiol.* *64*, 1510–1513.
- Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., et al. (1998). Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* *5*, 55–76.
- Kiener, A., König, H., Winter, J., and Leisinger, T. (1987). Purification and use of *Methanobacterium wolfei* pseudomurein endopeptidase for lysis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* *169*, 1010–1016.
- Kim, S.W., Kim, D.-U., Kim, J.K., Kang, L.-W., and Cho, H.-S. (2008). Crystal structure of Pfu, the high fidelity DNA polymerase from *Pyrococcus furiosus*. *Int. J. Biol. Macromol.* *42*, 356–361.
- Kim, Y.J., Lee, H.S., Kim, E.S., Bae, S.S., Lim, J.K., Matsumi, R., Lebedinsky, A.V., Sokolova, T.G., Kozhevnikova, D.A., Cha, S.-S., et al. (2010). Formate-driven growth coupled with H<sub>2</sub> production. *Nature* *467*, 352–355.
- Kovacs, K.L., Seefeldt, L.C., Tigyí, G., Doyle, C.M., Mortenson, L.E., and Arp, D.J. (1989). Immunological relationship among hydrogenases. *J. Bacteriol.* *171*, 430–435.
- Künel, A., Vorholt, J.A., Thauer, R.K., and Hedderich, R. (1998). An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* *252*, 467–476.
- Lake, J.A. (2015). Eukaryotic origins. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* *370*.
- Lallier, R. (1965). [Effects of 5-fluorouracil and 6-methylpurine on development of the egg of the sea urchin *Paracentrotus lividus*]. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *14*, 181–189.
- Lam, W.L., and Doolittle, W.F. (1989). Shuttle vectors for the archaeobacterium *Halobacterium volcanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 5478–5482.

- Lattuati, A., Guezennec, J., Metzger, P., and Largeau, C. (1998). Lipids of *Thermococcus hydrothermalis*, an archaea isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Lipids* 33, 319–326.
- Lauro, F.M., Chastain, R.A., Blankenship, L.E., Yayanos, A.A., and Bartlett, D.H. (2007). The Unique 16S rRNA Genes of Piezophiles Reflect both Phylogeny and Adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 838–845.
- Lederberg, J., and Tatum, E.L. (1946). Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158, 558.
- 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., Kim, H.-T., et al. (2008). The complete genome sequence of *Thermococcus onnurineus* NA1 reveals a mixed heterotrophic and carboxydrotrophic metabolism. *J. Bacteriol.* 190, 7491–7499.
- Leigh, J.A., Albers, S.-V., Atomi, H., and Allers, T. (2011). Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 577–608.
- L’Haridon, S., Jiang, L., Alain, K., Chalopin, M., Rouxel, O., Beauverger, M., Xu, H., Shao, Z., and Jebbar, M. (2014). *Kosmotoga pacifica* sp. nov., a thermophilic chemoorganoheterotrophic bacterium isolated from an East Pacific hydrothermal sediment. *Extrem. Life Extreme Cond.* 18, 81–88.
- Lipscomb, G.L., Keese, A.M., Cowart, D.M., Schut, G.J., Thomm, M., Adams, M.W.W., and Scott, R.A. (2009). SurR: A transcriptional activator and repressor controlling hydrogen and elemental sulfur metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Mol. Microbiol.* 71, 332–349.
- Lipscomb, G.L., Stirrett, K., Schut, G.J., Yang, F., Jenney, F.E., Scott, R.A., Adams, M.W.W., and 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.
- Lipscomb, G.L., Schut, G.J., Scott, R.A., and Adams, M.W.W. (2017). SurR is a master regulator of the primary electron flow pathways in the order Thermococcales. *Mol. Microbiol.* 104, 869–881.
- Lonsdale, P. (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep Sea Res.* 24, 857–863.
- Luo, Y., and Wasserfallen, A. (2001). Gene Transfer Systems and Their Applications in Archaea. *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 15–25.
- Lyon, E.J., Shima, S., Boecher, R., Thauer, R.K., Grevels, F.-W., Bill, E., Roseboom, W., and Albracht, S.P.J. (2004). Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 14239–14248.
- Ma, K., and Adams, M.W. (2001). Hydrogenases I and II from *Pyrococcus furiosus*. *Methods Enzymol.* 331, 208–216.
- Ma, K., Schicho, R.N., Kelly, R.M., and Adams, M.W. (1993). Hydrogenase of the

hyperthermophile *Pyrococcus furiosus* is an elemental sulfur reductase or sulfhydrogenase: evidence for a sulfur-reducing hydrogenase ancestor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 5341–5344.

Ma, K., Hao, Z., and Adams, M.W.W. (1994). Hydrogen production from pyruvate by enzymes purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: A key role for NADPH. *FEMS Microbiol. Lett.* *122*, 245–250.

Ma, K., Weiss, R., and Adams, M.W.W. (2000). Characterization of Hydrogenase II from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* and Assessment of Its Role in Sulfur Reduction. *J. Bacteriol.* *182*, 1864–1871.

Maaty, W.S., Wiedenheft, B., Tarlykov, P., Schaff, N., Heinemann, J., Robison-Cox, J., Valenzuela, J., Dougherty, A., Blum, P., Lawrence, C.M., et al. (2009). Something old, something new, something borrowed; how the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* responds to oxidative stress. *PLoS One* *4*, e6964.

MacDonald, A.G. (1984). The effects of pressure on the molecular structure and physiological functions of cell membranes. *Phil Trans R Soc Lond B* *304*, 47–68.

Macgregor, R.B. (1998). Effect of hydrostatic pressure on nucleic acids. *Biopolymers* *48*, 253–263.

Macgregor, R.B. (2002). The interactions of nucleic acids at elevated hydrostatic pressure. *Biochim. Biophys. Acta* *1595*, 266–276.

Magrum, L.J., Luehrsen, K.R., and Woese, C.R. (1978). Are extreme halophiles actually “bacteria”? *J. Mol. Evol.* *11*, 1–8.

Mangelsdorf, K., Zink, K.-G., Birrien, J.-L., and Toffin, L. (2005). A quantitative assessment of pressure dependent adaptive changes in the membrane lipids of a piezosensitive deep sub-seafloor bacterium. *Org. Geochem.* *36*, 1459–1479.

Mardanov, A.V., Ravin, N.V., Svetlitchnyi, V.A., Beletsky, A.V., Miroshnichenko, M.L., Bonch-Osmolovskaya, E.A., and 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. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 4580–4588.

Marteinsson, V.T., Moulin, P., Birrien, J., Gambacorta, A., Vernet, M., and Prieur, D. (1997). Physiological Responses to Stress Conditions and Barophilic Behavior of the Hyperthermophilic Vent Archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 1230–1236.

Marteinsson, V.T., Birrien, J.L., Reysenbach, A.L., Vernet, M., Marie, D., Gambacorta, A., Messner, P., Sleytr, U.B., and Prieur, D. (1999a). *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 Pt 2*, 351–359.

Marteinsson, V.T., Reysenbach, A.L., Birrien, J.L., and Prieur, D. (1999b). A stress protein is induced in the deep-sea barophilic hyperthermophile *Thermococcus barophilus* when grown under atmospheric pressure. *Extrem. Life Extreme Cond.* *3*, 277–282.

- Martin, A., Yeats, S., Janekovic, D., Reiter, W.D., Aicher, W., and Zillig, W. (1984). SAV 1, a temperate u.v.-inducible DNA virus-like particle from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius* isolate B12. *EMBO J.* *3*, 2165–2168.
- Martin, D.D., Bartlett, D.H., and Roberts, M.F. (2002). Solute accumulation in the deep-sea bacterium *Photobacterium profundum*. *Extrem. Life Extreme Cond.* *6*, 507–514.
- Martin, W., Baross, J., Kelley, D., and Russell, M.J. (2008). Hydrothermal vents and the origin of life. *Nat. Rev. Microbiol.* *6*, 805–814.
- Martinez, N., Michoud, G., Cario, A., Ollivier, J., Franzetti, B., Jebbar, M., Oger, P., and Peters, J. (2016). High protein flexibility and reduced hydration water dynamics are key pressure adaptive strategies in prokaryotes. *Sci. Rep.* *6*, 32816.
- Matsumi, R., Manabe, K., Fukui, T., Atomi, H., and 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.
- McTernan, P.M., Chandrayan, S.K., Wu, C.-H., Vaccaro, B.J., Lancaster, W.A., Yang, Q., Fu, D., Hura, G.L., Tainer, J.A., and Adams, M.W.W. (2014). Intact Functional Fourteen-subunit Respiratory Membrane-bound [NiFe]-Hydrogenase Complex of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* *289*, 19364–19372.
- Meersman, F., and McMillan, P.F. (2014). High hydrostatic pressure: a probing tool and a necessary parameter in biophysical chemistry. *Chem. Commun. Camb. Engl.* *50*, 766–775.
- Meile, L., Kiener, A., and Leisinger, T. (1983). A plasmid in the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Mol. Gen. Genet. MGG* *191*, 480–484.
- Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Künkel, A., and Hedderich, R. (1999). Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* *265*, 325–335.
- Meuer, J., Kuettner, H.C., Zhang, J.K., Hedderich, R., and Metcalf, W.W. (2002). Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 5632–5637.
- Mevarech, M., and Werczberger, R. (1985). Genetic transfer in *Halobacterium volcanii*. *J. Bacteriol.* *162*, 461–462.
- Michels, P.C., and Clark, D.S. (1997). Pressure-Enhanced Activity and Stability of a Hyperthermophilic Protease from a Deep-Sea Methanogen. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 3985–3991.
- Michoud, G. (2014). Etude des effets des hautes pressions hydrostatiques sur *Pyrococcus yayanosii* un piézophile extrême par une approche multi “omics.”
- Michoud, G., and Jebbar, M. (2016). High hydrostatic pressure adaptive strategies in an obligate piezophile *Pyrococcus yayanosii*. *Sci. Rep.* *6*, 27289.
- Miller, J.H., and Kempner, E.S. (1963). Effects of an adenine analog on yeast metabolism.



- Biochim. Biophys. Acta BBA - Spec. Sect. Nucleic Acids Relat. Subj. 76, 333–340.
- Minic, Z., Serre, V., and Hervé, G. (2006). Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *C. R. Biol.* 329, 527–540.
- Miroshnichenko, M.L., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. (2006). Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Extrem. Life Extreme Cond.* 10, 85–96.
- Moon, Y.-J., Kwon, J., Yun, S.-H., Lim, H.L., Kim, J., Kim, S.J., Kang, S.G., Lee, J.-H., Kim, S.I., and Chung, Y.-H. (2015). Proteomic Insights into Sulfur Metabolism in the Hydrogen-Producing Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9167–9195.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., and Imanaka, T. (1994). Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4559–4566.
- Morita, R.Y. (1975). Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39, 144–167.
- Nadal, M., Mirambeau, G., Forterre, P., Reiter, W.-D., and Duguet, M. (1986). Positively supercoiled DNA in a virus-like particle of an archaeobacterium. *Nature* 321, 256–258.
- Nogi, Y., Masui, N., and Kato, C. (1998). *Photobacterium profundum* sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment. *Extrem. Life Extreme Cond.* 2, 1–7.
- Nogi, Y., Kato, C., and Horikoshi, K. (2002). *Psychromonas kaikoa* sp. nov., a novel from the deepest piezophilic bacterium cold-seep sediments in the Japan Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1527–1532.
- Noll, K.M., and Vargas, M. (1997). Recent advances in genetic analyses of hyperthermophilic archaea and bacteria. *Arch. Microbiol.* 168, 73–80.
- Northrop, D.B. (2002). Effects of high pressure on enzymatic activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 71–79.
- O. Wirsén, C., W. Jannasch, H., Wakeham, S., and Canuel, E. (1986). Membrane lipids of a psychrophilic and barophilic deep-sea bacterium. *Curr Microbiol* 14, 319–322.
- Oger, P.M., and Cario, A. (2013). Adaptation of the membrane in Archaea. *Biophys. Chem.* 183, 42–56.
- Oger, P.M., and Jebbar, M. (2010). The many ways of coping with pressure. *Res. Microbiol.* 161, 799–809.
- Ohke, Y., Sakoda, A., Kato, C., Sambongi, Y., Kawamoto, J., Kurihara, T., and Tamegai, H. (2013). Regulation of cytochrome c- and quinol oxidases, and piezotolerance of their activities in the deep-sea piezophile *Shewanella violacea* DSS12 in response to growth conditions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77, 1522–1528.
- van der Oost, J., Schut, G., Kengen, S.W., Hagen, W.R., Thomm, M., and 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. *J. Biol. Chem.* *273*, 28149–28154.
- Ortenberg, R., Rozenblatt-Rosen, O., and Mevarech, M. (2000). The extremely halophilic archaeon *Haloferax volcanii* has two very different dihydrofolate reductases. *Mol. Microbiol.* *35*, 1493–1505.
- Oxelfelt, F., Tamagnini, P., and Lindblad, P. (1998). Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Cloning and characterization of a hupSL homologue. *Arch. Microbiol.* *169*, 267–274.
- Peck, R.F., DasSarma, S., and Krebs, M.P. (2000). Homologous gene knockout in the archaeon *Halobacterium salinarum* with *ura3* as a counterselectable marker. *Mol. Microbiol.* *35*, 667–676.
- Peeters, E., Albers, S.-V., Vassart, A., Driessen, A.J.M., and Charlier, D. (2009). Ss-LrpB, a transcriptional regulator from *Sulfolobus solfataricus*, regulates a gene cluster with a pyruvate ferredoxin oxidoreductase-encoding operon and permease genes. *Mol. Microbiol.* *71*, 972–988.
- Perrett, S., and Zhou, J.M. (2002). Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants. *Biochim. Biophys. Acta* *1595*, 210–223.
- Peters, J.W., Lanzilotta, W.N., Lemon, B.J., and Seefeldt, L.C. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* *282*, 1853–1858.
- Possot, O. (1990). Etude du gene *glnA* de *methanococcus voltae* et construction d'un vecteur d'integration permettant d'exprimer un marqueur de resistance eubacterien chez cette archaebacterie methanogene (Paris 7).
- Possot, O., Gernhardt, P., Klein, A., and Sibold, L. (1988). Analysis of drug resistance in the archaebacterium *Methanococcus voltae* with respect to potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* *54*, 734–740.
- Pradel, N., Ji, B., Gimenez, G., Talla, E., Lenoble, P., Garel, M., Tamburini, C., Fourquet, P., Lebrun, R., Bertin, P., 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*, e55130.
- Prieur, D., and Marteinsson, V.T. (1998). Prokaryotes living under elevated hydrostatic pressure. In *Biotechnology of Extremophiles*, (Springer, Berlin, Heidelberg), pp. 23–35.
- Qureshi, M.H., Kato, C., and Horikoshi, K. (1998). Purification of a ccb-type quinol oxidase specifically induced in a deep-sea barophilic bacterium, *Shewanella* sp. strain DB-172F. *Extrem. Life Extreme Cond.* *2*, 93–99.
- Reeve, J.N., and Schleper, C. (2011). Archaea: very diverse, often different but never bad? *Curr. Opin. Microbiol.* *14*, 271–273.

- Reysenbach, A.-L., Liu, Y., Banta, A.B., Beveridge, T.J., Kirshtein, J.D., Schouten, S., Tivey, M.K., Von Damm, K.L., and Voytek, M.A. (2006). A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* 442, 444–447.
- Rosenbaum, E., Gabel, F., Durá, M.A., Finet, S., Cléry-Barraud, C., Masson, P., and Franzetti, B. (2012). Effects of hydrostatic pressure on the quaternary structure and enzymatic activity of a large peptidase complex from *Pyrococcus horikoshii*. *Arch. Biochem. Biophys.*
- Rosenshine, I., Tchelet, R., and Mevarech, M. (1989). The mechanism of DNA transfer in the mating system of an archaebacterium. *Science* 245, 1387–1389.
- Rother, M., and Metcalf, W.W. (2005). Genetic technologies for Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 745–751.
- Sakuraba, H., Goda, S., and Ohshima, T. (2004). Unique sugar metabolism and novel enzymes of hyperthermophilic archaea. *Chem. Rec. N. Y. N* 3, 281–287.
- Samson, R.Y., Obita, T., Freund, S.M., Williams, R.L., and Bell, S.D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science* 322, 1710–1713.
- Santangelo, T.J., Čuboňová, L., and Reeve, J.N. (2008). Shuttle Vector Expression in *Thermococcus kodakaraensis*: Contributions of cis Elements to Protein Synthesis in a Hyperthermophilic Archaeon. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3099–3104.
- Santangelo, T.J., Čuboňová, L., and Reeve, J.N. (2010). *Thermococcus kodakaraensis* Genetics: TK1827-Encoded  $\beta$ -Glycosidase, New Positive-Selection Protocol, and Targeted and Repetitive Deletion Technology. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1044–1052.
- Santangelo, T.J., Čuboňová, L., and Reeve, J.N. (2011). Deletion of alternative pathways for reductant recycling in *Thermococcus kodakaraensis* increases hydrogen production. *Mol. Microbiol.* 81, 897–911.
- Sapra, R., Verhagen, M.F., and Adams, M.W. (2000). Purification and characterization of a membrane-bound hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 182, 3423–3428.
- Sapra, R., Bagramyan, K., and Adams, M.W.W. (2003). A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7545–7550.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2003). Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* 185, 210–220.
- Schelert, J., Drozda, M., Dixit, V., Dillman, A., and Blum, P. (2006). Regulation of mercury resistance in the crenarchaeote *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* 188, 7141–7150.
- Schicho, R.N., Ma, K., Adams, M.W., and Kelly, R.M. (1993). Bioenergetics of sulfur reduction in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* 175, 1823–1830.
- Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Murphy, J., and Zillig, W. (1995). A multicopy plasmid

of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* effects its transfer to recipients by mating. *J. Bacteriol.* *177*, 4417–4426.

Schmitz, O., Boison, G., Hilscher, R., Hundeshagen, B., Zimmer, W., Lottspeich, F., and Bothe, H. (1995). Molecular biological analysis of a bidirectional hydrogenase from cyanobacteria. *Eur. J. Biochem.* *233*, 266–276.

Schnabel, H. (1984). An immune strain of *Halobacterium halobium* carries the invertible L segment of phage PhiH as a plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 1017–1020.

Schneider, K., and Schlegel, H.G. (1976). Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H 16. *Biochim. Biophys. Acta* *452*, 66–80.

Schut, G.J., Bridger, S.L., and Adams, M.W.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. *J. Bacteriol.* *189*, 4431–4441.

Schut, G.J., Nixon, W.J., Lipscomb, G.L., Scott, R.A., and Adams, M.W.W. (2012). Mutational Analyses of the Enzymes Involved in the Metabolism of Hydrogen by the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Front. Microbiol.* *3*, 163.

Schut, G.J., Boyd, E.S., Peters, J.W., and Adams, M.W.W. (2013a). The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiol. Rev.* *37*, 182–203.

Schut, G.J., Boyd, E.S., Peters, J.W., and Adams, M.W.W. (2013b). The modular respiratory complexes involved in hydrogen and sulfur metabolism by heterotrophic hyperthermophilic archaea and their evolutionary implications. *FEMS Microbiol. Rev.* *37*, 182–203.

She, Q., Phan, H., Garrett, R.A., Albers, S.V., Stedman, K.M., and Zillig, W. (1998). Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. *Extrem. Life Extreme Cond.* *2*, 417–425.

She, Q., Zhang, C., Deng, L., Peng, N., Chen, Z., and Liang, Y.X. (2009). Genetic analyses in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 92–96.

Shima, S., and Thauer, R.K. (2007). A third type of hydrogenase catalyzing H<sub>2</sub> activation. *Chem. Rec. N. Y. N* *7*, 37–46.

Silva, P.J., van den Ban, E.C., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F.T., and Hagen, W.R. (2000). Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *Eur. J. Biochem.* *267*, 6541–6551.

Simonato, F., Campanaro, S., Lauro, F.M., Vezzi, A., D'Angelo, M., Vitulo, N., Valle, G., and Bartlett, D.H. (2006). Piezophilic adaptation: a genomic point of view. *J. Biotechnol.* *126*, 11–25.

Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 522–525.

Somero, G.N. (1990). Life at Low Volume Change: Hydrostatic Pressure as a Selective Factor in the Aquatic Environment. *Am. Zool.* *30*, 123–135.

- Somero, G.N. (1992). Adaptations to high hydrostatic pressure. *Annu. Rev. Physiol.* *54*, 557–577.
- Soppa, J. (2006). From genomes to function: haloarchaea as model organisms. *Microbiol. Read. Engl.* *152*, 585–590.
- Sowers, K.R., and Gunsalus, R.P. (1988). Plasmid DNA from the acetotrophic methanogen *Methanosarcina acetivorans*. *J. Bacteriol.* *170*, 4979–4982.
- Stephenson, M., and Stickland, L.H. (1931). Hydrogenase. *Biochem. J.* *25*, 215–220.
- Szabó, Z., Sani, M., Groeneveld, M., Zolghadr, B., Schelert, J., Albers, S.-V., Blum, P., Boekema, E.J., and Driessen, A.J.M. (2007). Flagellar motility and structure in the hyperthermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* *189*, 4305–4309.
- Takai, K., and Horikoshi, K. (2000). *Thermosiphon japonicus* sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan. *Life Extreme Cond.* *4*, 9–17.
- Tamegai, H., Li, L., Masui, N., and Kato, C. (1997). A denitrifying bacterium from the deep sea at 11,000-m depth. *Life Extreme Cond.* *1*, 207–211.
- Tamegai, H., Nishikawa, S., Haga, M., and Bartlett, D.H. (2012). The respiratory system of the piezophile *Photobacterium profundum* SS9 grown under various pressures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *76*, 1506–1510.
- Tersteegen, A., and Hedderich, R. (1999). *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins. *Eur. J. Biochem.* *264*, 930–943.
- Thauer, R.K., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T., and Shima, S. (2010). Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H<sub>2</sub> storage. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 507–536.
- Thiel, A., Michoud, G., Moalic, Y., Flament, D., and Jebbar, M. (2014). Genetic manipulations of the hyperthermophilic piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 2299–2306.
- Tumbula, D.L., and Whitman, W.B. (1999). Genetics of *Methanococcus*: possibilities for functional genomics in Archaea. *Mol. Microbiol.* *33*, 1–7.
- Vannier, P. (2012). Bases génomiques, protéomiques et transcriptomiques de l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques d'une archée hyperthermophile : *Thermococcus barophilus*.
- Vannier, P., Marteinsson, V.T., Fridjonsson, O.H., Oger, P., and Jebbar, M. (2011). Complete genome sequence of the hyperthermophilic, piezophilic, heterotrophic, and carboxydophilic archaeon *Thermococcus barophilus* MP. *J. Bacteriol.* *193*, 1481–1482.
- Vannier, P., Michoud, G., Oger, P., Marteinsson, V.P., and Jebbar, M. (2015). Genome expression of *Thermococcus barophilus* and *Thermococcus kodakarensis* in response to different hydrostatic pressure conditions. *Res. Microbiol.* *166*, 717–725.

- Vanreusel, A., De Groote, A., Gollner, S., and Bright, M. (2010). Ecology and biogeography of free-living nematodes associated with chemosynthetic environments in the deep sea: a review. *PloS One* 5, e12449.
- Vignais, P.M., and Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem. Rev.* 107, 4206–4272.
- Vignais, P.M., and Colbeau, A. (2004). Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6, 159–188.
- Vignais, P.M., Dimon, B., Zorin, N.A., Tomiyama, M., and Colbeau, A. (2000). Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H(2)-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 182, 5997–6004.
- Vignais, P.M., Billoud, B., and Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 455–501.
- Waege, I., Schmid, G., Thumann, S., Thomm, M., and Hausner, W. (2010). Shuttle Vector-Based Transformation System for *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3308–3313.
- Wagner, I.D., and Wiegel, J. (2008). Diversity of thermophilic anaerobes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 1–43.
- Wagner, A., Whitaker, R.J., Krause, D.J., Heilers, J.-H., van Wolferen, M., van der Does, C., and Albers, S.-V. (2017). Mechanisms of gene flow in archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 492–501.
- Wagner, M., Berkner, S., Ajon, M., Driessen, A.J.M., Lipps, G., and Albers, S.-V. (2009). Expanding and understanding the genetic toolbox of the hyperthermophilic genus *Sulfolobus*. *Biochem. Soc. Trans.* 37, 97–101.
- Wang, F., Wang, J., Jian, H., Zhang, B., Li, S., Wang, F., Zeng, X., Gao, L., Bartlett, D.H., Yu, J., et al. (2008). Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3. *PloS One* 3, e1937.
- Weidinger, G., Klotz, G., and Goebel, W. (1979). A large plasmid from *Halobacterium halobium* carrying genetic information for gas vacuole formation. *Plasmid* 2, 377–386.
- Welch, T.J., and Bartlett, D.H. (1998). Identification of a regulatory protein required for pressure-responsive gene expression in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Mol. Microbiol.* 27, 977–985.
- Wery, N. (2000). Caractérisation de micro-organismes thermophiles de la ride médio-atlantique. Description de deux nouveaux genres bactériens (Toulouse, INSA).
- Winter, R., and Jeworrek, C. (2009). Effect of pressure on membranes. *Soft Matter* 5, 3157–3173.
- Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the

- primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *74*, 5088–5090.
- Woese, C.R., Magrum, L.J., and Fox, G.E. (1978). Archaeobacteria. *J. Mol. Evol.* *11*, 245–251.
- Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 4576–4579.
- Wood, A.G., Whitman, W.B., and Konisky, J. (1985). A newly-isolated marine methanogen harbors a small cryptic plasmid. *Arch. Microbiol.* *142*, 259–261.
- Worrell, V.E., Nagle, D.P., McCarthy, D., and Eisenbraun, A. (1988). Genetic transformation system in the archaeobacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J. Bacteriol.* *170*, 653–656.
- Wu, L.F., and Mandrand, M.A. (1993). Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. *FEMS Microbiol. Rev.* *10*, 243–269.
- Xu, Y., Nogi, Y., Kato, C., Liang, Z., Rüger, H.-J., De Kegel, D., and Glansdorff, N. (2003). *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *53*, 533–538.
- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* *208*, 2819–2830.
- Yang, H., Lipscomb, G.L., Keese, A.M., Schut, G.J., Thomm, M., Adams, M.W.W., Wang, B.C., and Scott, R.A. (2010). SurR regulates hydrogen production in *Pyrococcus furiosus* by a sulfur-dependent redox switch. *Mol. Microbiol.* *77*, 1111–1122.
- Yano, Y., Nakayama, A., and Yoshida, K. (1997). Distribution of polyunsaturated Fatty acids in bacteria present in intestines of deep-sea fish and shallow-sea poikilothermic animals. *Appl. Environ. Microbiol.* *63*, 2572–2577.
- Yayanos, A.A. (1986). Evolutional and ecological implications of the properties of deep-sea barophilic bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 9542–9546.
- Yayanos, A.A. (1995). Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol.* *49*, 777–805.
- Yayanos, A.A., Dietz, A.S., and VAN Boxtel, R. (1979). Isolation of a deep-sea barophilic bacterium and some of its growth characteristics. *Science* *205*, 808–810.
- Yayanos, A.A., Dietz, A.S., and Van Boxtel, R. (1981). Obligately barophilic bacterium from the Mariana trench. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 5212–5215.
- Zeng, X., Birrien, J.-L., Fouquet, Y., Cherkashov, G., Jebbar, M., Querellou, J., Oger, P., Cambon-Bonavita, M.-A., Xiao, X., and Prieur, D. (2009). *Pyrococcus* CH1, an obligate piezophilic hyperthermophile: extending the upper pressure-temperature limits for life. *ISME J.* *3*, 873–876.
- Zeng, X., Zhang, X., Jiang, L., Alain, K., Jebbar, M., and Shao, Z. (2013). *Palaeococcus pacificus* sp. nov., an archaeon from deep-sea hydrothermal sediment. *Int. J. Syst. Evol.*

Microbiol. 63, 2155–2159.

Zheng, T., Huang, Q., Zhang, C., Ni, J., She, Q., and Shen, Y. (2012). Development of a simvastatin selection marker for a hyperthermophilic acidophile, *Sulfolobus islandicus*. Appl. Environ. Microbiol. 78, 568–574.

Zillig, W., Arnold, H.P., Holz, I., Prangishvili, D., Schweier, A., Stedman, K., She, Q., Phan, H., Garrett, R., and Kristjansson, J.K. (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. Extrem. Life Extreme Cond. 2, 131–140.

Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schwörer, B., Von Büнау, R., Richter, M., Klein, A., and Thauer, R.K. (1992). H<sub>2</sub>-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. Eur. J. Biochem. 208, 511–520.

Zivanovic, Y., Armengaud, J., Lagorce, A., Leplat, C., Guérin, P., Dutertre, M., Anthouard, V., Forterre, P., Wincker, P., and Confalonieri, F. (2009). Genome analysis and genome-wide proteomics of *Thermococcus gammatolerans*, the most radioresistant organism known amongst the Archaea. Genome Biol. 10, R70.

Zobell, C.E., and Morita, R.Y. (1957). BAROPHILIC BACTERIA IN SOME DEEP SEA SEDIMENTS<sup>1</sup>. J. Bacteriol. 73, 563–568.



# Valorisation des travaux de thèse

## ○ Responsabilités extra-recherche :

- Projet interdisciplinaire mené avec les M2 du Master Sciences de la Mer et du Littoral (Institut Universitaire Européen de la Mer, IUEM, Plouzané) dans le cadre de l'UE sciences et société (23/09/2015 au 17/11/2015)
- Formation des étudiants en stage (Co-encadrement de stages (3<sup>ème</sup>/L3/M1/M2), co-encadrement de travaux pratiques en génétique microbienne)
- Formation Initiale d'Animateurs Petits Débrouillards (24/10/2016 au 28/10/2016)
- Communication/vulgarisation scientifique (**Portes ouvertes de l'IUEM** en 2015, Intervention au Lycée Savina à Tréguier en 2015, Responsable de l'organisation pour le LM2E de la **Nuit Européenne des chercheur(e)s** 30/09/2016, **Fête de la science** du 14 au 16/10/2016, Participation au projet des **Jeunes reporters des Arts et des Sciences** avec le collègue Diwan Plijidi)
- Participation à la rédaction de la Newsletter mensuelle du LM2E

## ○ Campagne océanographique :

- Participation à la campagne océanographique chinoise (25/03/2015 au 29/04/2015) à bord du Da Yang Yi Hao, échantillonnage de sédiments et roches hydrothermales au niveau des dorsales océaniques de l'Océan Indien, à des fins de cultures et d'analyses biomoléculaires.

## ○ Communications orales :

### **2015, Genetics adaptations of archaea to hydrostatic pressure.**

**Tiphaine Birien**, Y. Moalic, and M. Jebbar

Réunion au Third institute of oceanography, Xiamen (China).

### **2016, Vivre dans les grands fonds, une question d'adaptation**

**T. Birien**

Journées de l'EDSML, accueil des nouveaux doctorants, IUEM.

### **2017, Role of Hydrogenases in adaptation to high hydrostatic pressure in a piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus***

**T. Birien**, M. Gardette, Y. Moalic, and M. Jebbar

Thermophiles 2017 14th International meeting on thermophile biology, August 27-sep 1 2017, South Africa. (Bourse AFEM)

## ○ Posters :

### **Genetic modifications of the hyperthermophilic piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*: Development of a stringent 6-methylpurine counterselection system.**

**Tiphaine Birien**, Yann Moalic, Axel Thiel and Mohamed Jebbar

UBO (Université de Bretagne Occidentale), Ifremer, LM2E (Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes), UMR 6197 (CNRS-Ifremer-UBO), IUEM (Institut Universitaire Européen de la Mer), Technopôle Brest-Iroise, 29280 PLOUZANE, France.

4th International workshop on Deep Sea Microbiology, September-15-17, 2014, Brest, France.

**Studying life adaptation to high hydrostatic pressure environments: implication of sulphur and hydrogen metabolism revealed through genetic manipulation in the piezo-hyperthermophilic archaeon: *Thermococcus barophilus*.**

Tiphaine Birien, Marion Gardette, **Yann Moalic** and Mohamed Jebbar

Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, CNRS, Brest, France, Ifremer, Brest, France

Molecular biology of Archaea 2016, August 1-3, 2016, London, England.

**Rôle des Hydrogénases dans l'adaptation aux hautes pressions hydrostatiques d'une archée piézophile hyperthermophile *Thermococcus barophilus*.**



Tiphaine Birien, Marion Gardette, **Yann Moalic** and Mohamed Jebbar

Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, CNRS, Brest, France, Ifremer, Brest, France

8<sup>ème</sup> Colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne, 17-20 oct 2017, Camaret-Sur-Mer, France.

Article

# Development of an Effective 6-Methylpurine Counterselection Marker for Genetic Manipulation in *Thermococcus barophilus*

Tiphaine Birien<sup>1,2,3</sup>, Axel Thiel<sup>1,2,3</sup>, Ghislaine Henneke<sup>1,2,3</sup>, Didier Flament<sup>1,2,3</sup>, Yann Moalic<sup>1,2,3</sup>  and Mohamed Jebbar<sup>1,2,3,\*</sup> 

- <sup>1</sup> Université de Brest (UBO, UBL), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)–UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Rue Dumont d’Urville, F-29280 Plouzané, France; Tiphaine.Birien@univ-brest.fr (T.B.); taxelt@gmail.com (A.T.); Ghislaine.Henneke@ifremer.fr (G.H.); Didier.Flament@ifremer.fr (D.F.); ymoalic@univ-brest.fr (Y.M.)
- <sup>2</sup> CNRS, IUEM–UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Rue Dumont d’Urville, F-29280 Plouzané, France
- <sup>3</sup> Ifremer, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Technopôle Pointe du diable, F-29280 Plouzané, France
- \* Correspondence: mohamed.jebbar@univ-brest.fr; Tel.: +33-298-498-817; Fax: +33-298-498-705

Received: 8 January 2018; Accepted: 2 February 2018; Published: 7 February 2018

**Abstract:** A gene disruption system for *Thermococcus barophilus* was developed using simvastatin (HMG-CoA reductase encoding gene) for positive selection and 5-Fluoroorotic acid (5-FOA), a *pyrF* gene for negative selection. Multiple gene mutants were constructed with this system, which offers the possibility of complementation in trans, but produces many false positives (<80%). To significantly reduce the rate of false positives, we used another counterselective marker, 6-methylpurine (6-MP), a toxic analog of adenine developed in *Thermococcus kodakarensis*, consistently correlated with the *TK0664* gene (encoding a hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase). We thus replaced *pyrF* by *TK0664* on our suicide vector and tested *T. barophilus* strain sensitivity to 6-MP before and after transformation. Wild-Type (WT) *T. barophilus* is less sensitive to 6-MP than WT *T. kodakarensis*, and an increase of cell resistance was achieved after deletion of the *T. barophilus* *TERMP\_00517* gene homologous to *T. kodakarensis* *TK0664*. Results confirmed the natural resistance of *T. barophilus* to 6-MP and show that *TK0664* can confer sensitivity. This new counterselection system vastly improves genetic manipulations in *T. barophilus* MP, with a strong decrease in false positives to <15%. Using this genetic tool, we have started to investigate the functions of several genes involved in genomic maintenance (e.g., *polB* and *rnhB*).

**Keywords:** archaea; piezophiles; hyperthermophiles; genetics; gene deletion; deep sea; hydrothermal vents

## 1. Introduction

The Thermococcales are generally found in natural biotopes typical of thermophilic microorganisms. Originally discovered in terrestrial and submarine hot vents, they have since been found in deep subsurface environments [1,2]. The Thermococcales order is presently represented by three genera: *Pyrococcus* [3], *Thermococcus* [4] and *Palaeococcus* [5,6]. Thermococcales are getting increasing attention from academia and industry because they provide a unique source of stable biocatalysts and other products such as archaeal lipids and compatible solutes [7,8]. Several species are used as biological models or sources of thermostable molecules studied in structural and metabolic biochemistry, genetics, and microbial physiology [9].

Members of this order grow easily under anaerobic conditions in the laboratory, making them models of choice for many years in fundamental or applied research projects [10,11]. Notably, their metabolism is based on the degradation of peptide and carbohydrate substrates to produce organic acids, hydrogen gas (H<sub>2</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). This is associated with the production of hydrogen sulfide through the reduction of elemental sulfur [12]. The production of H<sub>2</sub> has been well characterized for different models of Thermococcales even when elemental sulfur (S<sup>0</sup>) is not supplied in the growth medium [13–16].

*Thermococcus barophilus* is a hyperthermophilic, piezophilic and heterotrophic archaeon belonging to the Thermococcales order and Euryarchaeota phylum. *T. barophilus* was isolated from a deep-sea hydrothermal vent in 1993 and has the particularity of being the first true piezophile characterized. Indeed, it grows optimally at 85 °C with a pressure of 40 MPa. However, *T. barophilus* can also grow in a range spanning from atmospheric pressure (0.1 MPa) up to 85 MPa [17]. These features make it a good model for studying piezophilic and stress responses, and adaptive mechanisms [18–20].

Although comparative genomic and transcriptomic experiments offer substantial information about overall adaptive responses to changes in physico-chemical environmental conditions, the fundamental biological processes of cellular systems require synergy between biochemical and genetic approaches. Thus, as for eukarya and bacteria, genetic techniques have been developed for archaea, but have been seriously held back by limitations of culture conditions, expertise and the availability of suitable genetic markers for screening methods [21–25].

Nevertheless, genetic experimentation is now expanding on four groups of Archaea: Methanogens, Halophiles, Thermococcales and Sulfolobales, with more genetic manipulations being performed in Euryarchaeota than Crenarchaeota [23].

Since the first genetic system developed in *Thermococcus kodakarensis* [26], several studies have been published showing that genetic manipulation is possible in different species of Thermococcales (e.g., *Pyrococcus furiosus*, *Pyrococcus yamanosii*, *Thermococcus kodakarensis* and *Thermococcus onnurineus*) [27–30]. Among these, a gene deletion system has recently been developed for the *T. barophilus* MP  $\Delta$ *pyrF* host, relying on simvastatin resistance and 5-fluoroorotic acid sensitivity [31]. In this system, a suicide vector carries the selection markers, HMG-CoA reductase and *PyrF* genes, and the flanking areas of a targeted gene that are used in a double-crossover recombination to: (i) integrate in the chromosome; and then (ii) disrupt the gene of interest.

Indeed, two configurations are possible, either obtaining the mutant deleted in the targeted gene or a return to the wild-type state. However, as described previously when using the *PyrF*/5-FOA marker for counterselection [32], a third configuration is also obtained with a high rate of false positives (up to 80%), probably due to a lack of efficiency of the antibiotic, since no mutation was detected in *PyrF* alleles [31].

To avoid the stage of false-positive screening, which is particularly time-consuming for our model (at least five days of incubation), we improved our genetic tool by using another counterselective marker, 6-methylpurine (6-MP). This toxic compound is an adenine analog that depresses the growth of different organisms [33–35]. It inhibits the formation of guanylic acid from adenylic acid, decreases the incorporation of adenine into ribonucleic acid, and inhibits ribosome synthesis [36].

In *T. kodakarensis*, 6-MP is known as an effective growth inhibitor consistently correlated with *TK0664*, a gene encoding a hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase [37]. Thus, in this study, we replaced *pyrF* by *TK0664* on our suicide vector and tested the inhibitory effect of 6-MP on growth of several strains of *T. barophilus* before and after transformation with a suicide vector bearing sensitivity to 6-MP.

This new counterselection system strongly improves genetic manipulations in *T. barophilus* MP, with a strong decrease in the rate of false positives to 15%. Among the deletion mutants obtained, we confirmed that *polB* or *rnhB* could be deleted from *T. barophilus* without any effect of these individual deletions on cell growth under our growth conditions. This is similar to observations

in *T. kodakarensis* [38,39] and showed that PolD is sufficient for DNA replication in *T. barophilus*, as shown in *T. kodakarensis* [39].

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Strains and Growth Media

The strains used in this study are described in Table 1. All strains were grown under anaerobic conditions, at 85 °C in Thermococcales Rich Medium (TRM) [40], which was made up as follows: 1 L of demineralized water was supplemented with 23 g NaCl, 5 g MgCl<sub>2</sub>, 3.3 g PIPES, 4 g Tryptone, 1 g yeast extract, 0.7 g KCl, 0.5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05 g NaBr, 0.01 g SrCl<sub>2</sub>, and 1 mL resazurin 1%. The pH was adjusted to 6.6–6.7 and the medium autoclaved for 20 min at 121 °C. Once cooled, 1 mL of each of the following solutions was added sterily: 5% k<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2% CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O, 10 mM Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, 25 mM FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O. The liquid medium was dispensed in 50 or 100 mL vials, sulfur was added (2 g/L), and all vials were sealed with butyl-rubber stoppers, vacuum and N<sub>2</sub> gas addition steps were required to remove O<sub>2</sub> and to maintain the culture media under anaerobic conditions. The liquid phase was reduced by 0.1 mL of a Na<sub>2</sub>S, 9H<sub>2</sub>O solution. TRM was used in liquid or solid form and, for the latter case, 10 g/L of phytigel (Sigma-Aldrich Chimie, L'Isle D'Abeau Chesnes, St Quentin Falavier, France) were added to the TRM liquid medium.

After cell transformation, the transformants were selected on TRM supplemented with 2.5 µg/mL of simvastatin (Sigma) or 100 µM of 6-MP (Sigma).

**Table 1.** *Thermococcus barophilus* strains used and constructed in this study.

Strain	Genotype	Parent Strain	References
UBOCC-M-3203	Wild Type	<i>T. kodakarensis</i> KOD1	[22]
UBOCC-M-3107	Wild Type	<i>T. barophilus</i> MP	[17]
UBOCC-M-3300	TBΔTERMP_00517	<i>T. barophilus</i> MP	This study
UBOCC-M-3301	TBΔTERMP_00517::TK0664	<i>T. barophilus</i> MP	This study
UBOCC-M-3302	TBΔTERMP_00517, ΔTERMP_01623	<i>T. barophilus</i> MP	This study
UBOCC-M-3303	TBΔTERMP_00517, ΔTERMP_00671	<i>T. barophilus</i> MP	This study

### 2.2. Microbial Growth

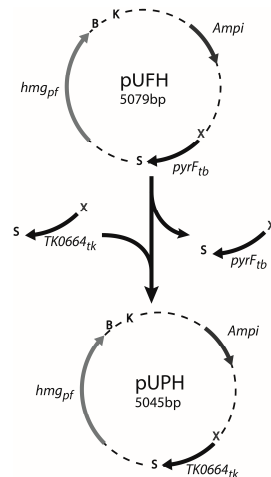
Pre-cultures were incubated overnight at 85 °C for 16 h, an aliquot of 0.2 mL of each overnight culture was introduced into 20 mL of fresh TRM supplemented with different concentrations of 6-MP (0 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM and 250 µM). Cultures were incubated at 85 °C and cell numbers were counted every 3 h. Growth was monitored by cell counting using a Thoma chamber and photonic microscopy at a magnification of 40× (Olympus) or using flow cytometry (CyFlowSpace, Sysmex Partec, GmbH, Görlitz, Germany). Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) and counted by one of the two cell counting methods described above. All the experiments were carried out in triplicate.

### 2.3. Construction of Gene Deletion Vectors

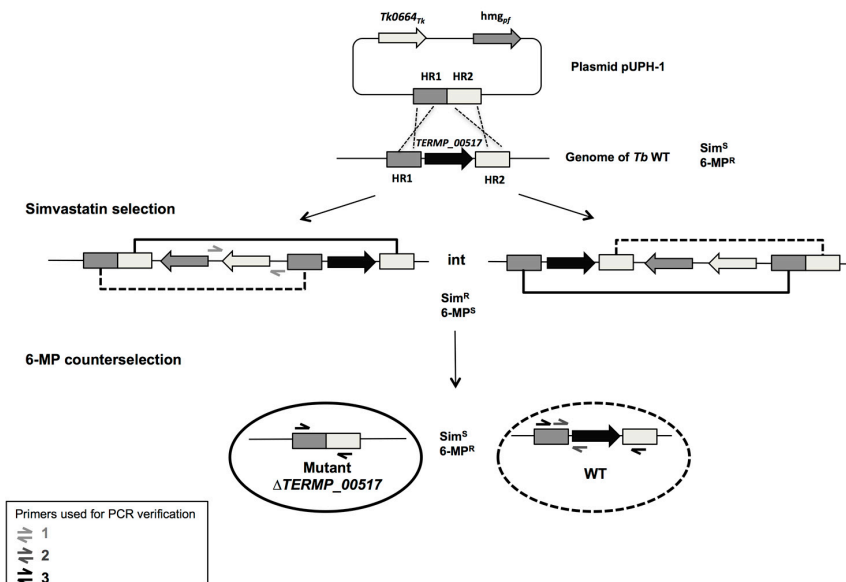
Plasmid pUFH served as a starting point to construct our new suicide vector [31]. This plasmid bears two selection markers: the *HMG-CoA* gene of *Pyrococcus furiosus*, encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, to reduce the inhibitory effects of simvastatin [41]; and the *pyrF* gene of *T. barophilus*, encoding the Orotidine-5'-monophosphate (OMP) decarboxylase, to confer sensitivity to 5-FOA [28,42]. In this study, *pyrF* was replaced by *TK0664* amplified from *T. kodakarensis* KOD1 (primers XhoI-6MPK\_Up and SmaI-6MPK\_Do). To achieve this, the XhoI and SmaI sites were used and the resulting plasmid was named pUPH (Figure 1).

According to Thiel et al. (2014), the flanking regions of the targeted gene were amplified sequentially with an overlap extension to form a fragment of 2 kb [31]. Then, this fragment

was inserted between the BamHI and KpnI sites of pUPH. The primers 6MPb\_1Up, 6MPb\_1Do, 6MPb\_2Up and 6MPb\_2Do (Table 2) were used to delete *TERMP\_00517* encoding xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. All primers used in the present study are detailed in Table 2. The deletion pathway and pop-in/pop-out recombination steps are described in Figure 2.



**Figure 1.** Construction of the pUPH plasmid. Primers XhoI-6MPK\_Up and SmaI-6MPK\_Do were used to amplify *TK0664* from the *T. kodakarensis* KOD1 genome. Then, *TK0664* and the vector pUFH were digested by SmaI (S) and XhoI (X) and ligated after a gel purification step, to form plasmid pUPH where *pyrF* is replaced by *TK0664*. The restriction sites BamHI (B) and KpnI (K) were conserved to enable cloning of the homologous regions in pUPH.



**Figure 2.** Schematic deletion diagram of *TERMP\_00517*. The plasmid pUPH-1 was constructed by ligation of homologous regions (HR) flanking *TERMP\_00517* inside pUPH and used to transform *T. barophilus* MP. After a first homologous recombination (pop-in), cells containing the integrated plasmid were selected with simvastatin (int). The pair of primers 1 was used to verify plasmid integration at this step. Then, intermediated cells were spread on 6-MP to get the second recombination event (pop-out), resulting in plasmid excision. This could lead either to gene deletion or to a WT genotype, depending on the recombination site (full line or dashed line respectively). Primer pairs 2 and 3 are used to validate successful creation of a mutant strain.

**Table 2.** List of primers used in this study.

Primers Used for Amplification of Flanking Regions of Targeted Gene	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
PolB_1Up	AAAAAAGGTACCGCTTAACATTCCTGACTCCCAGAATCTT	59.4
PolB_1Do	TCTATTTCAATAAATCACCTAATTTACCCCTTTAAAAATACATGCCCAT	57.9
PolB_2Up	ATTTTTAAAAGGGTGAAATTAGGTGATTTAATGAAATAGAATGAGCAGGA	57.9
PolB_2Do	AAAAAAGGATCCCGGCTTCTGGGGAAACCTCG	60.6
6MPb_1Up	AAAAAACGTACCAAGAAAACCGGAGTTTTAGTGAATACACC	58.4
6MPb_1Do	TCTCATGGAAACATTTAAATGGTTGTGGTATCTTGGACAAGAAGAAAA	59.5
6MPb_2Up	TTGTCCAAGATACCACAACCATTTAAATGTTTCCATGAGAAAAATGAAATGCAAAAA	60.3
6MPb_2Do	AAAAAAGATCTCTCGCTCTAAAGGAGCTTTCAACA	56.0
RHII_1Up	AAAAAAGGTACCCGGTACCCTGATAAAGAAGGCATC	59.4
RHII_1Do	TTAGTATTTCAGAAAATGAGGACTCTTGAAGTCTTTCTCTCGGT	61.3
RHII_2_Up	AGAGAAAGAACCTCAAGAGTCTCATTTCCTGAATACTAACGTTCCG	63.0
RHII_2_Do	AAAAAAGATCTACGACTCATGATGTTAATCCTCTTACAGAG	57.4
Primers Used to Check Mutants	Sequence (5'-3')	Tm (°C)
PolB_Up	GTCAGCTATGAGCTCGTGAAGAGTTAT	59
PolB_Do	AGAAGAGCGTAAATGTAAGGCTGGA	59
6MPk_Up	AAAAAACTCGAGCCCGTCCAAGCTACCACTCCC	69
6MPk_Do	AAAAAACCCGGCTTCAAACCCAGCCAAACAACACCC	71
6MPb_Up	ACCTCAGACATCTCTGCTGCTTG	60
6MPb_Do	GCCCGATAAGTGTCTGAAAGATACA	60
RHII_Up	GAGGAATCGCTGAAGTTTACTGGG	59
RHII_Do	CTACAAAGAGCATGGCGAATTTCCG	60

Tm: Melting temperature.

#### 2.4. Transformation of *Thermococcus barophilus*

The transformation protocol used in this study was identical to that described by Thiel et al. (2014) [31]. No CaCl<sub>2</sub> cell treatment was required for the transformation and sulfur was omitted from the TRM medium during the 6 h of cell pre-incubation at 85 °C. Then, the cells were harvested by centrifugation (8000× g, 6 min) concentrated in 200 µL of fresh TRM without sulfur; and kept on ice for 30 min. An aliquot of 4–5 µg of plasmid DNA was added to the cells, and the mixture was incubated for 1 h on ice. The heatshock step was carried out at 85 °C for 10 min and was followed by an incubation of 10 min on ice. Finally, the transformants were used to inoculate 20 mL of fresh TRM medium supplemented with sulfur and incubated at 85 °C for 18 h.

After transformation, the cells that had integrated the plasmid into their chromosome were selected on solid medium (Pop-in recombination, Figure 2). At 85 °C, phytagel maintains TRM plates in a solid state (Sigma, 10 g/L). Cells were harvested by centrifugation (8000× g, 6 min), resuspended in 100 µL of fresh TRM before spreading on plates containing simvastatin (final concentration 2.5 µg/mL). The plates were then incubated for five days at 85 °C.

A second step was needed to excise the targeted gene (pop-out recombination, Figure 2). This counterselection was performed on plates containing TRM, supplemented with 6-MP (final concentration 100 µM). The strains growing on these plates were resistant to 6-MP and sensitive to simvastatin, since the plasmids had been excised. A PCR was performed, and the PCR products sequenced to examine the different mutants.

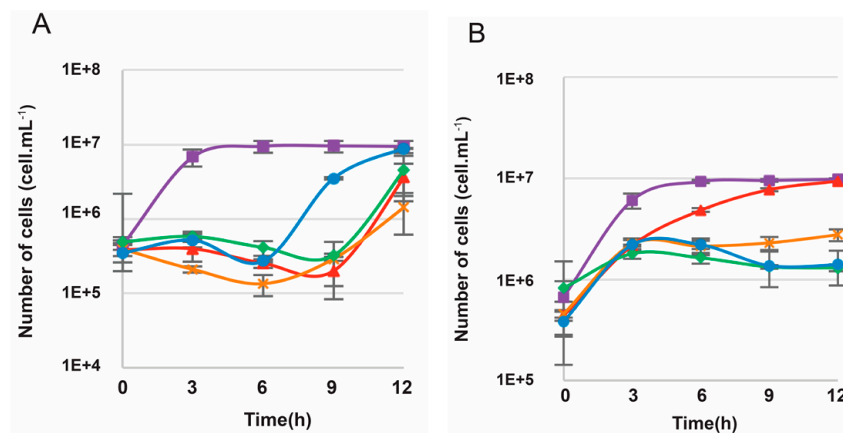
#### 2.5. DNA Extraction and Purification

First, overnight cultures were centrifuged at 8000× g for 8 min. Then, the pellet was suspended in 300 µL of TE (100 mM of Tris-HCl pH8, 50 mM of NaCl, 50 mM of EDTA pH 8). To ensure cell lysis, 40 µL of SDS (10%), 40 µL of Sarkosyl (10%) and 20 µL of proteinase K (20 mg/mL) were added. The cell suspension was incubated for 1 h at 55 °C. Then, 20 µL of RNase A (50 mg/mL) and 200 µL of lysis buffer (GeneJet Genomic DNA purification kit, ThermoFisher Illkirch, France) were added. The mix was put into a purification column and centrifuged at 6000× g for 1 min. Two successive cleaning steps were carried out, with 500 µL of cleaning solution and 1 min of centrifugation at 12,000× g. To remove any trace of ethanol, the suspension was centrifuged (12,000× g, 3 min). Then, the column was placed in a clean tube and 200 µL of sterile water used for elution after centrifugation at 12,000× g for 1 min.

### 3. Results

#### 3.1. Sensitivity of *T. barophilus* MP to the Purine Analog 6-MP

To verify if wild type (WT) *T. barophilus* cells were sensitive to 6-MP, growth experiments were conducted on liquid TRM media containing 6-MP at concentrations ranging from 0 to 250  $\mu\text{M}$  (Figure 3A). Growth of the WT strain was slightly impacted in the presence of 10  $\mu\text{M}$  6-MP, with a slight effect on the growth rate but not on the growth yield. As shown in Figure 3A, at a minimum concentration of 50  $\mu\text{M}$  6-MP, an inhibitory effect on growth was observed, with a halt in growth between 3 and 12 h (Figure 3A) that could even last until 24 h (data not shown). The same inhibitory effect was observed with higher concentrations of 6-MP (100 and 250  $\mu\text{M}$ ).



**Figure 3.** Growth curves of: *T. kodakarensis* KOD1 (A); and *T. barophilus* MP (B). The strains were cultivated at 85 °C and 0.1 MPa in TRM medium containing different concentrations of 6-MP: 0  $\mu\text{M}$  (■), 10  $\mu\text{M}$  (▲), 50  $\mu\text{M}$  (×), 100  $\mu\text{M}$  (◆) and 250  $\mu\text{M}$  (●).

To make a comparison with *T. kodakarensis*, in which 6-MP is used as a selection marker in genetic manipulations, we performed the same growth experiments in *T. kodakarensis* KOD1, with the same range of concentrations of 6-MP (Figure 3B). Regardless of the concentration used, growth inhibition was observed, but with a resumption of growth beyond 6 or 9 h of incubation, which might possibly be due to the growth of resistant cells.

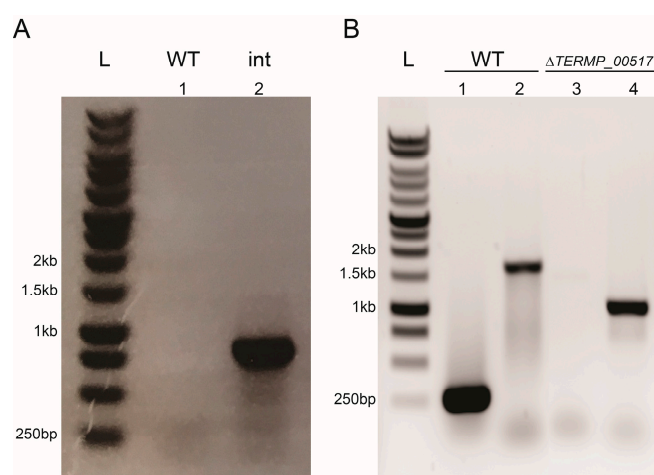
As genetic manipulations are mainly carried out on solid culture media, we tested whether *T. barophilus* is sensitive or not to 6-MP compared with *T. kodakarensis*. Therefore, we did spot tests to assess the growth of *T. barophilus* on TRM solid medium supplemented with 6-MP concentrations ranging from 0 to 250  $\mu\text{M}$ , followed by the incubation of the spotted plates for five days at 85 °C under anaerobic conditions. When comparing *T. barophilus* with *T. kodakarensis*, the results highlighted a clear difference at 100  $\mu\text{M}$ , with no growth in *T. kodakarensis* (data not shown), whereas *T. barophilus* cells were able to grow, even at 250  $\mu\text{M}$ , but not at 500  $\mu\text{M}$ . According to the results obtained, the *T. barophilus* WT strain does not appear to be very sensitive to 6-MP.

It is known that the sensitivity of *T. kodakarensis* to 6-MP is linked to the TK0664 gene encoding a hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase [37]. By analyzing the genome of *T. barophilus* [43], we identified the *TERMP\_00517* gene encoding a hypoxanthine/guanine phosphoribosyltransferase. The TK0664 gene product is composed of 214 amino acids, while the *TERMP\_00517* gene product is composed of 215 aa, these two proteins share 80.5% identity and 90.2% similarity in the peptide sequence. Given the degree of similarity between the two proteins, it was questioned whether the product of the *TERMP\_00517* gene is responsible to some extent for the relative sensitivity of *T. barophilus* to 6-MP. To test this, *TERMP\_00517* deletion experiments were performed.



### 3.2. Construction of the $\Delta$ TERMP\_00517

After several unsuccessful attempts to delete *TERMP\_00517* with the pUFH suicide vector [31], the new construct pUPH (Figure 1) containing the *TK0664* marker cassette was used to clone the flanking area of this targeted gene. The resulting plasmid (pUPH-1) served in the transformation of *T. barophilus* MP using simvastatin as a marker for the pop-in recombination step (Figure 2). Several transformants were checked for plasmid integration by PCR after genomic DNA extraction. As shown in Figure 4A, the gene *TK0664* was present in the transformants and absent from WT *T. barophilus*. Then, selected clones were spread on solid TRM medium supplemented with 100  $\mu$ M 6-MP. After five days of incubation at 85  $^{\circ}$ C, among the hundreds of clones obtained, more than sixty were streaked on solid TRM medium with or without added simvastatin (2.5  $\mu$ g/mL). This was done to validate the pop-out recombination step or the plasmid excision from the genome and to compare the efficiency of 6-MP with 5-FOA [31]. Thus, more than forty clones were sensitive to simvastatin, among which twenty-four were checked for targeted gene deletion. Finally, PCR controls made it possible to identify six clones as  $\Delta$ TERMP\_00517 (Figure 4B). One of these strain mutants was selected to be used as a host strain in further genetic experiments.



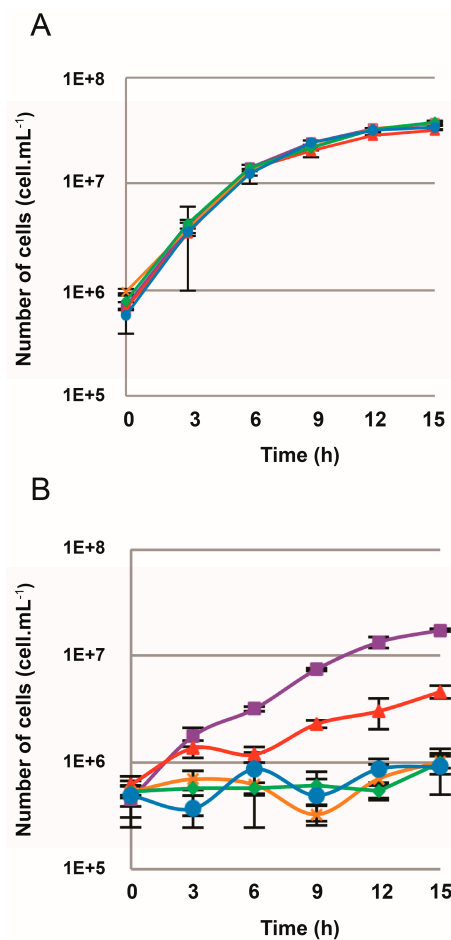
**Figure 4.** PCR gel migration of mutant strain constructions. (A) *TK0664* gene amplification realized with primers XhoI-6MPK\_Up and SmaI-6MPK\_Do (Primer pair 1, Figure 2) to verify the genotype of pUPH after integration into the *T. barophilus* genome (int, well 2, 819 bp). (B) *TERM\_00517* gene amplification realized with primers Verif- $\Delta$ 6MPB\_Up and Verif- $\Delta$ 6MPB\_Do (wells 1 and 3, Primer pair 2, Figure 2) and primers 6MPB\_verif\_YM\_Up and 6MPB\_verif\_YM\_Do (wells 2 and 4, Primer pair 3, Figure 2).

### 3.3. *TERMP\_00517* Is Responsible for 6-MP Sensitivity in *Thermococcus barophilus*

Growth monitoring was carried out with the  $\Delta$ TERMP-00517 *T. barophilus* mutant on liquid TRM medium with concentrations of 6-MP ranging from 0 to 250  $\mu$ M. Results showed that the mutant was resistant to 6-MP regardless of the concentration used, and demonstrated that the *TERMP\_00517* gene was responsible for the relative sensitivity to 6-MP in *T. barophilus* (compared with *T. kodakarensis*) and that its deletion did not affect the viability of the strain under selected culture conditions (TRM medium, 85  $^{\circ}$ C, anaerobic conditions) (Figure 5A).

The mutant  $\Delta$ TERMP\_00517 *T. barophilus* was transformed with the plasmid pUPH-1 bearing the flanking genes of the *TERMP\_00517* and *TK0664* genes. The integration of this plasmid was made upstream or downstream of the *TERMP\_00517* deleted region, the epictopic complemented mutant resistant to simvastatin was grown in liquid TRM medium supplemented with 6-MP up to 250  $\mu$ M (Figure 5B). This strain was slightly sensitive to 10  $\mu$ M 6-MP and its growth was completely inhibited

at 50  $\mu\text{M}$  6-MP, showing that the *Tk0664* gene confers sensitivity to 6-MP (Figure 5B) much more effectively than the *TERMP\_00517* gene, as shown in WT *T. barophilus* (Figure 3A).



**Figure 5.** Growth curves of: *T. barophilus*  $\Delta\text{TERMP}_{00517}$  (A); and *T. barophilus*  $\Delta\text{TERMP}_{00517}::\text{pUPH-1}$  (B). The strains were cultivated at 85 °C and 0.1 MPa in TRM medium containing different concentrations of 6-MP: 0  $\mu\text{M}$  (■), 10  $\mu\text{M}$  (▲), 50  $\mu\text{M}$  (×), 100  $\mu\text{M}$  (◆) and 250  $\mu\text{M}$  (●).

Thus, deletion of *TREMP\_00517*, the gene encoding xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, confers resistance to 6-MP along with a higher sensitivity through complementation with the *TK0664* gene.

#### 3.4. Efficiency of the New Counterselection Marker

To assess the efficiency of this new counterselection system, pop-in and pop-out recombinations were made for different target genes. Due to the randomization of the pop-out step that can either lead to the WT strain or to gene deletion, several clones were screened by PCR to verify the veracity of the mutation. However, it was also necessary to check for the absence of the plasmid from the strain genome. For *T. barophilus*, 5FOA has been previously used as a drug for the counterselection step [31] but a high rate of false positive clones (still containing the plasmid after growth on 5FOA plates) was recurrently observed. Consequently, colonies were re-streaked on TRM-simvastatin plates to sort out the ones that had really lost the plasmid. This false-positive screening is time-consuming because it requires another 3–5 days of incubation at 85 °C before screening for potential mutants is possible. The use of 6-MP could therefore strongly reduce the processing time of mutant constructions, in addition to expanding the utility of *T. barophilus* as a genetic tool.

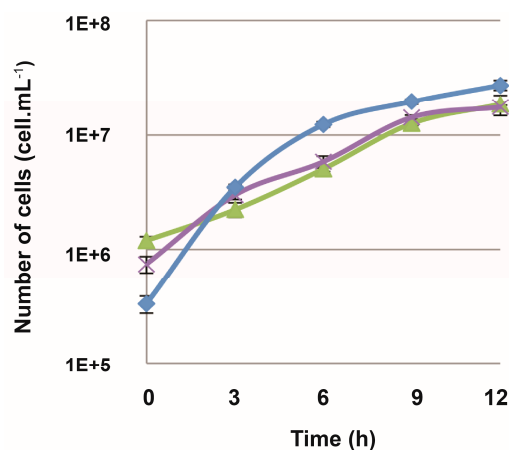
Overall, with 5-FOA, 726 clones were screened and 625 were false positives (86%). With 6-MP, as described above, the first construction ( $\Delta$ TERMP\_00517) gave a rate of 37% false positives, which represents a strong decrease. For the next genetic deletions realized with the strain  $\Delta$ TERMP\_00517, among the 326 clones screened, none were false positives (0%). This difference is highly significant ( $t$ -test,  $p$ -value  $< 10^{-22}$ ) and clearly demonstrates the improvement of the pop-out recombination step or the counterselection step with 6-MP.

### 3.5. Deletion of *polB* or *rnhB* Is Not Essential for Viability in *Thermococcus barophilus*

The construction of effective genetic tools in *T. barophilus*, a deep sea hydrothermal vent Thermococcales, completes the range of approaches used in our laboratory to study the cellular processes of *Thermococcales* essential for adaptation and genomic maintenance under extreme temperature and/or high hydrostatic pressure conditions of deep sea hydrothermal vents.

Among the different cellular processes being studied with this new genetic tool, a special emphasis is being put on genome replication, centering on the functional characterization of the Thermococcales (e.g., *Pyrococcus abyssi* and *T. barophilus*) replication complex. Here, the PolB and PolD DNA polymerases found in *Thermococcales* carry out DNA synthesis. It has been shown in a *T. kodakarensis* strain deficient in PolB that this does not affect growth rate [36] and PolB does provide resistance to UV irradiation. In contrast, all attempts to generate mutants deleted in *polD* have been unsuccessful.

The *polD* and *polB* genes were targeted for deletion in *T. barophilus*, with primers designed (Table 2) to delete the genes *TERMP\_01623* (PolB) and *TERMP\_01872-TERMP\_01873* (large and small subunits of PolD). Plasmids containing upstream and downstream homologous regions of these two deletion targets were inserted in the pUPH plasmid (at KpnI/BamHI restrictions sites). For *polB*, the counterselection on 6-MP made it possible to isolate several clones resistant to 6-MP that had been effectively deleted in the *TERMP\_01623* (*PolB*) gene. Conversely, several attempts in deleting *polD* have failed, demonstrating that as for *T. kodakarensis* [39] that PolB is not essential for cell growth (Figure 6) while PolD is and that PolD is sufficient for replicating DNA under the culture conditions used in this study.



**Figure 6.** Growth curves of *T. barophilus*  $\Delta$ TERMP\_00517, *T. barophilus*  $\Delta$ TERMP\_00517,  $\Delta$ TERMP\_01623 (*polB*) and *T. barophilus*  $\Delta$ TERMP\_00517,  $\Delta$ TERMP\_00671 (*rnhB*). The strains were cultivated at 85 °C and 0.1 MPa in TRM medium containing different concentration of 6-MP: *T. barophilus*  $\Delta$ TERMP\_00517,  $\Delta$ *rnhB* (×), *T. barophilus*  $\Delta$ TERMP\_00517,  $\Delta$ *polB* (▲) and *T. barophilus*  $\Delta$ TERMP\_00517 (parental strain) (◆).

DNA replication in all living organisms takes place concurrently on two separate strands. The lagging strand consists of multiple discontinuous segments called Okazaki fragments, whereas the

leading strand consists of one large continuous segment. The production of each individual lagging strand by DNA polymerase is primed by a short stretch of RNA. RNases H are enzymes that degrade the RNA portion of RNA/DNA or RNA-DNA/DNA duplexes and RNase HIII is likely the key enzyme involved in RNA elimination in Thermococcales [44]. In the same way as for *polB*, primers were designed to delete the *rnhB* gene. Genomic regions upstream and downstream of the targeted gene were PCR-amplified and cloned in the pUPH plasmid. The  $\Delta$ TERMP\_00517 *T. barophilus* strain was transformed by this new construction and the deletion of the mutant in the *rnhB* gene has since been successfully obtained. Thus, this gene does not appear to be essential for the growth cycle as its growth is similar to that of the parental strain (Figure 6). This confirms what has been recently demonstrated in *T. kodakarensis*, where RNase HIII individual deletion is not essential for cell growth [38].

#### 4. Discussion

In this study, we have shown that the WT *T. barophilus* MP strain is relatively resistant to 6-MP, and the deletion of the TERMP\_00517 gene homologous to the TK0664 gene makes the strain completely resistant to 6-MP. The ectopic expression of TK0664 in the *T. barophilus* strain deleted for the TERMP\_00517 gene makes it completely sensitive to 6-MP.

Based on the lethal incorporation of 6-methylpurine in the purine salvage pathway through TK0664 expression, the TK0664/6-MP system has allowed the deletion of multiple genes in different archaea [23,45]. In this study, we demonstrated the relevance of using this counterselection marker in *T. barophilus*. Despite the presence in its genome of the TERMP\_00517 gene encoding xanthine-guanine phosphoribosyltransferase, homologous to TK0664, *T. barophilus* has previously been described as insensitive to 6-MP [31]. Here, the results of our study highlighted the influence of this gene on the sensitivity of the WT strain. Indeed, a dose-effect is observed with the WT *T. barophilus* strain but this had totally disappeared from the strain with an impaired TERMP\_00517 gene (Figures 3A and 5A). Moreover, the sensitivity of *T. barophilus* to 6-MP conferred by TK0664 is much higher than that allowed by TERMP\_00517 (Figure 5B). Although the two gene products share more than 80% identity and 90% similarity, it seems that the xanthine-guanine phosphoribosyltransferase enzyme encoded by TK0664 gene is more efficient than that encoded by TERMP\_00517 gene in producing sufficient toxic product after 6-MP enzymatic conversion.

It should be mentioned that the system with the *pyrF*/5FOA marker was very useful for initiating genetic manipulations in *T. barophilus* [31], but because the percentage of false positives is too high, the time needed to obtain a mutant is much longer, requiring more liquid culture steps, restreaking on solid media, and PCR checking, which together lengthen the procedure considerably.

With the  $\Delta$ TERMP\_00517 *T. barophilus* strain, the new system gives few or no false positives (less than 15%) after screening on solid TRM supplemented with simvastatin, which substantially reduces the time required to obtain mutants in *T. barophilus*. However, it should be noted that this substantial improvement does not make it possible to skip the PCR verification step to truly verify plasmid excision.

The new pUPH suicide vector bearing simvastatin (*hmg-CoA*) resistance and 6-MP (TK0664) sensitivity markers that was constructed and used in this study for *T. barophilus* has already allowed individual deletion of the genes TERMP\_00517, *polB* and *rnhB* in *T. barophilus*. Here, the results obtained on genes encoding DNA polymerases corroborate the results obtained in *T. kodakarensis* [39]: PolD is likely the essential replicative enzyme and PolB could play a role in DNA repair and/or recombination and an alternative role in DNA replication [39]. As demonstrated in this study, loss of *rnhB* from *T. barophilus* had no effect on growth rate. This corroborates a recent study showing that RNase HIII can be deleted in *T. kodakarensis* with no discernible effects on viability and growth [38]. However, it seems that RNase HIII must collaborate with Fen1 (a flap endonuclease) to maintain viability in the absence of GAN (for GINS-associated nuclease) in *T. kodakarensis* [38].

## 5. Conclusions

This improvement enlarges the number of genetic selection markers for *T. barophilus*, which is particularly valuable at present to pursue investigations on piezophilic adaptation in this deep-sea hydrothermal vent archaeon [20]. As illustrated in this study, *T. barophilus* can also serve as a model for the genetic and physiological studies of other cellular processes such as the genomic maintenance under high temperature and high pressure, corresponding to the environmental conditions found in deep sea hydrothermal vents.

**Acknowledgments:** We thank Nadège Quintin for the deposition of the strains described in this work in the UBOculture collection (<http://www.univ-brest.fr/souchotheque/CollectionLM2E>). We are grateful to Helen McCombie for helpful improvements to the written English. 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. T.B. was supported by a Ph.D. fellowship from the Conseil Régional de Bretagne.

**Author Contributions:** T.B., A.T., Y.M. and M.J. conceived and designed the experiments; T.B., A.T. and Y.M. performed the experiments; all the authors analyzed the data; and T.B., A.T., Y.M., G.H., D.F. and M.J. wrote, edited and approved the manuscript.

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

## References

1. Huber, R.; Stetter, K.O. Discovery of hyperthermophilic microorganisms. *Methods Enzymol.* **2001**, *330*, 11–24. [[PubMed](#)]
2. Itoh, T. Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic archaea. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *96*, 203–212. [[CrossRef](#)]
3. Fiala, G.; Stetter, K.O. *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100 °C. *Arch. Microbiol.* **1986**, *145*, 56–61. [[CrossRef](#)]
4. Achenbach-Richter, L.; Gupta, R.; Zillig, W.; Woese, C.R. Rooting the archaeobacterial tree: The pivotal role of *Thermococcus celer* in archaeobacterial evolution. *Syst. Appl. Microbiol.* **1988**, *10*, 231–240. [[CrossRef](#)]
5. 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50*, 489–500. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Zeng, X.; Zhang, X.; Jiang, L.; Alain, K.; Jebbar, M.; Shao, Z. *Palaeococcus pacificus* sp. nov., an archaeon from deep-sea hydrothermal sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2013**, *63*, 2155–2159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Jebbar, M.; Franzetti, B.; Girard, E.; Oger, P. Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles* **2015**, *19*, 721–740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Leis, B.; Heinze, S.; Angelov, A.; Pham, V.T.; Thürmer, A.; Jebbar, M.; Golyshin, P.N.; Streit, W.R.; Daniel, R.; Liebl, W. Functional Screening of Hydrolytic Activities Reveals an Extremely Thermostable Cellulase from a Deep-Sea Archaeon. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Counts, J.A.; Zeldes, B.M.; Lee, L.L.; Straub, C.T.; Adams, M.W.W.; Kelly, R.M. Physiological, metabolic and biotechnological features of extremely thermophilic microorganisms. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2017**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Brasen, C.; Esser, D.; Rauch, B.; Siebers, B. Carbohydrate metabolism in Archaea: Current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2014**, *78*, 89–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Frock, A.D.; Kelly, R.M. Extreme Thermophiles: Moving beyond single-enzyme biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2012**, *1*, 363–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Hedderich, R.; Klimmek, O.; Kröger, A.; Dirmeier, R.; Keller, M.; Stetter, K.O. Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, *22*, 353–381. [[CrossRef](#)]
13. Chou, C.J.; Shockley, K.R.; Connors, S.B.; Lewis, D.L.; Comfort, D.A.; Adams, M.W.; Kelly, R.M. Impact of substrate glycoside linkage and elemental sulfur on bioenergetics of and hydrogen production by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 6842–6853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Hensley, S.A.; Moreira, E.; Holden, J.F. Hydrogen Production and Enzyme Activities in the Hyperthermophile *Thermococcus paralvinellae* Grown on Maltose, Tryptone, and Agricultural Waste. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Moon, Y.J.; Kwon, J.; Yun, S.H.; Lim, H.L.; Kim, J.; Kim, S.J.; Kang, S.G.; Lee, J.H.; Kim, S.I.; Chung, Y.H. Proteomic Insights into Sulfur Metabolism in the Hydrogen-Producing Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus onnurineus* NA1. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 9167–9195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Santangelo, T.J.; Cubonova, L.; Reeve, J.N. Deletion of alternative pathways for reductant recycling in *Thermococcus kodakarensis* increases hydrogen production. *Mol. Microbiol.* **2011**, *81*, 897–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Marteinson, V.T.; Birrien, J.L.; Reysenbach, A.L.; Vernet, M.; Marie, D.; Gambacorta, A.; Messner, P.; Sleytr, U.B.; Prieur, D. *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.* **1999**, *49*, 351–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cario, A.; Mizgier, A.; Thiel, A.; Jebbar, M.; Oger, P.M. Restoration of the di-myo-inositol-phosphate pathway in the piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Biochimie* **2015**, *118*, 268–293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cario, A.; Jebbar, M.; Thiel, A.; Kervarec, N.; Oger, P.M. Molecular chaperone accumulation as a function of stress evidences adaptation to high hydrostatic pressure in the piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Vannier, P.; Michoud, G.; Oger, P.; Marteinson, V.; Jebbar, M. Genome expression of *Thermococcus barophilus* and *Thermococcus kodakarensis* in response to different hydrostatic pressure conditions. *Res. Microbiol.* **2015**, *166*, 717–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Allers, T.; Mevarech, M. Archaeal genetics—The third way. *Nat. Rev. Genet.* **2005**, *6*, 58–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Atomi, H.; Imanaka, T.; Fukui, T. Overview of the genetic tools in the archaea. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Farkas, J.A.; Picking, J.W.; Santangelo, T.J. Genetic techniques for the archaea. *Annu. Rev. Genet.* **2013**, *47*, 539–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hileman, T.H.; Santangelo, T.J. Genetics Techniques for *Thermococcus kodakarensis*. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 195. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Leigh, J.A.; Albers, S.V.; Atomi, H.; Allers, T. Model organisms for genetics in the domain Archaea: Methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. *FEMS Microbiol. Rev.* **2011**, *35*, 577–608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sato, T.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T. Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakarensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3889–3899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Kim, Y.J.; Lee, H.S.; Kim, E.S.; Bae, S.S.; Lim, J.K.; Matsumi, R.; Lebedinsky, A.V.; Sokolova, T.G.; Kozhevnikova, D.A.; Cha, S.S.; et al. Formate-driven growth coupled with H<sub>2</sub> production. *Nature* **2010**, *467*, 352–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, X.; Fu, L.; Li, Z.; Ma, X.; Xiao, X.; Xu, J. Genetic tools for the piezophilic hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus yayanosii*. *Extremophiles* **2015**, *19*, 59–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Lipscomb, G.L.; Stirrett, K.; Schut, G.J.; Yang, F.; Jenney, F.E., Jr.; Scott, R.A.; Adams, M.W.; Westpheling, J. 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.* **2011**, *77*, 2232–2238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Matsumi, R.; Manabe, K.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T. Disruption of a sugar transporter gene cluster in a hyperthermophilic archaeon using a host-marker system based on antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2683–2691. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Thiel, A.; Michoud, G.; Moalic, Y.; Flament, D.; Jebbar, M. Genetic Manipulations of the Hyperthermophilic Piezophilic Archaeon *Thermococcus barophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 2299–2306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Suzuki, H.; Murakami, A.; Yoshida, K. Counterselection system for *Geobacillus kaustophilus* HTA426 through disruption of *pyrF* and *pyrR*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 7376–7383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Clarke, D.A.; Elion, G.B.; Hitchings, G.H.; Stock, C.C. Structure-activity relationships among purines related to 6-mercaptapurine. *Cancer Res.* **1958**, *18*, 445–456. [[PubMed](#)]
34. Dewey, V.C.; Heinrich, M.R.; Markees, D.G.; Kidder, G.W. Multiple inhibition by 6-methylpurine. *Biochem. Pharm.* **1960**, *3*, 173–180. [[CrossRef](#)]
35. Freese, E. The specific mutagenic effect of bases analogues on phage T 4. *J. Mol. Biol.* **1959**, *1*, 87–105. [[CrossRef](#)]
36. Miller, J.H.; Kempner, E.S. Effects of an adenine analog on yeast metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, *76*, 333–340. [[CrossRef](#)]
37. Santangelo, T.J.; Cubonova, L.; Reeve, J.N. *Thermococcus kodakarensis* genetics: TK1827-encoded beta-glycosidase, new positive-selection protocol, and targeted and repetitive deletion technology. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 1044–1052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Burkhart, B.W.; Cubonova, L.; Heider, M.R.; Kelman, Z.; Reeve, J.N.; Santangelo, T.J. The GAN exonuclease or the flap endonuclease Fen1 and RNase HIII are necessary for viability of *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* **2017**, *199*, e00141-117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Cubonova, L.; Richardson, T.; Burkhart, B.W.; Kelman, Z.; Connolly, B.A.; Reeve, J.N.; Santangelo, T.J. Archaeal DNA polymerase D but not DNA polymerase B is required for genome replication in *Thermococcus kodakarensis*. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 2322–2328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. 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. *ISME J.* **2009**, *3*, 873–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Waage, I.; Schmid, G.; Thumann, S.; Thomm, M.; Hausner, W. Shuttle vector-based transformation system for *Pyrococcus furiosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 3308–3313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Sato, T.; Fukui, T.; Atomi, H.; Imanaka, T. Targeted gene disruption by homologous recombination in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 210–220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Vannier, P.; Marteinsson, V.T.; Fridjonsson, O.H.; Oger, P.; Jebbar, M. Complete genome sequence of the hyperthermophilic, piezophilic, heterotrophic, and carboxydophilic archaeon *Thermococcus barophilus* MP. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 1481–1482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Le Laz, S.; Le Goaziou, A.; Henneke, G. Structure-specific nuclease activities of *Pyrococcus abyssi* RNase HIII. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 3689–3698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, C.; She, Q.; Bi, H.; Whitaker, R.J. The apt/6-methylpurine counterselection system and its applications in genetic studies in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus islandicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 3070–3081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



**Titre : Adaptation aux hautes pressions hydrostatiques: délétion de clusters de gènes des hydrogénases chez une archée piézo-hyperthermophile *Thermococcus barophilus***

**Mots clés :** Deep-sea, génétique, hydrogénases, pression hydrostatiques, sources hydrothermales, piézophiles, *Thermococcales*

**Résumé :** Dans cette étude, les adaptations physiologiques aux hautes pressions hydrostatiques ont été étudiées après délétion de groupes de gènes codant pour les Hydrogénases chez *Thermococcus barophilus*. Cette archée piézo-hyperthermophile isolée au niveau du site hydrothermal "Snakepit" à 3550 mètre de profondeur, a pour pression optimale 40 MPa; des études transcriptomiques antérieures ont mis en évidence la sur-expression de certains gènes codant pour les hydrogénases sous des conditions de pressions sub et supra-optimales (0,1 et 70 MPa). Ici, nous essayons de déterminer le rôle précis de chaque enzyme dans l'adaptation aux HPH en utilisant l'outil génétique récemment développé au laboratoire chez cette archée. Ce système génétique repose sur un double événement de recombinaison successif afin d'obtenir des mutants de délétion, et sur l'utilisation de la Simvastatine et de la 6-méthylpurine (6-MP) comme marqueur de sélection. Nous avons premièrement développé une nouvelle voie de sélection, utilisant la 6-MP comme marqueur de contre-sélection. Cette méthode a ensuite été utilisée pour déléter deux sulfhydrogénases cytosoliques (SHI et SHII), et des hydrogénases membranaires (Mbh, Mbh-Codh et Mbx). L'utilisation de la 6-méthylpurine pour la sélection négative, a considérablement diminué le nombre de faux positifs, avec un taux de 30% contre 80% obtenu avec le 5-FOA, l'ancien marqueur de sélection négatif. Les premières études phénotypiques des souches mutantes sous haute pression hydrostatique confirment le rôle majeur des hydrogénases.

**Title : Adaptation to high hydrostatic pressure: disruption of a Hydrogenase gene clusters in a piezo-hyperthermophilic archaeon *Thermococcus barophilus***

**Keywords :** Deep-sea, genetic, hydrostatic pressure, hydrogenases, hydrothermal vents, piezophiles, *Thermococcales*

**Abstract :** The deep sea representing a significant portion of the terrestrial biosphere, but still very little studied and many questions remain about organisms that live in these ecosystems, including their diversity and adaptability. At this depth Hydrostatic pressure is the major physical parameter. In this study, physiological adaptations to HHP were investigated after genetic deletion of hydrogenase clusters in *T.barophilus*. This archaea piezo-hyperthermophilic was isolated at 3550 m from a hydrothermal vent site; indeed, previous transcriptomic experimented have highlighted the over-expression of genes encoding hydrogenases under sub and supra-optimal HHP conditions (0,1 and 70 MPa). Here, we aimed to refine the precise role of each of these enzymes in adaptation to HHP using the recent genetic system available for this archaeon. This gene disruption system is based on single and double crossover events to obtain makerless deletion mutants, and used simvastatin and 6-MP for selection and counterselection respectively. In this study we developed firstly a new way of selection for the genetic disruption system, using 6-methylpurine for negative selection. This method was then used to delete two cytoplasmic sulfhydrogenases (SHI and SHII), and membrane bound hydrogenases (Mbh, Mbh-Codh, Mbx). Using 6-methylpurine for negative selection, to inverted the rate of false positives pop-out clones from 80% obtained with 5-FOA to 10%, and the first phenotypic studies of mutants strains under HHP show the impact of hydrogenase on culture growth and hydrogen production.