



HAL
open science

Etude des vésicules membranaires produites par les Archées hyperthermophiles marines de l'ordre des Thermococcales

Marie Gaudin

► **To cite this version:**

Marie Gaudin. Etude des vésicules membranaires produites par les Archées hyperthermophiles marines de l'ordre des Thermococcales. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112093 . tel-00716699

HAL Id: tel-00716699

<https://theses.hal.science/tel-00716699>

Submitted on 11 Jul 2012

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.



UNIVERSITE PARIS-SUD XI

Ecole doctorale : Gènes, Génomes, Cellules

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences

De l'Université Paris-Sud XI Orsay

Spécialité : Biologie

par

Marie Gaudin

**Etude des vésicules membranaires produites par les
Archées hyperthermophiles marines de l'ordre des
Thermococcales**

Soutenue le 13 juin 2012

Devant le jury composé de :

M. SIME-NGANDO Téléphone
Mme SCHLEPER Christa
Mme GESLIN Claire
M. CAPY Pierre
M. CONFALONIERI Fabrice
M. FORTERRE Patrick

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse



UNIVERSITE PARIS-SUD XI

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences

De l'Université Paris-Sud XI Orsay

Spécialité : Biologie

par

Marie Gaudin

**Etude des vésicules membranaires produites par les
Archées hyperthermophiles marines de l'ordre des
Thermococcales**

Soutenue le 13 juin 2012

Devant le jury composé de :

M. SIME-NGANDO Télésphore
Mme SCHLEPER Christa
Mme GESLIN Claire
M. CAPY Pierre
M. CONFALONIERI Fabrice
M. FORTERRE Patrick

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Patrick, je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de passer trois années merveilleuses à étudier ces microorganismes originaux que sont les Archées hyperthermophiles anaérobies. Je te remercie de m'avoir entraînée dans cette aventure scientifique avec autant de passion. J'ai beaucoup apprécié tes qualités de pédagogue, ta patience, ta disponibilité et cet enthousiasme qui t'irradie dès que l'on commence à parler de Sciences. Je te remercie de m'avoir donné l'occasion d'assister à de nombreux congrès nationaux et internationaux, qui ont été tellement enrichissants (...à bien des égards !). C'est une chance de t'avoir eu comme directeur de thèse !

Evelyne, je te remercie d'avoir partagé avec moi ce travail de thèse dans le dynamisme et l'enthousiasme pendant ces trois ans. Merci pour tout ce que tu m'as appris, les méthodes et l'organisation pour lesquelles tu as été exigeante (je reconnais que je ne suis pas aussi parfaite que toi dans ces domaines). Ton soutien inconditionnel m'a été extrêmement précieux. Un grand merci pour l'immense générosité que tu m'as manifesté.

Emilie, je te remercie pour ta contribution dans ce travail de thèse. Les superbes coupes fines que tu as réalisées avec tes doigts de fée nous ont permis d'en savoir plus sur la formation des vésicules membranaires.

Je remercie chaleureusement tous mes collègues qui m'ont beaucoup aidée et entourée durant ces trois ans :

- Ludo, le « pro de la purif », patient, pédagogue, à qui je dois le savoir-faire d'une purification de protéines qui marche, je te remercie pour m'avoir épaulée au cours de mes expériences de biochimie. Grâce à toi, le Secteur B ne sera peut-être plus mon unique spécialité...

- Jaqcues, merci pour tes nombreux conseils, ta gentillesse et ta bonne humeur ! Je te suis également très reconnaissante d'avoir réalisé, avec William, le plasmide pLC71, faisant ainsi avancer mon étude sur la protéine p24. Je te remercie également pour ta contribution sur l'étude du génome de pTN3 ainsi que pour la mise en place d'outils informatiques permettant l'étude du génome de *T. nautilus*.

- Mimi, merci de ton aide pour la préparation des milieux et pour ton efficacité. Ta bonne humeur contribue à égayer nos journées au labo.

- Estelle, Tamara, et Dorian (« les jeunes de la pièce 202 ») un grand merci pour votre aide et vos conseils pour mes manips ainsi que pour les discussions (scientifiques ou non) que nous avons eues.

- Danielle, merci pour tes indications sur les gels retards en agarose. Grâce à toi (et Alexis), j'ai pu me tenir au courant du quotidien d'une classe de lycée...

- Mohéa, je te remercie pour ta bonne humeur contagieuse. Tes petites visites lors de la rédaction m'ont revigorée.

- Marc, Florence et Hélène, vos petits mots de réconfort durant la rédaction m'ont fait du bien.

- Mart, many thanks for using your bioinformatics skills in my study. Thank you for your advice and the discussions we had during the conferences.

- Je remercie Arnaud Hecker, pour m'avoir donné les bases de biochimie lorsque je suis arrivée au labo. Ses conseils ont été très utiles.

- Un grand merci à Ryosuke qui m'a aidée à construire un mutant d'inactivation chez *T. kodakaraensis*...j'imagine que cela n'a certainement pas été évident de me superviser, alors que je venais d'arriver au labo et ignorait tout de la génétique des Archées.

- Merci à Souhir, en compagnie de qui j'ai passé de très bons moments. Son aide au début de mes expériences de transformation m'a été très précieuse.

Je remercie les différentes personnes avec qui nous avons souvent collaboré au long de ces trois années :

-Ikuo et Eriko Matsui avec qui nous avons développé un projet afin d'étudier le rôle de la protéine stomatine dans la formation des vésicules membranaires chez les Thermococcales. Leur accueil au Japon a été extrêmement sympathique.

- Pascal Lenormand, très efficace pour l'analyse protéomique, toujours plein de gentillesse et de bonne humeur.

- Stefan Schouten qui a réalisé l'analyse des lipides et qui a toujours répondu avec sympathie à mes emails.

- Claire Geslin et Aurore Gorlas qui ont eu la gentillesse de tester leur méthode avec les vésicules de *T. nautilus*.

Je remercie les membres de mon jury de thèse d'avoir pris de leur temps pour examiner ce travail.

Un grand merci à Claire Geslin, Béatrice Satiat-Jeunemaitre et Fabrice Confalonieri pour avoir assuré le tutorat de cette thèse et pour m'avoir donné de nombreux conseils.

Merci à Barry Holland et Simone Seror pour m'avoir aidée à préparer les présentations que j'ai faites dans les congrès internationaux. Barry, ton aide pour la relecture de l'article a été très précieuse.

Je tiens à remercier mes amis adorés : Estelle, Fanny, Camille, Clara, Claire que je n'ai plus voulu quitter depuis notre rencontre à Lyon ; Maëlle, Stan, Céline, Jonathan...avec qui j'ai passé de supers moments et qui sont toujours là pour me remonter le moral...

Un grand merci à mon Anthony pour m'avoir réconfortée, supportée (malgré la distance)... et avoir amélioré considérablement mon niveau d'anglais !

Enfin, je remercie toute ma famille et particulièrement mes parents qui m'ont toujours soutenue dans tout ce que j'ai entrepris. Un grand merci à eux pour m'avoir épaulée, moralement et financièrement tout au long de mes études.

TABLE DES MATIERES

<u>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</u>	3
<u>ABBREVIATIONS</u>	6
<u>INTRODUCTION</u>	7
I. Présentation générale des vésicules membranaires sécrétées dans les trois domaines du vivant	9
I.1. Les vésicules membranaires chez les Eucaryotes.....	9
I.2. Les vésicules membranaires chez les Bactéries.....	15
I.3. Les vésicules membranaires chez les Archées.....	19
II. Interactions des vésicules membranaires avec les cellules et l'environnement ...21	
II.1. Les vésicules membranaires, une armée pour les cellules.....	21
II.2. Les vésicules membranaires, un moyen de réponse au stress.....	24
II.3. Les vésicules membranaires, des acteurs de la coopération entre cellules.....	26
II.4. Les vésicules membranaires, des navettes pour le transfert d'acides nucléiques.....	28
III. Interactions entre les vésicules membranaires et les virus	32
III.1. Les vésicules membranaires, un moyen de lutte contre l'infection virale.....	32
III.2. L'utilisation du processus de vésiculation par les virus.....	33
III.3. Vésicules membranaires ou virus ?.....	36
MATERIELS ET METHODES	42
Culture des Thermococcales en anaérobiose à haute température.....	43
Purification des vésicules membranaires.....	43
Observations de microscopie électronique.....	43
Analyses protéomique et lipidique des vésicules membranaires et des membranes cellulaires.....	45
Extraction des membranes cellulaires.....	45
Analyse des protéines par SDS-PAGE, spectrométrie de masse et coloration des glycoprotéines.....	45
Construction d'un mutant d'inactivation (Knock out) pour le gène codant la protéine stomatine TK0348 chez <i>T. kodakaraensis</i> , KU216.....	46
Analyse des lipides.....	46
Etude de l'association ADN – vésicules membranaires.....	46
Extraction d'ADN, digestions et électrophorèse.....	46
Expériences de transformation.....	48
Etude de l'interaction protéine p24-ADN plasmidique.....	48
Délétion du gène codant pour la protéine p24 sur le plasmide pLC71.....	48
Identification des sites potentiels de fixation de la protéine p24.....	48
Expression et purification de la protéine p24.....	49
Retards sur gel.....	50
Détermination de l'infectivité des vésicules membranaires de <i>T. nautilus</i>	52

<u>RESULTATS</u>	54
I. Présentation générale du travail	55
II. Caractérisation des vésicules membranaires produites par trois espèces d'Archées appartenant au groupe des Thermococcales	57
II.1. La formation des vésicules membranaires.....	57
II.2. Composition protéique et lipidique des vésicules.....	60
II.3. La transformation des cellules avec des vésicules membranaires.....	65
III. <i>Thermococcus nautilus</i>, une souche produisant des « vésicules virales »	68
III.1. Le transport d'ADN plasmidique via les VMs chez <i>T. nautilus</i>	69
III.2. La découverte d'un nouvel élément extrachromosomique chez <i>T. nautilus</i>	70
III.3. Le plasmide pTN3, un génome viral.....	72
III.4. Le plasmide pTN3, un génome viral... transporté par des vésicules membranaires !.....	73
III.5. La nature de l'association plasmides-VMs chez <i>T. nautilus</i>	74
III.6. L'empaquetage des plasmides pTN1 et pTN3 dans les VMs.....	77
III.7. La découverte d'une nouvelle caractéristique des VMs de <i>T. nautilus</i>	83
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	86
<u>ANNEXES</u>	102
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	117

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Tableaux

Tableau 1 : Protéines Vps de classe E impliquées dans la formation des MVBs.....	10
Tableau 2 : Caractéristiques des différentes populations de VMs chez les Eucaryotes.....	13
Tableau 3 : Caractéristiques des VMs chez les Bactéries « gram -» et « gram +».....	15
Tableau 4 : Mutants de la vésiculation obtenus chez <i>E. coli</i>	16
Tableau 5 : Caractéristiques des VMs chez les Archées.....	20
Tableau 6 : Virus enveloppés codant pour des protéines avec des domaines-L interagissant avec les protéines cellulaires impliquées dans la machinerie ESCRT-Vps.....	36
Tableau 7 : Protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les VMs de <i>T. gammatolerans</i> , <i>T. kodakaraensis</i> , <i>T. sp. 5-4</i>	61
Tableau 8 : Composition en lipides des VMs et des membranes cellulaires de <i>T. kodakaraensis</i> et <i>T. sp. 5-4</i>	65
Tableau 9 : Sites de restriction présents sur les plasmides pTN1 et pTN2, déterminés grâce au logiciel Vector NTI®.....	70
Tableau 10 : Sites potentiels de fixation de la protéine p24.....	82

Figures

Figure 1 : Résumé des observations ayant mené à la première description des exosomes par Harding <i>et al.</i> (1983) et Pan <i>et al.</i> (1985).....	10
Figure 2 : Organisation du système ESCRT.....	11
Figure 3 : Implication du céramide dans la formation des exosomes.....	11
Figure 4 : Composition protéique d'un exosome type.....	12
Figure 5 : Exosomes purifiés à partir de cultures de lymphoblastes observés en MET.....	12
Figure 6 : Photos de cellules sécrétant des ectosomes, obtenues en MEB.....	13
Figure 7 : Protéines majoritaires associées aux vésicules membranaires de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figure 8 : Cinq hypothèses pouvant expliquer la formation de VMs chez les bactéries « gram-».....	17
Figure 9 : Micrographie de cellules bactériennes (<i>Maribacter forsetii sp.</i>) de forme bacille produisant à leur surface de nombreuses vésicules.....	18
Figure 10 : Micrographie de VMs dérivées de cellules de <i>Sulfolobus islandicus</i> observées au MET.....	10
Figure 11 : Coupes de cellules d' <i>Ignicoccus hospitalis</i> observées au MET.....	11
Figure 12 : Micrographies de VMs et de structures filamenteuses de Thermococcales, observées au MET.....	20
Figure 13 : Schéma expliquant comment les VMs de <i>P. aeruginosa</i> peuvent interagir avec les bactéries « gram+ » et les bactéries « gram -».....	23
Figure 14 : Implications des VMs eucaryotes dans l'activation des cellules immunitaires.....	26
Figure 15 : Coupes fines observées au MET révélant les zones de contacts entre les VMs d' <i>Ignicoccus hospitalis</i> et l'archée symbiotique <i>Nanoarchaeum equitans</i>	28
Figure 16 : Coupes fines de cellules d' <i>Haemophilus parainfluenzae</i> observées au MET.....	29
Figure 17 : Observation de cellules d' <i>Ostreococcus tauri</i> infectées par le virus OtV5 au MET.....	32
Figure 18 : Complexes VMs- virus observés au MET.....	33

Figure 19 : Recrutement de la machinerie ESCRT par les protéines virales comportant un domaine-L.....	35
Figure 20 : Utilisation de la machinerie ESCRT pour le bourgeonnement des virus enveloppés.....	35
Figure 21 : Gamme de tailles des différents types de VMs chez les Eucaryotes.....	37
Figure 22 : Similarités concernant la composition biochimique, le mécanisme de biogenèse et de relargage entre les exosomes et les virions du VIH.....	37
Figure 23 : Les « proto-virus » et la dissémination des molécules autorépliquatives (ARN) au sein des cheminées hydrothermales.....	40
Figure 24 : Arbre phylogénétique non raciné des Archées basé sur la concaténation de 57 protéines ribosomales présentes dans 89 génomes.....	55
Figure 25 : Particules virales de PAV1 (<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1) observées au MET.....	55
Figure 26 : Virus infectant les Crénarchées observés au MET.....	56
Figure 27 : Micrographies de cellules, VMs, protubérances et structures filamenteuses de <i>T. kodakaraensis</i> , <i>T. gammatolerans</i> et <i>T. sp. 5-4</i>	57
Figure 28 : Coupes fines de cellules, VMs et structures filamenteuses de <i>T. gammatolerans</i> , <i>T. kodakaraensis</i> et de <i>T. sp. 5-4</i> contrastées ou non au rouge de ruthénium et observées au MET.....	58
Figure 29 : « Nanopodes » observés chez <i>Delftia sp.</i> au MET et <i>Bacillus subtilis</i> au MEB.....	60
Figure 30 : SDS-PAGE de préparations de VMs et de membranes cellulaires obtenues à partir des souches <i>T. kodakaraensis</i> , <i>T. gammatolerans</i> , <i>T. sp. 5-4</i>	60
Figure 31 : Contexte génomique du gène <i>OppA</i> et structure du précurseur protéique.....	62
Figure 32 : SDS-PAGE de préparations de VMs et de membranes cellulaires obtenues à partir des souches <i>T. kodakaraensis</i> , <i>T. gammatolerans</i> , <i>T. sp. 5-4</i> et coloration des glycoprotéines.....	63
Figure 33 : SDS-PAGE de préparations de VMs et de membranes cellulaires de <i>T. gammatolerans</i> cultivée en milieu riche et en milieu minimum ASW-AA.....	63
Figure 34 : Carte du plasmide pLC70 construit à partir du plasmide pTN1 de l'archée <i>T. nautilus</i> et du plasmide pCR2.1-TOPO de la bactérie <i>E. coli</i>	65
Figure 35 : Transformation de la souche <i>T. kodakaraensis</i> KUW1 avec le plasmide navette pLC70 et avec les VMs associées à ce plasmide.....	66
Figure 36 : Carte des plasmides pTN1 et pTN2 de <i>T. nautilus</i>	68
Figure 37 : Représentation schématique de la protéine p24.....	68
Figure 38 : Coupe fine de cellule et VMs de <i>T. nautilus</i> observées au MET.....	69
Figure 39 : Observations de VMs après addition de 1M de NaCl dans la préparation et d'ADN extrait des VMs au MET en coloration positive.....	69
Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique et de l'ADN extrait des VMs de <i>T. nautilus</i>	70
Figure 41 : SDS-PAGE des membranes cellulaires et des VMs de <i>T. nautilus</i>	71
Figure 42 : Le génome de pTN3.....	73
Figure 43 : Gamme de DNase I permettant de déterminer la quantité de cette enzyme nécessaire à l'élimination de l'ADN situé à l'extérieur des VMs.....	75
Figure 44 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des VMs de <i>T. nautilus</i> , traitées ou non à la DNase I.....	76
Figure 45 : Mécanisme d'intégration du plasmide pTN3 de <i>T. nautilus</i> dans le chromosome.....	77
Figure 46 : Transformation de <i>T. kodakaraensis</i> KUW1 avec le plasmide pLC71.....	78
Figure 47 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des VMs de <i>T. kodakaraensis</i> KUW1 transformé avec le plasmide pLC71, traitées ou non à la DNase I.....	79
Figure 48 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des membranes, de l'ADN extrait des fractions cytosoliques et de l'ADN plasmidique de <i>T. kodakaraensis</i> KUW1 transformé avec le plasmide pLC70 ou avec le plasmide pLC71.....	80

Figure 49 : Modèle hypothétique présentant l'association des plasmides pLC70 et pLC71 avec les VMs.....	81
Figure 50 : Expérience de retard sur gel d'agarose afin de détecter l'interaction p24Δ- sites potentiels de fixation.....	82
Figure 51 : Expérience de retard sur gel polyacrylamide afin de détecter l'interaction p24Δ- sites potentiels de fixation.....	83
Figure 52 : Résultats des expériences visant à déterminer le pouvoir d'infection des VMs de <i>T. nautilus</i> sur différentes souches de Thermococcales.....	84
Figure 53 : Portion de gelrite récupérée au niveau de la tache translucide du tapis de <i>T. kodakaraensis</i> après 129h d'incubation, observée au microscope à épifluorescence (SYBR green) et au MET.....	85

ABBREVIATIONS

AA : Acides aminés
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine tri-phosphate
ASW : Eau de mer artificielle (Artificial sea water)
BET : Bromure d'éthidium
BLAST : Basic local alignment search tool – Outil de recherche de similarités de séquence par alignement local au sein d'une base de données
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
DNase : Désoxyribonucléase
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétate
EGTA : Ethylène glycol tétraacétique
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
g, mg, µg : gramme, milligramme, microgramme
h : heure
IPTG : Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside
kb : kilo paire de base
kDa : kilo Dalton
L, mL, µL : litre, millilitre, microlitre
LPS : lipopolysaccharide
LUCA : Last Universal Cellular Ancestor, dernier ancêtre cellulaire universel
M, mM, µM : molaire, millimolaire, micromolaire
MCM : mini-chromosome maintenance. Protéine hélicase répliquative chez les Eucaryotes et les Archées, caractérisées chez la levure par une mutation impliquée dans la maintenance de minichromosomes
MET : Microscopie électronique à transmission
MEB : Microscopie électronique à balayage
min : minute
MVB : multivesicular body
ORF : Phase ouverte de lecture (open reading frame)
PG: peptidoglycane
PQS: *Pseudomonas* quinolone signal
PS : phosphatidylsérine
RNase : Ribonucléase
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes par le SDS
sec : seconde
p/v : poids/volume
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (polymerase chain reaction)
TAE : Tris-Acétate-EDTA
UV : Ultra-violets
VM : vésicule membranaire
Vps : Vacuolar protein sorting
V/cm : volts par centimètre
v/v : volume/volume

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les vésicules membranaires (VMs) sont de petits compartiments clos formés à partir de membranes cellulaires, pouvant être sécrétés dans le milieu extérieur ou intervenant dans le trafic au sein de la cellule.

L'implication des vésicules dans le trafic intracellulaire a donné lieu à de nombreuses revues et constitue un phénomène très étudié (Gruenberg, 2001; Scita and Di Fiore, 2010). Les vésicules peuvent se former et constituer une voie de communication au sein du système intramembranaire (ex : Golgi, réticulum endoplasmique). Elles peuvent également résulter de l'invagination de la membrane plasmique par un processus nommé endocytose se retrouvant ainsi dans l'espace cytoplasmique. L'endocytose est reconnue comme étant un processus spécifique aux Eucaryotes permettant aux cellules d'internaliser des molécules présentes au niveau de la membrane plasmique dans le but d'être recyclées et ramenées au niveau de la surface cellulaire ou bien d'être acheminées vers les lysosomes pour y être dégradées (Doherty and McMahon, 2009). De façon intéressante, la formation de structures ressemblant aux endosomes a récemment été observée chez un groupe de bactéries, les *Planctomycetes* (Kahn et al., 1982; Barany and Kahn, 1985; Lonhienne et al., 2010). Ce mécanisme n'a, jusqu'à présent, jamais été rapporté dans le domaine des Archées.

A contrario, la sécrétion de VMs dans le milieu extérieur, à laquelle nous nous intéressons ici, apparaît comme une caractéristique partagée par l'ensemble des trois domaines du vivant. Ces vésicules sont des structures de forme, taille et composition variées et peuvent être produites par une diversité de mécanismes. D'après leur composition ainsi que la nature des éléments transportés, beaucoup de rôles physiologiques peuvent leur être attribués. Sécrétées dans le milieu extérieur, elles peuvent interagir dans leur environnement avec d'autres cellules, ainsi qu'avec des virus. Si les VMs produites par les Eucaryotes et les Bactéries, découvertes il y a maintenant plus de quarante ans, sont à ce jour bien caractérisées, un grand manque de connaissance est à noter concernant les vésicules sécrétées par les Archées.

I. Présentation générale des vésicules membranaires sécrétées dans les trois domaines du vivant

1 . Les vésicules membranaires chez les Eucaryotes

La sécrétion de VMs par les Eucaryotes a été pour la première fois décrite par Wolf en 1967 (Wolf, 1967) qui observa dans le plasma la présence de particules enrichies en lipides (« platelet dust ») pouvant être séparées par ultracentrifugation et ayant des propriétés de coagulation. Quelques années plus tard, Trams *et al.* proposent le terme « exosomes » pour décrire la population de vésicules libérées par les cellules gliales présentant une activité 5' exonucléotidase (Trams et al., 1981). Cependant, des observations ultérieures mettent en évidence une grande diversité de vésicules membranaires, en ce qui concerne leur origine, leur taille, leur composition et leur mode de genèse, menant ainsi à de multiples désignations : exosomes, microvésicules, ectosomes, microparticules, corps apoptotiques, oncosomes... Afin d'éviter toute ambiguïté, un seul terme sera employé pour chaque type de vésicule.

La sécrétion de VMs chez les Eucaryotes peut être accomplie par trois types de processus (pour une revue récente voir (Gyorgy et al., 2011)) . Bien que majoritairement décrite chez les Eucaryotes modèles pluricellulaires, tels que l'homme ou la souris, la formation de VMs a également été rapportée chez des organismes eucaryotes unicellulaires, comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou le protozoaire parasite *Leishmania donovani*.

a) Les exosomes

La sécrétion des exosomes est la plus documentée parmi tous les types de vésicules décrites chez les Eucaryotes. Les exosomes sont de petites vésicules dont l'ordre de taille est de 40 à 100 nm de diamètre. Bien que produites par une très grande variété de cellules (sinon toutes), les exosomes ont été particulièrement bien caractérisés dans le

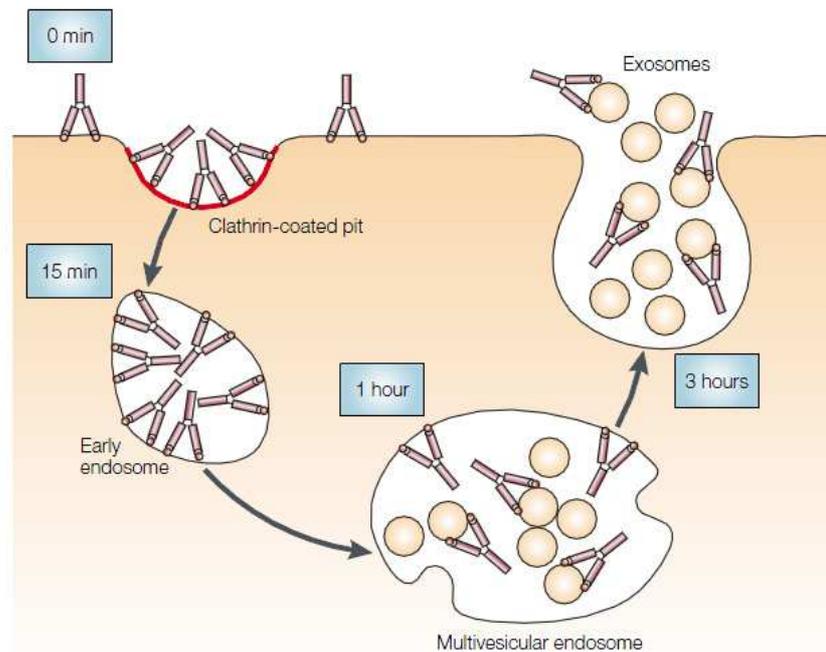


Figure 1 : Résumé des observations ayant mené à la première description des exosomes par Harding *et al.* (1983) et Pan *et al.* (1985). Expérience effectuée à partir de réticulocytes de mouton ayant été incubés à 37°C.

T0 min : dans des cellules de réticulocytes fixées, les anticorps anti-récepteur de la transferrine sont situés à la surface cellulaire, dans des dépressions associées à un manteau de clathrine.

T15 min : le marquage est retrouvé au niveau des endosomes précoces.

T1h : les anticorps sont associés aux vésicules intraluminales formées par invagination de la membrane endosomale, donnant ainsi naissance au « multivesicular body » (MVB).

T3h : la fusion du MVB avec la membrane plasmique est observée, libérant ainsi les VIL dans l'espace extracellulaire. Ces vésicules sont alors nommées « exosomes ».

(They *et al.*, 2002; Huotari and Helenius, 2011)

Complexe	Noms des protéines chez la levure	Noms des protéines chez l'humain	Liaison à :
ESCRT-I	Vps23 Vps28 Vps37	Tsg101 Vps28 Vps37	Ub, Vps27 (protéine liant l'Ub)
ESCRT-II	Vps22 Vps25 Vps36	Eap30 Eap25 Eap45	ESCRT-III (via Vps20) Ub
ESCRT-III	Vps2 Vps20 Vps24 Snf7	Chmp2 Chmp6 Chmp3 Chmp4	ESCRT-II (via Vps25)
Vps4	Vps4	Vps4	ESCRT-III

Tableau 1 : Protéines Vps de classe E impliquées dans la formation des MVBs.

Ub : ubiquitine, ESCRT: endosomal sorting complex required for transport; Vps: vacuolar protein sorting; Chmp: charged multivesicular body protein; Eap: ELL-associated protein; Tsg: Tumor susceptibility gene

(Hurley and Emr, 2006)

cas des cellules du système immunitaire (cellules dendritiques, lymphocytes T, lymphocytes B, macrophages) et dans le cas des cellules tumorales. Le mécanisme de formation et de sécrétion des exosomes fut découvert en 1983 par Harding *et al.* (Harding et al., 1983) et confirmé quelques années plus tard par Pan *et al.* (Pan et al., 1985). Ces auteurs visualisèrent par microscopie électronique le parcours d'anticorps anti-récepteur de la transferrine, une protéine située au niveau de la membrane plasmique, dans des cellules de réticulocytes à différents temps (Figure 1). Ils découvrirent ainsi l'origine endocytaire des exosomes, dont la formation s'effectue au niveau du « multivesicular body » (MVB) par invagination de la membrane des endosomes, résultant en la formation de vésicules intraluminales contenant du cytoplasme et exposant le domaine extracellulaire du récepteur de la transferrine à leur surface. Le MVB fusionne alors avec la membrane plasmique, libérant ainsi les exosomes dans l'espace extracellulaire.

De récentes études montrent que la machinerie moléculaire conduisant à la formation des vésicules intraluminales au sein du MVB est en fait assez diverse. Le lien entre exosomes et voie endocytaire est soutenu par la découverte de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Babst, 2005; Williams and Urbe, 2007; Hurley, 2008) constituées de trois complexes protéiques : ESCRT I, II, III, décrits en premier lieu chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et conservés chez tous les Eucaryotes. Ces complexes sont requis pour la formation des MVBs et les analyses génétiques ont montré l'implication de 17 gènes codant pour des protéines Vps (vacuolar protein sorting) de classe E (voir Tableau 1). Les différents mutants obtenus pour ces protéines Vps manifestent des défauts dans la formation des vésicules intraluminales au sein des MVBs et ont permis de comprendre le rôle de chacun des complexes. Les complexes ESCRT I et II qui possèdent des sous-unités liant l'ubiquitine (Vps23 and Vps36 respectivement) agissent en amenant les protéines ubiquitinylées au niveau de la membrane des endosomes⁽¹⁾ (Figure 2). Le complexe ESCRT III participe alors à l'invagination de la membrane endosomale conduisant à la formation de vésicules intraluminales. L'ATPase Vps4 utilise l'énergie de l'ATP pour désassembler ce complexe de la membrane en vue de sa réutilisation. L'implication de cette machinerie ESCRT dans

⁽¹⁾ L'incorporation, au niveau des endosomes, des protéines destinées ultérieurement à être sécrétées (via les exosomes) ou dégradées (dans les lysosomes) nécessite en effet leur ubiquitinylation (Buschow et al., 2005).

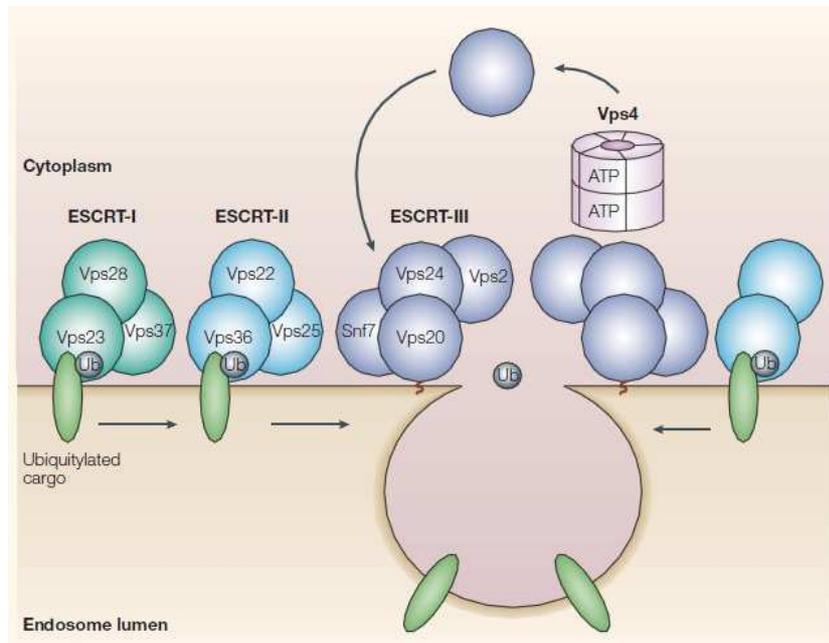


Figure 2 : Organisation du système ESCRT.

La combinaison de la génétique et de la biochimie chez *Saccharomyces cerevisiae* a conduit à l'identification de trois complexes constitués de plusieurs sous-unités : « endosomal sorting complexes required for transport-I, -II et -III » (ESCRT -I, -II et -III) permettant l'incorporation de protéines ubiquitylées (en vert sur le schéma) dans la membrane endosomale. Les complexes sont recrutés et fonctionnent de façon séquentielle.

Sfn7 : « sucrose non-fermenting » ; Ub : ubiquitine

(Gruenberg and Stenmark, 2004; Platta and Stenmark, 2011)

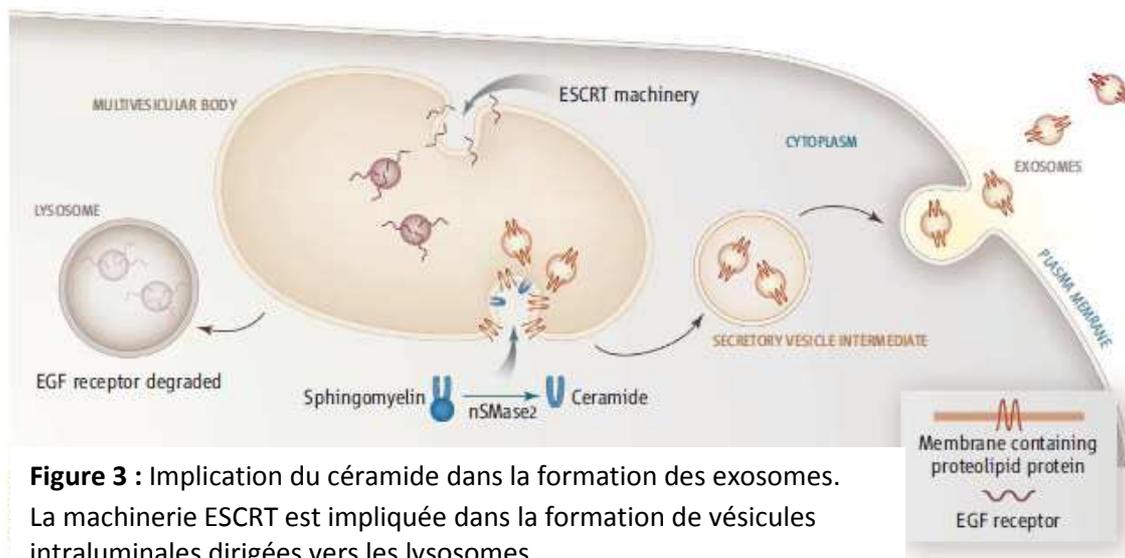


Figure 3 : Implication du céramide dans la formation des exosomes.

La machinerie ESCRT est impliquée dans la formation de vésicules intraluminales dirigées vers les lysosomes.

EGF : epidermal growth factor

(Marsh and van Meer, 2008)

la formation des exosomes est étayée par de nombreuses analyses protéomiques révélant un enrichissement des différentes sous-unités du complexe ESCRT ou des protéines associées (ex : Alix), ainsi que des protéines ubiquitinylées (Geminard et al., 2004; Buschow et al., 2005; Liu et al., 2009) dans ces VMs.

Cependant d'autres études fournissent la preuve que ce mécanisme n'est pas général et que les vésicules intraluminales peuvent être également libérées dans l'espace extracellulaire d'une façon ESCRT-indépendante (Fang et al., 2007; Trajkovic et al., 2008). En effet, la formation des exosomes sécrétés par les cellules gliales ne requiert pas la machinerie ESCRT mais dépend d'un autre mécanisme impliquant le céramide, un lipide présent en grande quantité dans certains domaines membranaires, produit à partir de la sphingomyeline, sous l'action de la spingomyelinase (nSMase2) (Figure 3) (Trajkovic et al., 2008; Bianco et al., 2009; Zhang et al., 2009). Il a notamment été montré que la déplétion de cette enzyme par RNAi ou l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques réduit drastiquement la sécrétion d'exosomes par les oligodendrocytes (Trajkovic et al., 2008). Le rôle du céramide dans la formation des vésicules intraluminales est lié à sa structure conique pouvant faciliter l'invagination spontanée de la membrane (Trajkovic et al., 2008). Le complexe ESCRT intervient cependant dans ces cellules gliales pour former les vésicules intraluminales ayant pour destination les lysosomes afin d'accomplir la dégradation de certaines molécules (ex : le récepteur EGFR) (voir Figure 3). Jusqu'à présent peu d'articles soulignent l'implication du céramide dans la formation des exosomes, et il n'est donc pas aisé de savoir s'il s'agit d'un mécanisme répandu et si les exosomes produits par un même type cellulaire peuvent avoir différents modes de formation. Par ailleurs, si la fusion du « multivesicular body » (MVB) avec la membrane plasmique apparaît comme le mode de sécrétion des exosomes le plus décrit, d'autres observations montrent que certains domaines de la membrane plasmique (nommés « endosome-like domains » par certains auteurs) enrichis en protéines endosomales et exosomales constitueraient des sites de bourgeonnements directs d'exosomes (Booth et al., 2006).

En conséquence de leur origine endocytique, la composition protéique et lipidique des exosomes rend facile leur identification. En effet, presque tous, indépendamment du type cellulaire dont ils émergent, arborent des protéines impliquées dans le transport et

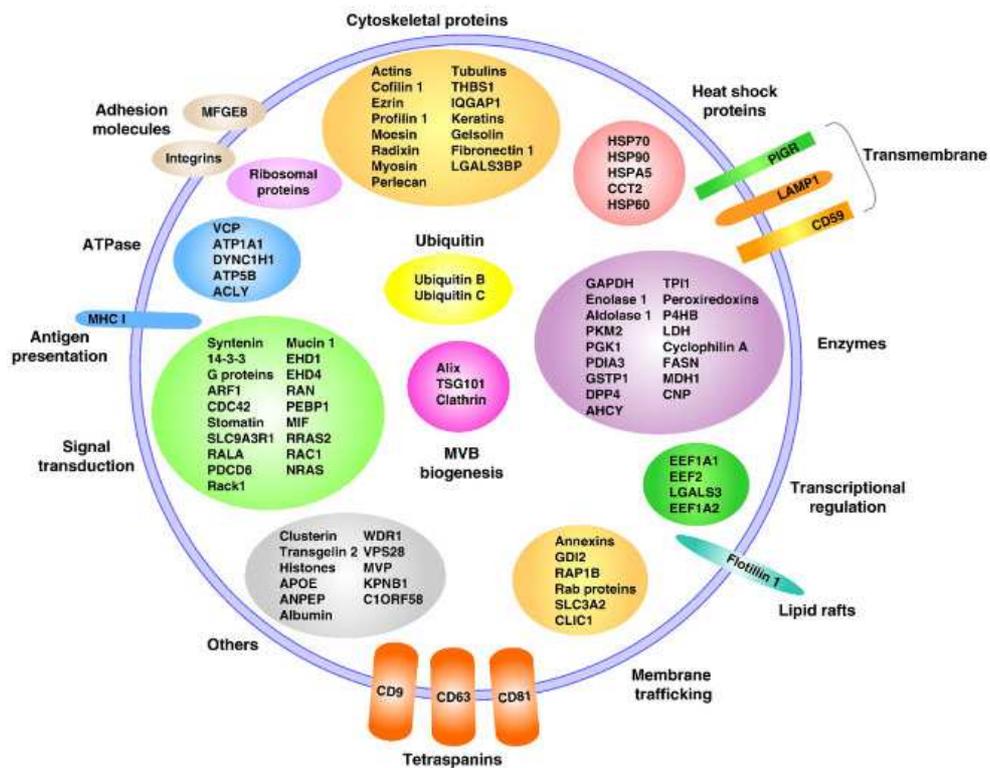


Figure 4 : Composition protéique d'un exosome type.

Données obtenues en chargeant 19 études protéomiques sur la base de donnée ExoCarta : <http://www.exocarta.org/> (Mathivanan and Simpson, 2009) (Barany and Kahn, 1985; Mathivanan et al., 2010)

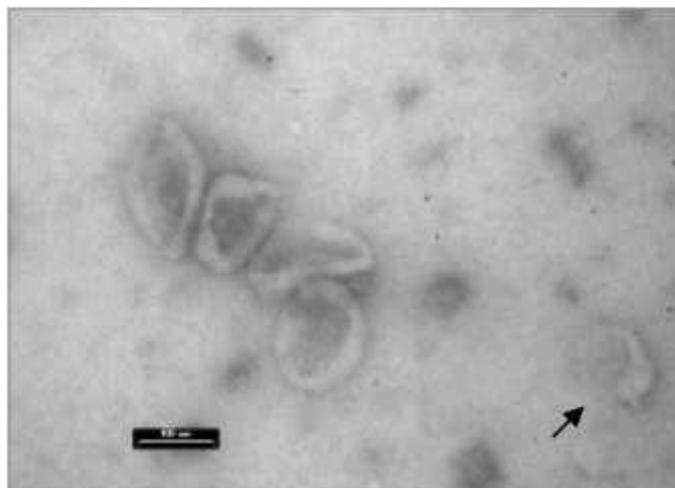


Figure 5: Exosomes purifiés à partir de cultures de lymphoblastes observés au MET.

Ces VMs se caractérisent par la morphologie en forme de coupe (« cup-shaped morphology »). Echelle : 100nm. (Zomer et al., 2010)

la fusion membranaire (Rab GTPases, Annexines, flotillines), dans la formation du MVB (Alix, Tsg101), dans les processus nécessitant les protéines de choc thermique (HSC70 et 90). Les exosomes contiennent également les protéines tetraspanines (CD63, CD81, CD82 et CD9) et intégrines (ITGB1, ITGA6, ITGAV)(Mathivanan et al., 2010) (Figure 4). Les protéines Alix, flotilline, Tsg101, CD63 étant particulièrement enrichies dans les exosomes en représentent ainsi les marqueurs. Les exosomes sont particulièrement enrichis en radeaux lipidiques contenant du cholestérol, des sphingolipides, du céramide et des glycérophospholipides ayant des longs bras d'acides gras saturés (Wubbolts et al., 2003; Subra et al., 2007). Ces vésicules sont par ailleurs impliquées dans le transport d'acides nucléiques (voir partie II. 4).

Mise à part leur taille et leur composition biochimique, d'autres caractéristiques permettent d'identifier les exosomes parmi les différentes populations de VMs sécrétées par les cellules eucaryotes (voir Tableau 2). Observés en microscopie électronique à transmission, après coloration négative, ceux-ci ont la forme de coupe (« cup-shaped morphology ») (Figure 5). D'autre part, sur gradient de saccharose, leur densité est comprise entre 1, 13 et 1, 19 g/mL (Thery et al., 2006). Une méthode pour isoler les exosomes consiste donc à effectuer des ultracentrifugations différentielles (entre 100 000 et 200 000 g pour les collecter) suivies d'une ultracentrifugation sur gradient de saccharose (Thery et al., 2006).

b) Les ectosomes (aussi nommés microvésicules ou microparticules)

Les ectosomes se distinguent des exosomes par leur taille plus importante et plus hétérogène (autour de 100-1000 nm) et par leur formation s'effectuant par bourgeonnement de la membrane plasmique vers l'extérieur de la cellule (Figure 6). Les ectosomes produits par les cellules sanguines, telles les plaquettes, les erythrocytes et les cellules endothéliales, ont été particulièrement bien caractérisés (Aharon and Brenner, 2009; Leroyer et al., 2010; Little et al., 2010; Dignat-George and Boulanger, 2011). Les ectosomes peuvent également être sécrétés par des cellules en tout début d'apoptose (Beyer and Pisetsky, 2010).

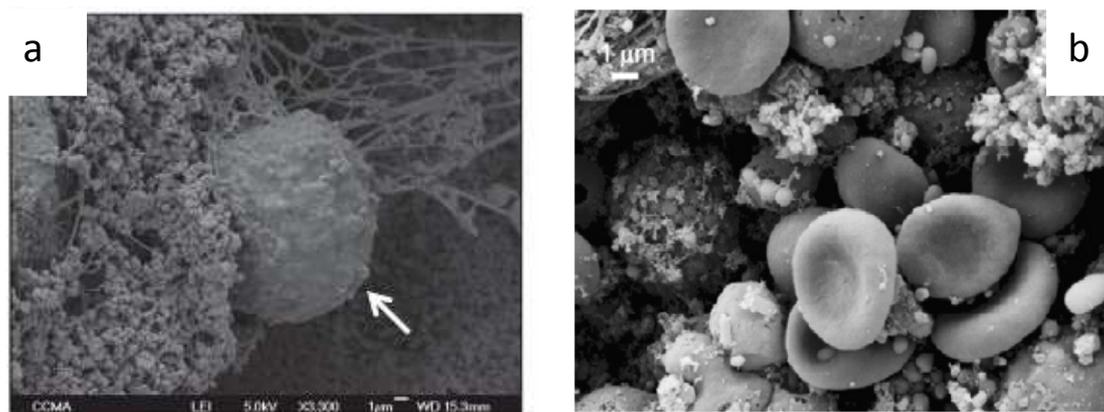


Figure 6 : Photos de cellules sécrétant des ectosomes, obtenues au MEB.

- a) Monocyte humain (Mouline et al., 2010)
- b) Erythrocytes humain (Mrvar-Brecko et al., 2010; Scita and Di Fiore, 2010; Soler et al., 2010)

	Exosomes	Ectosomes	Corps apoptotiques
Taille (diamètre)	40-100 nm	100-1000 nm	1-5µm
Mécanisme de formation	Fusion et exocytose des MVBs avec la membrane plasmique	Bourgeoisement à partir de la membrane plasmique	Bourgeoisement de la membrane plasmique menant à la fragmentation de la cellule
Composition en lipides	Cholestérol, sphingolipides, céramide, glycérophospholipides	Cholestérol, forte exposition de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire	Forte exposition de la phosphatidylsérine à la surface cellulaire
Marqueurs protéiques	Tsg101, Alix, HSC70, CD63, CD81, CD9	Intégrines, annexine V, marqueurs spécifiques des cellules /tissus (ex : métalloprotéinases)	histones
Méthode d'identification-purification	Microscopie électronique Ultracentrifugations différentielles (entre 100 000 et 200 000g) et ultracentrifugations sur gradient de saccharose (densité : 1, 13 - 1, 19 g/mL)	Cytométrie de flux Centrifugations différentielles (entre 18 000 et 100 000g)	Microscopie électronique Densité sur gradient de saccharose > à 1,23 g/mL
Sources cellulaires les mieux caractérisées	Cellules immunitaires, cellules tumorales	Plaquettes, érythrocytes, cellules endothéliales	Différentes lignées cellulaires
Revues	(Thery et al., 2009; Mathivanan et al., 2010; Gyorgy et al., 2011)	(Leroyer et al., 2010; Dignat-George and Boulanger, 2011; Gyorgy et al., 2011)	(Gyorgy et al., 2011)

Tableau 2 : Caractéristiques des différentes populations de VMs chez les Eucaryotes.

Au contraire des exosomes, peu de données sont disponibles concernant le mécanisme de formation des ectosomes. Le mécanisme d'« exovésiculation » qui caractérise la formation de ces vésicules est associé à un réarrangement de la symétrie des phospholipides membranaires par une machinerie enzymatique qui inclut les protéines aminophospholipide translocase, scramblase flippase, floppase et calpaine (Piccin et al., 2007). De telles perturbations entraînent un changement dans l'organisation de la bicouche phospholipidique résultant en l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) à la surface de la cellule, de même qu'en des modifications du cytosquelette conduisant au bourgeonnement des ectosomes (Piccin et al., 2007). D'autre part, l'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse du cholestérol entraîne une diminution marquée de la sécrétion de ces vésicules, suggérant une implication cruciale des radeaux lipidiques membranaires riches en cholestérol dans la biogenèse des ectosomes (Del Conde et al., 2005; Pilzer et al., 2005). Si les cellules semblent relarguer des ectosomes de façon constitutive, leur production est augmentée de façon très importante sous l'effet de différents stimuli, le plus souvent liés à une inflammation (Combes et al., 1999; Szotowski et al., 2007; Wang et al., 2007). Ces processus impliquent majoritairement le Ca^{2+} (Bianco et al., 2005; Pizzirani et al., 2007) et la protéine kinase C (Baj-Krzyworzeka et al., 2006) comme seconds messagers.

Les ectosomes expriment majoritairement le répertoire de molécules représentatif des cellules dont ils sont originaires. Par exemple, les ectosomes libérés par les neutrophiles et les cellules tumorales sont enrichies en métalloprotéinases ainsi qu'en d'autres enzymes protéolytiques (Gasser et al., 2003; Mochizuki and Okada, 2007) assurant la digestion de la matrice extracellulaire, ce qui permet la progression de l'inflammation ou le développement de cancers. Les ectosomes formés par les plaquettes arborent divers types d'intégrines, les glycoprotéines membranaires GPIb et GPIIb-IIIa ainsi que la P selectine (Heijnen et al., 1999; Del Conde et al., 2005) qui sont importants pour la coagulation. Cependant, quelques protéines sont exprimées de façon ubiquitaire telle que l'intégrine $\beta 1$ (Dolo et al., 1998; Del Conde et al., 2005), présente dans les ectosomes sécrétés par tous les types cellulaires étudiés jusqu'à maintenant (pour une

présentation des caractéristiques des ectosomes, voir Tableau 2). Les ectosomes sont dénués de protéines endosomales et de marqueurs typiques des exosomes, ce qui les distingue des « endosome-like domains » bourgeonnant à la surface des cellules (voir paragraphe précédent). D'autre part, les ectosomes renferment très souvent de l'ADN, de l'ARN et des microARNs issus de la cellule mère et qu'ils transfèrent à des cellules cibles (voir partie II. 4).

Contrairement aux exosomes, aucun protocole standard ne semble mis en place pour la purification des ectosomes. La plupart des équipes effectuent des centrifugations différentielles allant de 18 000g jusqu'à 100 000g, pendant des temps pouvant varier entre 30 et 100 min (Dignat-George et al., 2009). Leur densité située autour de 1,16 g/mL (Meckes and Raab-Traub, 2011) fait qu'il est difficile de les isoler des exosomes par centrifugation sur gradient de saccharose. La cytométrie de flux s'avère cependant un bon outil pour trier ces VMs et dans beaucoup d'études, l'annexine V très souvent associée à ces VMs, constitue le plus commun des marqueurs.

c) Les corps apoptotiques

Ces vésicules, jusqu'à présent très peu décrites, sont issues de cellules en cours d'apoptose avancée (Beyer and Pisetsky, 2010). Les corps apoptotiques sont de grosse taille (1-5µm) et se forment par bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique conduisant à la fragmentation de la cellule. Ils se caractérisent également par l'externalisation de la phosphatidylsérine (PS) et contiennent souvent de l'ADN fragmenté (Beyer and Pisetsky, 2010). Ces vésicules, une fois libérées sont très souvent ingérées par des phagocytes ou des cellules avoisinantes.

Leur taille, beaucoup plus importante par rapport aux autres populations de VMs, constitue une bonne caractéristique pour identifier les corps apoptotiques en microscopie électronique (voir Tableau 2). Leur forme est également très irrégulière et leur densité sur gradient de saccharose est supérieure à 1,23 g/mL (Thery et al., 2001). Cependant, aucun article ne fait état d'un protocole spécialisé dans leur purification, la plupart des études utilisant des cultures de cellules apoptotiques plutôt que des corps apoptotiques isolés.

	Vésicules membranaires bactériennes	
	Bactéries « gram -»	Bactéries « gram +»
Taille (diamètre)	50-250 nm	50-150nm
Mécanisme de formation	Bourgeonnement de la membrane externe (voir Figure 8)	Bourgeonnement de la membrane plasmique accompagnée de périplasma
Composition en lipides	Lipopolysaccharides (LPS), phospholipides (majoritairement phosphatidyl-ethanolamine)	Phospholipides de la membrane plasmique (acides palmitique, stéarique, enrichissement en acide myristique)
Marqueurs protéiques	Protéines de la membrane externe (ex : OprD, OprE, OprF, OprG, OprH, OprI, PagL and PcoB), protéines périplasmiques (ex : alkaline phosphatase, beta-lactamase, autolysines), protéines cytoplasmiques (ex : protéines ribosomales 50S, les sous-unités de l'ATP synthase et les cytochrome C oxidases)	Protéines cytoplasmiques (ex : pyruvate deshydrogenase, ADN polymérase), protéines de la membrane plasmique (ex : protéines ribosomales, ATPase), protéines périplasmiques (beta-lactamase, alpha-hémolysine)
Méthode d'identification-purification	Microscopie électronique Centrifugations différentielles, filtration	Microscopie électronique Centrifugations différentielles, filtration
Sources cellulaires les mieux caractérisées	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus anthracis</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i>
Articles	(Beveridge, 1999; Kulp and Kuehn, 2010; Tashiro et al., 2011a)	(Lee et al., 2009; Rivera et al., 2010)

Tableau 3 : Caractéristiques des VMs chez les Bactéries « gram -» et « gram +».

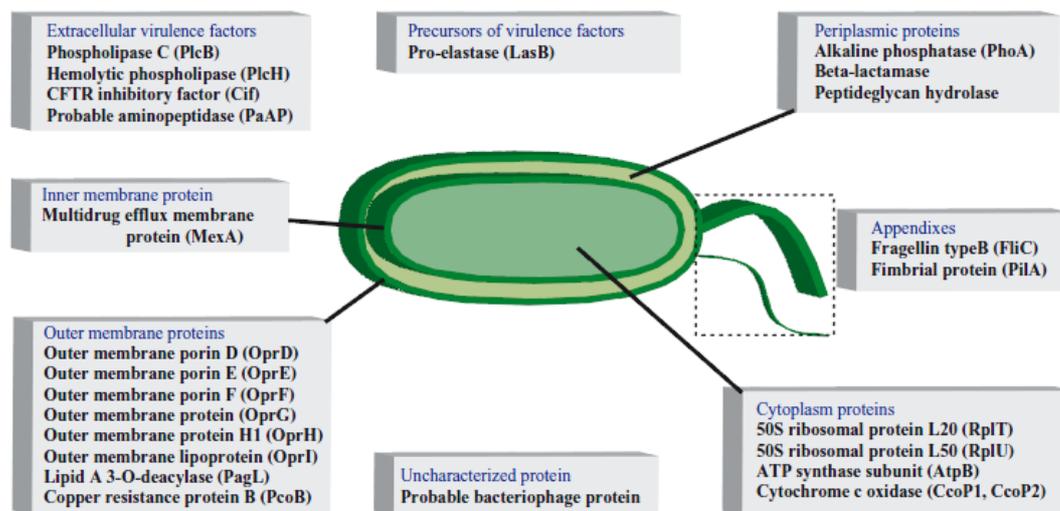


Figure 7 : Protéines majoritaires associées aux vésicules membranaires de *Pseudomonas aeruginosa*.

(Tashiro et al., 2011a)

2. Les vésicules membranaires chez les Bactéries

Les vésicules sécrétées par les bactéries ont été découvertes à peu près à la même époque que les premières vésicules eucaryotes, par Bishop et Work (Bishop and Work, 1965) qui ont observé la présence de lipopolysaccharides (LPS) dans le surnageant de cultures d'*Escherichia coli*. Les observations en microscopie électronique effectuées sur ces cultures révélèrent la présence de structures sphériques à la surface de la membrane externe. Des études ultérieures montrèrent que ces vésicules sont en fait produites par une très grande variété de bactéries « gram- » (Protéobactéries, ayant une membrane externe) (Hoekstra et al., 1976; Beveridge, 1999; Fiocca et al., 1999) et qu'elles ont une taille généralement comprise entre 50 à 250 nm de diamètre. Récemment, quelques études ont également souligné la sécrétion de vésicules chez les bactéries « gram + » (Lee et al., 2009; Rivera et al., 2010), dont l'ordre de taille est de 50-150 nm de diamètre. Ces dernières restent cependant à ce jour mal caractérisées (pour une présentation des caractéristiques des vésicules bactériennes, voir Tableau 3). De façon intéressante, la sécrétion de VMs semble conservée au niveau des mitochondries et constitue une voie de communication avec les peroxyosomes et d'autres organelles intracellulaires (Andrade-Navarro et al., 2009).

Les VMs sécrétées par les bactéries « gram - » sont constituées de protéines, de LPS et de phospholipides. D'autres molécules telles que de l'ADN, des peptidoglycanes (PG), des peptides antimicrobiens, des molécules hydrophobes (ex : PQS)...sont souvent transportées par ces VMs (voir partie II.). Si les protéines qui y sont identifiées sont majoritairement des protéines de la membrane externe (OprD, OprE, OprF, OprG, OprH, OprI, PagL and PcoB) (Bauman and Kuehn, 2006; Tashiro et al., 2010b; Choi et al., 2011), ces vésicules contiennent également des protéines périplasmiques (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995, 1996; Li et al., 1996) et récemment il a été montré que les VMs de *Pseudomonas aeruginosa* contiennent également des protéines cytoplasmiques (Choi et al., 2011), celles-ci étant majoritairement des protéines ribosomales 50S, les sous-unités de l'ATP synthase et les cytochrome C oxidases (Figure 7). Ainsi certaines protéines de la membrane externe sont particulièrement enrichies dans les VMs tandis que d'autres en sont totalement exclues. Des observations similaires peuvent être également faites

Gènes inactivés	Rôle / localisation de la protéine correspondante	Niveau de sécrétion des VMs par rapport à la souche sauvage
<i>Gènes impliqués dans la structure de l'enveloppe</i>		
ponB	Synthèse du PG	+
tolB	Protéine périplasmique (impliquée dans la capture des colicines de type A)	+
pal	Lipoprotéine associée au PG	+
tolA	Protéine impliquée dans l'intégrité de la ME	+
ompF	Porine de la ME	+
ompC	Porine de la ME	+
ompR	Régulateur impliqué dans la réponse au stress osmotique	+
wzxE	Translocase située au niveau de la MI	+
nlpI	Lipoprotéine de la ME	+
<i>Gènes impliqués dans la voie du stress σ^E</i>		
degS	Sérine protéase de la MI	+
degP	Sérine protéase périplasmique	+
rseA	Régulateur négatif de la voie σ^E	+
<i>Gènes à effets globaux</i>		
pnp	Polynucléotide phosphorylase	+
glnA	Glutamine synthétase	-
lysS	Lysyl tRNA synthetase	-
pepP	Proline aminopeptidase	-
<i>Gènes à effets non caractérisés</i>		
yieM	Protéine non caractérisée	+
ypjA	Protéine non caractérisée	-
nlpA	lipoprotéine	-

Tableau 4 : Mutants de la vésiculation obtenus chez *E. coli*.

Les gènes ont été inactivés par mutagenèse de transposition. Les phénotypes obtenus correspondent soit à une augmentation de la sécrétion de VMs (+), soit à une diminution de la sécrétion (-).

MI : membrane interne ; ME : membrane externe

(McBroom et al., 2006; Scita and Di Fiore, 2010)

concernant la composition en lipides (Horstman and Kuehn, 2000; Kato et al., 2002; Tashiro et al., 2011b). Ceci suggère que la formation de ces vésicules résulte d'un processus biologique spécifique.

Sur le plan génétique, certains mutants produisant plus ou moins de VMs par rapport au type sauvage ont été générés chez *E. coli* (McBroom et al., 2006; McBroom and Kuehn, 2007). Mc Broom *et al.* ont remarqué que de nombreuses variations du taux de vésiculation étaient causées par des inactivations dans les gènes codant pour des protéines de la membrane externe, ainsi que dans des gènes codant des protéines impliquées dans la synthèse du PG et dans la voie du stress σ^E (voir Tableau 4). Ainsi les mutants $\Delta ompF$ et $\Delta ompC$ (outer membrane protein F et outer membrane protein C), dont les produits sont des porines situées dans la membrane externe, ont un taux de vésiculation plus élevé que la souche sauvage. Des résultats similaires ont été obtenus pour les inactivations du gène *ponB*, impliqué dans la voie de synthèse du PG, et des gènes *tolA*, *tolB* et *pal*, effectuant des liaisons entre le PG, la membrane externe et la membrane interne. Ces auteurs ont également mis en évidence un lien entre le taux de vésiculation et des mutations induites dans des gènes intervenant dans la voie du stress σ^E ⁽²⁾. Il a été montré que l'inactivation par mutation de tous les gènes impliqués dans cette voie (ex : *degS*, *rseA*, *degP*) entraîne une augmentation de la sécrétion de VMs. Ces observations suggèrent que la vésiculation constitue un mécanisme de réponse au stress pouvant pallier la voie σ^E (McBroom and Kuehn, 2007). Il est également important de noter que beaucoup de mutants affectés dans le taux de vésiculation correspondent à des inactivations effectuées dans des gènes codant pour des protéines hypothétiques ou non caractérisées (ex : *yieM*). D'autre part, très peu de mutants produisant de faibles quantités de vésicules (ex : $\Delta yjpA$, $\Delta glnA$, $\Delta lysS$) et aucun mutant ne produisant pas du tout de vésicules n'ont pu être identifiés, suggérant que la sécrétion de VMs constitue certainement un processus important pour la croissance des bactéries.

⁽²⁾ La voie σ^E est un mécanisme de réponse au stress se mettant en place au niveau de l'enveloppe cellulaire et qui est activée par la présence de protéines mal repliées dans l'espace périplasmique, conduisant à la transcription d'une batterie de gènes de réponse au stress (Alba and Gross, 2004).

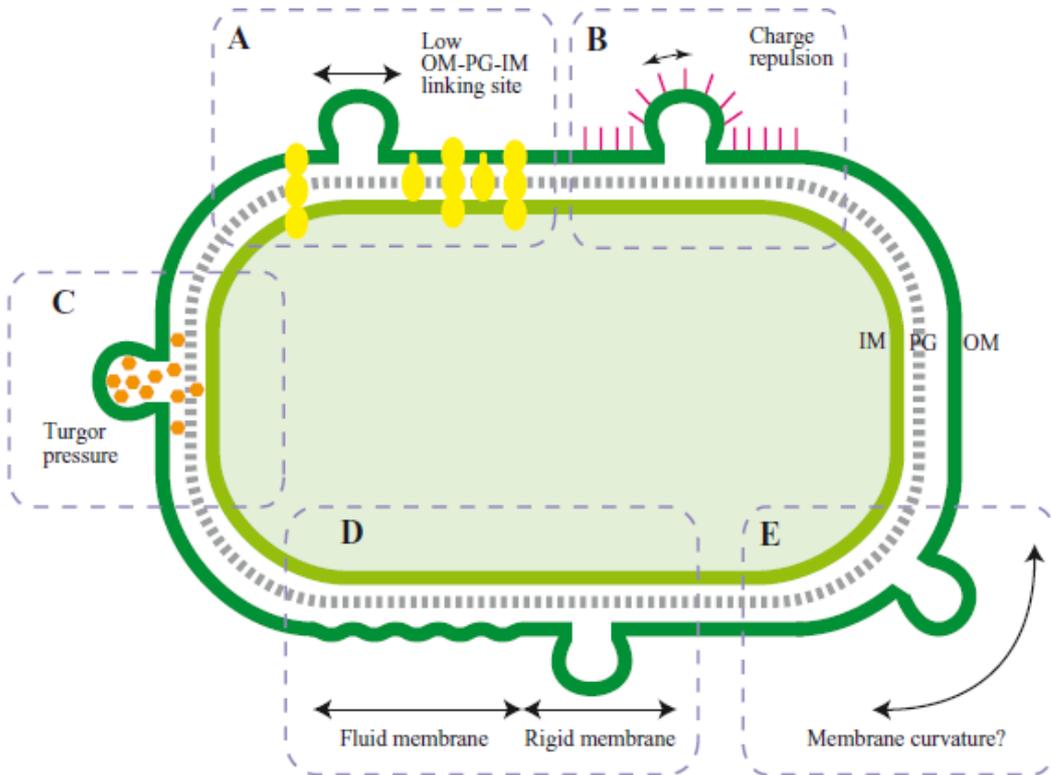


Figure 8 : Cinq hypothèses pouvant expliquer la formation de VMs chez les bactéries « gram -».

- Les VMs se forment en des sites où les liens protéiques (en jaune) entre membrane externe, PGs et membrane interne sont rares.
- La formation de VMs est favorisée par la répulsion entre molécules de LPS (en rouge) adjacentes à la surface de la membrane externe.
- L'accumulation de composés (PGs, protéines mal formées, en orange) augmente la pression de turgescence dans le périplasme induisant la formation de VMs.
- Les VMs se forment au niveau de sites où la membrane externe est très rigide.
- Les VMs sont sécrétées au niveau de sites où la l'enveloppe est particulièrement courbée. (Tashiro et al., 2011a)

Sur les bases génétique et biochimique, plusieurs modèles hypothétiques ont été proposés pour essayer de comprendre le mécanisme de formation des VMs chez les bactéries « gram -» (Figure 8).

Une première hypothèse stipule que les VMs se forment à des niveaux de l'enveloppe où les liens protéiques unissant la membrane externe, le peptidoglycane (PG) et la membrane interne sont rompus (Sonntag et al., 1978; Suzuki et al., 1978) (hypothèse A figure 8). Deatherage *et al.* suggèrent que ce processus intervient durant la croissance de la cellule au cours de laquelle un remodelage de l'enveloppe cellulaire peut conduire à une rupture des liens PG-membrane externe, et également au niveau des sites de division où l'invagination de la membrane interne et du PG cause le désassemblage des complexes protéiques membrane externe-PG-membrane interne (Deatherage et al., 2009). Les résultats des expériences de mutation obtenus par Mc Broom *et al.* corroborent cette hypothèse (voir précédemment). De façon similaire, Bernadac *et al.* avaient également montré que l'inactivation par mutation des gènes *tolA*, *tolB* et *pal* conduit à une augmentation de la vésiculation chez *E. coli* (Bernadac et al., 1998).

Un autre modèle prend en compte la composition en lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe (hypothèse B, figure 8). En effet celle-ci est enrichie en LPS de type B chargés négativement, causant des répulsions charge-charge à sa surface et induisant par conséquent une instabilité membranaire qui serait responsable de la formation des VMs. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, cet effet semble être renforcé par l'attachement du composé hydrophobe PQS (« *Pseudomonas* quinolone signal ») qui déstabilise les ponts salins créés par les ions positifs Mg^{2+} et Ca^{2+} dans la membrane externe, amplifiant ainsi les interactions anioniques entre les molécules de LPS (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006; Mashburn-Warren et al., 2008).

L'inefficacité du turnover des molécules de PGs, conduisant à leur accumulation dans le périplasme constituerait un autre mécanisme menant à la formation des VMs (hypothèse C, figure 8). Zhou *et al.* ont en effet montré que l'inactivation du gène codant pour l'autolysine (peptidoglycane hydrolase) chez *Pseudomonas gingivalis* entraînant l'accumulation de PGs dans l'espace périplasmique, favorise la sécrétion de VMs (Zhou et al., 1998). Cependant, aucune évidence concrète ne supporte le fait que la pression de

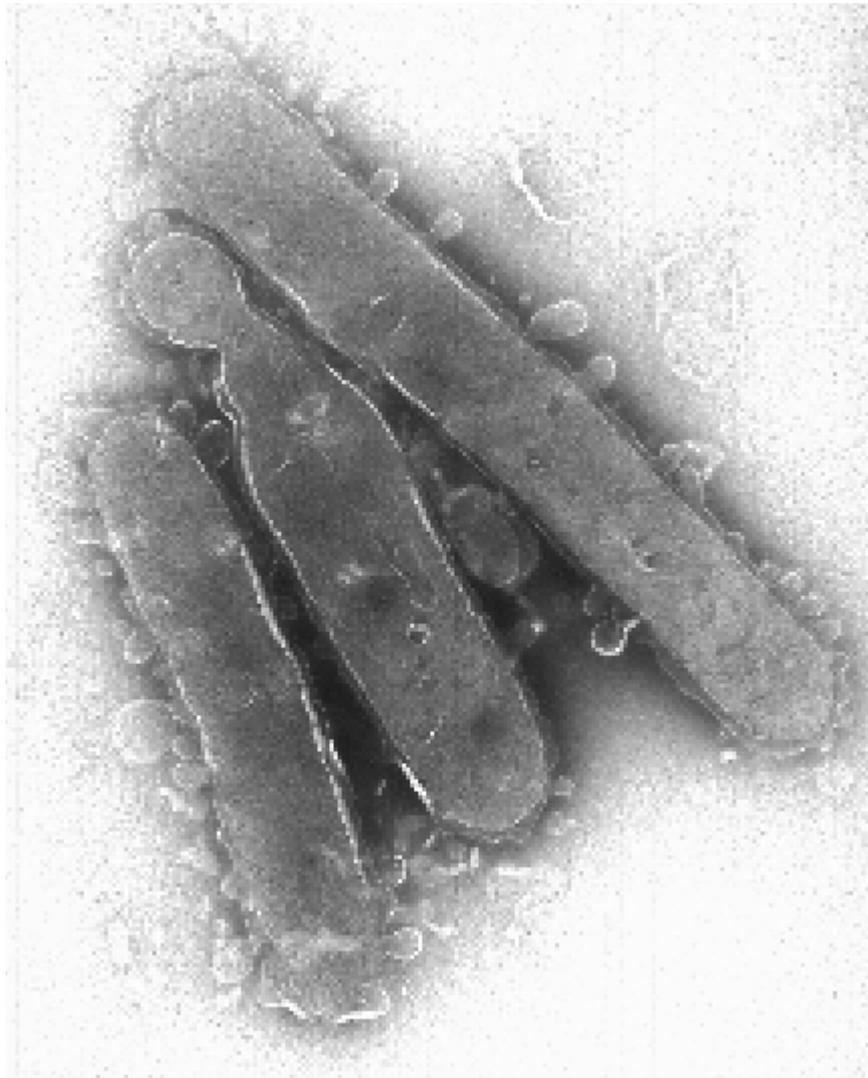


Figure 9 : Micrographie de cellules bactériennes (*Maribacter forsetii* sp.) de forme bacille produisant à leur surface de nombreuses vésicules. (Tristan Barbeyron, communication personnelle)

turgescence induite par l'accumulation des PGs dans l'espace périplasmique est en elle-même suffisante pour entraîner la formation des VMs. D'autres auteurs rapportent également que l'accumulation de protéines mal formées dans le périplasme pourrait contribuer, de la même façon que les PGs, à une augmentation des VMs sécrétées (McBroom and Kuehn, 2007; Tashiro et al., 2009).

La différence de composition en acides gras entre les sites de vésiculation et le reste de la membrane externe, se manifestant par une différence de rigidité, pourrait également être responsable du bourgeonnement (hypothèse D, figure 8). En effet, les VMs de *P. aeruginosa* sont enrichies en acides gras saturés par rapport à la membrane externe ce qui rend leur structure plus rigide. Ainsi, Tashiro *et al.* ont émis l'hypothèse selon laquelle les VMs pourraient naître au niveau de sites de forte rigidité membranaire, ces sites favorisant la torsion de la membrane externe et conséquemment la production de vésicules (Tashiro et al., 2011b). Cependant, cette différence de composition d'acides gras et donc de fluidité membranaire n'est pas observé chez *E. coli* (Hoekstra et al., 1976) et ne peut donc pas expliquer la formation de VMs chez toutes les bactéries « gram- ».

Une dernière hypothèse (hypothèse E, figure 8) émise par Deatherage *et al.* met en jeu la forme des organismes : coques *versus* bacilles (Deatherage et al., 2009). Ces auteurs suggèrent que les organismes ayant une membrane très incurvée (type coque) produiraient plus de VMs que les organismes dont la membrane est plus rectiligne (type bacille). Cette hypothèse est supportée par les travaux de Tashiro *et al.* (Tashiro et al., 2008) qui montrent que la mutation dans le gène Opr86 chez *P. aeruginosa* induisant un changement de sa forme en coque, augmente la sécrétion de VMs. Cependant, très peu de travaux ont jusqu'à présent démontré la robustesse d'un tel modèle et certaines observations effectuées en microscopie électronique sur des bactéries de forme bacille mettent en évidence un niveau élevé de vésiculation (Figure 9).

Sur l'ensemble de ces cinq modèles, les hypothèses A (formation des VMs en des sites où l'enveloppe cellulaire comporte peu de liens protéiques unissant la membrane externe, le PG et la membrane interne) et C (formation des VMs suite à l'accumulation de composés dans le périplasme) restent les mieux soutenues, notamment d'un point de vue génétique, pour expliquer la formation des VMs chez les bactéries « gram - ». Cependant,

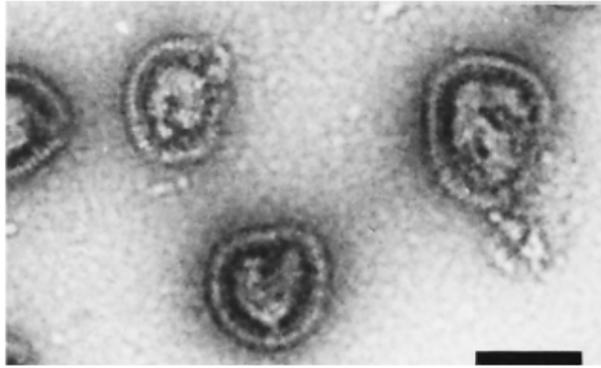


Figure 10 : Micrographie de VMs dérivées de cellules de *Sulfolobus islandicus* observées au MET. Echelle : 150nm.
(Prangishvili et al., 2000)

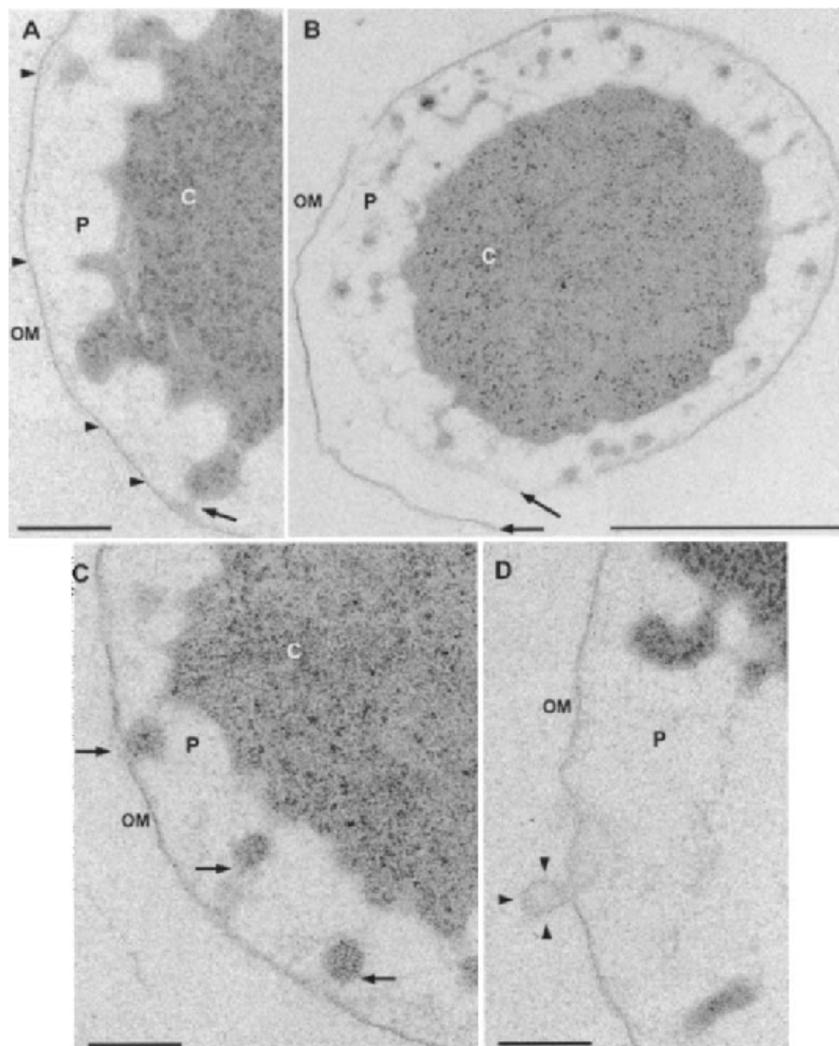


Figure 11 : Coupes de cellules d'*Ignicoccus hospitalis* observées au MET.
A. VMs bourgeonnant à la surface de la membrane cytoplasmique.
B. Cellule entière.
C. Certaines des VMs émises dans le compartiment intermembraire (anciennement nommé espace périplasmique) fusionnent avec la membrane externe.
D. Très rarement, une vésicule bourgeonnant au niveau de la membrane externe est observée.
OM : membrane externe ; C : cytoplasme ; P : périplasme (maintenant nommé espace intermembranaire). Echelle A, C, D : 200 nm ; échelle B : 1 μ m
(Nather and Rachel, 2004; Huotari and Helenius, 2011)

les expériences à l'origine de ces modèles utilisent préférentiellement les bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa* et ne permettent donc pas d'estimer l'universalité de tels mécanismes chez l'ensemble des bactéries « gram - ». De plus, ces hypothèses ne sont certainement pas mutuellement exclusives et il est possible que plusieurs mécanismes interviennent dans la formation des VMs. Si le processus de formation des VMs a particulièrement bien été étudié dans le cas des bactéries « gram - », comme nous venons de le voir, le mécanisme de formation des vésicules sécrétées par les bactéries « gram + » reste à ce jour inconnu.

3. Les vésicules membranaires chez les Archées

Au contraire des Eucaryotes et des Bactéries, la découverte de VMs produites chez les Archées est très récente. La sécrétion de VMs a été rapportée dans les phyla Euryarchées et Crenarchées (pour une présentation des caractéristiques des vésicules dans ces deux phyla, voir Tableau 5).

C'est en 2000 que Prangishvili *et al.* soulignent un tel phénomène lorsqu'ils montrent que la sulfolobicine, une protéine antimicrobienne produite par différentes souches de *Sulfolobus islandicus* (phylum des Crenarchées), est sécrétée en association avec des VMs (Prangishvili *et al.*, 2000) (Figure 10).

Plus récemment, les VMs d'autres espèces de *Sulfolobus* (*S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* et *S. tokodaii*) ont également été caractérisées (Ellen *et al.*, 2009). Ces vésicules sont enveloppées d'une couche glycoprotéique, nommée « S-layer » entourant également la cellule, et font environ entre 90 et 230 nm de diamètre. Les différentes espèces du genre *Ignicoccus* sont également de vigoureuses productrices de VMs. Ces crenarchées hyperthermophiles anaérobies présentent une caractéristique unique chez les Archées, à savoir la présence d'une membrane externe. Les VMs qu'elles produisent sont sécrétées au niveau de la membrane cytoplasmique dans un vaste compartiment intermembranaire où elles peuvent fusionner avec la membrane externe (Figure 11). Très rarement, des VMs sont observées entrain de bourgeonner directement à la surface de la membrane externe.

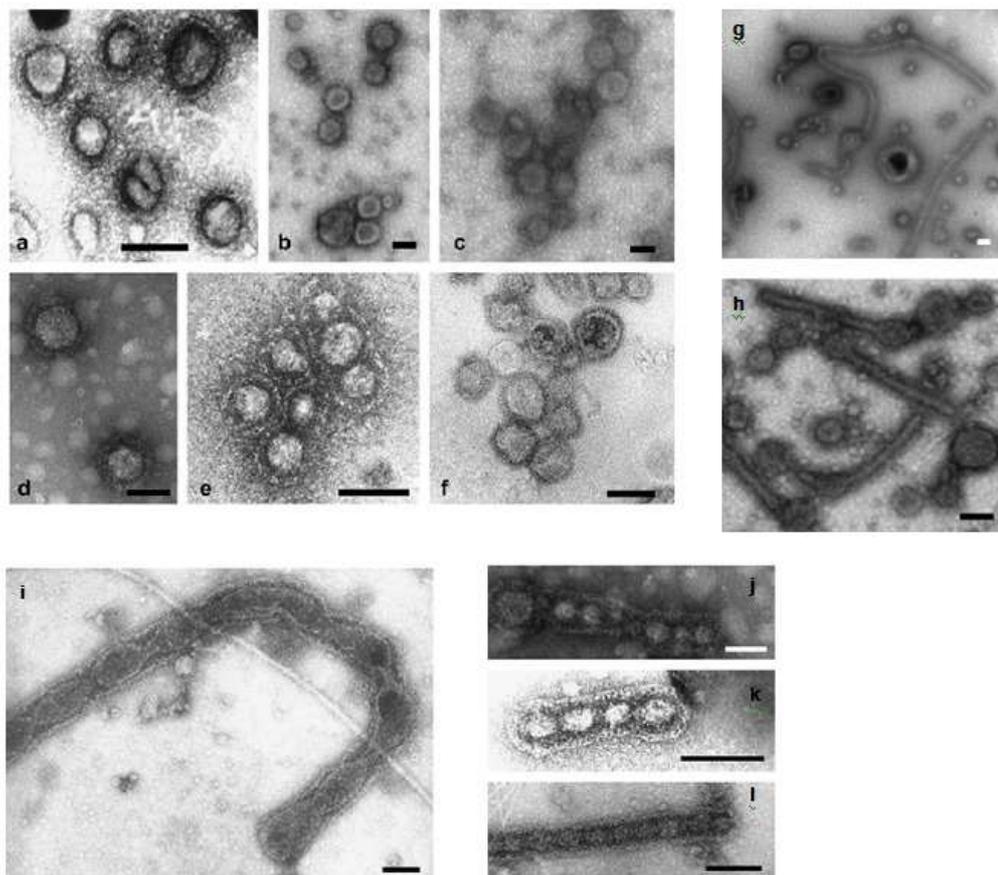


Figure 12 : Micrographies de VMs (« virus-like vesicles ») (a-f) et de structures filamenteuses, en forme de bâtonnets (g, h) et de collier de perles (i-l) de Thermococcales, observées au MET.

Echelle 100 nm.

(Soler et al., 2008)

	Vésicules membranaires des Archées	
	Crénarchées	Euryarchées
Taille (diamètre)	90-230 nm	50-130nm
Mécanisme de formation	Bourgeonnement de la membrane plasmique accompagnée du S-layer	Non déterminé (même si le bourgeonnement est l'hypothèse favorisée)
Composition en lipides	Lipides à liaison tétraéther (GDGTs et GTGTs)	Non déterminé
Marqueurs protéiques	Homologues des sous-unités du complexe ESCRT-III et homologue de l'ATPase Vps4 eucaryotes	Non déterminé
Méthode d'identification-purification	Microscopie électronique Centrifugations différentielles, ultracentrifugation sur gradient de CsCl, filtration	Microscopie électronique Centrifugations différentielles, ultracentrifugation sur gradient de CsCl, filtration
Sources cellulaires les mieux caractérisées	<i>G/ Sulfolobus</i> , <i>Ignicoccus</i>	<i>O/ Thermococcales</i>
Articles	(Nather and Rachel, 2004; Ellen et al., 2009)	(Soler et al., 2008)

Tableau 5 : Caractéristiques des VMs chez les Archées.

La production de vésicules a également été décrite pour différentes cellules du phylum des Euryarchées. Une première observation montre qu'*Aciduliprofundum boonei*, une euryarchée hyperthermophile vivant dans les sources hydrothermales marines présente à sa surface des vésicules enveloppées de S-layer (Reysenbach et al., 2006). En 2008, Soler *et al.* mettent en évidence que la production de VMs est un processus conservé dans l'ordre des *Thermococcales* (Soler et al., 2008). En effet, les Archées appartenant à ce groupe produisent des VMs qui ont été nommées « virus-like vesicles » en raison de leur ressemblance avec certains virions (tels que les Globuloviridae, un groupe de virus infectant les Crénarchées) et ont une taille généralement comprise entre 50 à 130 nm de diamètre. En plus des VMs, les Archées de l'ordre des *Thermococcales* produisent des structures filamenteuses ayant la forme de bâtonnets ou colliers de perles (Figure 12).

Jusqu'à maintenant, seules les VMs de *Sulfolobus* ont subi une analyse protéomique, révélant une composition très différente de celle de la membrane cytoplasmique (Ellen et al., 2009). Ceci tend à suggérer que leur formation résulte également d'un processus spécifique. De manière intéressante, des homologues de protéines constituant le complexe ESCRT-III et de l'ATPase Vps4 eucaryotes ont été identifiés dans ces VMs (Ellen et al., 2009). Ceci suggère que le mécanisme de bourgeonnement vers l'extérieur des VMs au niveau de la membrane plasmique de *Sulfolobus* présente des similitudes avec celui se produisant au niveau de la membrane endosomale chez les Eucaryotes. Cependant, des études génétiques nécessitent d'être effectuées afin de valider cette hypothèse.

II. Interactions des vésicules membranaires avec les cellules et l'environnement

Si de nombreuses différences sont à noter dans la structure, la composition et dans le mode de genèse des VMs entre les trois domaines du vivant, plusieurs traits communs peuvent être au contraire distingués en ce qui concerne les rôles biologiques qui leur sont attribués.

1. Les vésicules membranaires, une armée pour les cellules

Très souvent, les VMs de nombreux organismes sont impliquées dans le transfert de composés toxiques, pouvant inhiber la croissance des autres cellules ou directement les tuer, sans effet sur la cellule productrice. La sécrétion de ces composés est réalisée majoritairement par les microorganismes et ont été nommés bactériocines, bien qu'également produites par les Archées (Dobson et al., 2012).

C'est certainement chez les Bactéries que la virulence des VMs a été le mieux décrite. En effet, l'activité antimicrobienne de surnageants de culture de *P. aeruginosa* a été observée il y a plus de cent ans (Pasteur, 1877; Bouchard, 1889). Cependant, la nature et le mode d'action des composants lytiques n'avaient pas été examinés. C'est en 1996 que Li *et al.* montrent que les VMs de *P. aeruginosa* sont associées à une activité antimicrobienne (Li et al., 1996). Celle-ci résulte de l'activité des protéines autolysines (ou peptidoglycane hydrolases) ayant la capacité de cliver les liaisons covalentes du PG⁽³⁾. Délivrées à d'autres souches bactériennes (« gram + » ou gram -), elles entraînent la dégradation du PG et donc la lyse des cellules. Des études plus récentes montrent que cette activité antimicrobienne n'est pas restreinte aux VMs sécrétées par *P. aeruginosa*. Les travaux de Li *et al.* rapportent en effet un effet toxique associé aux VMs de 15 bactéries « gram - » contre des bactéries « gram + » et « gram - » avec *P. aeruginosa* ayant le plus vaste spectre (Li et al., 1998). La très forte activité lytique des VMs de *P. aeruginosa* semble provenir d'une concentration particulièrement élevée en autolysine

⁽³⁾ Ces protéines participent normalement au turnover de la couche de PGs lors de la croissance bactérienne.

associée à différentes quinolones antibactériennes (Li et al., 1996; Mashburn and Whiteley, 2005). Kadurugamuwa et Beveridge ont montré que *P. aeruginosa* cultivée en présence de gentamicine, un agent perturbant l'organisation membranaire, accroît la sécrétion de VMs contenant cet antibiotique (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995). De plus, ces VMs ont un pouvoir de lyse particulièrement accru lié à l'action synergique de la gentamicine et de l'autolysine qu'elles convoient (Kadurugamuwa and Beveridge, 1996).

De façon intéressante, il a été rapporté que la formation des VMs constitue un pré-requis pour l'activation de certaines toxines. Ceci est le cas de l'enterotoxine bactérienne ClyA, sécrétée en association avec les VMs d'*E. coli*. La protéine ClyA possède un état monomérique inactif lorsqu'elle est dans le périplasme mais devient oligomérisée sous l'effet d'un changement rédox lorsqu'elle intègre les VMs ce qui lui confère un état actif (Wai et al., 2003).

La pathogénicité d'une grande variété de bactéries « gram - » a été maintenant caractérisée et reliée à leur capacité à sécréter un très grand nombre de facteurs de virulence, souvent via des VMs (hemolysine, aerolysine, verotoxine...). Récemment, il a été montré que le convoyage de la toxine anthrax produite par la bactérie « gram+ » *Bacillus anthracis* s'effectue également via des VMs (Rivera et al., 2010). L'empaquetage de ces composés dans des structures membranaires permet d'éviter qu'ils diffusent ou soient dégradés dans le milieu extérieur.

La lyse des microorganismes environnants ne permet pas seulement de réduire la compétition dans les environnements polymicrobiaux mais permet également d'apporter aux cellules lytiques des nutriments provenant des cellules lysées (Bauman and Kuehn, 2006). Il est d'ailleurs intéressant de noter que la lyse médiée par les VMs n'intervient pas dans les conditions où les cellules se divisent et croissent activement, mais plutôt dans des environnements pauvres en nutriments. Les VMs ont alors dans ce cas un rôle de prédation, créant un environnement plus riche via la libération des nutriments provenant des cellules lysées (Kadurugamuwa and Beveridge, 1996). Kadurugamuwa et Beveridge ont proposé un modèle pour expliquer l'interaction des VMs de *P. aeruginosa* avec d'autres bactéries « gram+ »/ « gram- » (Figure 13) (Kadurugamuwa and Beveridge, 1996). Celui-ci implique des interactions entre les anions situés à la surface des VMs et les

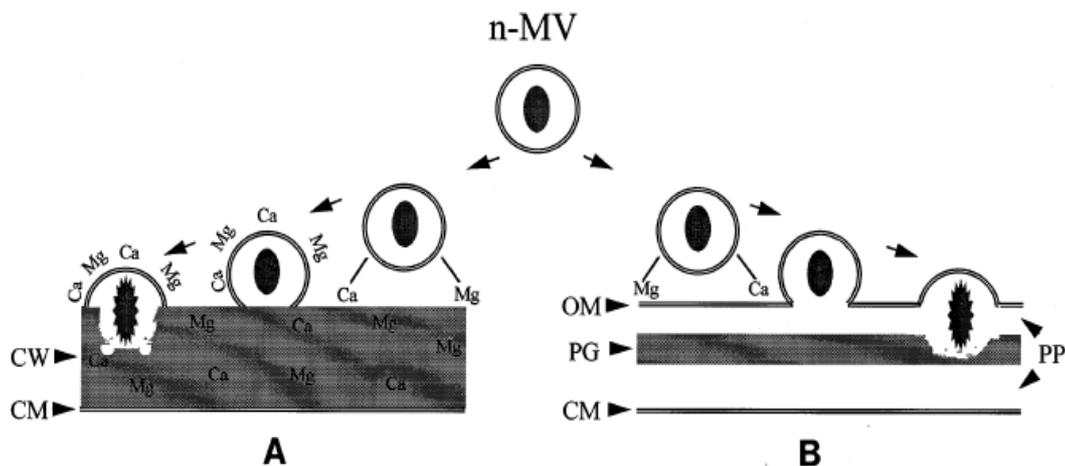


Figure 13 : Schéma expliquant comment les VMs (« n-MVs ») de *P. aeruginosa* peuvent interagir avec les bactéries « gram+ » (A) et les bactéries « gram -» (B).

Ces VMs exposent essentiellement les LPS de types B à leur surface, chargés négativement (voir I. 2).

- A) La paroi des bactéries « gram+ » étant riche en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} permet la formation de ponts salins avec les VMs, provoquant leur adhérence immédiate. Comme de plus en plus d'ions Ca^{2+} et Mg^{2+} deviennent disponibles quand les VMs se rapprochent, une tension de plus en plus grande est appliquée à leur surface, résultant en leur rupture et en la libération de l'autolysine dans la paroi.
- B) La membrane externe des bactéries « gram -» est également riche en ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , ce qui entraîne à aussi la formation de ponts salins VMs-membrane externe. Cependant dans ce cas, les deux structures possèdent une surface compatible (toutes deux constituées de LPS, phospholipides, protéines), rendant possible un phénomène de fusion induisant la libération de l'autolysine dans l'espace périplasmique.

(Barany and Kahn, 1985; Kadurugamuwa and Beveridge, 1996)

cations présents au niveau de la paroi bactérienne. Une tension particulièrement forte est exercée sur les VMs interagissant avec l'enveloppe des bactéries « gram+ » conduisant à leur rupture et à la libération de l'autolysine dans la paroi. Dans le cas d'une interaction des VMs avec la paroi des bactéries « gram - », un phénomène de fusion des membranes rend possible la libération de l'enzyme dans l'espace périplasmique.

Les VMs produites par les Bactéries participent également au développement de la pathogénèse chez les Eucaryotes. Les VMs des bactéries *Bacteroides gingivalis* ont en effet été identifiées dans la plaque dentaire de patients souffrant de maladies parodontales où elles sont suspectées de faciliter la colonisation de ces bactéries, l'inflammation et la déstructuration de la dent (Williams and Holt, 1985; Mayrand and Grenier, 1989). Les VMs de nombreuses bactéries pathogènes ont ainsi été retrouvées sur les lieux de multiples infections (Dorward et al., 1991; Namork and Brandtzaeg, 2002). L'adhésion de ces vésicules bactériennes aux cellules eucaryotes est permise par les molécules d'adhésine qu'elles portent à leur surface et leur effet toxique se manifeste par leur entrée dans la cellule cible souvent via endocytose (Kesty et al., 2004).

La sécrétion de toxines antimicrobiennes associées aux VMs a également été identifiée chez les Archées. Prangishvili *et al.* observent qu'une toxine protéique, la sulfolobicine, est relâchée via les VMs de *S. islandicus*, tuant d'autres souches du même genre telles que *S. solfataricus* P1 et *S. shibatae* B12 mais sans effet sur *S. acidocaldarius* (Prangishvili et al., 2000). Récemment, l'équipe d'A. Driessen a montré que ce composé est constitué de deux polypeptides, dont l'association s'avère indispensable pour maintenir l'effet toxique (Ellen et al., 2011). Si d'autres études révèlent la sécrétion de toxines chez les Halobacterales (Lee and Cheung, 1996; Price and Shand, 2000), un groupe appartenant aux Euryarchées, aucune évidence pour l'instant ne lie cette sécrétion à celle de VMs.

La production de toxines chez les Eucaryotes est particulièrement bien documentée chez les végétaux et les animaux avec des molécules telles que les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes), les composés azotés (ex : alcaloïdes). Cependant, aucune étude ne décrit la sécrétion de ces composés via les VMs. Des travaux récents évoquent toutefois la libération de facteurs de virulence via des VMs chez des organismes eucaryotes

unicellulaires (Silverman and Reiner, 2011). L'analyse du sécrétome de nombreux eucaryotes unicellulaires pathogènes révèle que les protéines de choc thermique et superoxyde dismutase constituent les agents le plus souvent impliqués dans la virulence (Albuquerque et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Silverman et al., 2010). Les exosomes de *Cryptococcus neoformans* (organisme unicellulaire appartenant aux champignons Basidiomycètes) contiennent en plus certains composés toxiques spécifiques tels que la laccase, l'uréase, des glucosylcéramides et le polysaccharide glucuronoxylomannan (Rodrigues et al., 2008). Ces VMs peuvent également comporter des molécules connues pour permettre l'adhésion de parasites sur les cellules hôtes, comme les glycoprotéines de la famille gp85/transsialidase portées par les ectosomes de *Trypanosoma cruzi* (Trocoli Torrecilhas et al., 2009). Peu de données sont disponibles pour comprendre comment ces VMs interagissent avec les cellules cibles et expriment leur toxicité. Une seule étude décrit la phagocytose d'exosomes sécrétés par le genre *Leishmania*, par des macrophages, via un mécanisme actine-dépendant (Silverman and Reiner, 2011).

2. Les vésicules membranaires, un moyen de réponse au stress

Différents stress imposés aux cellules peuvent influencer le taux de sécrétion des VMs ainsi que leur composition.

Certaines conditions de stress affectant l'enveloppe cellulaire peuvent entraîner l'accumulation d'agrégats de protéines endommagées ou mal repliées dans le périplasma des bactéries « gram - ». Les VMs peuvent être un moyen de soulager rapidement la cellule de ce matériel qui pourrait devenir à terme toxique. McBroom *et al.* suggèrent d'ailleurs que la vésiculation n'est peut être pas seulement liée à une modification de l'intégrité de la membrane de la cellule et qu'elle pourrait constituer un mécanisme de réponse au stress (McBroom and Kuehn, 2007). Ces auteurs observent une augmentation de la vésiculation suite à un stress de chaleur, provoquant l'accumulation de protéines mal repliées dans l'espace périplasmique. Par des expériences de mutations, ils montrent que ce mécanisme fonctionne indépendamment des voies du stress couramment mises

en place chez les bactéries telles que les voies σ^E et Cpx (Alba and Gross, 2004; Raivio, 2005). Une augmentation de la sécrétion d'exosomes par les lymphocytes B a également été observée lorsque qu'un stress thermique leur est appliqué (Clayton et al., 2005). Les VMs relarguées dans ces conditions transportent par ailleurs une très forte concentration de protéines de choc thermique.

D'autre part, l'hypervésiculation apparaît comme un moyen de survivre dans un environnement chimiquement toxique. Certains mutants d'*E. coli* produisant davantage de vésicules que la souche sauvage, tels que les mutants de la voie du stress σ^E ($\Delta degS / \Delta degP$) et le mutant $\Delta yieM$ (gène codant pour une protéine hypothétique non impliquée dans une des voies du stress) sont capables de survivre à un traitement à l'éthanol et la polymixine (McBroom and Kuehn, 2007; Manning and Kuehn, 2011). Au contraire, les mutants dont le taux de vésiculation est faible ($\Delta nlpA$ par exemple) apparaissent plus sensibles que la souche sauvage dans ces mêmes conditions. Manning and Kuehn ont également montré que la supplémentation de cultures d'*E. coli* avec des VMs purifiées augmente le taux de survie des bactéries en présence de peptides antimicrobiens (colistine, polymixine) par adsorption de ces peptides à la surface des VMs (Manning and Kuehn, 2011). De plus, ces auteurs ont mis en évidence que ces composés induisent la vésiculation d'une façon significative et suggèrent que la formation des VMs chez les bactéries constitue une réponse régulée. Récemment, Tashiro *et al.* (Tashiro et al., 2010a) ont montré que certaines souches bactériennes telles que *E. coli*, *Pseudomonas putida*, *P. stutzeri*, *Burkholderia capacia*, sécrètent davantage de VMs lorsqu'elles sont cultivées en présence de PQS (Pseudomonas quinolone signal). Ce composé, qui normalement inhibe leur croissance, est par ailleurs retrouvé dans les VMs qu'elles produisent. De façons similaires, *P. aeruginosa* produit des VMs associées à la gentamicine lorsque cette bactérie est cultivée en présence de cet antibiotique (Kadurugamuwa and Beveridge, 1995) et *P. putida* augmente sa sécrétion de VMs en présence de toluène (Kobayashi et al., 2000), ce composé étant également retrouvé dans ces structures.

Chez les Eucaryotes, ce mécanisme de tolérance à des composés chimiques néfastes pour la cellule a été mis en évidence chez *Dictyostelium discoideum*. En présence d'hypericine, un composé cytotoxique internalisé par les cellules, cet organisme

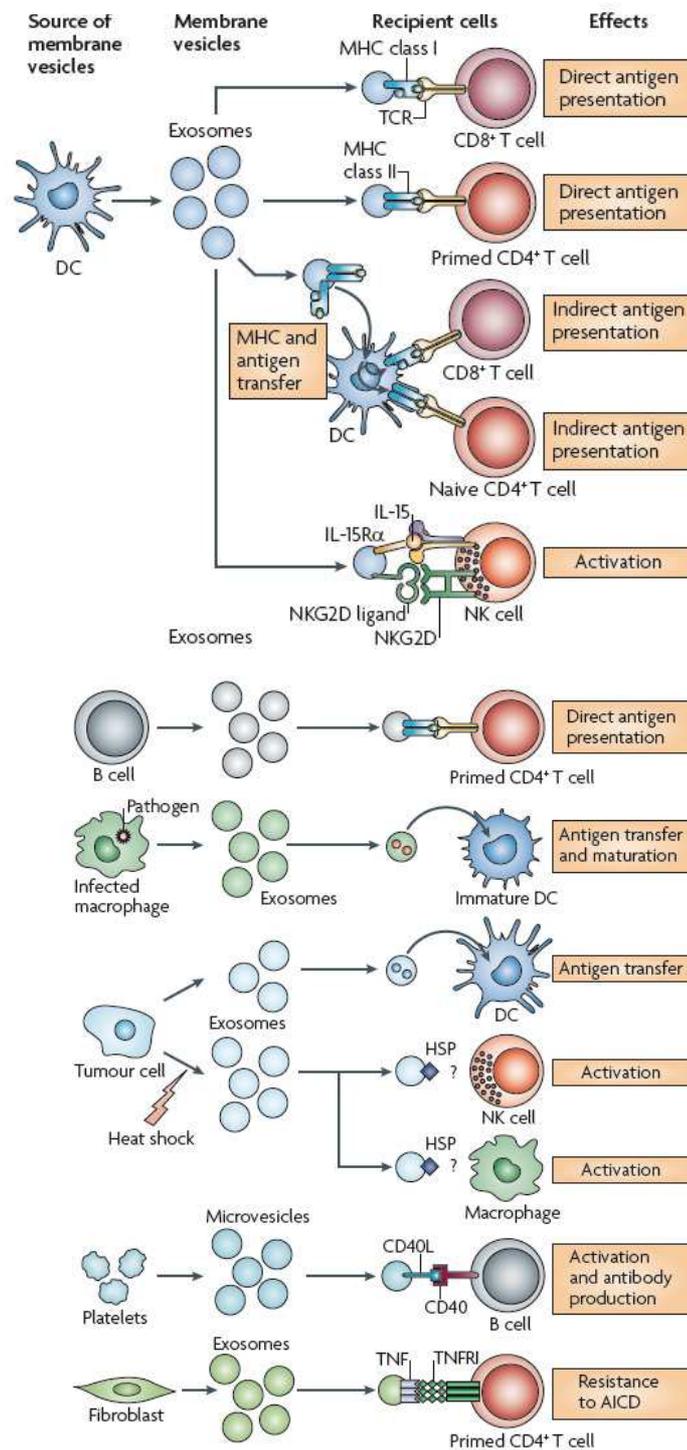


Figure 14 : Implications des VMs eucaryotes dans l'activation des cellules immunitaires (observations faites *in vitro*).

Les VMs comportent les mêmes antigènes et les mêmes peptides du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) que les cellules dont elles proviennent. Cette propriété leur permet d'activer les cellules du système immunitaire (cellules T, macrophages, cellules « natural killer », cellules dendritiques) de façon directe ou de façon indirecte par l'intermédiaire des cellules dendritiques (DC).

NK cell : cellules « natural killer » ; DC : cellules dendritiques ; MCH : complexe majeur d'histocompatibilité ; TNF : facteur de nécrose tumorale (Barany and Kahn, 1985; They et al., 2009)

produit des VMs permettant son excrétion dans le milieu de culture, assurant ainsi la survie des cellules (Lavialle et al., 2009). Des études assez anciennes effectuées sur les réticulocytes (érythrocyte immature) de mouton indiquent que les exosomes qu'ils produisent permettent de se débarrasser de certaines protéines membranaires, telles que le récepteur de la transferrine, devenues inutiles dans les cellules matures (Pan and Johnstone, 1983). Les exosomes constituent à ce titre une voie de dégradation alternative à la voie lysosomale.

3. Les vésicules membranaires, des acteurs de la coopération entre cellules

Les VMs constituent un rôle crucial dans les phénomènes de coopération, au sein de l'organisme quand il est pluricellulaire, au sein de l'espèce et même entre les espèces.

Chez les Mammifères, les vésicules peuvent être impliquées dans la communication cellulaire à différents niveaux. Le fait qu'elles soient émises dans les compartiments liquidiens tels que le sang favorise leur transport à longue distance ainsi que leur interaction avec des cellules du système immunitaire. En effet, les VMs jouent un rôle très important à différents stades de la réponse immunitaire (Figure 14). Comportant les mêmes antigènes et les mêmes molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) que les cellules qui leur ont donné naissance, ces vésicules ont la possibilité de déclencher différents types de réponse de la part du système immunitaire. Ainsi, comme les cellules présentatrices d'antigènes, les exosomes obtenus à partir de cultures de lignées tumorales ou infectées par des virus peuvent induire l'activation de lymphocytes T spécifiques (Wolfers et al., 2001). De même, ces vésicules arborant à leur surface les molécules du CMH peuvent les présenter directement aux lymphocytes T afin de les activer (Utsugi-Kobukai et al., 2003; Admyre et al., 2006; Luketic et al., 2007). Les exosomes libérés par les macrophages infectés par des pathogènes intracellulaires (tels que *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*) arborent en plus des molécules pathogéniques pro-inflammatoires qui stimulent la sécrétion de cytokines par les autres macrophages (Bhatnagar and Schorey, 2007; Bhatnagar et al., 2007).

Les VMs permettent également la coopération entre cellules tumorales, favorisant ainsi le développement et la propagation de cancers. Al-Nedawi *et al.* ont montré que les cellules gliales cancéreuses transfèrent le récepteur EGFRvIII (Epidermal Growth Factor Receptor VIII), exprimé seulement par une petite fraction de cellules au stade précoce du développement tumoral, aux autres cellules via la sécrétion d'ectosomes (appelés ici oncosomes du fait de leur origine). Ce transfert leur confère ainsi un phénotype tumoral (Al-Nedawi *et al.*, 2008; Al-Nedawi *et al.*, 2009). Les tumeurs se propagent également grâce à leur capacité à augmenter la vascularisation dans leur environnement. Ces effets angiogéniques peuvent être induits par le transfert d'ARNm et de microARNs via les VMs libérées par les cellules tumorales (ex : glioblastomes) qui sont incorporés et exprimés par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Skog *et al.*, 2008) (voir également paragraphe II. 4). Les VMs sécrétées par les cellules tumorales contribuent ainsi à créer un environnement prémétastatique favorable à leur propagation.

Comme décrit précédemment, les VMs produites par de nombreuses bactéries transportent des enzymes et des récepteurs qui contribuent à l'acquisition de nutriments et ainsi à la survie bactérienne (Bauman and Kuehn, 2006). Les VMs de *P. aeruginosa* portent à leur surface des protéases pouvant libérer dans l'environnement des acides aminés critiques pour la croissance bactérienne (Bauman and Kuehn, 2006). Ces VMs sont également associées au PQS (*Pseudomonas* quinolone signal) capable de lier le fer également essentiel à la viabilité des cellules et très souvent en quantité limitante dans les environnements biologiques (Mashburn and Whiteley, 2005; Dubern and Diggle, 2008). De façon similaire aux sidérophores, les VMs pourraient être un moyen d'accumuler les ions ferreux, le complexe PQS-fer-VMs libérant ensuite le fer dans la cellule après fusion avec la membrane externe.

Les VMs bactériennes apparaissent également impliquées dans la formation et la constitution des biofilms. Il a été montré que l'addition de VMs d' *Helicobacter pylori* dans des cultures stimule la formation de biofilms (Yonezawa *et al.*, 2009). Cette observation suggère que les vésicules sont bien responsables de la formation des biofilms et ne sont pas seulement piégées dans la matrice. L'ADN, souvent retrouvé associé à la surface de ces VMs bactérienne jouerait un rôle considérable dans l'adhésion des cellules et donc

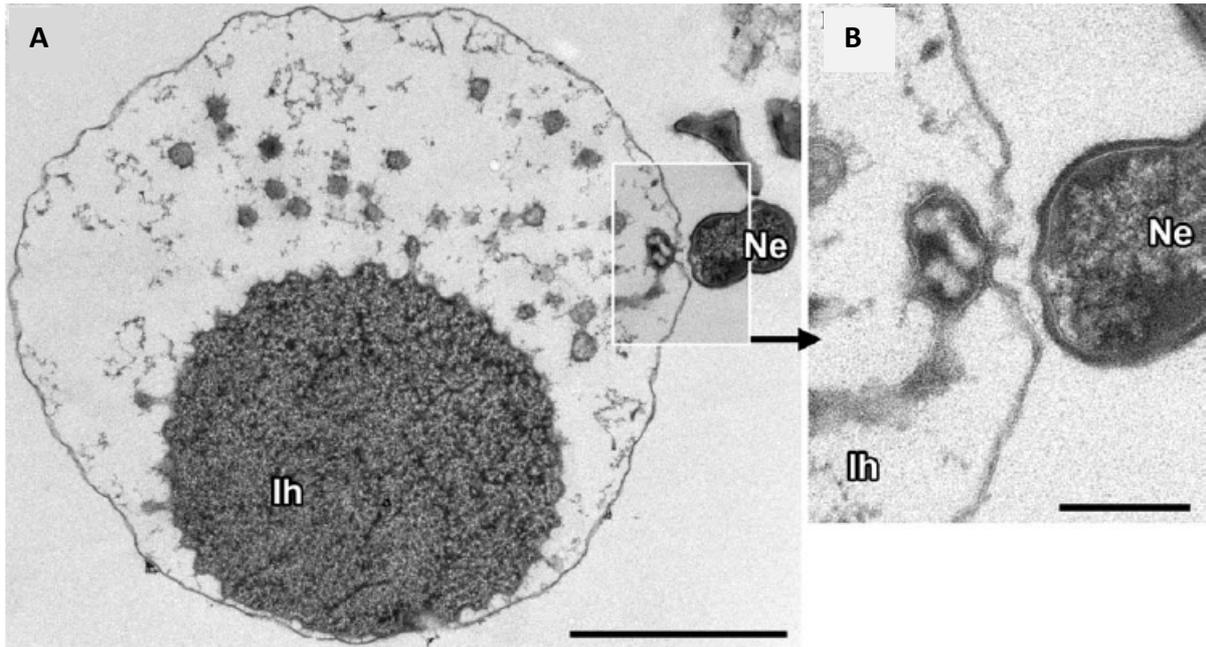


Figure 15 : Coupes fines observées au MET révélant les zones de contacts entre les VMs d'*Ignicoccus hospitalis* et l'archée symbiotique *Nanoarchaeum equitans*.

A) Cellule entière d'*I. hospitalis*.

B) Zoom sur le site de contact entre la VM produite par *I. hospitalis* et *N. equitans*

Echelle A : 1 μ m

Echelle B : 200 nm

(Junglas et al., 2008; Huotari and Helenius, 2011)

dans la production des biofilms (Whitchurch et al., 2002). En plus de leur rôle dans la nucléation, les VMs peuvent médier les interactions à l'intérieur et vers l'extérieur du biofilm, notamment via l'association avec des molécules du quorum sensing (Mashburn and Whiteley, 2005). De plus, les VMs du biofilm peuvent adsorber ou inactiver des molécules pouvant endommager le biofilm, telles que des antibiotiques, des anticorps...

Les VMs jouent également un rôle dans la coopération interespèces. Les VMs de *Moraxella catarrhalis*, une bactérie pathogène causant des infections respiratoires chez l'humain, transportent l'enzyme β -lactamase pouvant dégrader l'antibiotique β -lactam. Lorsque ces VMs sont mises en contact avec les bactéries *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, ces-dernières acquièrent la résistance à l'antibiotique (Schaar et al., 2011). Ces VMs contribueraient ainsi à la survie de différentes souches pathogènes au site de l'infection.

Chez les Archées, certaines observations de microscopie électronique laissent à penser que les VMs produites par *Ignicoccus hospitalis* dans l'espace intermembranaire pourraient être impliquées dans le transport de métabolites en direction de son archée symbiotique, *Nanoarchaeum equitans*. En effet, cette archée de petite taille ne possède pas tous les gènes nécessaires à la synthèse de certaines molécules (telles que les lipides, les acides aminés). De même, son ATP synthase incomplète et rudimentaire ne permet pas la synthèse d'ATP. Certaines coupes fines (Figure 15) montrent des vésicules d'*I. hospitalis* fusionnant pratiquement avec la membrane externe, en des sites où *N. equitans* est elle-même très proche de la membrane. Ces observations suggèrent un possible transfert de molécules essentielles d'*I. hospitalis* vers *N. equitans* par l'intermédiaire des VMs.

4. Les vésicules membranaires, des navettes pour le transfert d'acides nucléiques

La première évocation de structures membranaires associées à l'internalisation d'ADN par les cellules date de 1982, lorsque Kahn *et al.* mettent en évidence la présence d'expansions à la surface de la membrane externe de cellules compétentes

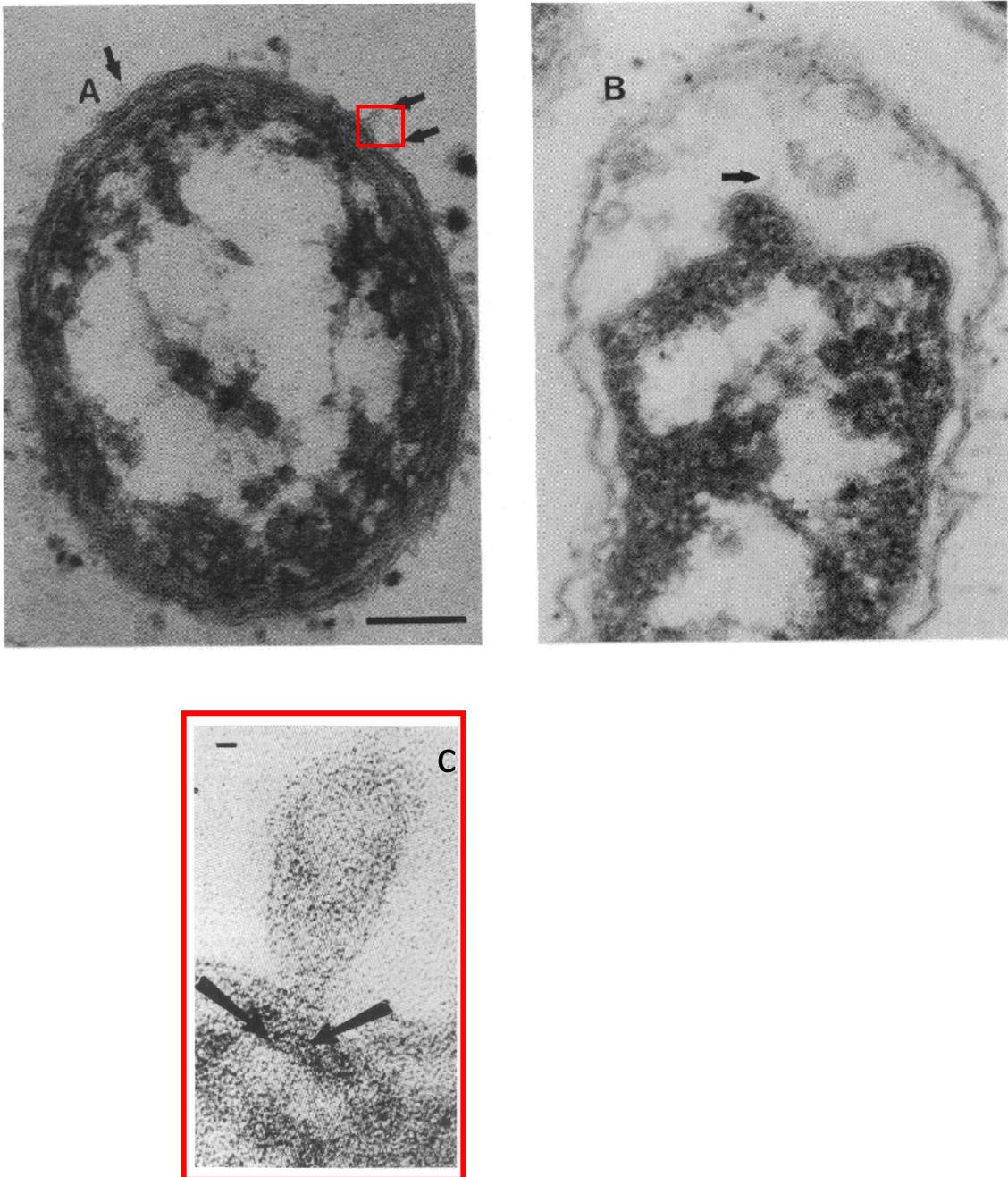


Figure 16 : Coupes fines de cellules d'*Haemophilus parainfluenzae* observées au MET.

- A) Des expansions membranaires, les « transformasomes » (flèches noires) sont observées à la surface de la membrane externe de cellules compétentes.
- B) Après addition de l'ADN servant à transformer la cellule, les transformasomes ne sont plus observés. Des vésicules intrapériplasmiques apparaissent (flèches noires).
- C) Zoom sur un transformasome. Les flèches noires indiquent la présence de pores membranaires probablement impliqués dans le passage de l'ADN du transformasome vers le périplasme.

Echelle A, B : 100 nm ; échelle C : 10 nm

(Kahn et al., 1982) (Barany and Kahn, 1985; Huotari and Helenius, 2011)

d'*Haemophilus parainfluenzae* et *Haemophilus influenzae* (Kahn et al., 1982). Ces structures d'environ 20 nm de diamètre qu'ils nomment un an plus tard « transformasomes » seraient, d'après ces auteurs, responsables de la capture et de la protection d'ADN exogène avant que celui-ci ne soit relargué dans le cytoplasme par l'intermédiaire de vésicules intrapériplasmiques (Figure 16) (Kahn et al., 1983). Quelques années plus tard, Dorward *et al.* observent la formation de VMs chez *Neisseria gonorrhoeae* associées à de l'ADN, circulaire et linéaire, ainsi qu'à de l'ARN (Dorward et al., 1989). Comme dans le cas des transformasomes, ces acides nucléiques sont résistants à des nucléases exogènes, ce qui prouve leur internalisation dans les VMs. En incubant des souches de *gonococci* dénuées de plasmides en présence des VMs sécrétées par *Neisseria gonorrhoeae*, ces auteurs mettent en évidence le transfert de plasmides via les VMs et soulignent ainsi l'existence d'un mécanisme d'échange génétique inexploré chez ces bactéries. Par la suite, Kolling et Matthews montrent que les VMs sécrétées par la souche *E. coli* O157:H7, en plus de transporter des toxines, comportent également de l'ADN codant pour des gènes de virulence (Kolling and Matthews, 1999). Ces auteurs montrent ensuite que ces gènes peuvent être transférés à d'autres souches (*Salmonella enterica*, *E. coli* JM109) et même, d'après les tests de cytotoxicité effectués, exprimés dans les cellules receveuses (Yaron et al., 2000). Cependant, d'autres expériences de transfert utilisant les VMs de *P. aeruginosa* indiquent que celles-ci sont capables de fusionner avec les cellules receveuses sans pour autant entraîner leur transformation (Renelli et al., 2004). Pour ces auteurs, l'absence d'une préparation de VMs complètement pure, dénuée de toute cellule, expliquerait les résultats observés par Yaron *et al.* Leurs travaux indiquent que l'ADN retrouvé associé aux vésicules peut en fait avoir deux origines : celui-ci peut être incorporé dans les VMs à partir du périplasma (impliquant un mécanisme de transport de l'ADN du cytoplasme vers le périplasma); d'autre part, l'ADN des vésicules peut être d'origine exogène, c'est-à-dire internalisé à partir de l'environnement extracellulaire.

De nombreuses études concernant le développement d'infections virales et cancéreuses rapportent le transfert d'acides nucléiques via les VMs eucaryotes. La coculture de différents types cellulaires (fibroblastes, monocytes, cellules endothéliales)

avec les corps apoptotiques produits par des cellules lymphoïdes porteuses du virus Epstein-Barr résulte en la capture d'ADN et l'expression de marqueurs spécifiques du virus dans les cellules receveuses (Holmgren et al., 1999). D'autres études décrivent le transport d'oncogènes par les exosomes, les ectosomes et les corps apoptotiques dérivés de cellules tumorales (Bergsmedh et al., 2001; Pap, 2011). La phagocytose de ces vésicules par des cellules non cancéreuses suivie de l'expression des gènes tumoraux qu'elles transportent entraînent l'acquisition du phénotype tumoral par ces cellules. En plus de transporter de l'ADN, les VMs peuvent également comporter des ARNm ainsi que des microARNs. Ratajczak *et al.* ont observé que les VMs produites par les cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines transfèrent de l'ARNm aux cellules souches hématopoïétiques dont l'expression déclenche l'activation de gènes impliqués dans la reprogrammation cellulaire (Ratajczak et al., 2006). Une autre étude révèle que les exosomes sécrétés par les mastocytes de souris transportent les ARNm d'environ 1300 gènes. Après incubation de ces exosomes avec des mastocytes humains, les ARNm murins ainsi que les protéines correspondantes sont retrouvés dans les cellules humaines indiquant que les ARNs transférés ont été traduits dans la cellule receveuse (Valadi et al., 2007). Les cellules cancéreuses utilisent également ce moyen pour promouvoir leur propagation. Les exosomes libérés par les cellules tumorales de glioblastome (tumeur du cerveau) transportent une grande variété d'ARNm correspondant à des protéines habituellement identifiées dans les cellules tumorales (ex : le récepteur EGFRvIII) (Skog et al., 2008). Après capture de ces VMs par des cellules endothéliales normales du cerveau, ces ARNs sont traduits et les protéines oncogéniques retrouvées dans les cellules receveuses. Une autre étude montre que les cellules gastriques métastatiques sécrètent des exosomes contenant les microARNs de la famille *let-7* (Ohshima et al., 2010). Les produits des gènes *let-7* ciblent habituellement les oncogènes et jouent donc un rôle suppresseur de tumeur. Ainsi, la libération des microARNs *let-7* via les exosomes permet la propagation de signaux oncogéniques et donc la propagation de la tumeur. De la même façon, de nombreuses études rapportent l'implication d'ectosomes sécrétés par des cellules tumorales dans le transfert d'ARNm et la favorisation du développement cancéreux (Wyszczynski and Ratajczak, 2009; Grange et al., 2011).

Le fait que les VMs (exosomes, ectosomes, corps apoptotiques) soient libérées dans le sang, les urines et autres fluides offre également l'opportunité d'accéder, d'une façon non-invasive, à de nombreuses informations sur les cellules cancéreuses d'origine, faisant de ces vésicules un nouvel outil de diagnostic pouvant aider à dépister les tumeurs (Koga et al., 2005; Al-Nedawi et al., 2008; Skog et al., 2008).

Jusqu'à présent, seule l'association d'ADN génomique aux VMs a été observée chez un groupe d'Archées, les Thermococcales (Soler et al., 2008). Aucune étude n'a cependant révélée que ces VMs sont impliquées dans le transport d'ADN.

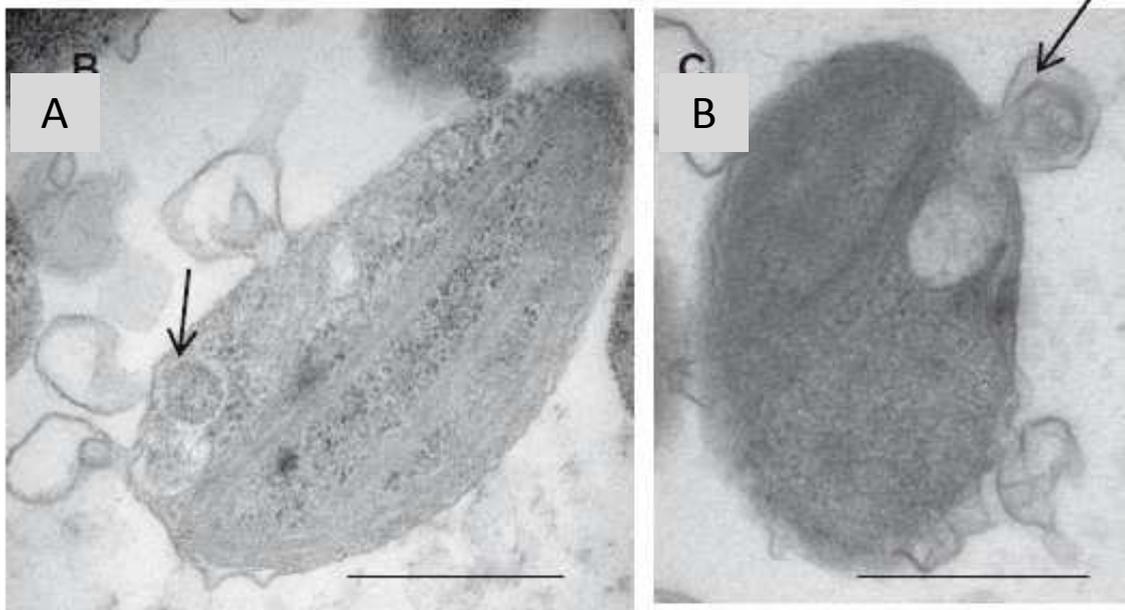


Figure 17 : Observation de cellules d'*Ostreococcus tauri* infectées par le virus OtV5 au MET.

- A) Les particules virales sont à l'intérieur de la cellule. Des vésicules bourgeonnent à sa surface.
- B) Les particules virales quittent la cellule, empaquetées dans les vésicules formées par la cellule.

Les flèches pointent les particules virales. Echelle : 500 nm

(Scita and Di Fiore, 2010; Thomas et al., 2011)

III. Interactions entre les vésicules membranaires et les virus

Les relations physiologiques et évolutives entre les VMs et les virus constituent un nouveau terrain de recherche qui, encore une fois, a été surtout bien exploré chez les Eucaryotes (Meckes and Raab-Traub, 2011). Si les VMs peuvent constituer un moyen de lutte pour contrer l'invasion des cellules par les virus, ces-derniers peuvent également tirer partie des vésicules et de la machinerie cellulaire conduisant à leur formation. D'autre part, de nombreuses similarités peuvent être observées entre les VMs et les virions, suggérant une relation évolutive étroite. La distinction entre ces deux entités peut même quelques fois devenir extrêmement floue.

1. Les vésicules membranaires, un moyen de lutte contre l'infection virale

Chez les organismes eucaryotes dotés d'un système de défense contre les agents infectieux, la propagation virale peut être entravée par la présentation des antigènes viraux portés par les VMs aux cellules immunitaires, conduisant à l'activation de ces dernières (Thery et al., 2009; Walker et al., 2009; Bobrie et al., 2011). Les VMs peuvent également contribuer à un mécanisme de défense innée. Par exemple, la cytidine déaminase APOBEC3G qui fait partie d'une machinerie cellulaire inhibant la réplication de rétrovirus, peut être empaquetée et transférée dans des exosomes afin de contrer la propagation du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Khatua et al., 2009). Il a également été montré que les exosomes libérés par les cellules trachéobronchiales humaines sont associés à l' α -2,6-acide sialique pouvant lier et neutraliser le virus influenza humain (Kesimer et al., 2009). Cette propriété confère ainsi à ces vésicules un rôle essentiel dans la défense innée au niveau des muqueuses. L'implication des VMs dans l'interaction cellule hôte-virus a également été rapportée dans les environnements planctoniques. En effet un des mécanismes de résistance à l'infection virale mise en place chez l'algue verte picoeucaryote *Ostreococcus tauri* consiste à bourgeonner des vésicules contenant des particules virales (Figure 17) (Thomas et al., 2011). Dans ce cas, aussi bien l'hôte que le virus sont préservés faisant de ce mécanisme davantage une stratégie de

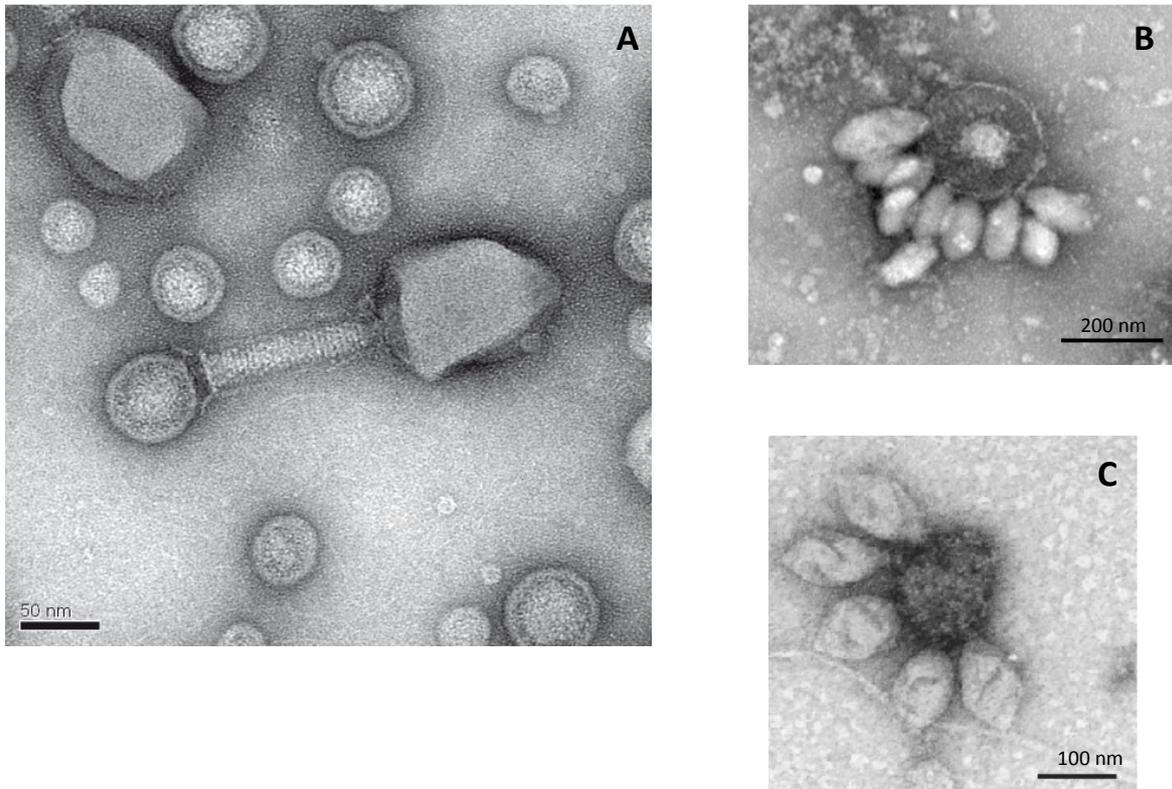


Figure 18 : Complexes VMs- virus observés au MET.

- A) Bactériophage T4 attaché à une VM sécrétée par *E. coli* (Manning and Kuehn, 2011)
- B) Guttavirus attachés à une VM sécrétée par l'Archée *Aeropyrum pernix* (Tomohiro MOCHIZUKI, communication personnelle)
- C) Virus PAV1 attachés à une VM sécrétées par l'Archée *Pyrococcus abyssi* (Geslin et al., 2003)

tolérance du virus que de résistance. Jusqu'à présent, un seul article rapporte l'interaction virus-VMs produites par les bactéries. Manning et Kuehn montrent en effet

que la co- incubation d'une grande quantité de VMs produites par *E. coli* avec des bactériophages T4 entraîne une drastique réduction de l'infection phagique (d'environ 90%) (Manning and Kuehn, 2011). En utilisant la microscopie électronique, ces auteurs furent en mesure d'observer de nombreux complexes bactériophages-VMs (Figure 18 A). L'utilisation de chloroforme se révélant inefficace pour séparer les complexes VMs-bactériophages, indique une association irréversible (Manning and Kuehn, 2011). De façon intéressante, d'autres observations rapportent des interactions similaires entre les VMs de diverses archées et leurs virus, telles qu'entre l'archée *Aeropyrum pernix* et des virions de la famille des Guttaviridae (Figure 18 B) et entre les VMs de *Pyrococcus abyssi* et le virus PAV1 (Pyrococcus abyssi virus 1) (Figure 18C). Ces données suggèrent que la sécrétion de VMs, en constituant un leurre cellulaire pour les virus, contribue à la défense innée bactérienne et certainement à plus grande échelle, chez tous les microorganismes.

2. L'utilisation du processus de vésiculation par les virus

L'utilisation des VMs par les virus afin de promouvoir le développement de l'infection virale est un phénomène essentiellement étudié chez les Eucaryotes, particulièrement dans le cas des infections humaines. Les cellules infectées produisent des VMs contenant des protéines et/ ou des acides nucléiques viraux.

Comme dans le cas des cellules tumorales, les VMs libérées par les cellules infectées par les virus interagissent le plus souvent avec les cellules du système immunitaire, afin de contrer celles-ci et laisser la voie libre à l'infection virale. Les exosomes sécrétés par les lymphocytes B infectés par le virus Epstein-Barr transportent la protéine LMP1 (latent membrane protein 1) dont l'activité induit une inhibition de la prolifération des lymphocytes T, ainsi qu'une réduction de la cytotoxicité des cellules NK (natural killer) et de la production d'anticorps (Meij et al., 1999; Dukers et al., 2000). De plus cette

protéine virale interagissant avec le récepteur EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)
à activité oncogénique induit la transformation des lymphocytes B en cellules malignes

(Wang et al., 1985). Les exosomes délivrés par les cellules contaminées par le virus Epstein-Barr permettent également le transfert de microARNs viraux conduisant, au niveau des cellules cibles comme les cellules dendritiques, à la répression de gènes immunostimulateurs tels que le gène *CXCL11* (Pfeffer et al., 2004; Pegtel et al., 2010). Des effets immunosupresseurs similaires ont été rapportés pour les exosomes libérés par les cellules épithéliales intestinales infectées par des Rotavirus (Barreto et al., 2010). Ces VMs arborent le facteur TGF- β 1 (Transforming growth factor- β 1) responsable d'une drastique diminution de la viabilité et de la prolifération des lymphocytes T. De nombreuses études rapportent également l'interaction des VMs avec les cellules immunitaires dans le cas du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) dont un des symptômes est une diminution des lymphocytes CD4+. Les travaux de Lenassi *et al.* révèlent que la protéine virale Nef (Negative regulatory factor) connue pour ses effets délétères sur les lymphocytes CD4+ est exportée via les exosomes libérés par des cellules T infectées par le VIH (Lenassi et al., 2010). Ces VMs contribuent ainsi à l'apoptose des lymphocytes T CD4+ sains situés à proximité. En plus de ses effets immunosupresseurs, ces auteurs montrent que la protéine Nef conduit à une augmentation de la libération d'exosomes par les cellules infectées, favorisant ainsi la formation d'un environnement propice à la propagation du virus.

Outre leurs effets modulateurs sur le système immunitaire, les VMs secrétées par les cellules subissant une infection virale peuvent transférer aux cellules saines des récepteurs permettant l'entrée des virus. Pour infecter efficacement les cellules, le VIH-1 (Virus de l'immunodéficience humaine-1) requiert, en plus du récepteur CD4, l'interaction avec l'un des corécepteurs CCR5 ou CXCR4 (récepteurs de chémokines). Ces récepteurs exprimés par différentes cellules immunitaires telles que les lymphocytes T, les macrophages, les mégacaryocytes et les cellules dendritiques peuvent être transférés par l'intermédiaire d'ectosomes à d'autres types cellulaires qui en sont dépourvus élargissant ainsi le répertoire des cellules pouvant être infectées par le virus (Mack et al., 2000)

(Rozmyslov

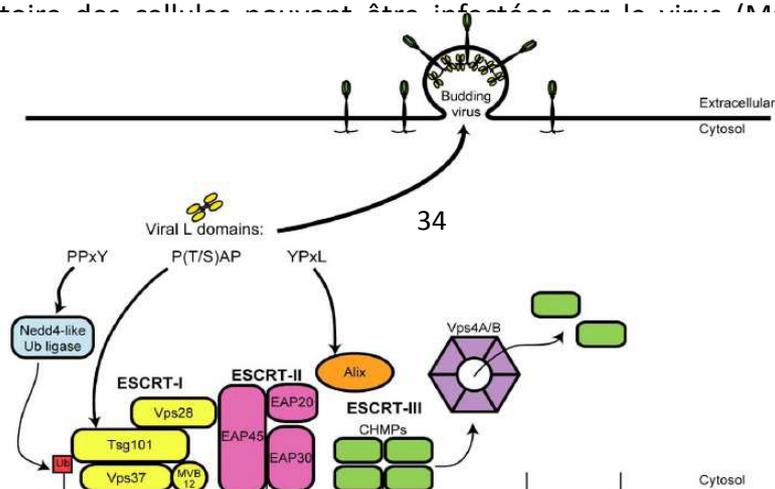


Figure 19 : Recrutement de la machinerie ESCRT par les protéines virales comportant un domaine-L.

Ces domaines protéiques peuvent interagir avec trois types de protéines associées au complexe ESCRT: ubiquitine ligase Nedd4, Tsg101 ou AIP1/Alix.
(Chen and Lamb, 2008)

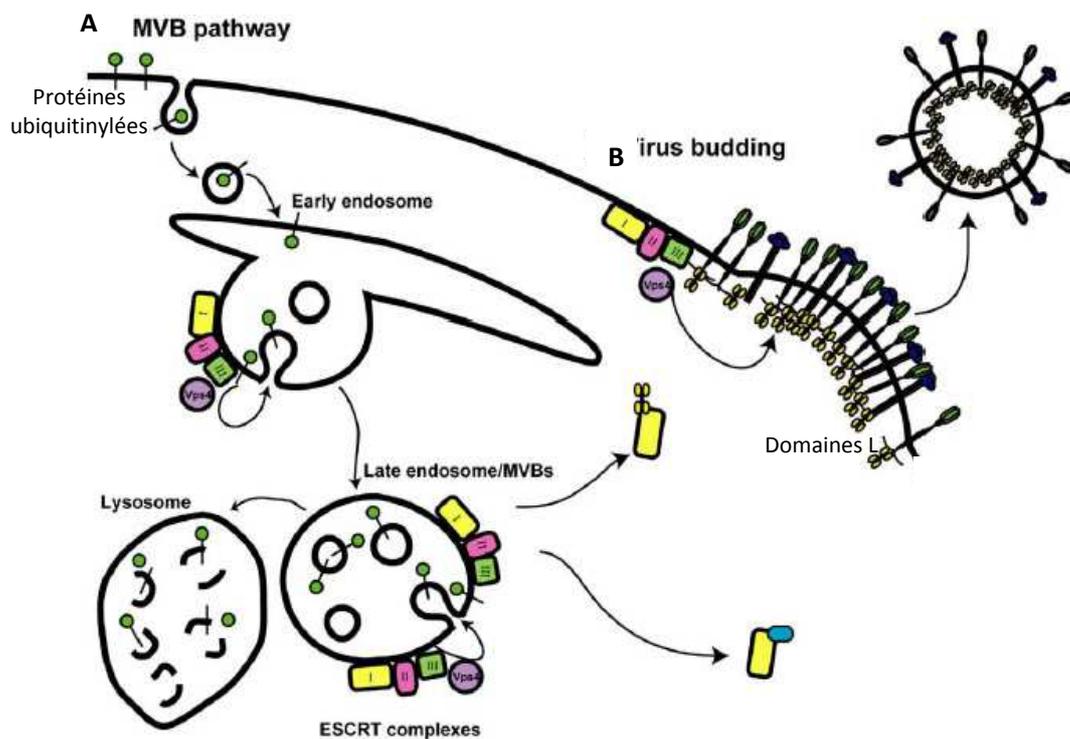


Figure 20 : Utilisation de la machinerie ESCRT pour le bourgeonnement des virus enveloppés.

A) Le système ESCRT conduit à la formation de vésicules intraluminales (VILs) au niveau des endosomes tardifs résultant en « multivesicular bodies » (MVBs). Ceux-ci peuvent fusionner avec la membrane plasmique libérant ainsi des exosomes dans l'espace extracellulaire ou bien fusionner avec les lysosomes afin de dégrader les protéines ubiquitinylées.

B) Les protéines de certains virus enveloppés recrutent les composants du système ESCRT via leurs domaines- L redirigeant ainsi la machinerie de formation des MVBs au niveau de la membrane plasmique pour le bourgeonnement du virus.
(Gruenberg, 2001; Chen and Lamb, 2008)

comme point commun avec les VMs de se former par bourgeonnement à partir de la membrane plasmique de la cellule d'origine. Cette constatation suggère une possible réquisition de la machinerie cellulaire de formation des VMs par ces virus. Ceci a été mis en évidence suite à l'observation de l'incapacité de rétrovirus à bourgeonner lorsque certains domaines protéiques viraux, nommés « domaines-L » sont mutés (Morita and Sundquist, 2004; Schmitt and Lamb, 2004). Des analyses biochimiques et structurales ont montré que ces motifs peuvent interagir avec des protéines cellulaires, normalement impliquées dans les voies conduisant à la formation des exosomes. Par exemple, la structure atomique de deux composants clés intervenant dans le système ESCRT, Tsg101, composant du complexe ESCRT-I, et AIP1/Alix, une protéine impliquée dans l'interaction ESCRT-I et ESCRT-III, révèle la présence de sites de fixation pour les domaines-L (Figure 19) (Fisher et al., 2007; Lee et al., 2007). D'autres études montrent que certains de ces domaines viraux peuvent également lier l'ubiquitine ligase Nedd4 agissant en amont du complexe ESCRT (Martin-Serrano et al., 2005). Ces interactions entre les domaines-L viraux et les protéines du système ESCRT redirigent la machinerie ESCRT au niveau de la membrane plasmique et conduisent au bourgeonnement du virus (Figure 20). L'étape finale de bourgeonnement, lorsque les vésicules se séparent de la membrane est la moins bien comprise et semblerait impliquer, comme dans le cas de la formation des exosomes, l'ATPase AAA Vps4 (Chen and Lamb, 2008). La liste des virus utilisant la machinerie ESCRT-Vps pour leur bourgeonnement apparaît maintenant assez vaste (Tableau 6).

Cependant dans certains cas, le bourgeonnement de virus enveloppés s'avère plus complexe et le recrutement du système ESCRT seul est insuffisant. Dans d'autres cas, le bourgeonnement de ce type de virus est même totalement indépendant de cette voie. Contrairement à la plupart des rétrovirus chez qui la protéine Gag portant le domaine-L est suffisante pour le bourgeonnement de virus, le virus Foamy nécessite en plus l'implication de la protéine Env (Shaw et al., 2003). Dans le cas du virus enveloppé influenza, aucune protéine comportant un domaine-L n'est exprimée et il a été montré que ce virus ne requiert pas l'activité de la protéine Vps4 pour terminer son

Virus	Protéine virale possédant le domaine-L	Protéine du système ESCRT interagissant directement avec le domaine-L
<i>Retrovirus</i> Virus de l'immunodéficience humaine-1 (VIH-1) Virus du sarcome de Rous Virus de l'anémie infectieuse équine Virus Mason-Pfizer du singe Virus de la leucémie murine Virus de la leucémie à cellules T humaines Virus Foamy	Gag (p6) Gag (p2b) Gag (p9) Gag (p24) Gag (MA, p12) Gag (MA) Gag	Tsg 101 ; AIP1/Alix Nedd4 AIP1/Alix; AP-2 Tsg 101 ; Nedd4 Tsg 101 ; AIP1/Alix Nedd4.1; Tsg101 Tsg 101
<i>Rhabdovirus</i> Virus de la stomatite vésiculeuse Virus de la rage	M M	Nedd4 Nedd4
<i>Filovirus</i> Virus Ebola Virus de Marburg	VP40 VP40	Tsg 101 ; Nedd4 Tsg 101
<i>Arenavirus</i> Virus de la chorioméningite lymphocytaire Virus de Lassa	Z Z	Tsg 101 Tsg 101
<i>Paramyxovirus</i> Virus parainfluenza-5 Virus Nipah Virus Sendai	M M C	Non déterminé Non déterminé AIP1/Alix
<i>Autres virus à ARN</i> Virus de l'encéphalite japonaise Virus de la fièvre catarrhale	NS3 NS3/3A	Tsg 101 Tsg 101
<i>Virus à ADN</i> Virus de l'herpès simplex-1 Virus Epstein-Barr	F13L Rta	Non déterminé Tsg 101

Tableau 6 : Virus enveloppés codant pour des protéines avec des domaines-L interagissant avec les protéines cellulaires impliquées dans la machinerie ESCRT-Vps.

(Chen and Lamb, 2008)

bourgeonnement (Chen et al., 2007). Un autre mécanisme, nécessitant la protéine hématagglutinine (HA) semble ici être à l'œuvre. De plus, le regroupement de cette protéine et des autres protéines virales au niveau de radeaux lipidiques membranaires

semble favoriser le bourgeonnement du virus influenza. En effet, la vésiculation serait induite par des attractions locales hydrophiles entre les protéines du virus et leur environnement lipidique entraînant la courbure de la membrane (Reynwar et al., 2007). Cette association des protéines virales au sein de ces microdomaines lipidiques serait par ailleurs suffisante pour entraîner le bourgeonnement d'autres virus enveloppés tels que le VIH-1 (Ono and Freed, 2001), le virus Ebola (Bavari et al., 2002) ou le virus de la stomatite vésiculeuse (Brown and Lyles, 2003).

Dans certains cas, le mécanisme de bourgeonnement des particules virales n'intervient pas au niveau de la membrane plasmique, mais à une étape ultérieure. C'est le cas du virus herpès humain-6 (HHV-6) dont l'assemblage des virions s'effectue au niveau de l'appareil de Golgi, ceux-ci étant ensuite transférés dans les « multivesicular bodies » (MVBs) où ils acquièrent, en plus de leurs glycoprotéines, le marqueur des exosomes CD63 (Mori et al., 2008). Les MVBs contiennent alors un mélange d'exosomes cellulaires et de particules virales qui seront libérés hors de la cellule via leur fusion avec la membrane plasmique. Le virus HHV-6 utilise donc ici la voie de sortie des exosomes pour son propre relargage.

Les virus ont donc développé des stratégies utilisant les vésicules comme moyen d'attaque pour déprimer ou utiliser à leur profit les cellules du système immunitaire, pavant ainsi la voie à l'infection. Les virus à enveloppe peuvent en outre détourner la machinerie cellulaire de formation des exosomes pour fabriquer leurs virions, même si les processus de bourgeonnement apparaissent en réalité beaucoup plus divers.

3. Vésicules membranaires ou virus ?

Les similarités structurales et fonctionnelles entre les VMs et les virus enveloppés soulèvent des questions intéressantes sur leurs relations évolutives et sur la nature de ces entités. La distribution de taille des VMs et des virus eucaryotes montre un recouvrement

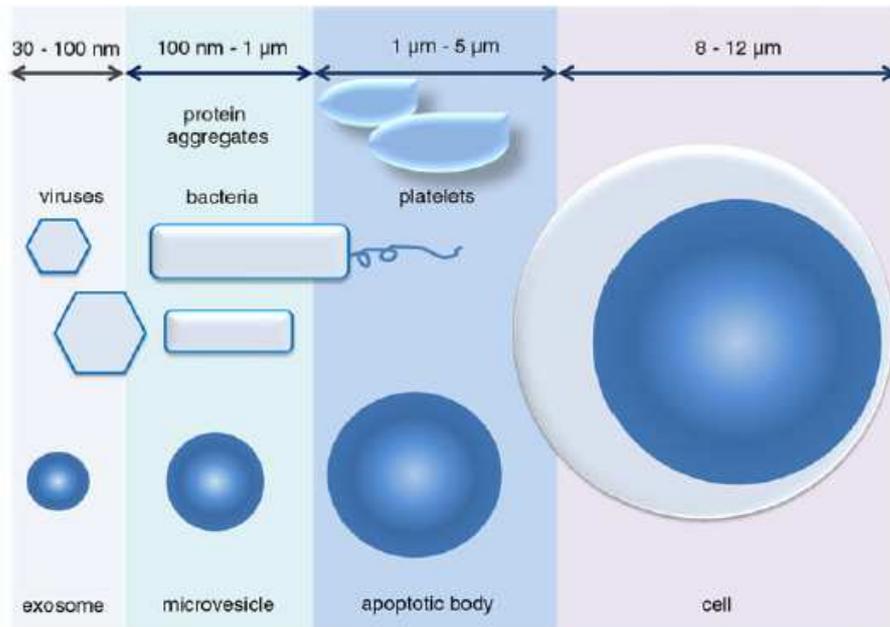


Figure 21 : Gamme de tailles des différents types de VMs chez les Eucaryotes. Les exosomes et les virus partagent le même intervalle de tailles. (Gyorgy et al., 2011)

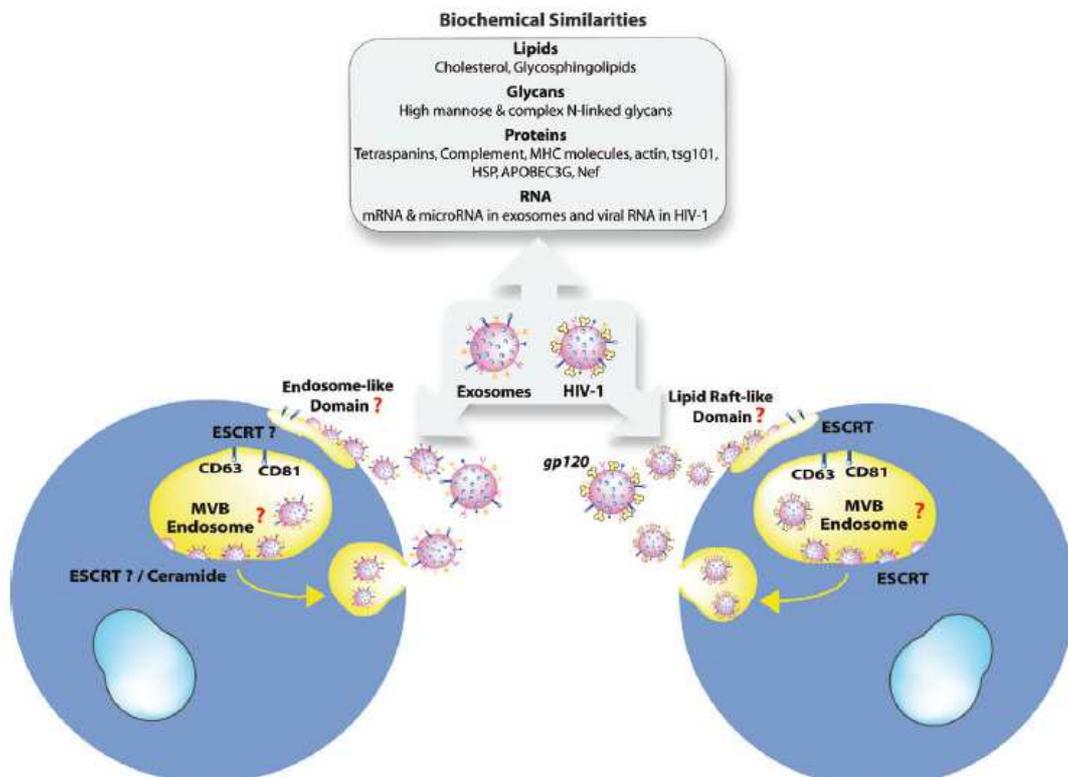


Figure 22 : Similarités concernant la composition biochimique, le mécanisme de biogenèse et de relargage entre les exosomes et les virions du VIH. MVB: multivesicular body ; ESCRT : endosomal sorting complex required for transport (Izquierdo-Useros et al., 2011)

important virus-exosomes en particulier (Figure 21) et leur densité sur gradient de saccharose est comprise entre 1,13 et 1,21 g/mL ce qui rend leur séparation difficile. De plus, les VMs et les virus à enveloppe correspondent à des structures vésiculaires formées de lipides membranaires et de protéines, transportant des acides nucléiques pouvant être relargués et exprimés dans le cytoplasme de cellules receveuses (Yaron et al., 2000; Bergsmedh et al., 2001; Valadi et al., 2007; Skog et al., 2008). Ainsi, la description des VMs semble correspondre à celle de virus enveloppés et la limite entre ces deux structures peut devenir floue. Une différence majeure cependant est la capacité des virus à coder au moins pour une protéine de capsid assurant le transport du génome viral.

La similarité VMs-virus enveloppés a particulièrement été étudiée dans le cas des exosomes et des rétrovirus. Ces similarités se situent au niveau biochimique ainsi qu'au niveau du mécanisme de biogenèse et de relargage.

D'un point de vue biochimique (Figure 22), ces deux entités sont constituées d'une membrane lipidique davantage enrichie en cholestérol et en glycosphingolipides que la membrane plasmique (Aloia et al., 1993; Wubbolts et al., 2003). Les rétrovirus et les exosomes partagent également le même ensemble de protéines, telles que des protéines de la membrane plasmique (tétraspanines, molécules du CMH, intégrines...) et des protéines cytoplasmiques (actine, Tsg101, protéines de choc thermique...) (Thery et al., 2002; Gould et al., 2003; Ott, 2008). De plus, les profils protéiques obtenus pour les particules virales du VIH et les exosomes de macrophages sont très similaires (Nguyen et al., 2003). D'autre part, il a été montré que les exosomes peuvent incorporer des protéines virales lorsqu'ils sont sécrétés par des cellules infectées par le VIH, comme cité précédemment avec le cas de la protéine virale Nef (Lenassi et al., 2010). Krishnamoorthy *et al.* ont également souligné que les exosomes et les virions du VIH-1 partagent un glycome (ensemble des sucres) commun (Krishnamoorthy et al., 2009). Ces observations renforcent les liens biochimiques entre les exosomes et les rétrovirus et expliquent la facilité qu'ont les particules rétrovirales à détourner les mécanismes de défense immunitaires.

Des points communs concernant le mécanisme de formation et de relargage peuvent également être identifiés entre les exosomes et les rétrovirus. Les exosomes peuvent se former au niveau de la membrane endosomale ou bien directement au niveau de la membrane plasmique (« endosome-like domains ») (voir paragraphe I. 1). De façon similaire, ces deux sites de bourgeonnement ont été identifiés dans le cas du VIH-1. Il a par exemple été montré que les virions peuvent bourgeonner au niveau des endosomes des macrophages et des cellules dendritiques (Blom et al., 1993; Raposo et al., 2002). Cependant, dans les lymphocytes T, les particules virales et les exosomes se forment essentiellement au niveau de zones locales de la membrane plasmique (Booth et al., 2006). Comme cité précédemment (voir paragraphe I. 1), deux mécanismes peuvent conduire à la formation des exosomes : la voie nécessitant le complexe ESCRT (Williams and Urbe, 2007; Hurley, 2008) et une voie indépendante, mettant en jeu des microdomaines riches en céramides (Trajkovic et al., 2008). Comme pour de nombreux virus enveloppés (voir paragraphe précédent), il a été rapporté que le virus VIH-1 détourne la machinerie ESCRT pour effectuer son bourgeonnement (Morita and Sundquist, 2004; Bieniasz, 2006). L'utilisation d'inhibiteurs de la formation du céramide n'entrave pas la production de ces particules virales mais semble cependant réduire leur infectivité (Brugger et al., 2006; Izquierdo-Useros et al., 2009).

Des similarités peuvent également être mises en évidence dans la façon dont les rétrovirus et les exosomes interagissent avec leurs cellules cibles. Certaines études démontrent que les exosomes peuvent fusionner directement avec la membrane plasmique des cellules receveuses (Parolini et al., 2009; Thery et al., 2009). Un tel mécanisme existe également chez les rétrovirus. La fusion nécessite dans ce cas l'interaction des glycoprotéines de l'enveloppe virale (protéines Env) avec des récepteurs cellulaires. Ainsi, la protéine gp120 du virus VIH-1 interagissant avec le récepteur CD4 des lymphocytes T déclenche la fusion du virus avec la membrane plasmique et donc l'entrée du virus dans la cellule (Wilén et al., 2012). Si les protéines virales impliquées dans ce mécanisme sont plutôt bien caractérisées, les molécules agissant dans le cas des exosomes sont peu connues. D'autres études montrent que les exosomes peuvent

également subir une internalisation dans la cellule, via la voie endocytique (Feng et al., 2010; Tian et al., 2010). Ceci implique l'interaction entre des récepteurs situés à la surface des cellules et des molécules d'adhésion (telles que ICAM1), la phosphatidylsérine et d'autres molécules portées à la surface des exosomes (Thery et al., 2009). De façon similaire, les particules du VIH peuvent être endocytosées indépendamment d'une interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe et les récepteurs cellulaires. Ceci a notamment été observé lors de l'infection de cellules telles que les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les cellules lymphoïdes, (Fackler and Peterlin, 2000; Blanco et al., 2004). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'endocytose des virions sont à ce jour toujours mal compris.

Deux modèles alternatifs ont été proposés pour expliquer les similitudes existant entre les exosomes et les rétrovirus (Izquierdo-Useros et al., 2011). La première hypothèse, de « l'exosome troyen » (« Trojan exosome hypothesis ») considère que les exosomes sont les ancêtres des rétrovirus, ceux-ci ayant acquis les traits qui leur sont spécifiques en conséquence d'une évolution divergente (Gould et al., 2003). Le second modèle postule que les exosomes ne sont pas à l'origine des rétrovirus, mais que leur ressemblance du point de vue biochimique permet aux rétrovirus d'utiliser la même machinerie cellulaire de base pour leur bourgeonnement, faisant de ce modèle, un modèle convergent (Pelchen-Matthews et al., 2004). Bien qu'avançant des mécanismes différents pour expliquer l'origine des rétrovirus, ces deux hypothèses supposent l'existence d'un lien évolutif entre exosomes et rétrovirus et sont toutes deux soutenues par les ressemblances existant entre ces deux entités. Cependant, actuellement, aucun argument ne permet de soutenir un modèle plus que l'autre. Une troisième hypothèse que nous pourrions avancer serait la possibilité de l'acquisition par la cellule de gènes viraux permettant le bourgeonnement. En effet, beaucoup d'études soulignent que les cellules ont capturé de nombreux gènes viraux au cours de l'évolution (de Parseval and Heidmann, 2005; Forterre and Prangishvili, 2009), ceux-ci ayant eu très souvent des conséquences majeures dans l'acquisition de nouvelles caractéristiques cellulaires (Bell, 2001; Jalasvuori and Bamford, 2008).

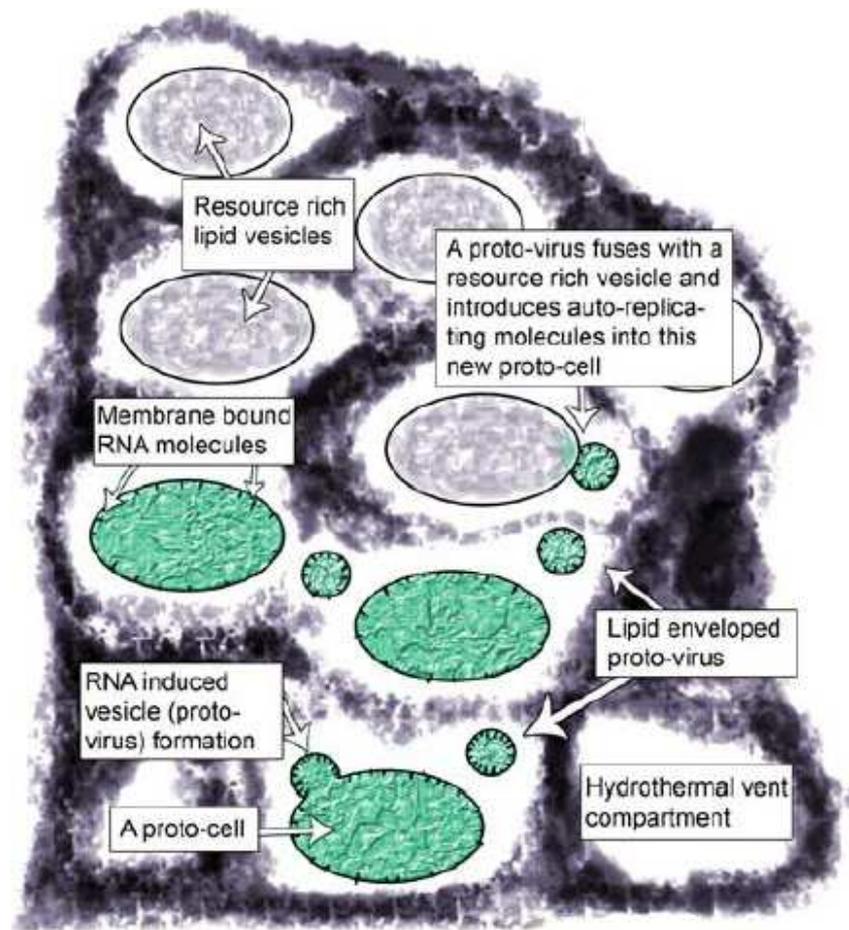


Figure 23 : Les « proto-virus » et la dissémination des molécules autorépliquatives (ARN) au sein des cheminées hydrothermales. (Jalasvuori and Bamford, 2008)

La production des VMs rappelle également la relation qu'ont certains virus enveloppés avec leur hôte. En effet, si de nombreux virus sortent de la cellule par un processus lytique, d'autres sont produits de façon continue sans gêne pour le développement de l'hôte. Cet état, appelé état porteur a notamment été observé chez des virus d'Archées, tel les virus d'Archées hyperthermophiles SSV1 (*Sulfolobus spindle-shaped virus 1*) ou TPV1 (*Thermococcus prieurii virus 1*) ainsi que chez le groupe des pleolipovirus infectant des archées halophiles. Les virions appartenant à ce dernier groupe sont enveloppés de la même bicouche lipidique que celle des cellules hôtes dont ils bourgeonnent et possèdent uniquement deux ou trois protéines structurales (Pietila et al., 2012). Si le mécanisme moléculaire précis à l'origine de leur formation reste à ce jour inconnu, leur bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique sans lyse de la cellule hôte leur confère de grandes ressemblances avec le bourgeonnement des ectosomes eucaryotes, à la différence près que ces virions induisent un retard de croissance chez les cellules infectées par rapport aux cellules saines.

L'idée selon laquelle l'émergence des virus est très intimement liée à la formation initiale de vésicules membranaires a été proposée par Jalasvuori et Bamford (Jalasvuori and Bamford, 2008). Ces derniers suggèrent en effet que les premiers virus (ou « proto-virus ») ont émergé lors du premier âge du monde à ARN quand des molécules d'ARN catalytiques ont pu se lier à la membrane des premières cellules (ou « proto-cellules »), déclenchant le bourgeonnement de vésicules. Le transfert de ces molécules via les vésicules/« proto-virus » conférait alors aux « proto-cellules » avec qui ils fusionnaient (infection) la capacité de bourgeonner (Figure 23). Ces « proto-virus » assurant le transfert des molécules informatives et catalytiques d'ARN, et ne tuant pas leurs hôtes, auraient permis l'évolution des premières « proto-cellules ». Cependant, la majorité des études décrivant la fusion de membranes mentionnent l'implication de protéines dans ce mécanisme (Backovic and Jardetzky, 2011; Zhou and Platt, 2011)(et voir précédemment). Or à l'époque du premier âge du monde à ARN, les ribosomes et donc les protéines n'existaient pas. Certains articles récents indiquent cependant que les peptides ont également la capacité de déclencher la fusion des membranes (Inaba et al., 2011; Fuhrmans and Marrink, 2012). L'hypothèse d'une fusion entre les « proto-virus » et les

« proto-cellules » émise par Jalasvuori et Bamford pourraient alors s'expliquer par l'intervention de peptides synthétisés de façon abiotiques.

Ainsi une meilleure connaissance du mécanisme de production des vésicules modernes pourrait permettre de mieux comprendre l'origine des virus. Il pourrait être particulièrement intéressant de déterminer s'il existe des relations évolutives entre certaines protéines intervenant dans la formation des vésicules et les protéines de capsides. L'identification d'homologies entre les protéines entrant dans la constitution des vésicules et celles des enveloppes virales pourraient donner à ce titre des informations significatives. Cependant, à ce jour, aucun homologue n'a pu être identifié dans les vésicules et dans les capsides/enveloppes virales.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

Culture des Thermococcales en anaérobiose à haute température

Les souches de Thermococcales sont mises à pousser en anaérobiose dans des bouteilles Wheaton de 1L, dans 500 mL de milieu riche mis au point par le professeur Wolfram Zillig (voir composition en Annexe 1) ou dans 500 mL de milieu minimum (voir composition en Annexe 2). Les cultures sont inoculées au 1/500^{ème} (v/v) à partir de souches pures isolées durant la campagne AMISTAD et répertoriées dans la collection du laboratoire (Lepage et al., 2004). L'incubation est réalisée sur la nuit (14-16h) à 85°C en agitation à 150 rpm.

Purification des vésicules membranaires

500 mL de culture (phase stationnaire) sont centrifugés deux fois à 8 000g pendant 20 min, puis une fois à 16 000g pendant 20 min (Avanti™ J26 XP, Beckman) en utilisant le rotor F500, afin d'enlever les cellules et les débris cellulaires. Le surnageant est collecté et ultracentrifugé dans des tubes en polycarbonates à 120 000g pendant 2h à 8°C (ultracentrifugeuse Optima™ L80 XP, Beckman) en utilisant le rotor 45 Ti. Le surnageant est éliminé et les culots contenant les VMs sont resuspendus dans 8mL de tampon Mu x1 (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH7,5, 1 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄) et filtré deux fois avec un filtre 0,2 µm pour enlever le reste des débris cellulaires. Le filtrat est ultracentrifugé dans des tubes en polyallomer, à 120 000g pendant 2h à 4°C (ultracentrifugeuse Optima™ TLX, Beckman) en utilisant le rotor TLA 100.4. Les culots de VMs sont alors resuspendus dans 500 µL de tampon Mu x1 et conservés à 4°C.

Observations de microscopie électronique

Microscopie électronique à transmission pour l'observation des cellules (coloration négative). Une goutte de 20 µL d'échantillon à observer est déposée sur une grille de nickel carbonée de 400 mailles (Euromedex). Après une minute, cette goutte est absorbée sur du papier filtre (Prolabo), puis la grille est rincée avec une goutte d'eau distillée stérile. Enfin, une goutte d'acétate d'uranyle à 2% (p/v) est déposée sur la grille

pendant 1 minute. L'excès est alors éliminé avec du papier filtre et la grille est rangée. Elle est observée une fois sèche, au minimum quelques heures plus tard avec un microscope électronique à transmission Philips EM208 à une tension d'accélération de 80kV. Les images sont prises par une caméra d'acquisition CCD AMT (Hamamatsu).

Microscopie électronique à transmission pour l'observation d'ADN et des vésicules membranaires (coloration positive). 5 μ L de solution (ADN extrait des VMs ou VMs dans 1M de NaCl) sont déposés sur une grille en cuivre 600 mailles recouverte d'un fin film de carbone, préalablement chargée positivement dans un plasma de pentylamine. Les grilles sont rincées avec quelques gouttes d'acétate d'uranyle à 2% (p/v) puis séchées et observées comme précédemment décrit par Beloin *et al.* (Beloin et al., 2003) en fond noir annulaire avec un microscope électronique à transmission Zeiss 902.

Coupes fines de cellules. Les cellules sont fixées dans 3% de glutaraldéhyde, avec ou sans rouge de ruthénium à 0,5% ajoutés dans le milieu de culture à température ambiante pendant 60 min. Après 3 lavages dans du tampon cacodylate 0,1M, pH 7,2, les cellules sont fixées en les incubant avec 1% de tétraoxyde d'osmium, avec ou sans rouge de ruthénium à 0,5% dans du tampon cacodylate 0,1M pH 7,2 pendant 60 min à température ambiante. Les cellules sont de nouveau lavées 3 fois dans du tampon cacodylate 0,1M, pH 7,2 et concentrées dans des billes de gélatine 10% (p/v) dans du tampon cacodylate 0,1M, pH 7,2 par centrifugation. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des passages successifs dans une série de bain d'éthanol de concentration croissante (30 à 90%) avant d'être scellés dans de la résine Epoxy (Embed 812, Electron Microscopy Sciences, Washington, Pa, USA) que l'on laisse polymériser 48 à 72h à 60°C. Des coupes fines de 50 nm sont alors effectuées avec un ultramicrotome (Ultracut, Leica). Celles-ci sont ensuite contrastées avec 0,5% d'acétate d'uranyl et 0,5% de citrate de plomb (ultrastrain, Leica) avant d'être observées en microscopie électronique à transmission.

Microscopie électronique à balayage. Les cellules sont fixées dans 2% de glutaraldéhyde dans de l'eau de mer artificielle (ASW) pendant 4h à 4°C, puis rincées sur la nuit dans de l'eau de mer artificielle et fixées à des lamelles de verre recouvertes de polylysine. Elles sont ensuite fixées pendant 1h à température ambiante avec du tétraoxyde d'osmium à

1% dans de l'eau de mer artificielle. Les cellules sont ensuite déshydratées dans une série de bain d'éthanol de concentration croissante (30 à 90%) puis séchées avec un appareil de contournement du point critique CPD 750 EMSCOPE ELEXIENCE. Finalement, les cellules sont recouvertes de métal avec un métalliseur Jeol JFC-2300HR : une couche de 0,7 nm de platine est déposée sous atmosphère d'argon. Les échantillons sont ensuite observés en utilisant un microscope électronique à balayage (JEOL, modèle JSM 6700F) avec une tension d'accélération de 5.0 kV.

Analyses protéomique et lipidique des vésicules membranaires et des membranes cellulaires

Extraction des membranes cellulaires

250 mL de culture (phase stationnaire) sont centrifugés à 5 000g pendant 10 min (Allegra™ 25R, Beckman). Les culots de cellules sont resuspendus dans 5 mL de tampon contenant 20 mM de Tris-HCl pH 7,5 et 200 mM de NaCl. Les cellules sont alors lysées à la french press à 14 kPsi et les débris cellulaires sont séparés du lysat par centrifugation à 3 000g pendant 20min à 4°C. Les membranes sont ensuite collectées par ultracentrifugation en utilisant des tubes en polyallomer, à 100 000g pendant 45min à 4°C (ultracentrifugeuse Optima™ TLX, rotor TLA 100.4, Beckman) et finalement resuspendues dans 200µL de tampon (20 mM de Tris-HCl pH 7,5 et 200 mM de NaCl) puis conservées à -80°C.

Analyse des protéines par SDS-PAGE, spectrométrie de masse et coloration des glycoprotéines

Des préparations de VMs et de membranes cellulaires sont chauffées pendant 5min à 95°C dans du tampon de charge 5x (2% SDS, 50% glycérol, 5% (p/v) β-mercaptoéthanol, 60mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2% (p/v) bleu de bromophénol) puis soumis à une électrophorèse sur gel polyacrylamide (12%) contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Le gel est ensuite coloré avec du bleu de Coomassie G250 (ethanol 50%, acetic acid 10%, Coomassie blue brilliant R-250 0,1%), puis les bandes protéiques sont excisées du gel, digérées par la trypsine et analysées par spectrométrie de masse suivant

le protocole décrit dans Stingl et al. (Stingl et al., 2008). La coloration des glycoprotéines a été réalisée en traitant des gels polyacrylamides après électrophorèse avec les réactifs fournis dans le kit Pro-Q Emerald 300 (P21857) de chez Invitrogen. Ces réactifs se lient aux groupements glycosylés des glycoprotéines, en créant un signal fluorescent.

Construction d'un mutant d'inactivation (Knock out) pour le gène codant la protéine stomatine TK0348 chez *T. kodakaraensis*, KU216

L'inactivation du gène *tk0348* a été réalisée en suivant le protocole de Fujikane *et al.* (Fujikane et al., 2010). Le principe de la méthode est explicité dans l'Annexe 4.

Analyse des lipides

Les lipides polaires intacts ont été extraits de la biomasse sèche (VMs ou membranes cellulaires) congelée en utilisant une technique modifiée du protocole de Bligh et Dyer (Schouten et al., 2008). Les extraits sont soumis à une hydrolyse acide et le taux de glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether (GDGT-0) est mesuré par chromatographie liquide à haute performance suivi d'une ionisation chimique à pression atmosphérique-spectrométrie de masse suivant le protocole décrit dans Ellen *et al.* (Ellen et al., 2009).

Etude de l'association ADN –vésicules membranaires

Extraction d'ADN, digestions et électrophorèse

Extraction d'ADN total des cellules. L'extraction d'ADN total est réalisée à partir de 50 mL de cellules prélevées en fin de phase exponentielle (environ 15-16 h de culture à 85-90°C), récupérées par centrifugation 20 min à 5 000 g. Les culots sont repris dans 250 µL de solution TEN (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, NaCl 150 mM), puis les cellules sont lysées par l'ajout de 250 µL de solution TENST (0,12% Triton X-100 et 1,6% de SDS en TEN). Après 20 min à température ambiante, les extraits sont traités à la protéinase K (500 µg/mL final) pendant 1 h à 55°C. L'ADN est alors extrait avec un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1, v/v) puis par un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24:1, v/v). Il est ensuite précipité avec 0,8 volume d'isopropanol et centrifugé 30 min à 4°C à 18 000 g. Le culot ainsi récupéré est lavé de ses

sels avec 500 μ L d'éthanol froid à 70% (v/v) et séché, soit au Speed Vac quelques minutes, soit 1 h dans une étuve à 37°C. Le culot sec est finalement repris dans 20 ou 25 μ L d'eau distillée stérile. La solution est alors traitée à la RNase (50 μ g/mL final) pendant 1h à 37°C.

Extraction d'ADN plasmidique des cellules. Les extractions d'ADN plasmidique sur les souches sélectionnées sont réalisées selon une technique de lyse alcaline dérivée de Birnboim et Doly (Birnboim and Doly, 1979) adaptée aux Thermococcales. Les cellules d'une culture de 50 mL sont récupérées en culot par centrifugation et remises en suspension avec 300 μ L d'un tampon 1 (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH8), puis incubées 5 minutes dans la glace. 400 μ L de la solution 2 de lyse alcaline (0,2 M NaOH, 1% SDS) sont ensuite ajoutés et le mélange est homogénéisé par retournement du tube. Après 1 minute 30 s à température ambiante, l'addition de 300 μ L d'acétate de potassium 5M pH5 (solution 3) neutralise le mélange. Après une incubation de 5 min dans la glace, une centrifugation à 10 000 g pendant 10 min permet de récupérer le surnageant limpide. Ensuite une extraction d'ADN classique suivie d'une précipitation à l'isopropanol est réalisée (selon la technique décrite précédemment pour l'extraction d'ADN total). Le culot récupéré est séché puis repris dans 20 ou 25 μ L d'eau distillée stérile.

Extraction de l'ADN des vésicules membranaires et des membranes cellulaires. 500 μ L de préparation de VMs ou de membranes extraites des cellules (voir les protocoles d'isolation des VMs et des membranes cellulaires ci-dessus) sont traitées avec de protéinase K (1mg/mL final) et du SDS (0,5% final) et laissés à 55°C pendant 14h. La préparation est ensuite soumise à une extraction d'ADN classique suivie d'une précipitation à l'isopropanol (selon la technique décrite précédemment pour l'extraction d'ADN total). Le culot récupéré est séché puis repris dans 20 ou 25 μ L d'eau distillée stérile.

Digestion de l'ADN et électrophorèse

Chaque préparation d'ADN (2 à 3 μ g d'ADN total/plasmidique/extrait des VMs,) est digérée par une enzyme de restriction (KpnI/XhoI/BamHI/PstI, Promega, 5 unités) dans 20 μ L final. L'échantillon est déposé sur gel d'agarose 0,8% et la migration électrophorétique s'effectue en tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE, 0,5x) à 2V/cm pendant 15 à 17h. Le gel est coloré dans un bain de bromure d'éthidium (BET) à 1 μ g/mL puis rincé à l'eau distillée.

Expériences de transformation

Une culture de 50 mL de *T. kodakaraensis* KUW1 (Trp-, Ura-) est mise à pousser en anaérobiose dans une fiole pénicilline de 100 mL jusqu'à atteindre la phase exponentielle. Des échantillons de 10 mL sont prélevés et centrifugés pendant 10 min à 5 000g. Les surnageants sont éliminés et les culots resuspendus dans 1 mL de milieu de Zillig (voir composition Annexe 1). Chaque solution est alors mélangée avec soit 3µg de plasmide pLC70 extrait d'*E. coli*, soit 100µL de VMs associées au plasmide pLC70 extraites de la souche *T. kodakaraensis* KUW1 transformée, soit 100µL de ces mêmes VMs traitées préalablement avec 0,5u de DNase I (DNase I, RNase free, Fermentas), quantité nécessaire pour dégrader l'ADN situé à l'extérieur des VMs. La DNase I est ensuite inactivée avec 25mM d'EGTA, 10 min à 65°C. Les solutions sont alors placées 2h à 85°C. Chaque mélange est ensuiteensemencé dans des fioles pénicilline 50 mL contenant 25mL de milieu sélectif (eau de mer artificielle supplémentée d'hydrolysate de caséine et d'uracile, voir composition en Annexe 3) puis incubé pendant 21h à 85°C.

Les témoins négatifs ont été effectués en incubant le culot cellulaire de 10 mL de culture *T. kodakaraensis* KUW1 en milieu sélectif ou en incubant 100µL de VMs associées au plasmide pLC70 extraites de la souche *T. kodakaraensis* KUW1 transformée en milieu sélectif. Un témoin positif a également été réalisé en incubant le culot cellulaire de 10 mL de culture *T. kodakaraensis* KUW1 en milieu sélectif supplémenté en tryptophane.

Etude de l'interaction protéine p24-ADN plasmidique

Délétion du gène codant pour la protéine p24 sur le plasmide pLC71

Quatre échantillons du plasmide pLC70 ont été chacun soumis à une double digestion enzymatique (HindIII+SphI, SphI+BamHI, BamHI+NdeI, NdeI+HindIII) afin de générer 4 fragments ayant des extrémités compatibles deux à deux. Ces fragments sont ensuite mélangés et leur ligature est catalysée par l'ADN ligase T4 (Invitrogen). Des bactéries *E. coli* XL1-Blue sont ensuite transformées avec le plasmide pLC71 obtenu et sélectionnées sur milieu ampicilline.

Identification des sites potentiels de fixation de la protéine p24

Les régions intergéniques de pTN1 ont été comparées à celles de TKV4 et de pTN3 par

blastn en utilisant le logiciel CLC Genomics Workbench. Des séquences homologues de 30 paires de bases situées en amont du gène codant la protéine p24 ont été identifiées et désignées comme les sites potentiels de fixation de la protéine p24.

Expression et purification de la protéine p24

Nous avons utilisé le vecteur recombinant pET::p24Δ construit par Nicolas Soler lors de sa thèse. Ce vecteur formé à partir du plasmide pET-9a (Stratagène) porte un gène de résistance à la kanamycine ainsi que la protéine recombinante p24Δ à étiquette hexahistidine, dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur de l'ARN polymérase du bactériophage T7.

Expression de la protéine p24Δ. 50 ng du plasmide pET::p24Δ sont utilisés pour transformer par électroporation des cellules *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS (Novagen). Les cellules transformées sont étalées sur boîtes (LB (Luria-Bertani), agar, 50 µg/mL kanamycine, et 34 µg/mL de chloramphenicol) et laissées à 37°C sur la nuit. Un des clones sert ensuite à inoculer une préculture de 200 mL de milieu sélectif (LB, 50 µg/mL kanamycine, et 34 µg/mL de chloramphenicol) laissée la nuit à 37°C en agitation à 180 rpm. Cette préculture est ensuite diluée dans 1L de milieu sélectif jusqu'à $DO_{600nm}=0,1$. 1mM d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) est ajouté au milieu lorsque la culture a atteint une DO_{600nm} de 0,7 afin d'induire l'expression de la protéine recombinante. La culture est ensuite incubée pendant 4h à 37°C à 180 rpm.

Purification de la protéine p24Δ. La culture est centrifugée à 5 000g pendant 10 min à 4°C et les culots sont stockés à -80°C. Les cellules sont ensuite resuspendues dans du tampon de lyse (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, β-mercaptoethanol 5 mM) et soniquées (2 cycles de sonication de 1 minute sur glace). Le lysat est centrifugé à 10 000g pendant 15 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires et le matériel insoluble. Le surnageant (correspondant à la fraction soluble) est récupéré, et passé sur 2 mL de résine de nickel (Ni-NTA, Qiagen) préalablement équilibrée avec du tampon de lyse. Cette résine est ensuite lavée par 100 mL de tampon de lyse, suivi de 60 mL de tampon de lyse supplémenté de 40 mM imidazole. La protéine recombinante est ensuite éluée par un gradient d'imidazole (100, 200 puis 400 mM) et les différentes fractions correspondant à

chaque élution sont récupérées et analysées sur gel SDS-PAGE. Les fractions contenant la protéine p24Δ recombinante sont ensuite réunies et concentrées par filtration (Amicon, Millipore) en un volume de 200 μL et injectés sur une colonne de gel-filtration Superdex™ 200 10/300 (GE Healthcare) branchée sur un système de FPLC AKTA (GE Healthcare). Cette étape consiste en la séparation des différents composés présents au sein de l'échantillon en fonction de leurs tailles par passage sur une matrice Dextran poreuse, et permet donc l'élimination des contaminants protéiques ainsi que de l'imidazole. La gel-filtration est effectuée à 4°C, dans un tampon TrisHCl 20 mM, NaCl 200 mM. L'éluant est collecté en sortie de colonne par fractions de 500 μL, et la présence de protéines est suivie par l'absorbance à 280 nm. Les différentes fractions de gel-filtration sont ensuite analysées sur gel SDS-PAGE, et celles contenant la protéine purifiée sont concentrées, quantifiées par dosage au Bradford, puis stockées après ajout de glycérol 10% final à -20°C.

Élimination de l'ADN associé à la protéine p24Δ. 60 μL de protéine p24Δ sont traitées avec 6 unités de DNase I pendant 1h à 37°C. La solution est injectée sur une colonne de gel-filtration Superdex™ 200 10/300 (GE Healthcare) branchée sur un système de FPLC AKTA afin de séparer la protéine p24Δ (sortant sous forme d'oligomère > 70 kDa) de la DNase I (DNase I, RNase free, Fermentas, monomérique de 29 kDa).

Retards sur gel

- **Gel retard en agarose**

Amplification des fragments d'ADN de 1kb contenant le site potentiel de fixation par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Les oligonucléotides sont donnés dans le tableau ci-après. Le mélange réactionnel comprend pour 50 μL final : 5 μL de tampon 10x, 2,5 μL de chaque oligonucléotide (10 μM), 1 μL de dNTPs (10 mM), 1 μg d'ADN plasmidique de *T. nautilus* et 0,5 μL d'enzyme *Pfu* Fermentas (1 unité). Une première étape de 2 min à 94°C permet de dénaturer l'ADN. Puis, 30 cycles de 3 étapes sont alors effectués : une dénaturation 1 min à 94°C, 1 min d'hybridation des amorces à 52°C et 5 min de polymérisation à 72 °C. Une étape finale d'élongation de 15 min à 72°C est enfin réalisée.

Mélange ADN-protéine p24Δ et migration sur gel d'agarose. Différentes quantités de

protéine (de 0 à 22 μM) sont ajoutées à 100ng d'ADN de chaque type de fragment, dans un tampon Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM, pour un volume final de 20 μL , puis laissées 15 min à 4°C. La préparation est ensuite mise à migrer sur gel d'agarose 0,8% (tampon TAE 0,5x, pendant 3h à 1,75 V/cm).

Oligo. pour le site pTN1-sens	CCGGATGATGCTTTCCGTG
Oligo. pour le site pTN1-antisens	GGCTCAGGGTCAGGCTCAGG
Oligo. pour le site pTN3 n°1-sens	CGCGCTTCACCTCCTTCTCGCG
Oligo. pour le site pTN3 n°1-antisens	CCGGAAGCCTCCCGAGAGGGTC
Oligo. pour le site pTN3 n°2-sens	GCGCCTTCCCGTGCGTGTCG
Oligo. pour le site pTN3 n°2-antisens	CCGTGTGGACCACGAACACTG
Oligo. pour pBR322-sens	GCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGC
Oligo. pour pBR322-antisens	GGCGGTATGGATGCGGCGGG

Oligonucléotides pour l'amplification des fragments d'ADN de 1 kb contenant les sites potentiels de fixation de la protéine p24.

- **Gel retard en polyacrylamide**

Des oligonucléotides simples brins de 43 et 73 mers (sens et antisens) contenant les sites potentiels de fixation sont synthétisés (Sigma). Les séquences sont données dans le tableau ci-après.

Le brin sens est marqué radioactivement en 5' avec [β - ^{32}P]-ATP (6000 Ci mmol^{-1}) en utilisant la polynucléotide kinase T4 (fermentas). Celui-ci est ensuite hybridé avec l'oligonucléotide antisens correspondant pour constituer un substrat d'ADN double brin. Le mélange réactionnel ADN marqué-protéine est réalisé dans 20 μL final dans un tampon contenant Tris-HCl 20 mM pH7,5, NaCl 200 mM ou 50 mM, avec 200 Fmol d'ADN et des quantités de protéine p24 Δ allant de 0 à 10 μM . Après 15 min d'incubation à 4°C, 5 μL de tampon de charge 5x (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 20% glycérol, 1 mM EDTA, 0,1 mg/mL BSA et 0,1% de xylène cyanol) est ajouté dans le mélange. Les échantillons sont ensuite chargés sur un gel polyacrylamide 10% non dénaturant et l'électrophorèse est réalisée dans du TGE 1x (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 8 mM glycine, 0,1 mM EDTA) à 4°C pendant 4 h à 10 V/cm. Les complexes ADN-protéine sont visualisés par autoradiographie et phosphorimaging.

Oligo. pour le site pTN1-sens 43 mers	GTTCC TAATTCTCCAGTTTTCTGGTTCACTGCTTAAAT ACTCC
Oligo. pour le site pTN1-antisens	GGAGT ATTTAAGCAGTGAACCAGAAA CTGGAGAATTAGGAAC
Oligo. pour le site pTN1-sens 73 mers	TGATGTGTCCGTTTTGTTCC TAATTCTCCAGTTTTCTGGTTCACTGCTTAAAT ACTCCTCTGCCGTAGCTCTG
Oligo. pour le site pTN1-antisens 73 mers	CAGAGCTACGGCAGAGGAGT ATTTAAGCAGTGAACCAGAAA CTGGAGAATTAGGAACAAAACGGACACATCA
Oligo. pour le site pTN3 n°1-sens 43 mers	CTTGT ATTTAAGCAGTGAACCAGAAATGTGCAGAATTC GGGAG
Oligo. pour le site pTN3 n°1-antisens 43 mers	CTCC GAATTCTGCACATTTCTGGTTCACTGCTTAAAT ACAAG
Oligo. pour le site pTN3 n°1-sens 73 mers	TCCCCTATTTGCACCCTTGT ATTTAAGCAGTGAACCAGAAATGTGCAGAATTC GGGAGAAATCTCCCGATAAT
Oligo. pour le site pTN3 n°1-antisens 73 mers	ATTATCGGGAGATTTCTCC GAATTCTGCACATTTCTGGTTCACTGCTTAAAT ACAAGGGTGC AAATAGGGGA
Oligo. pour le site pTN3 n°2-sens 43 mers	CCCCT ATTTAAGCACTGAACCAGAAA AGAGGAGAAAACGGCAG
Oligo. pour le site pTN3 n°2-antisens 43 mers	CTGCC TTTTCTCCTCTTTTCTGGTTCACTGCTTAAAT AGGGG
Oligo. pour le site pTN3 n°2-sens 73 mers	ATAGAATAGAACAAACCCCT ATTTAAGCACTGAACCAGAAA AGAGGAGAAAACGGCAGAAATCTGGAGAAAAC
Oligo. pour le site pTN3 n°1-antisens 73 mers	GTTTTCTCCAGATTTCTGCC TTTTCTCCTCTTTTCTGGTTCACTGCTTAAAT AGGGGTTTGTCTATTCTAT
Oligo. pBR322-sens 43 mers	GCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCGCGTTGCGTTCGCGGTGCAT
Oligo. pBR322-antisens 43 mers	ATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTATAGGGC
Oligo. pBR322-sens 73 mers	TGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCGCGTTGCGTTCGCGGTGCATGGAGCCGGGC
Oligo. pBR322-antisens 743 mers	GCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAAGGTATAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCA

Oligonucléotides pour l'amplification des fragments d'ADN de 43 et 73 mers contenant les sites potentiels de fixation de la protéine p24. En rouge : le site potentiel de fixation de p24 sur pTN1 ; En vert: le site potentiel de fixation n°1 de p24 sur pTN3 ; En bleu : le site potentiel de fixation n°2 de p24 sur pTN3.

Détermination de l'infectivité des VMs de *T. nautilus* sur différentes souches de *Thermococcales* par la méthode de plage de lyse inversée

Différentes souches de *Thermococcales* sont cultivées en milieu solide sur boîte de pétri en utilisant la méthode de double couche établie par Erauso *et al.*, 1995 (Erauso, 1995). La gomme de gellane (Gelrite, Kelco, Merck & Co. Inc.) est utilisée comme agent solidifiant thermostable. En accord avec le caractère strictement anaérobie des *Thermococcales*, toutes les étapes sont réalisées dans la chambre anaérobie sous une atmosphère contrôlée (N₂ 93%, H₂ 7%).

100 mL de solution de Gelrite (1,6%) sont ajoutées à 100 mL de milieu Ravot (Ravot et al., 1995) réduit avec 1mL de solution stérile de Na₂S (concentration finale 0,0% [p/v]) et mis en agitation à 85-90°C. Cette solution est ensuite versée dans des boîtes de Pétri et constitue la couche basale. Cette couche est surmontée d'une solution constituée 1,3 mL de milieu Ravot 2x réduit, 1,3 mL de solution de Gelrite (0,4%), 300µL de soufre colloïdal (200mg/mL) et de 100 µL d'hôte potentiel (à partir d'une suspension à 1.10⁸ cellules/mL). Ce mélange est placé dans des tubes préchauffés (85-90°C) et brièvement vortexé avant d'être déposé sur la couche basale.

Après la solidification de la couche de surface, 3 gouttes de 10µL de solution de VMs sont déposées sur chaque boîte. Après un séchage de 15 min, les boîtes sont entreposées dans des jarres en anaérobiose et incubées à 85°C. Après 6 heures d'incubation, les jarres sont ouvertes et observées toutes les 2 heures dans la chambre anaérobie.

RESULTATS

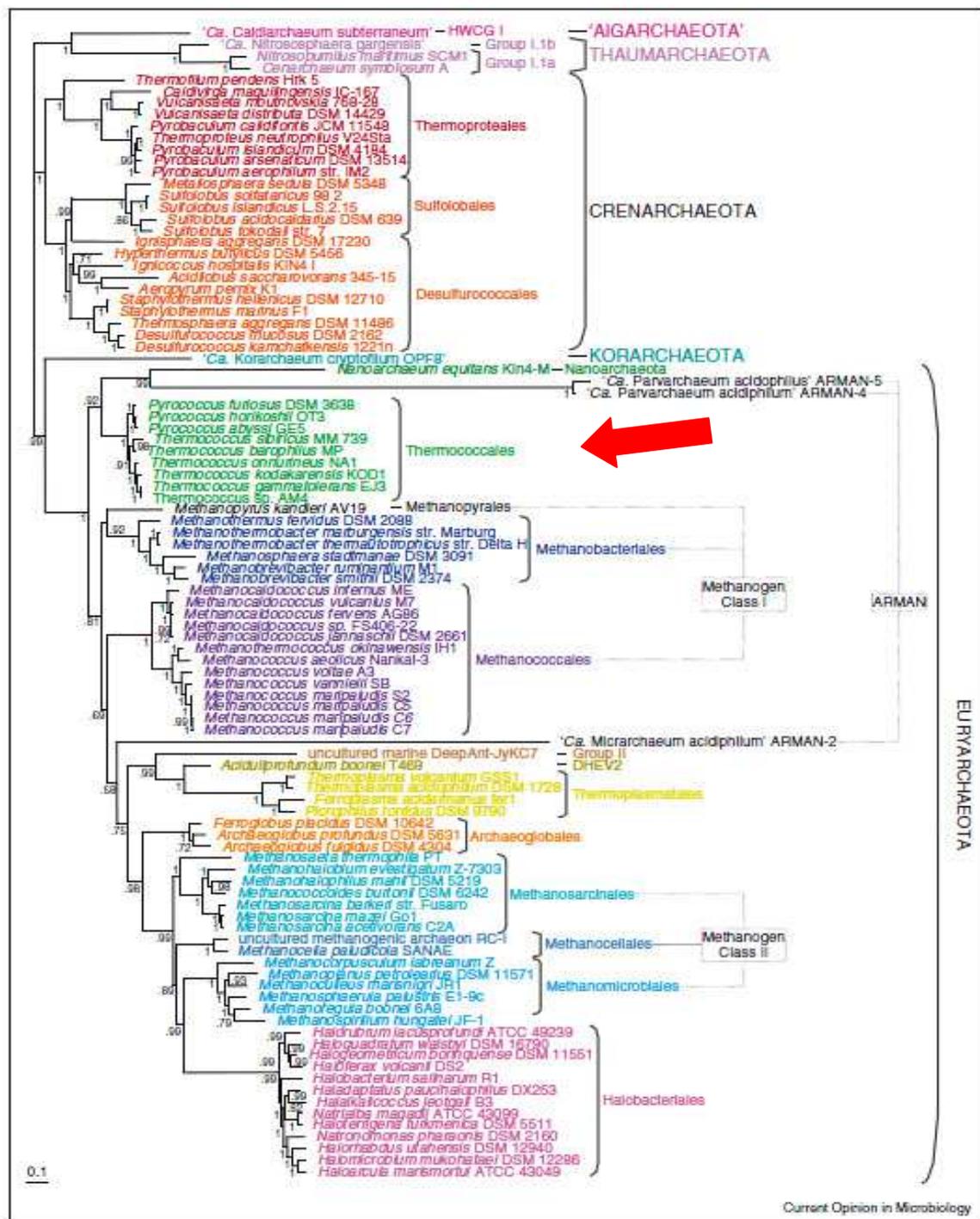
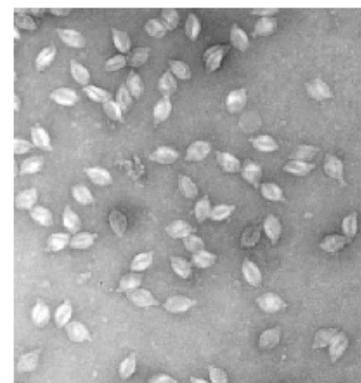
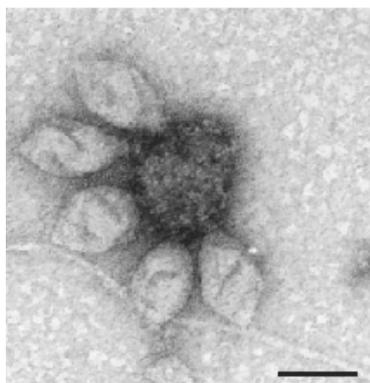


Figure 24 : Arbre phylogénétique non raciné des Archées basé sur la concaténation de 57 protéines ribosomales présentes dans 89 génomes. (Brochier-Armanet et al., 2011)

Figure 25 : Particules virales de PAV1 (*Pyrococcus abyssi* virus 1) observées en MET. Echelle : 100 nm. (Geslin et al., 2003)



RESULTATS

I. Présentation générale du travail

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les vésicules membranaires produites chez les Archées sont à ce jour encore très peu caractérisées. Si certains rôles et mécanismes de formation ont déjà pu être identifiés pour les vésicules de certaines Crénarchées (ex : *G/ Sulfolobus*), très peu de données sont disponibles concernant la vésiculation chez les Euryarchées. Nous avons ainsi entrepris l'étude des VMs sécrétées par les Thermococcales, un groupe appartenant aux Euryarchées (Figure 24). Les Thermococcales regroupent des organismes hyperthermophiles et anaérobies vivant dans les sources hydrothermales océaniques. La sécrétion de vésicules par ces Archées a été découverte au laboratoire il y a quelques années suite à la collecte d'échantillons de cheminées hydrothermales dans le Pacifique (campagne Amistad en 1999) dont ont pu être extraites et identifiées 70 souches de Thermococcales (Lepage et al., 2004). A cette époque, le seul virus d'Euryarchées hyperthermophiles connu était le virus PAV1 (*Pyrococcus abyssi* virus 1) (Figure 25). Ce constat était en opposition avec la grande diversité de virus connue chez les Crénarchées (Figure 26). Le laboratoire a alors commencé à rechercher d'autres virus d'Euryarchées hyperthermophiles à partir de la collection de Thermococcales qui venait d'être établie. Cette recherche n'a pas abouti sur la découverte de virus, mais a débouché par hasard sur l'observation de vésicules membranaires (voir Figure 12) ressemblant à certains virions (de la famille des Globuloviridae par exemple). Pour cette raison, ces structures ont été dans un premier temps baptisées « virus-like vesicles ». Un premier travail sur ces VMs publié par Nicolas Soler révèle que toutes les souches de Thermococcales étudiées alors produisent des VMs (Soler et al., 2008). Celles-ci ont une taille de l'ordre de 50 à 130 nm de diamètre et sont associées à de l'ADN génomique extrêmement résistant à haute température. Ces observations ont donc suggéré un premier rôle pour ces VMs, à savoir le transfert horizontal de gènes au sein des environnements chauds.

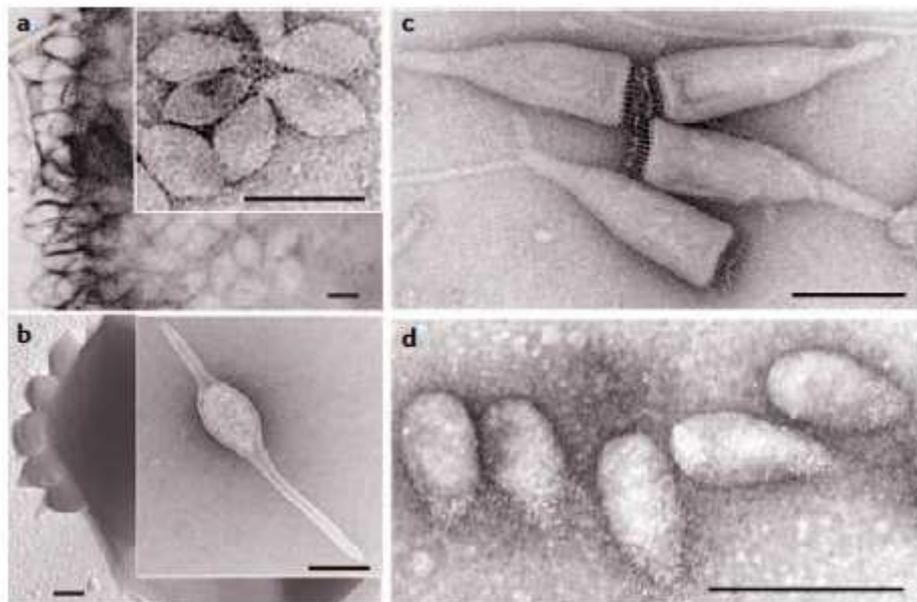


Figure 26 : Virus infectant les Crénarchées observés en MET.

Ces virus ont des morphologies très diverses. a) *Sulfolobus* spindle-shaped virus 1 (SSV1). b) *Acidianus* two tailed virus (ATV). c) *Acidianus* bottle-shaped virus (ABV). d) *Sulfolobus* neozelandicus droplet-shaped virus (SNDV). Echelle : 100 nm. (Prangishvili et al., 2006)

J'ai poursuivi ces premiers travaux afin de mieux caractériser les VMs produites par les Thermococcales. Quatre souches ont servi de modèle pour cette étude: *Thermococcus kodakaraensis*, KU216, et *Thermococcus gammatolerans*, spEJ3, souches séquencées de longue date, *Thermococcus sp. 5-4*, souche non séquencée, et *Thermococcus nautilus*, souche séquencée récemment. Les souches *T. sp. 5-4* et *T. nautilus* présentent des caractéristiques intéressantes ayant attiré notre attention dans le cadre de cette étude. *T. sp. 5-4* est notamment une forte productrice de structures filamenteuses qui accompagnent la production de VMs. *T. nautilus* quant à elle possède plusieurs plasmides qui ont été caractérisés récemment (Soler et al., 2007; Soler et al., 2010).

Nous avons entrepris de déterminer le mode de formation de ces VMs. Ce travail a essentiellement reposé sur les observations de microscopie électronique et sur des travaux de génétique. D'autre part, des analyses biochimiques ont permis de déterminer la composition en lipides et en protéines des vésicules, et ont rendu possible l'identification de certains rôles pour les vésicules. Leur implication dans le transfert d'ADN a également été approfondie. L'étude de la souche *T. nautilus* s'est révélée très intéressante à cet égard. En effet, en plus de transporter de l'ADN génomique, cette souche assure la vectorisation de certains plasmides contenus dans la cellule via les VMs. Un de ces plasmides, pTN3, a été récemment séquencé. L'étude de son génome révèle la présence de gènes codant pour des protéines de type viral. Le mécanisme d'emballage de ce plasmide a également été étudié. L'implication de vésicules dans le transport d'un génome de type viral n'a pour l'instant jamais été évoquée dans la littérature. Cette observation rappelle là aussi que la limite entre les virus et les vésicules n'est clairement pas établie. En plus d'être impliquées dans le transport de plasmides/virus, les VMs produites par *T. nautilus* exercent un effet toxique sur certaines souches de Thermococcales, probablement dû au convoyage de toxines. Même si ces « thermococcines » nécessitent d'être caractérisées, il s'agit de la première mise en évidence d'une activité toxique liée aux VMs chez les Thermococcales.

Une partie des travaux réalisés dans le cadre de cette étude a donné lieu à un article, sous presse actuellement. D'autres articles sont également en cours d'écriture.

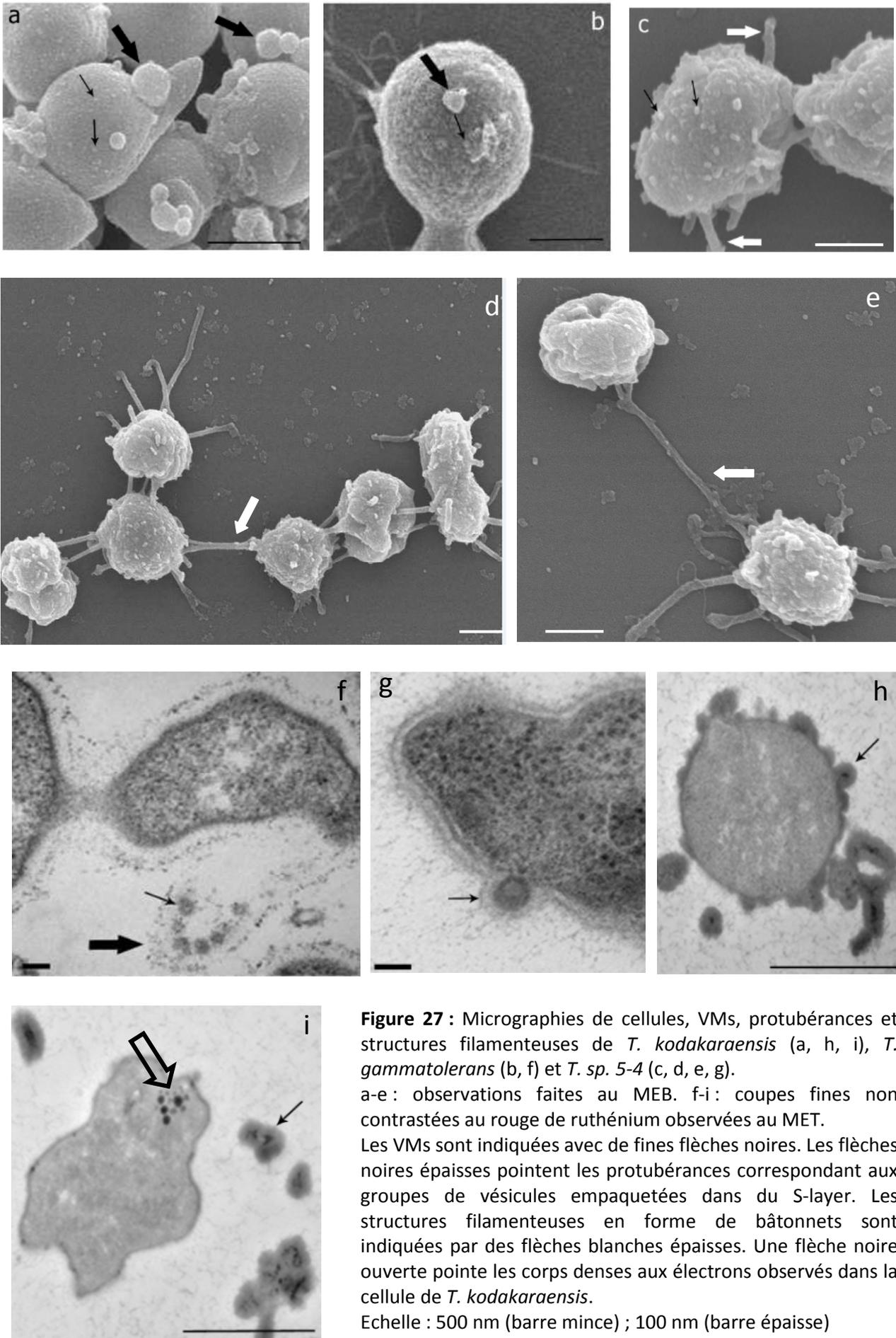


Figure 27 : Micrographies de cellules, VMs, protubérances et structures filamenteuses de *T. kodakaraensis* (a, h, i), *T. gammatolerans* (b, f) et *T. sp. 5-4* (c, d, e, g).

a-e : observations faites au MEB. f-i : coupes fines non contrastées au rouge de ruthénium observées au MET.

Les VMs sont indiquées avec de fines flèches noires. Les flèches noires épaisses pointent les protubérances correspondant aux groupes de vésicules empaquetées dans du S-layer. Les structures filamenteuses en forme de bâtonnets sont indiquées par des flèches blanches épaisses. Une flèche noire ouverte pointe les corps denses aux électrons observés dans la cellule de *T. kodakaraensis*.

Echelle : 500 nm (barre mince) ; 100 nm (barre épaisse)

II. Caractérisation des vésicules membranaires produites par trois espèces d'Archées appartenant au groupe des Thermococcales

1. La formation des vésicules membranaires

Les VMs se forment par bourgeonnement de l'enveloppe cellulaire

Les VMs produites par les Thermococcales ont été découvertes en observant des surnageants de culture en microscopie électronique à transmission (MET) (Soler et al., 2008). Bien que quelques images suggéraient alors la présence de vésicules au niveau de la surface cellulaire, les observations de MET ne permettaient pas d'identifier clairement le mécanisme de production des VMs.

Nous avons ainsi décidé d'utiliser d'autres techniques de microscopie afin de visualiser la formation des VMs chez *T. kodakaraensis*, *KU216*, *T. gammatolerans*, *spEJ3* et *T. sp. 5-4*. Nous avons dans un premier temps examiné des préparations de cellules entières en utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 27a –e). Si la fixation des échantillons a été faite au laboratoire, les observations sous microscope ont été réalisées à l'université Paul Sabatier de Toulouse par Isabelle Fourquaux et Stephane le Blond du Plouy. Les clichés obtenus montrent que des VMs peuvent être observées à la surface des cellules, suggérant que les VMs sont produites par bourgeonnement. Les différentes souches semblent manifester des taux différentiels de production. Les surfaces des cellules de *T. kodakaraensis* et de *T. sp. 5-4* sont en effet recouvertes de très nombreuses vésicules (Figure 27a et c), alors que peu de ces structures sont observées pour *T. gammatolerans* (Figure 27b). En plus des vésicules de petite taille, de grosses protubérances (200-300 nm) sont très souvent observables à la surface des cellules de *T. kodakaraensis* et de *T. gammatolerans* (Figure 27a et b, flèches épaisses noires). Chez *T. sp. 5-4*, ce sont plutôt des structures filamenteuses en forme de bâtonnets qui partent des cellules et s'étendent au contact d'autres cellules (Figure 27c-e, flèches épaisses blanches).

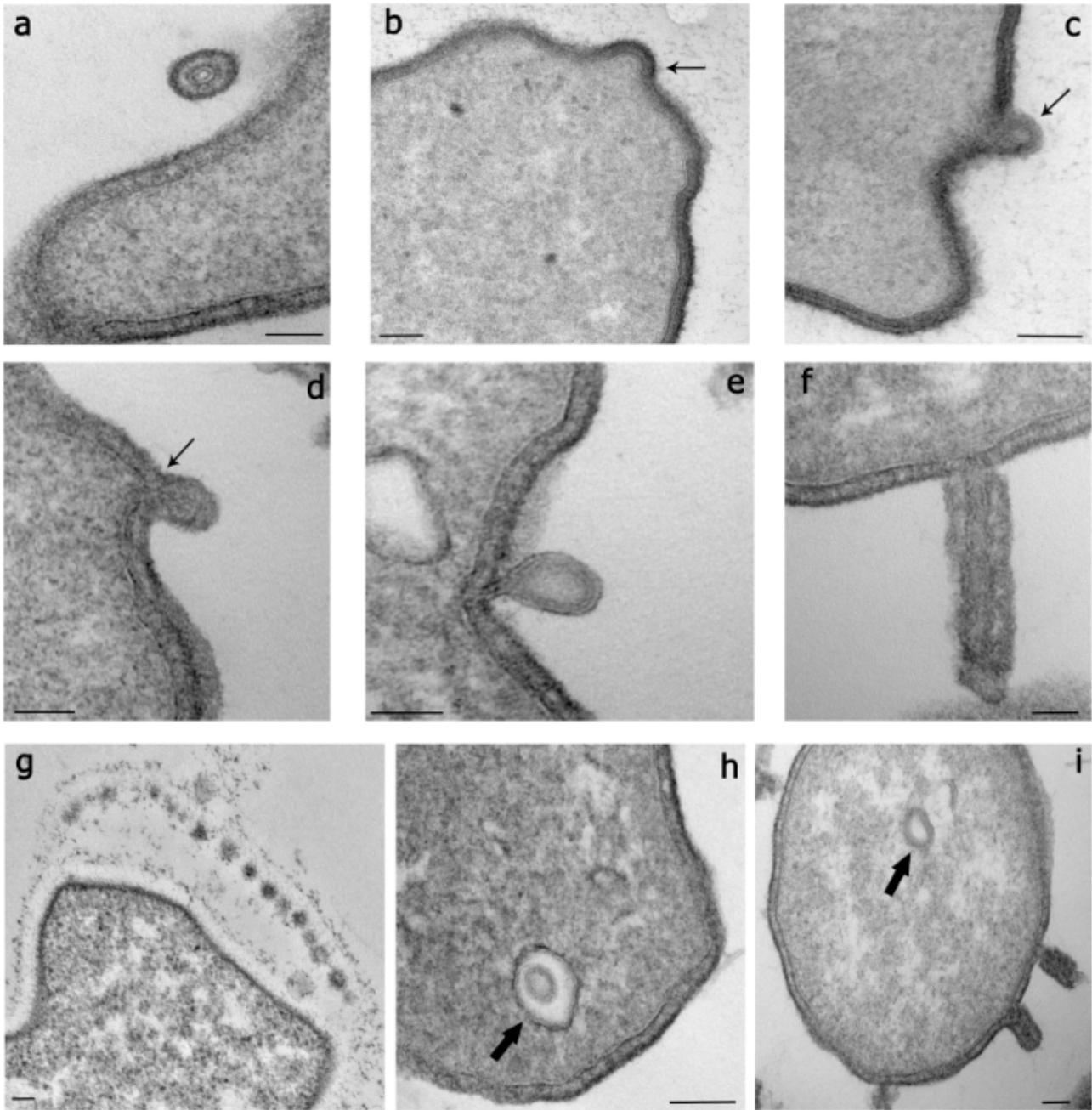


Figure 28 : Coupes fines de cellules, VMs et structures filamenteuses de *T. gammatolerans* (a,b, g), *T. kodakaraensis* (c, d) et de *T. sp. 5-4* (e, f, h, i), contrastées (a-f, h, i) ou non (g) au rouge de ruthénium et observées en MET.

Les VMs sont indiquées avec des flèches noires fines. Les structures membranaires observées à l'intérieur des cellules sont pointées avec des flèches noires épaisses. Echelle : 100 nm.

Détermination de la structure des VMs

Afin de déterminer la structure des VMs, de même que celle des grosses protubérances et des filaments, des coupes fines (50 nm) réalisées dans les cellules des trois souches étudiées ont été observées en MET (figure 27f-i, Figure 28). Certaines de ces coupes ont été contrastées avec du rouge de ruthénium, un réactif qui se lie aux structures glycosylées. Cette coloration supplémentaire permet de mieux définir le S-layer, l'enveloppe glycoprotéique située autour des cellules. Des différences reproductibles peuvent être constatées concernant l'aspect des cellules et des VMs entre les trois souches, tout particulièrement lorsque les micrographies n'ont pas été contrastées avec le rouge de ruthénium. Dans ces dernières conditions, les cellules et les VMs de *T. gammatolerans* et de *T. sp. 5-4* sont délimitées par une membrane plasmique recouverte d'un S-layer diffus ayant une surface hérissée de composants correspondant certainement à des polysaccharides qui émergent à la surface cellulaire (Figure 27f, 28g et figure 27g, respectivement). Des micrographies montrent très souvent des cellules liées entre elles via le S-layer (Figure 27f) suggérant un rôle dans l'adhésion cellulaire pour cette structure. L'enveloppe des cellules et des VMs produites par *T. kodakaraensis* apparaît moins bien définies, avec un S-layer plus sombre et d'épaisseur variable (Figure 27h). De façon intéressante, des structures rondes fortement contrastées sont observées à l'intérieur de certaines cellules de *T. kodakaraensis* (Figure 27i) et une coloration sombre du même type apparaît dans la plupart des VMs produites par cette souche (Figure 27h et i). Puisque nous avons utilisé différents réactifs pour colorer ces coupes, chacun contrastant des molécules biologiques spécifiques, il est difficile d'avoir une idée sur la nature biochimique de ces structures denses aux électrons. Des structures similaires à celles identifiées chez *T. kodakaraensis* ont été observées chez *Thermococcus coalescens* où elles ont été décrites comme des « groupes de particules denses » (Kuwabara et al., 2005).

Lorsque les coupes sont colorées au rouge de ruthénium, les enveloppes des cellules des trois souches apparaissent compactes et contrastées de façon plus intense (Figure 28a-f, h, i). Ces coupes fines révèlent que le S-layer est en réalité une structure complexe comprenant une couche sombre d'environ 10 nm d'épaisseur qui surmonte une couche

plus claire, d'environ 30 nm au dessus de la membrane plasmique. Cette observation correspond à la description faite du S-layer chez la majorité des Archées (Ellen et al., 2010; Jarrell et al., 2010), à savoir un ensemble cristallin de glycoprotéines ayant chacune une forme en « T », la barre verticale correspondant à la partie ancrée dans la membrane (partie C-ter) et constituant la couche claire, tandis que la barre horizontale correspond aux domaines glycosylés (souvent des O-glycosylations) des glycoprotéines, à l'origine de la zone mince fortement contrastée.

De plus, la coloration au rouge de ruthénium permet d'observer clairement la structure des VMs. Ces dernières, délimitées par la membrane plasmique, sont presque toujours enveloppées du S-layer et contiennent dans leur lumen des composants contrastés de la même manière que le cytoplasme des cellules (Figure 28a). Ces observations suggèrent que les VMs bourgeonnent à partir de l'enveloppe cellulaire et transportent du cytoplasme. La haute définition des coupes contrastées au rouge de ruthénium nous permet en outre d'observer le bombement de l'enveloppe cellulaire qui précède certainement le bourgeonnement des VMs (Figure 28b, c). Dans certains cas, les VMs sont encore connectées avec la surface des cellules par l'intermédiaire de leurs enveloppes (Figure 27g, 28d). D'autre part, des VMs de structure inhabituelle, ont été observées chez la souche *T. sp. 5-4* (Figure 28e). Ces VMs semblent se former par l'enroulement vers l'extérieur de deux bicouches lipidiques situées côte à côte. Ces VMs contrastent cependant avec les vésicules précédemment décrites en ce sens qu'elles ne sont pas entourées de S-layer. De façon intéressante, nous avons parfois pu observer des structures membranaires ressemblant à des vésicules à l'intérieur des cellules, tout particulièrement chez la souche *T. sp. 5-4* (Figure 28h, i). La plupart d'entre elles apparaissent délimitées par plusieurs couches lipidiques enroulées l'une sur l'autre. L'interprétation de ces structures n'est cependant pas toujours évidente. La VM observée dans la cellule de la figure 28h par exemple peut correspondre à une vésicule présente dans un compartiment endocytique mais peut également être due à une section réalisée dans une invagination de la cellule où bourgeonnerait une vésicule.

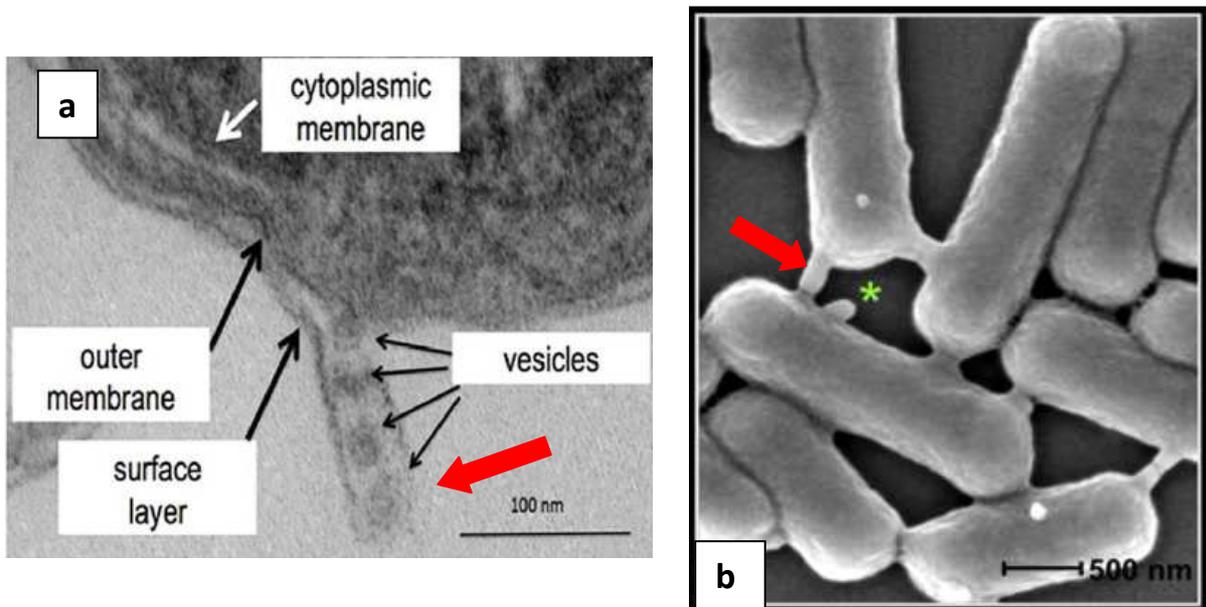


Figure 29 : « Nanopodes » (ou « nanotubes », flèches rouges) observés chez *Delftia sp.* (a) au MET (coupe fine) et *Bacillus subtilis* au MEB (b).

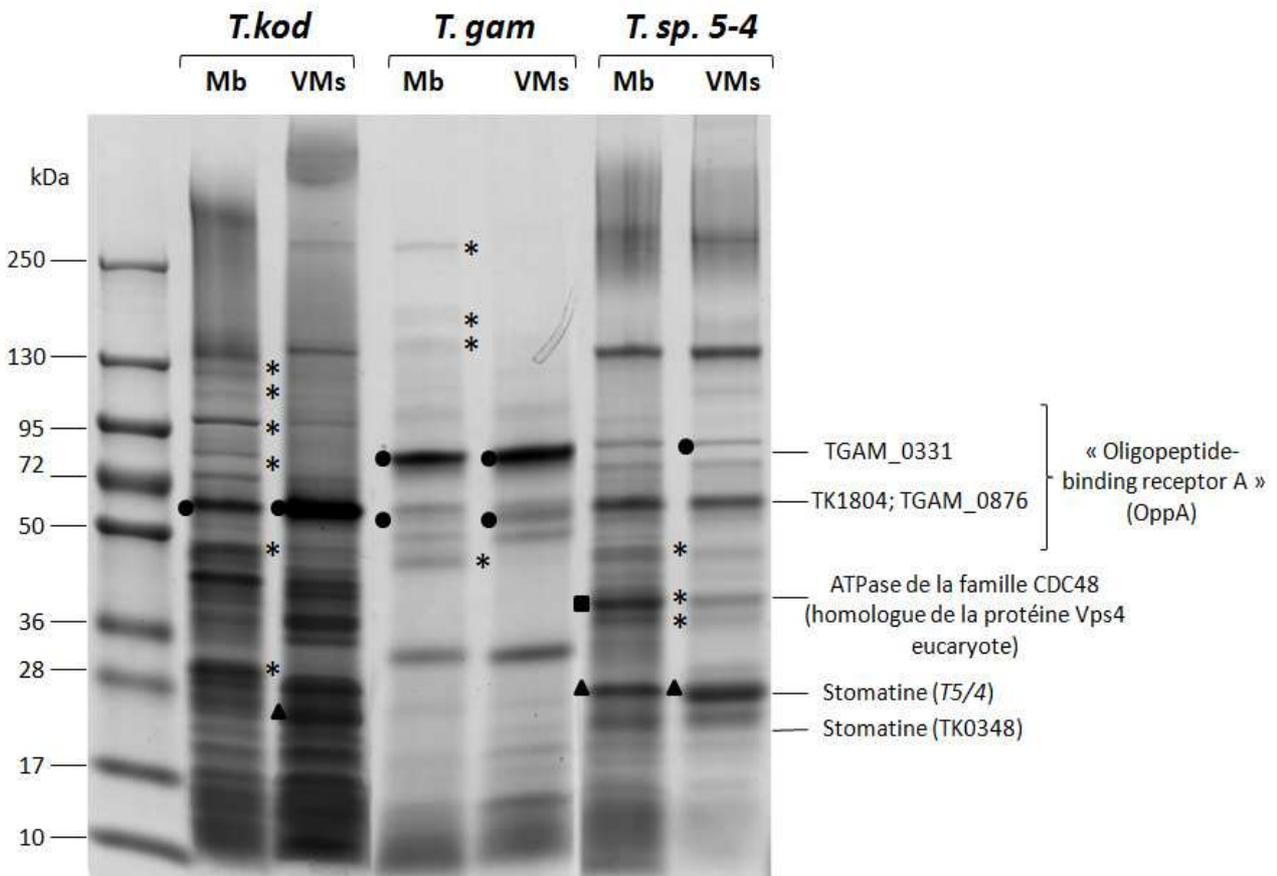


Figure 30 : SDS-PAGE de préparations de VMs et de membranes cellulaires obtenues à partir des souches *T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans*, *T. sp. 5-4*. Les protéines absentes ou en quantité réduite dans les VMs par rapport aux membranes sont indiquées avec un astérisque. Les ronds noirs signalent les protéines OppA, les triangles noirs indiquent la protéine stomatine et le carré noir signale l'homologue de la protéine eucaryote Vps4 chez *T. sp. 5-4*.

Les VMs peuvent également être sécrétées en groupes ou sous forme de filaments

Si les VMs sont dans beaucoup de cas produites indépendamment à la surface de la cellule par bourgeonnement, elles peuvent également être sécrétées en groupes entourés de S-layer (Figure 27f). La forme et la taille de ces regroupements de VMs suggèrent qu'ils correspondent certainement aux grosses protubérances observées en MEB (Figure 27a et b). Les VMs peuvent également être sécrétées en file indienne donnant naissance à des structures filamenteuses (Figure 28f et g). Chez la souche *T. gammatolerans*, les VMs les constituant restent indépendantes les unes des autres et forment ainsi des filaments en colliers de perles (Figure 28g). Chez *T. sp. 5-4*, les VMs semblent fusionner au sein des filaments, donnant ainsi des structures en forme de bâtonnets (Figures 27c-e et 28f). Ces bâtonnets ressemblent de façon frappante à des éléments tubulaires (appelés « nanopodes » ou « nanotubes ») qui ont été récemment décrits chez des Bactéries, telle la bactérie *Bacillus subtilis* (Firmicutes) (Dubey and Ben-Yehuda, 2011) et la protéobactérie *Delftia sp.* (Shetty et al., 2011) (Figure 29). Chez cette dernière des coupes fines révèlent que des VMs sont également encastrées dans une couche cristalline de surface analogue au S-layer (Figure 29a). Chez *B. subtilis*, ces nanotubes forment des ponts entre les cellules (de la même espèce et avec des espèces différentes) qui rappellent énormément les contacts réalisés entre les cellules de *T. sp. 5-4* par l'intermédiaire des bâtonnets, bien que ceux-ci soient plus longs (Figures 27d, e et figure 29b).

2. Composition protéique et lipidique des vésicules

Composition des VMs en protéines majoritaires et comparaison avec les membranes cellulaires

La composition en protéines majoritaires des VMs, a été comparée à celle des membranes cellulaires⁽⁴⁾, en faisant migrer sur gel SDS-PAGE des préparations de membranes extraites à la presse de French de *T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans* et *T. sp. 5-4* ainsi que des préparations de VMs isolées à partir des mêmes souches (Figure 30). Les profils protéiques obtenus pour les préparations de VMs et de membranes

⁽⁴⁾ Les termes de membranes cellulaires ou membranes utilisés par la suite incluent l'ensemble membrane cytoplasmique- S-layer.

	Annotation	VMs de Thermococcales (numéro de l'ORF)	VMs de Sulfolobales (a) (numéro de l'ORF)
Protéines de l'enveloppe cellulaire	Peptide-binding protein (OppA)	TGAM_0331* TK1804*	SSO1273, SSO2619, Saci_1038, ST2539
	Peptide-binding protein (OppA)	TGAM_0876* T5/4 (TGAM_0876)	SSO1273, SSO2619, Saci_1038, ST2539
	ABC transport substrate binding protein (b)	TGAM_1088*	
	Peptide transport, permease protein OppB	TGAM_0332*	
	Peptide transport, permease protein OppC	TGAM_0333*	
	Peptide transport, ATPase component OppD	TK1801*	
	ABC transport, ATPase component	TK2053*	
	Amylopullulanase related protein	TGAM_1390*	
	Amylopullulanase	TGAM_0603* T5/4 (TGAM_0603; TK1774)	SSO1172
	Metallophosphoesterase (c)	TGAM_1662*	
	Flagellin	TGAM_1534; TGAM_1533** T5/4 (TGAM_1533)	Saci_1178
	S-layer protein	T5/4 (TK0895; TGAM_0444)*	
	Stomatin/prohibitin-like protein	TK0348* T5/4 (TK0348; TGAM_1901)	Saci_1749
	Hypothetical protein 1 (d)	TGAM_1300*	
Hypothetical protein 2 (e)	TK0569*		
V-type ATP synthase subunit A	TK1602		
Ferredoxin – NADP+ reductase subunit alpha	TK1326		
Protéines cytoplasmiques	Glutamate dehydrogenase	TK1431	SSO1907, ST2241
	Aminotransferase, class III	TK2101	
	Phosphoenolpyruvate synthase	TK1292	
	Translation elongation factor EF-1, alpha subunit	TK0308	Saci_0685; SSO0216
	Thermosome alpha subunit	TK2303	Saci_0666; SSO0282
	50S ribosomal protein L2P	TK1539	
	50S ribosomal protein L4P	TK1541	
	30S ribosomal protein S5P	TK1521	

(a) SSO : *Sulfolobus solfataricus* ; Saci_ : *Sulfolobus acidocaldarius* ; ST : *Sulfolobus tokadaii*

(b) Certains homologues sont annotés comme des protéines liant le fer

(c) Aurait un rôle dans la déglycosylation

(d) Homologue lointain des amylopullulanases et des protéines du S-layer

(e) Comportent des motifs communs avec les amylopullulanases, les ABC transporteurs et les phosphoestérases

* peptide signal détecté par PRED-TAT

** peptide signal détecté par FlaFind

Tableau 7 : Protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les VMs de *T. gammatolerans*, *T. kodakaraensis*, *T. sp. 5-4*.

Ces protéines ont été comparées à celles trouvées dans les VMs de trois souches de *Sulfolobus* : *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus*, *S. tokadaii* (Ellen et al., 2009).

apparaissent très différents d'une souche à l'autre, indiquant que les VMs et les membranes cellulaires de souches différentes ont une composition en protéines distinctes. Au contraire, la composition en protéines des VMs et des membranes cellulaires au sein d'une souche donnée sont très similaires, certaines protéines étant toutefois absentes ou en quantité réduite dans les VMs par rapport aux membranes (astérisques sur le gel de la figure 30, surtout visible chez *T. kodakaraensis*) alors que d'autres sont au contraire enrichies dans les VMs.

Les bandes principales obtenues sur gel SDS-PAGE ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse. Dans le cas de la souche *T. sp. 5-4*, non séquencée, il a été possible d'identifier certaines protéines grâce à leur grande similarité de séquences avec leurs homologues chez les autres souches de *Thermococcus* dont le génome a déjà été séquencé. Le tableau 7 présente l'ensemble des protéines qui ont été identifiées dans les VMs de *T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans* et *T. sp. 5-4*. De façon intéressante, certaines de ces protéines ont des homologues présents dans les VMs de trois espèces de Sulfolobales (*S. solfataricus*, *S. acidocaldarius*, *S. tokodaii*) (Ellen et al., 2009). L'analyse par spectrométrie de masse révèle uniquement des protéines associées aux membranes pour les VMs de *T. gammatolerans* et *T. sp. 5-4* (stomatine, récepteurs de peptides (OppA), protéine du S-layer, V-ATPase...) tandis que chez *T. kodakaraensis*, les VMs contiennent à la fois des protéines membranaires et de nombreuses protéines cytoplasmiques (protéines ribosomales, glutamate deshydrogénase, thermosome...). Ces résultats corroborent les observations de microscopie électronique suggérant que les VMs sont produites par bourgeonnement de l'enveloppe cellulaire en internalisant du cytoplasme (voir paragraphe II. 1 des résultats). Les VMs sont particulièrement enrichies en protéines situées à la surface des membranes, telles que les sous-unités de transporteurs ABC (voir ci-dessous) et les enzymes modifiant les substrats extracellulaires comme les amylopullulanases. La partie N-terminale d'un peptide signal (type Sec) a notamment pu être détectée dans presque toutes ces protéines en utilisant le programme PRED-TAT (Bagos et al., 2010).

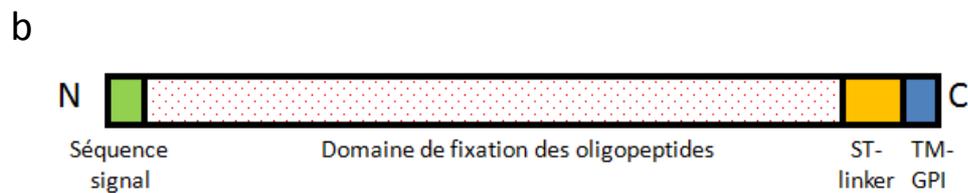
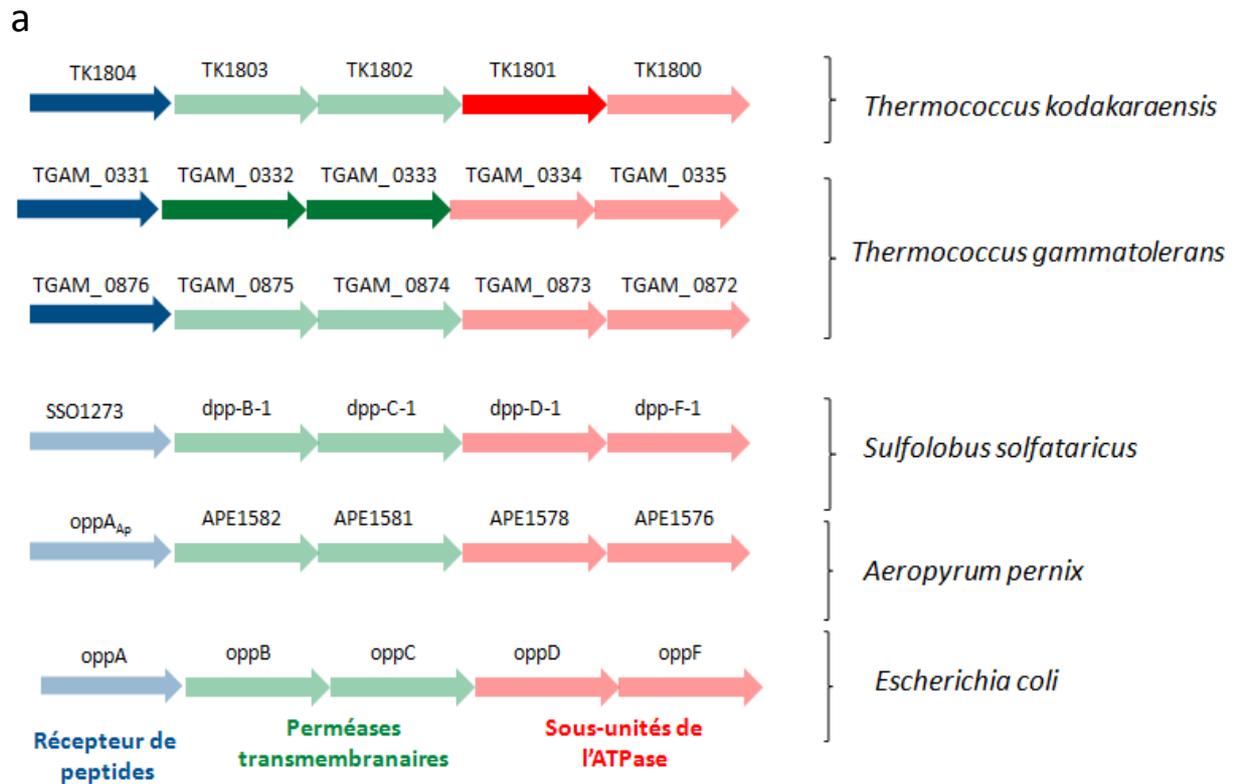


Figure 31 : Contexte génomique du gène OppA et structure du précurseur protéique.

a) Organisation de la région génomique autour des gènes codant pour les protéines de la famille « Oligopeptide-binding proteins A » (OppA) chez *T. kodakaraensis* (TK1804), *T. gammatolerans* (TGAM_0331, TGAM_0876), *S. solfataricus* (SSO1273), *A. pernix* (oppA_{Ap}) et *E. coli* (oppA). Les gènes homologues sont de la même couleur. Chaque groupe de gènes code pour un récepteur de peptides (protéine OppA), deux perméases transmembranaires et deux sous-unités en charges de l'hydrolyse de l'ATP. Les gènes codant pour des protéines identifiées dans les VMs sont indiqués par les flèches de couleurs foncées.

b) Structure des précurseurs OppA. ST-linker : région riche en résidus sérine/thréonine ; TM-GPI : séquence signal GPI (glycosylphosphatidylinositol) C-terminale contenant un domaine transmembranaire.

Le récepteur de peptides de la famille « Oligopeptide-binding protein A », une protéine abondante dans les VMs des trois souches de Thermococcales étudiées.

De façon intéressante, nous avons pu identifier une protéine commune dans toutes ces préparations. Il s'agit d'un récepteur de peptides homologue aux protéines de la famille bactérienne « Oligopeptide-binding proteins A» (OppA) (ronds noirs sur le gel de la figure 30). Cette protéine est notamment abondante dans les VMs de *T. kodakaraensis* et *T. gammatolerans*. Chez *T. kodakaraensis*, un seul récepteur de ce type, codé par le gène *tk1804* a été identifié tandis chez *T. gammatolerans*, deux protéines sont identifiées, TGAM_0331 et TGAM_0876. L'alignement de ces trois séquences protéiques révèle que les protéines TK1804 et TGAM_0331 sont plus proches entre elles qu'elles ne le sont de TGAM_0876. Il est intéressant de noter que quatre protéines de la famille « OppA » ont également été identifiées dans les VMs produites par trois espèces de Sulfolobales (voir tableau 7).

Les protéines OppA interviennent dans la fixation de peptides et sont intégrées à un système de transport de type ABC (ATP Binding Cassette transporter) spécialisé dans la capture de peptides (Monnet, 2003). Tout comme les protéines OppA bactériennes, les protéines OppA de Thermococcales comportent une région riche en sérine/thréonine dans la région C terminale suivie par un domaine hydrophobe transmembranaire (Figure 31b). En plus du récepteur OppA, les transporteurs ABC comportent typiquement deux protéines transmembranaires (OppB et OppC) et deux sous-unités en charges de l'hydrolyse de l'ATP (OppD et OppF), les cinq protéines étant codées par des gènes organisés en opéron (Monnet, 2003). Le contexte génomique des gènes codant les protéines TK1804, TGAM_0331 et TGAM_0876 suggère que ceux-ci sont également probablement organisés en opérons homologues aux opérons bactériens (Figure 31a). En plus des récepteurs OppA, trois autres protéines participant à la formation de ces transporteurs ABC ont été détectées dans les préparations de VMs (TGAM_0332, TGAM_0333 et TK1801) (flèches de couleur foncée dans la figure 31a).

De précédentes études ont confirmé que les protéines OppA des Archées *Sulfolobus solfataricus* et d'*Aeropyrum pernix* lient des peptides et sont des glycoprotéines (Palmieri et al., 2006; Gogliettino et al., 2010; Balestrieri et al., 2011).

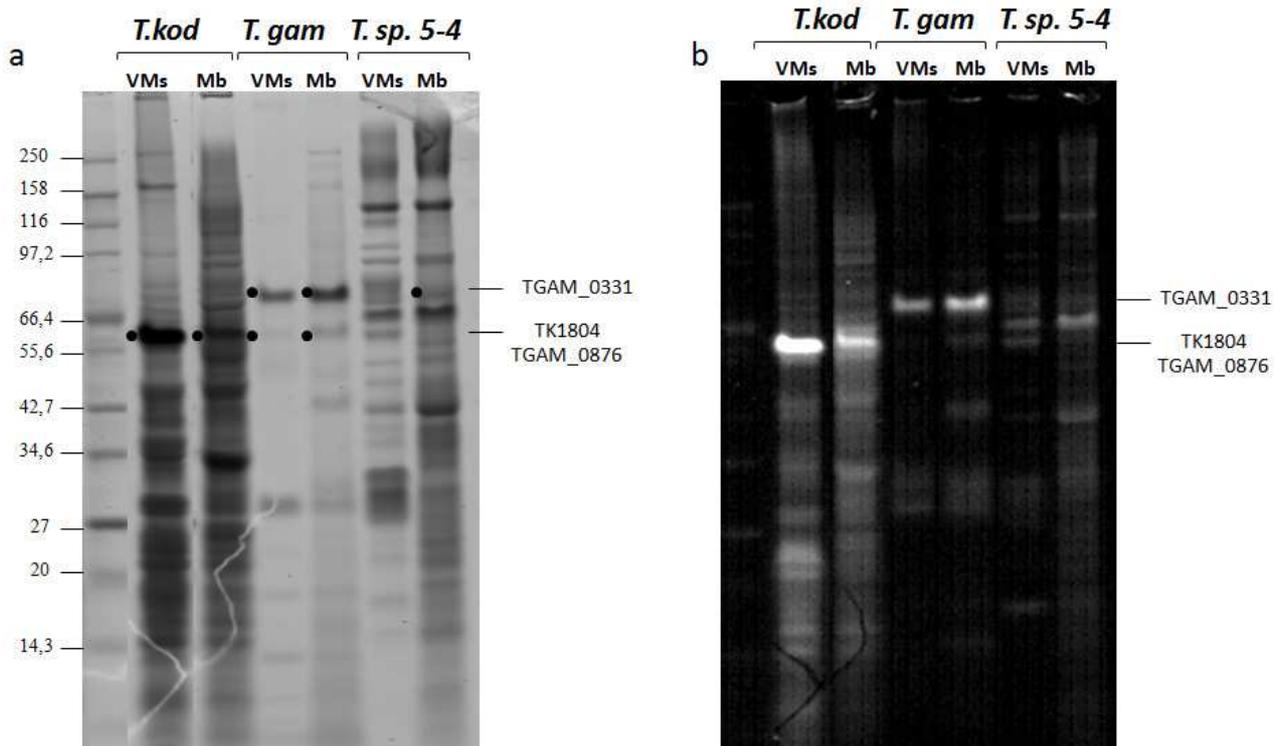


Figure 32 : SDS-PAGE de préparations de VMs et de membranes cellulaires obtenues à partir des souches *T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans*, *T. sp. 5-4* et coloration des glycoprotéines.
 a) SDS-PAGE de VMs et de membranes cellulaires obtenues à partir des souches *T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans*, *T. sp. 5-4*. Les ronds noirs signalent les protéines OppA. b) le même gel coloré avec des réactifs liant les parties glycosylées des glycoprotéines.

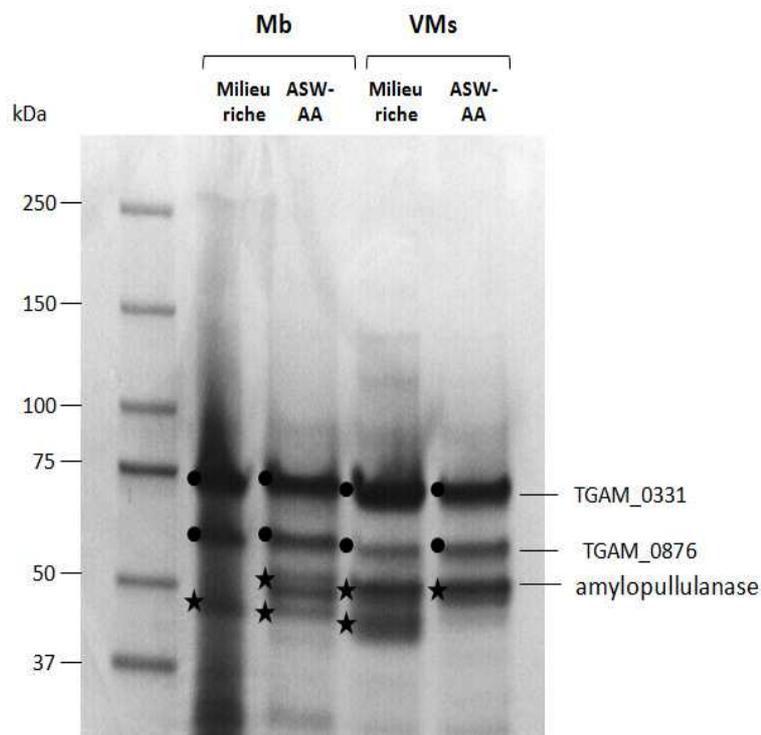


Figure 33 : SDS-PAGE de préparations de VMs et de membranes cellulaires de *T. gammatolerans* cultivée en milieu riche (contenant des peptides) et en milieu minimum ASW-AA (eau de mer artificielle supplémentée d'un mélange de 20 acides aminés). Les protéines OppA (TGAM_0331 et TGAM_0876) sont indiquées avec des ronds noirs et la protéine amylopullulanase est signalée avec des étoiles noires.

De façon similaire, la coloration de gels polyacrylamides présentant les profils protéiques des VMs et des membranes cellulaires des trois souches de Thermococcales avec des réactifs liant les groupements glucidiques des glycoprotéines révèle que les protéines TK1804, TGAM_0876 et TGAM_0331 sont également des glycoprotéines (Figure 32). La mise en évidence de ces protéines OppA au niveau des VMs suggère certains rôles pour ces VMs, tels que la nutrition des cellules via l'apport des peptides capturés à partir du milieu.

Comme ces résultats ont été obtenus avec des souches de *Thermococcus* cultivées en milieu riche contenant des peptides, nous nous sommes demandés si l'enrichissement en protéines OppA dans ces VMs était dû à une surexpression de ces protéines déclenchée par la présence de peptides dans le milieu. Nous avons ainsi tenté de cultiver *T. kodakaraensis* et *T. gammatolerans* en milieu minimum contenant seulement des acides aminés comme unique source de carbone. Cependant, contrairement à *T. gammatolerans*, nous n'avons pas réussi à faire croître *T. kodakaraensis* dans ces conditions. Les gels SDS-PAGE obtenus avec les VMs et les membranes cellulaires de *T. gammatolerans* cultivée en milieu minimum révèlent une composition protéique similaire à celle obtenue lorsque la souche est cultivée en milieu riche, les protéines TGAM_0876 et TGAM_0331 étant toujours très fortement exprimées tout comme la protéine amylopullulanase (Figure 33). Ainsi, ces résultats suggèrent que la capture de peptides à partir du milieu pour la nutrition ne peut pas constituer l'unique rôle pour ces protéines. Il est probable que les VMs intègrent les peptides synthétisés par les cellules elles-mêmes (de la même ou de différentes espèces), suggérant un rôle dans la signalisation ou la compétition entre cellules.

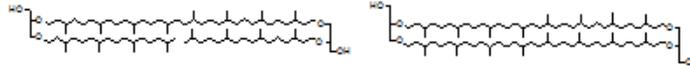
La recherche de protéines potentiellement impliquées dans la vésiculation

Même si les protéines OppA sont particulièrement abondantes dans les VMs des Thermococcales étudiées, d'autres protéines ont également attiré notre attention comme la stomatine et une protéine homologue à l'ATPase eucaryote Vps4. Les travaux publiés concernant ces protéines laissent en effet penser que celles-ci pourraient être impliquées dans la formation des VMs. La protéine stomatine a été repérée dans les VMs de

T. kodakaraensis (TK0348) et dans les VMs et membranes cellulaires de *T. sp.* 5-4 (figure 30 et tableau 7). L'homologue de la protéine eucaryote Vps4 (annoté ATPase AAA de la famille CDC48) a été détecté dans les membranes cellulaires de *T. sp.* 5-4 (Figure 30).

L'intérêt porté à la protéine stomatine provient de la lecture de nombreux articles rapportant son implication dans le bourgeonnement de VMs chez les Eucaryotes (Hagerstrand et al., 2006; Langhorst et al., 2008; Salzer et al., 2008). La stomatine est en fait une protéine universelle, présente dans les trois domaines du vivant (mais pas dans toutes les espèces). Chez les Thermococcales, il existe deux gènes paralogues codant pour deux protéines stomatine. L'équipe du Dr Matsui au Japon a cristallisé l'une de ces protéines chez *Pyrococcus horikoshii* (PH1511) (Yokoyama et al., 2008) et a proposé un modèle de formation des VMs basée sur la structure de cette protéine. Nous avons donc débuté une collaboration avec cette équipe dans le but d'étudier plus précisément le rôle de la stomatine chez les Thermococcales. Afin de savoir si cette protéine est véritablement impliquée dans la vésiculation chez ce groupe d'Archées, j'ai inactivé par mutation (Knock out) l'un des gènes (*tk0348*) codant cette protéine chez *T. kodakaraensis* (voir les grandes lignes du procédé en Annexe 4). Cependant, malgré quelques différences phénotypiques mineures (voir Annexe 4), nous avons constaté que la souche délétée pour ce gène produisait toujours des VMs. Ce résultat indique que la protéine stomatine TK0348 n'est pas indispensable à la formation des VMs. Il est toutefois possible que la protéine stomatine codée par le second gène (*tk1316*) puisse pallier à l'absence de la protéine stomatine codée par le gène *tk0348*. Il serait ainsi intéressant de vérifier la production de VMs chez le double mutant *tk0348-tk1316*.

La découverte d'un homologue de la protéine eucaryote Vps4 au niveau des membranes cellulaires de *T. sp.* 5-4 est également intéressante. Cette protéine est en effet connue pour interagir avec le système ESCRT-III lors de la formation des vésicules intraluminales à l'origine des exosomes chez les Eucaryotes (voir introduction, partie I. 1). Cependant, si nous avons pu détecter cette protéine dans les membranes de l'une des Thermococcales étudiées, nous n'avons identifié aucune des sous-unités homologues au système ESCRT-III des Eucaryotes. L'implication de la protéine Vps4 dans la formation des



	Lipides	GTGT-0		GDGT-0		Total
		ng/mg masse sèche	% total lipides	ng/mg masse sèche	% total lipides	
VMs	<i>T.kodakaraensis</i>	80	1,3	4782	98,7	4862
	<i>T. sp. 5-4.</i>	40	1,4	2933	98,6	2973
Membranes cellulaires	<i>T.kodakaraensis</i>	10	14,3	60	85,7	70
	<i>T. sp. 5-4.</i>	10	1,8	550	98,2	560

Tableau 8 : Composition en lipides des VMs et des membranes cellulaires de *T. kodakaraensis* et *T. sp. 5-4.*

GTGT-0 : glycerol triphytanyl glycerol tetraether.

GDGT-0: glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether.

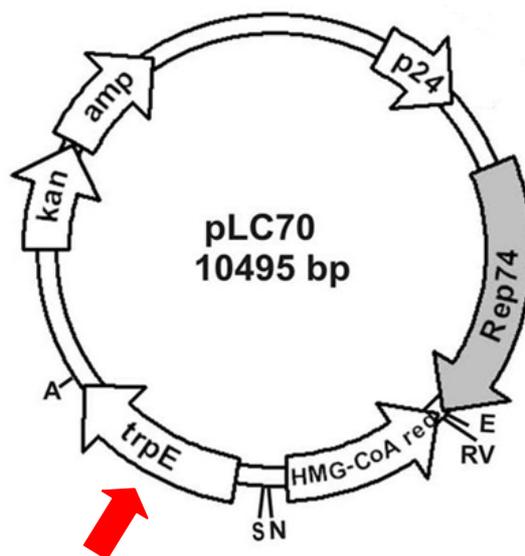


Figure 34 : Carte du plasmide pLC70 construit à partir du plasmide pTN1 de l'archée *Thermococcus nautilus* (voir partie III.) et du plasmide pCR2.1-TOPO de la bactérie *E. coli* (Santangelo et al., 2008). Ce plasmide comporte un gène responsable de la synthèse du tryptophane (flèche rouge) pouvant ainsi servir de marqueur.

VMs chez les Thermococcales ainsi que ses partenaires potentiels restent donc à déterminer.

Analyse de la composition en lipides des VMs et comparaison avec les membranes cellulaires

L'analyse des lipides des VMs et des membranes cellulaires de *T. kodakaraensis* et de *T. sp. 5-4* ⁽⁵⁾ réalisée par Stefan Schouten (Institut de recherche marine, Pays-bas) révèle la présence de deux types lipidiques : le glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether (GDGT-0) et le glycerol triphityanyl glycerol tetraether (GTGT-0) (Tableau 8). Si les VMs et les membranes comportent ces deux lipides dans des proportions assez similaires (nette abondance du lipide GDGT-0 par rapport au lipide GTGT-0), les VMs apparaissent nettement enrichies en lipides par rapport aux membranes. Ceci pourrait s'expliquer par un rapport surface lipidique sur volume beaucoup plus important dans le cas des VMs par rapport aux cellules.

3. La transformation des cellules avec des vésicules membranaires

L'hypothèse selon laquelle les VMs de Thermococcales joueraient un rôle dans le transport d'ADN émane des observations rapportant leur association avec de l'ADN chromosomique (Soler et al., 2008), et dans le cas de la souche *Thermococcus nautilus*, avec de l'ADN plasmidique (Soler et al., 2011). L'élaboration par l'équipe de John Reeve du plasmide navette pLC70, construit à partir du plasmide pTN1 de *T. nautilus* et du plasmide pCR2.1-TOPO d' *E. coli* (Santangelo et al., 2008) a permis de tester cette hypothèse. En effet, en plus de pouvoir se répliquer dans les cellules du genre *Thermococcus* et chez *E. coli*, ce plasmide comporte un gène responsable de la synthèse du tryptophane pouvant ainsi servir de marqueur (Figure 34).

⁽⁵⁾ La faible quantité de VMs obtenue pour *T. gammatolerans* a rendu impossible l'identification des lipides qu'elles contiennent.

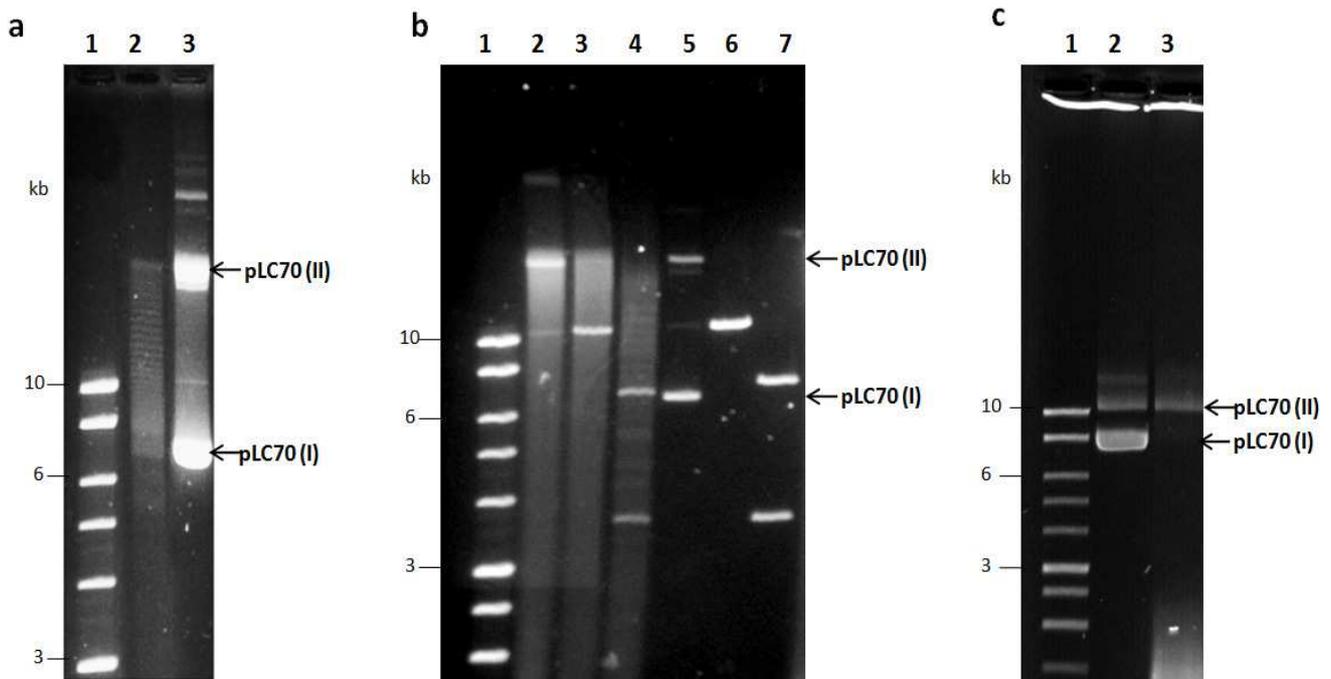


Figure 35 : Transformation de la souche *T. kodakaraensis* KUW1 avec le plasmide navette pLC70 (a, b) et avec les VMs associées à ce plasmide (c).

a) Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique extrait des cellules de *T. kodakaraensis* KUW1 après transformation avec le plasmide pLC70 (2) et pLC70 purifié à partir d'*E. coli* (3). b) Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN extrait des VMs de *T. kodakaraensis* KUW1 transformé avec pLC70 (2, 3, 4) et pLC70 extrait d'*E. coli* (5, 6, 7). (3, 6) ADN digéré par Not1, (4, 7) ADN digéré par BamH1. c) Analyse électrophorétique sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique extrait des cellules *T. kodakaraensis* KUW1 après transformation avec les VMs associées au plasmide pLC70 (3) et pLC70 extrait d'*E. coli* (2). (1) Smart ladder (Promega). pLC70 (I) : forme surenroulée ; pLC70 (II) : forme circulaire ouverte.

Nous avons donc dans un premier temps transformé la souche *T. kodakaraensis* KUW1 (Trp-, Ura-) avec le plasmide pLC70. Les cellules de *T. kodakaraensis* KUW1 ont été concentrées puis mélangées avec le plasmide pLC70 pendant 2h à 85°C puis l'ensemble a été inoculé dans un milieu sélectif sans tryptophane. L'extraction d'ADN plasmidique suivant la transformation de cette souche révèle que celle-ci a bien intégré le plasmide (Figure 35a). Cependant, alors que le plasmide pLC70 isolé d'*E. coli* est surenroulé négativement (Figure 35a, puits 3), le plasmide pLC70 extrait de *T. kodakaraensis* migre sur gel d'agarose sous la forme d'une échelle de topoïsomères partiellement relâchés (Figure 35a, puits 2). Ce comportement a précédemment été mis en évidence pour des plasmides endogènes isolés à partir d'autres Archées hyperthermophiles (Charbonnier et al., 1992; Lopez-Garcia and Forterre, 1997) et peut être expliqué par l'absence d'ADN gyrase chez les Thermococcales.

Nous nous sommes alors interrogés sur la possibilité de trouver le plasmide pLC70 au niveau des VMs produites par la souche *T. kodakaraensis* KUW1 ayant subi la transformation. L'ADN a été extrait de ces VMs puis digéré avec les enzymes de restriction Not1 et BamH1 dont les sites sur le plasmide pLC70 sont connus. Le même plasmide extrait de la bactérie *E. coli* a subi les mêmes digestions afin de servir de contrôle. Les profils d'ADN sur gel d'agarose obtenus pour *T. kodakaraensis* et *E. coli* sont identiques (Figure 35b), révélant que le plasmide pLC70 est en effet associé aux VMs produites par la souche *T. kodakaraensis* KUW1 transformée.

La dernière étape a été de rechercher si ces VMs associées au plasmide pLC70 ont la capacité de transformer d'autres cellules dépourvues de plasmides. Pour cela, un protocole similaire à celui mis en place dans le cas de la transformation de la souche *T. kodakaraensis* KUW1 avec le plasmide pLC70 a été testé. Les cellules *T. kodakaraensis* KUW1 ont été mélangées avec des VMs associées au plasmide pLC70 pendant 2h à 85°C, puis l'ensemble a été réensemencé dans un milieu sélectif sans tryptophane (pour plus de détails, voir la partie matériels et méthodes). L'examen des fioles après plusieurs heures d'incubation révèle que les cellules ont poussé dans ce milieu. L'analyse électrophorétique de l'ADN plasmidique extrait de ces-dernières confirme qu'elles ont intégré le plasmide pLC70 (Figure 35c). Afin de savoir si l'ADN plasmidique permettant la

transformation correspond à de l'ADN adsorbé à la surface des VMs ou se trouve empaqueté à l'intérieur des VMs, cette expérience a également été réalisée en traitant préalablement les VMs à la DNase I. De façon similaire à la première fois, nous avons également obtenu des cultures positives. Ces résultats indiquent donc que les VMs peuvent transférer de l'ADN d'une cellule à une autre et qu'elles sont également capables de fusionner avec la cellule receveuse pour délivrer leur contenu.

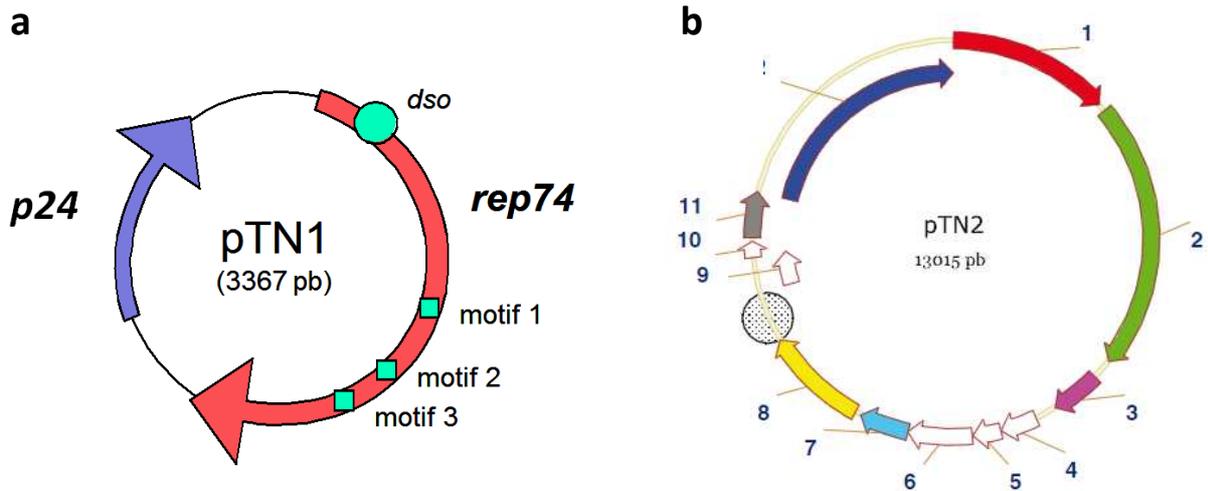


Figure 36: Carte des plasmides pTN1(a) et pTN2 (b) de *T. nautilus*.

Les ORFs (open reading frame) sont indiqués avec des flèches de couleur.

(a) Les trois motifs caractéristiques des protéines initiatrices de la réplication en cercle roulant sont indiqués. L'origine de réplication (dso) est également notée.

(b) 1 : hélicase putative de la superfamille SF1 ; 12 : ADN polymérase à activité primase, réverse transcriptase et nucléotide transcriptase.

(Soler et al., 2007)

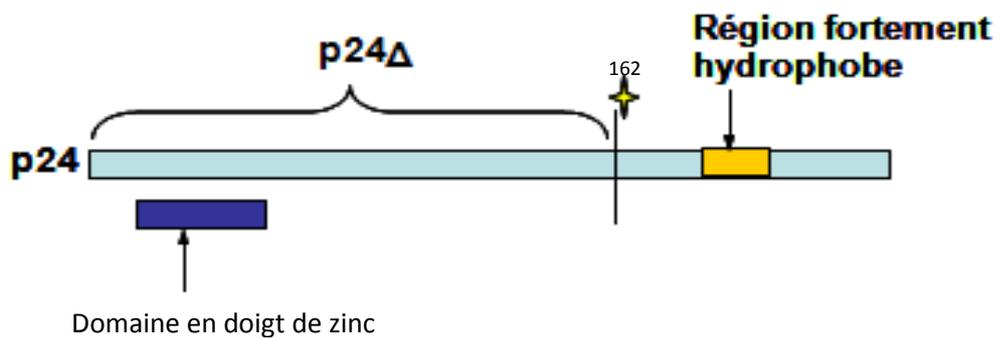


Figure 37 : Représentation schématique de la protéine p24.

La protéine p24 a également été produite sous forme tronquée, sans la région hydrophobe (p24Δ). L'étoile et le numéro du résidu indique la position dans la séquence protéique choisie pour le C-ter de la proprotéine tronquée.

III. *Thermococcus nautilus*, une souche produisant des « vésicules virales »

Thermococcus nautilus est également une Archée de l'ordre des Thermococcales qui a été isolée au laboratoire suite à la campagne Amistad de 1999. Cette souche comporte deux plasmides, appelés pTN1 et pTN2 (Figure 36), précédemment caractérisés (Soler et al., 2007; Soler et al., 2010).

Le plasmide pTN1 (plasmide *Thermococcus nautilus* 1) est un petit plasmide de 3 367 pb qui code deux protéines, Rep74 et p24, de 74 et 24 kDa respectivement. La protéine Rep74 est une protéine initiatrice de la réplication en cercle roulant alors que p24 est une protéine sans homologue connu (constat remis en cause par notre étude, voir plus loin dans le texte) qui contient notamment un segment hydrophobe ainsi qu'un domaine à motif en doigt de zinc (Figure 37). Pour ces raisons, cette protéine est annotée « protéine de fixation à l'ADN » et la présence du segment hydrophobe suggère que la protéine p24 est certainement ancrée dans la membrane plasmique.

pTN2 est un plasmide de plus grosse taille (13 015 pb) qui contient 12 ORFs (open reading frame) parmi lesquels trois sont homologues à des gènes codés par le virus PAV1 (*Pyrococcus abyssi* virus 1). pTN2 code notamment pour une hélicase putative de la superfamille SF1 et une nouvelle ADN polymérase (Soler et al., 2010). Les travaux se poursuivant au laboratoire ont montré que cette dernière possède les activités primase, réverse transcriptase et nucléotidyl-transférase.

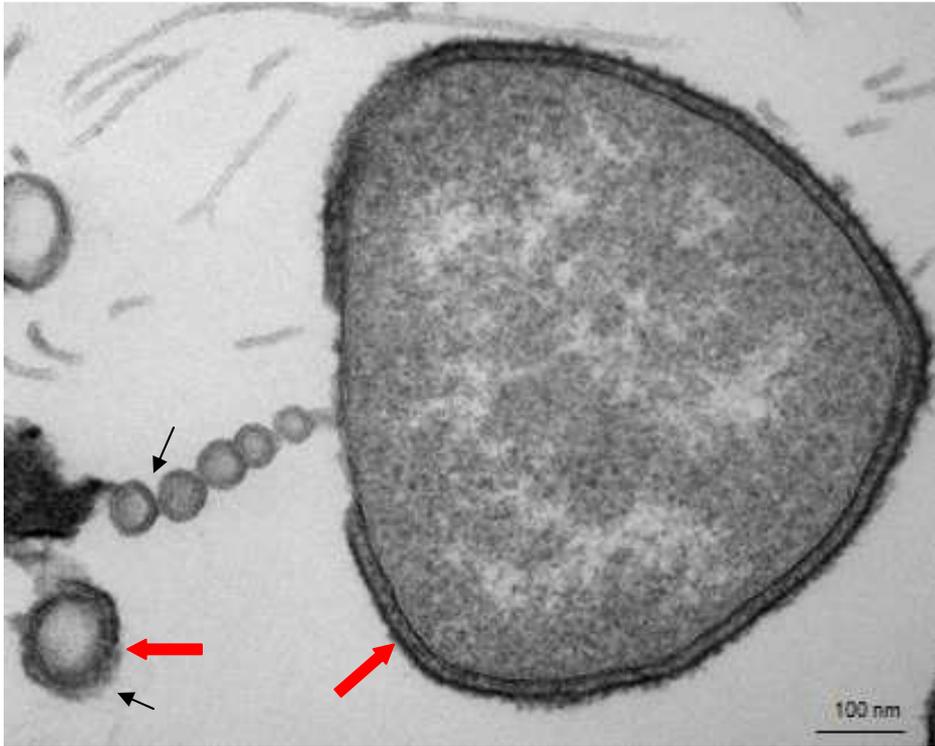


Figure 38 : Coupe fine de cellule et VMs (flèches noires) de *T. nautilus* observées au MET. Le S-layer (flèche épaisse rouge) a été « arraché » par la VM s'étant certainement formée en premier, laissant les autres VMs bourgeonner sans S-layer autour.

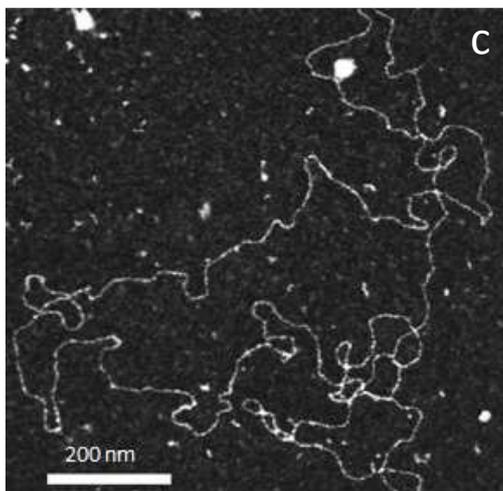
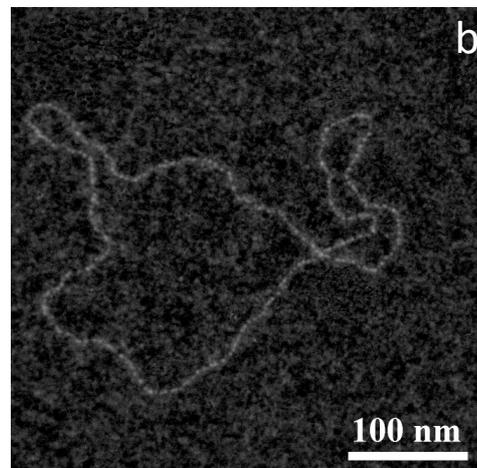
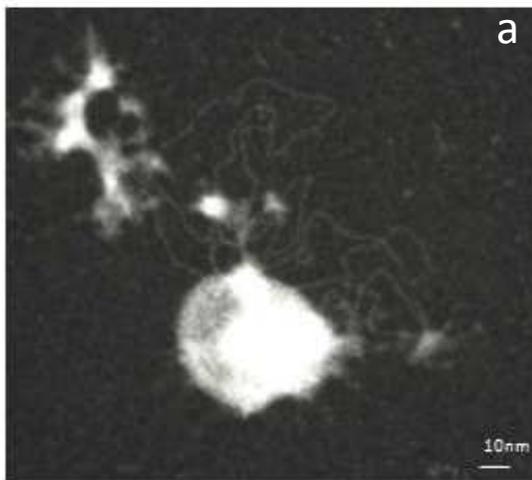


Figure 39 : Observations de VMs après addition de 1M de NaCl dans la préparation (a) et d'ADN extrait des VMs (b, c) au MET en coloration positive.

1. Le transport d'ADN plasmidique via les VMs chez *T. nautilus*

Comme les autres souches de la collection de *Thermococcales* disponibles au laboratoire, *T. nautilus* produit des VMs (Figure 38). Celles-ci ont la même structure que les VMs produites par les autres *Thermococcales* étudiées. Elles sont délimitées par la membrane plasmique surmontée de S-layer (à noter : une partie du S-layer de la cellule sur la figure 38 a été « arrachée » par la VM s'étant formée à priori en premier) et contiennent du cytoplasme. L'observation d'une préparation de VMs à laquelle a été ajoutée 1M de NaCl au microscope électronique à transmission (MET) par la technique de coloration positive (voir matériels et méthodes) montre certaines VMs associées à de l'ADN (Figure 39a). L'ajout de NaCl dans le milieu faisant éclater les VMs, il est probable que cet ADN se trouvait initialement empaqueté à l'intérieur des VMs. D'autres observations du même type réalisées sur de l'ADN extrait des VMs révèle la présence de structures circulaires de différentes tailles (Figure 39b et c). L'estimation de la taille de l'une d'elles, à 3,6 kb, suggère qu'il s'agit de pTN1 (Figure 39b). Cependant, un autre ADN circulaire, de beaucoup plus grosse taille a également été découvert (Figure 39c). D'après l'estimation de taille, ce plasmide est plus grand que pTN2.

Ces observations faites au MET, très intéressantes mais uniquement descriptives, amènent donc de nombreux questionnements. Quelle est la nature du deuxième ADN circulaire de grande taille retrouvé associé aux VMs ? La figure 39a correspond-elle bien à de l'ADN empaqueté à l'intérieur de la VMs ou s'agit-il d'ADN collé à l'extérieur ? Il apparaît donc très important d'essayer de répondre à ces questions afin de définir les modalités de transport d'ADN par ces VMs. De nouvelles expériences sont donc nécessaires pour poursuivre notre « enquête ».

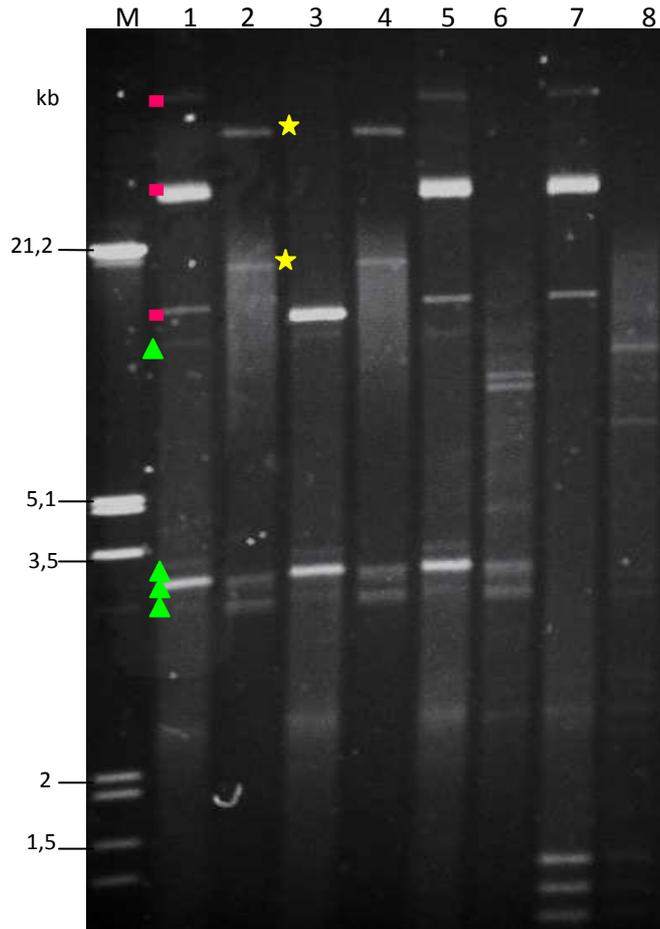


Figure 40 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique (1, 3, 5, 7) et de l'ADN extrait des VMs (2, 4, 6, 8) de *T. nautilus*.

(3,4) digestion avec BamHI ; (5, 6) digestion avec XhoI ; (7, 8) digestion avec KpnI. M : ADN de phage lambda digéré par EcoRI et Hind III (Fermentas). Les bandes correspondant au plasmide pTN1 sont indiquées par des triangles verts ; les bandes correspondant au plasmide pTN2 sont signalées par les carrés roses. Les étoiles jaunes indiquent la présence d'un autre élément extrachromosomique (pTN3).

Enzymes de restriction	Sites sur pTN1	Sites sur pTN2
BamHI (G/GATCC)	0 site	3 sites (417 ; 717 ; 11 881)
XhoI (C/TCGAG)	0 site	0 site
Acc 651 (G/GTACC)	4 sites (250 ; 975 ; 1 120 ; 1 274)	0 site
Pst I (CTGCA/G)	1 site (3 619)	0 site
Hind III (A/AGCTT)	4 sites (520 ; 660 ; 975 ; 1 464)	4 sites (300 ; 750 ; 2 434 ; 9 531)
SmaI (CCC/GGG)	1 site (3 619)	1 site (13 015)
EcoRI (G/AATTC)	0 site	6 sites (184 ; 1 756 ; 1 979 ; 2 199 ; 3 503 ; 3 394)
KpnI (GGTAC/C)	4sites (250 ; 975 ; 1 120 ; 1 274)	0 site

Tableau 9 : Sites de restriction présents sur les plasmides pTN1 et pTN2, déterminés grâce au logiciel Vector NTI®.

2. La découverte d'un nouvel élément extrachromosomique chez *T. nautilus*

Analyse électrophorétique de l'ADN plasmidique et de l'ADN extrait des VMs de *T. nautilus*

Afin de vérifier si l'ADN circulaire de grande taille extrait des VMs et observé en MET correspond au plasmide pTN2, nous avons digéré l'ADN plasmidique et l'ADN extrait des VMs avec différentes enzymes de restriction, puis observé les profils de restriction sur gel d'agarose (Figure 40). La séquence des plasmides pTN1 et pTN2 étant alors connue, nous pouvions ainsi déterminer quelles enzymes pouvaient induire ou non des coupures dans ces plasmides (Tableau 9). L'observation des profils d'ADN plasmidique et extrait des VMs de *T. nautilus* non digérés sur gel d'agarose montrent déjà des différences, suggérant que les VMs ne transportent pas exactement le même ensemble de plasmides que ceux présents dans la cellule. La digestion de ces deux types d'ADN par l'enzyme BamHI (puits 3 et 4), coupant pTN2 en trois sites mais ne coupant pas pTN1 (voir Tableau 9), modifie le profil de l'ADN plasmidique en coupant plusieurs bandes (carrés roses sur le gel de la figure 40), mais ne change rien au profil d'ADN extrait des vésicules. La digestion des ces ADN par l'enzyme KpnI (puits 7 et 8), connue pour couper pTN1 en 4 sites (voir tableau 9) induit une modification du profil d'ADN plasmidique et du profil d'ADN extrait des vésicules en coupant des bandes situées au même niveau dans les deux cas (indiquées par des triangles sur le gel de la figure 40). Ces deux digestions, permettent ainsi d'identifier sur gel les bandes correspondant aux plasmides pTN1 et pTN2. Elles indiquent que le plasmide pTN1 est associé aux VMs ce qui corrobore l'observation que nous avons faite en MET en observant un ADN circulaire d'environ 3,6 kb à partir de l'ADN extrait des vésicules (voir paragraphe précédent). Au contraire, le plasmide pTN2, enrichi dans l'ADN plasmidique n'apparaît pas associé aux VMs puisqu'il n'est pas visible dans le profil obtenu à partir de l'ADN extrait des vésicules. Un autre résultat particulièrement intrigant provient de la digestion de l'ADN plasmidique et de l'ADN des vésicules par l'enzyme XhoI (enzyme qui ne digère ni pTN1, ni pTN2 ; puits 5 et 6). En effet, alors que le profil d'ADN plasmidique n'est pas modifié (puits 5), deux bandes présentes initialement sur le profil

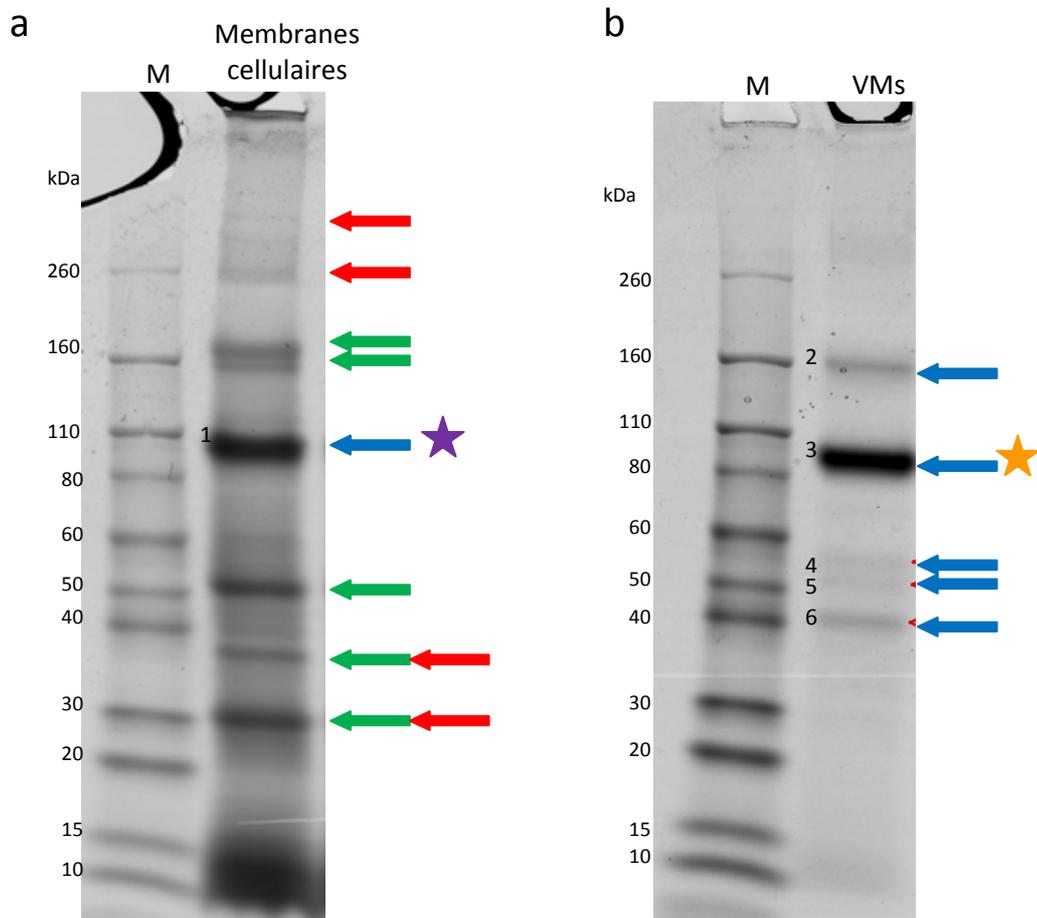


Figure 41 : SDS-PAGE des membranes cellulaires (a) et des VMs (b) de *T. nautilus*. Seules les protéines majoritaires ont été analysées par spectrométrie de masse. Des protéines cytoplasmiques (flèches vertes) et des protéines membranaires (flèches rouges) ont été identifiées dans les fractions de membranes cellulaires. Les bandes dont les protéines n'ont pas pu être identifiées par homologie de séquence avec les souches séquencées sont indiquées par les flèches bleues. Les étoiles signalent que deux de ces bandes contiennent des protéines de même taille, probablement identiques. Se référer au texte (partie III. 4) pour les numéros 1-6.

de l'ADN extrait des vésicules (puits 2) disparaissent (étoiles sur le gel de la figure 40). Ces deux bandes sont par ailleurs également coupées par l'enzyme KpnI (puits 8).

Cette observation suggère donc l'existence d'un autre élément extrachromosomique (plasmide ? virus ?) non identifié jusqu'alors, possédant les sites de restriction XhoI et KpnI, enrichi dans l'ADN extrait des vésicules où il apparaît clairement et absent ou en quantité infime dans l'ADN plasmidique.

Identification des protéines majoritaires présentes dans les membranes cellulaires et les VMs de *T. nautilus*

Parallèlement à cette découverte, nous avons recherché à déterminer les protéines majoritaires entrant dans la constitution des VMs produits par *T. nautilus*. Comme pour les autres souches de Thermococcales sur lesquelles nous avons travaillé, nous avons comparé le profil protéique des VMs avec celui des membranes cellulaires sur gel SDS-PAGE (Figure 41). Les bandes majoritaires ont alors été analysées par spectrométrie de masse. Rappelons, qu'à cette époque, le génome de cette souche n'était pas connu. L'identification de certaines de ces bandes s'est donc faite en cherchant des homologues chez les souches séquencées telles que *T. kodakaraensis* ou *T. gammatolerans*. Ce travail a ainsi permis de déterminer la majorité des protéines présentes dans les membranes des cellules (flèches rouges et vertes), celles-ci correspondant à des protéines membranaires (ex : oxidoréductase membranaire, NADH dehydrogenase,...) et cytoplasmiques (ex : 4-aminobutyrate aminotransferase, facteur d'élongation alpha-1,...). Une protéine, présente en très forte proportion, n'a cependant pas pu être identifiée par cette méthode (étoile violette). D'autre part, l'identification des protéines majoritaires dans les VMs s'est révélée peu fructueuse puisqu'aucun homologue n'a été trouvé dans les souches séquencées (flèches bleues). De façon intéressante, la bande observée sur le profil des membranes cellulaires dont les protéines n'ont pas été identifiées (étoile violette) est située au même niveau que l'une des bandes particulièrement intense sur le profil des VMs (étoile orange), suggérant que ces deux bandes contiennent probablement les mêmes protéines.

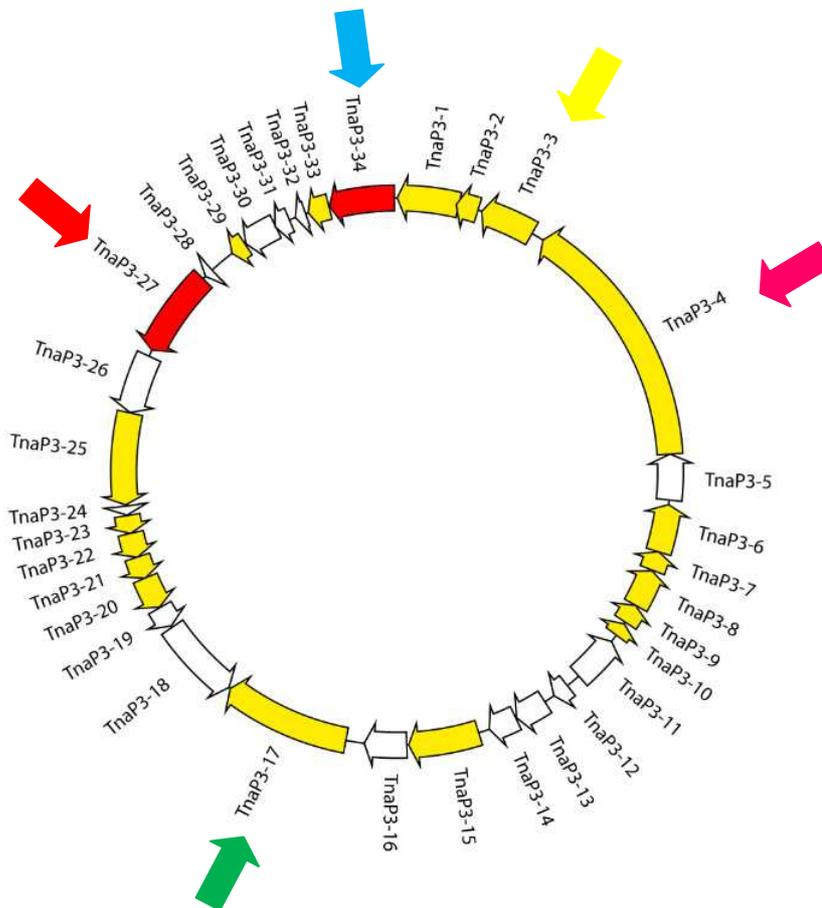
Nous avons ainsi corrélé la découverte du nouvel élément extrachromosomique dans cette souche à notre incapacité à déterminer par homologie de séquence la nature des protéines présentes dans les VMs et en partie dans les membranes cellulaires. Nous avons alors supposé que ces protéines indéterminées étaient probablement codées par l'élément extrachromosomique que nous venions de découvrir.

Ainsi, cette souche se révélait plus énigmatique que nous l'avions supposé au départ et beaucoup de questions nous assaillaient à son propos. Nous nous interrogeons sur la nature de ce nouvel élément extrachromosomique ainsi que sur le fait d'observer un enrichissement du plasmide pTN1 et de cet ADN non identifié dans l'ADN extrait des vésicules, alors que le plasmide pTN2 était absent ou associé en très faible quantité aux VMs. La solution la plus simple (mais pas forcément la moins onéreuse) qui nous est apparue pour lever le mystère sur cette souche, fut alors d'effectuer son séquençage.

3. Le plasmide pTN3, un génome viral

Nous avons donc demandé à la société « Fidelity Systems » basée aux Etats-Unis d'effectuer le séquençage du génome de *T. nautilus* ainsi que des éléments extrachromosomiques associés. Ce séquençage nous a permis d'une part de connaître la taille du génome de *T. nautilus* (1 976 356 pb, taille similaire à celle des autres Archées de l'ordre des Thermococcales), mais également de confirmer la présence d'un élément extrachromosomique autre que pTN1 et pTN2, que nous avons nommé pTN3 (plasmide *Thermococcus nautilus* 3).

Nous avons alors entrepris la caractérisation de ce nouveau plasmide (travail réalisé en collaboration avec Mart Krupovic, Jacques Oberto et Patrick Forterre). Ce dernier est de grande taille (18 345 pb) et la première annotation de son génome a révélé un très grand nombre d'ORFs codant pour des protéines orphelines ou codant pour des protéines hypothétiques chez *T. kodakaraensis* (Figure 42). De façon intéressante, quatorze

a**b**

TNaP3-1 protéine hypothétique (TK1357)
 TNaP3-2 protéine hypothétique (TK1359)
 TNaP3-3 protéine hypothétique (TK1360),
 homologue à la protéine p24 de
T. nautilus
 TNaP3-4 protéine de réplication hélicase MCM
 (TK1361)
 TNaP3-5 protéine orpheline
 TNaP3-6 protéine hypothétique (TK1364)
 TNaP3-7 protéine hypothétique (TK1366)
 TNaP3-8 protéine hypothétique (TK0100)
 TNaP3-9 protéine hypothétique (TK1368)
 TNaP3-10 protéine hypothétique (TK1371)
 TNaP3-11 protéine orpheline
 TNaP3-12 protéine orpheline
 TNaP3-13 protéine orpheline
 TNaP3-14 protéine orpheline
 TNaP3-15 protéine hypothétique (TK1243)
 TNaP3-16 modulateur transcriptionnel de la
 superfamille Pemk
 TNaP3-17 intégrase, fragment N-ter (TK1378)
 intégrase, fragment C-ter (TK1342)

TNaP3-18 protéine orpheline
 TNaP3-19 carboxypeptidase
 TNaP3-20 protéine hypothétique (TK1347)
 TNaP3-21 protéine hypothétique (TK1348)
 TNaP3-22 protéine hypothétique (TK1349)
 TNaP3-23 protéine hypothétique (TK1350)
 TNaP3-24 protéine orpheline
 TNaP3-25 protéine membranaire
 hypothétique (TK1351)
 TNaP3-26 protéine orpheline
 TNaP3-27 protéine majoritaire
 de capsid MCP (TK1353)
 TNaP3-28 protéine orpheline
 TNaP3-29 protéine hypothétique (TK1354)
 TNaP3-30 protéine impliquée dans la liaison
 à des acides nucléiques, de la superfamille
 PIN (TK1751)
 TNaP3-31 protéine orpheline
 TNaP3-32 protéine hypothétique (TGAM_0101)
 TNaP3-33 protéine hypothétique (TK1355)
 TNaP3-34 ATPase impliquée dans l'empaquetage
 d'ADN viral (TK1356)
 TNa2292 protéine orpheline

Figure 42 : Le génome de pTN3.

(a) Représentation schématique de l'annotation du génome de pTN3. Les flèches de couleur pointent les gènes codant pour cinq protéines intéressantes, homologues aux protéines codées dans le génome du virus intégré TKV4 (voir texte) ; en jaune et rouge : les gènes ayant des homologues dans le génome de TKV4 ; en rouge : les gènes codant la protéine virale de capsid et l'ATPase impliquée dans l'empaquetage de l'ADN viral. (b) Liste des ORFs identifiés chez pTN3. Les homologues identifiés chez *T. kodakaraensis* ou *T. gammatolerans* sont indiqués entre parenthèses. L'ensemble des protéines homologues à celles codées par TKV4 sont en rouge.

protéines codées par pTN3 sont homologues à des protéines codées dans le génome du virus intégré TKV4 (*Thermococcus kodakaraensis* virus 4) (voir liste des protéines dans la figure 42b). Cinq d'entre elles ont particulièrement attiré notre attention (voir les flèches colorées de la figure 42a) : l'intégrase (TNa0017= fragment N-ter de l'intégrase/ TNa2274=fragment C-ter de l'intégrase) qui est une protéine permettant l'intégration de plasmides ou virus dans le chromosome (des analyses bioinformatiques ont d'ailleurs indiqué que ce plasmide existe à l'état intégré); l'hélicase de type MCM (minichromosome maintenance) (TNa004), qui est la principale hélicase répliquative des Archées et des Eucaryotes ; un homologue de la protéine p24 codée par le plasmide pTN1 (TNa003) ; une protéine majoritaire de capsid (TNa2284) caractérisée par sa forme en « double jelly roll fold »⁽⁶⁾ et une ATPase (TNa2291) impliquée dans l'empaquetage des acides nucléiques viraux dans les virions. Ces deux dernières protéines sont notamment conservées au sein de la lignée d'adenovirus PRD1 (virus possédant de l'ADN double brin à capsid icosaédrique) qui comprend notamment la famille de virus NCLDV (nucleocytoplasmic large DNA viruses) infectant les Eucaryotes, le virus bactérien PRD1 et le virus STIV (Sulfolobus turreted icosahedral virus) chez les Crénarchées.

La découverte de gènes codant pour ces protéines de type viral est intrigante et remet en question la nature de ce « plasmide ». Peut-on dire que pTN3 est un virus ? Dans ce cas-ci, les bandes non identifiées sur gel SDS-PAGE contiennent-elles la protéine de capsid codée par pTN3 (d'où l'impossibilité d'identifier les protéines qu'elles contenaient par homologie de séquence avec les autres souches de Thermococcales séquencées) ?

4. Le plasmide pTN3, un génome viral...transporté par des vésicules membranaires !

La constitution d'une nouvelle banque de séquences pour *T. nautilus* nous a alors permis de déterminer la nature des protéines qui n'avaient pas pu être identifiées sur les profils des gels SDS-PAGE chargés avec les VMs et les fractions membranaires (Figure 41).

⁽⁶⁾ *jelly roll (angl.) : gâteau roulé*

De nouveaux gels SDS-PAGE reproduisant les mêmes profils protéiques que les précédents gels ont donc été resoumis à l'analyse par spectrométrie de masse. Les résultats ont alors indiqué que les protéines contenues dans les deux bandes situées au même niveau sur les gels des membranes et des VMs (bandes numérotées 1 et 3 dans la figure 41) ne sont finalement pas des protéines de capsid virale, comme nous l'avions supposé, mais des récepteurs de peptides de la famille des « Oligopeptide-binding proteins A » (OppA). Cette protéine a aussi été identifiée dans une autre bande (bande 2, figure 41b) où elle correspond certainement à un dimère. Rappelons que les protéines OppA ont également été trouvées dans les VMs et les fractions membranaires des autres souches de Thermococcales étudiées dans ce travail de thèse (*T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans* et *T. sp. 5-4*) où elles apparaissent particulièrement enrichies (voir partie II. 2). D'autres protéines présentes sur le profil du gel de la figure 41b ont pu être identifiées : une protéine prédite pour être une phosphohydrolase (bande 4), le composant périplasmique d'un ABC transporteur permettant le transport du fer (bande 5) et le composant périplasmique d'un ABC transporteur non caractérisé (bande 6). Ainsi, aucune protéine de type viral n'a pu être identifiée dans la composition des VMs. Ceci suggère que le plasmide pTN3 correspond à un génome viral ne fabriquant pas (ou plus) de capsid et utilise les VMs produites par cette souche pour se propager.

5. La nature de l'association plasmides-VMs chez *T. nautilus*

Comme nous l'avons vu précédemment sur gel d'agarose (Figure 40), les plasmides pTN1, pTN2 et pTN3 sont plus ou moins enrichis (voire peut être absents) dans les fractions d'ADN plasmidique et d'ADN extrait des vésicules. Ainsi, le plasmide pTN2 n'apparaît pas sur le profil d'ADN extrait des VMs, suggérant qu'il n'est pas (ou très peu) associé à ces vésicules alors que les plasmides pTN1 et pTN3 leur sont associés de façon bien marquée. Les modalités de cette association restent cependant vagues et méritent d'être mieux définies. Ces plasmides sont-ils transportés à l'extérieur ou à l'intérieur des VMs ? Dans ce dernier cas, existe-il un empaquetage spécifique qui expliquerait que les

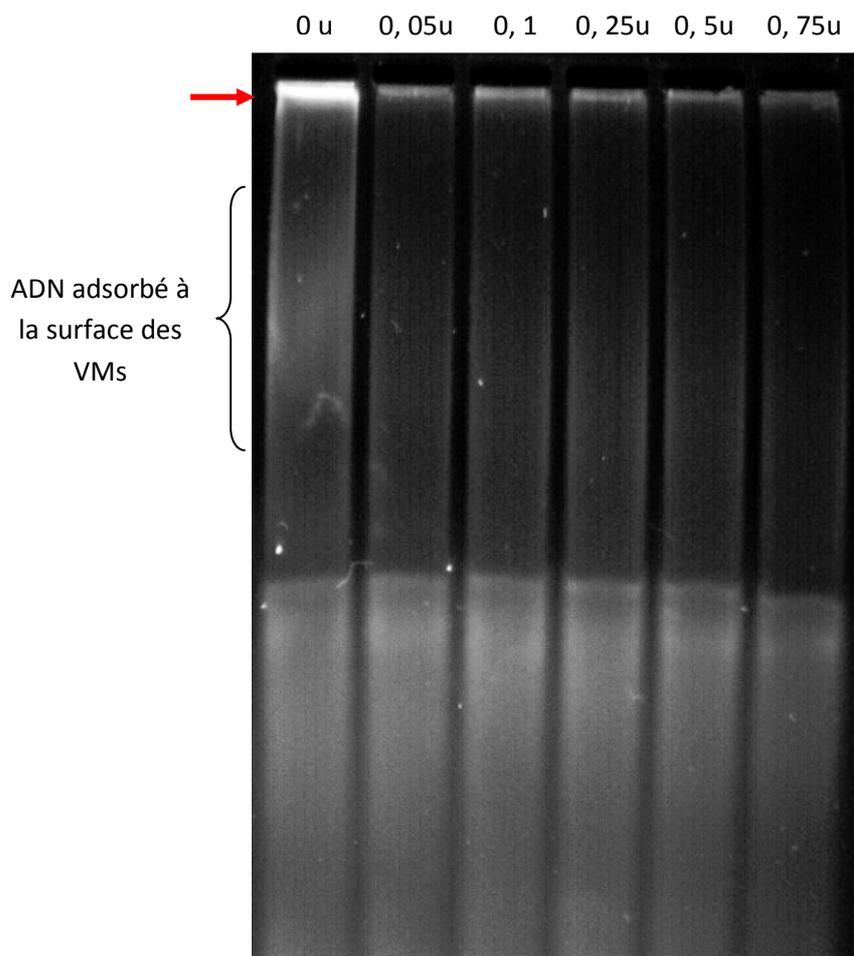


Figure 43: Gamme de DNase I permettant de déterminer la quantité de cette enzyme nécessaire à l'élimination de l'ADN situé à l'extérieur des VMs.

30 μ L de préparations de VMs sont traités avec différentes quantités de DNase I (allant de 0 à 0,75u) pendant 1h à 37°C, puis mis à migrer sur gel d'agarose. L'ADN contenu dans les vésicules de grosse taille et de nature lipidique reste, avec ces-dernières, dans les puits du gel (flèche rouge), tandis que l'ADN adsorbé à leur surface peut se décrocher et migrer, permettant son observation sur gel.

Dans cet exemple de gamme, le traitement de 30 μ L de VMs avec 0,05u de DNase I suffit à éliminer l'ADN externe. Un volume plus conséquent (500 μ L) de VMs est alors traité avec la quantité correspondante de DNase I, qui est ensuite inactivée, avant d'en extraire l'ADN.

plasmides pTN1 et pTN3 soient associés aux VMs, alors que le plasmide pTN2 ne l'est pas ?

Le traitement des VMs avec la DNase I permet de déterminer la localisation des plasmides pTN1 et pTN3 associés aux VMs

Nous avons dans un premier temps essayé de déterminer le mode d'association des plasmides aux VMs, soit à l'extérieur ou à l'intérieur des VMs, en traitant celles-ci avec de la DNase I. Pour cela, nous avons évalué la quantité de DNase I nécessaire à la dégradation de l'ADN externe aux VMs. En effet, durant la croissance des cellules, certaines d'entre elles lysent (surtout durant la phase stationnaire), libérant ainsi leurs acides nucléiques dans le milieu de culture. L'ADN relargué par les cellules peut alors venir se coller contre les structures membranaires, telles que les vésicules. L'ADN génomique associé aux VMs des Thermococcales étudiées dans l'article de Soler *et al.* (Soler et al., 2008) provient certainement (au moins en partie) d'un tel phénomène. Pour savoir si les plasmides retrouvés associés aux VMs sont localisés à l'intérieur des VMs ou simplement adsorbés à leur surface, nous avons établi une gamme de DNase consistant à traiter des volumes égaux de VMs de *T. nautilus* avec différentes quantités de DNase I. A l'issue de cette digestion, les VMs sont mises à migrer sur gel d'agarose (voir un exemple de gel dans la figure 43). L'objectif de cette gamme est de déterminer la quantité exacte d'enzyme permettant de dégrader l'ADN situé à l'extérieur des VMs (résultant en l'absence d'ADN génomique et plasmidique sur gel, ou seulement à l'état dégradé) tout en observant la présence d'ADN dans le puits (ADN qui n'a pas pu migrer car inclus dans les VMs riches en lipides et de trop grande taille). Une fois cette quantité déterminée, un plus vaste volume de VMs est traité avec le nombre d'unités de DNase correspondant, puis l'ADN est extrait de cette préparation en faisant éclater les VMs grâce à un mélange SDS - protéinase K (voir matériels et méthodes). Une fois extrait, l'ADN des VMs est mis à migrer sur gel d'agarose. Du fait du traitement DNase, l'ADN observé sur gel correspond donc à celui qui se trouvait à l'intérieur des VMs. Ce protocole a préalablement été utilisé pour déterminer le mode de transfert du plasmide pLC70 (plasmide dérivé de pTN1) via les VMs produites par la souche *T. kodakaraensis* K UW1 transformée avec ce plasmide (voir partie II. 3). Les résultats avaient alors permis de conclure que ces vésicules

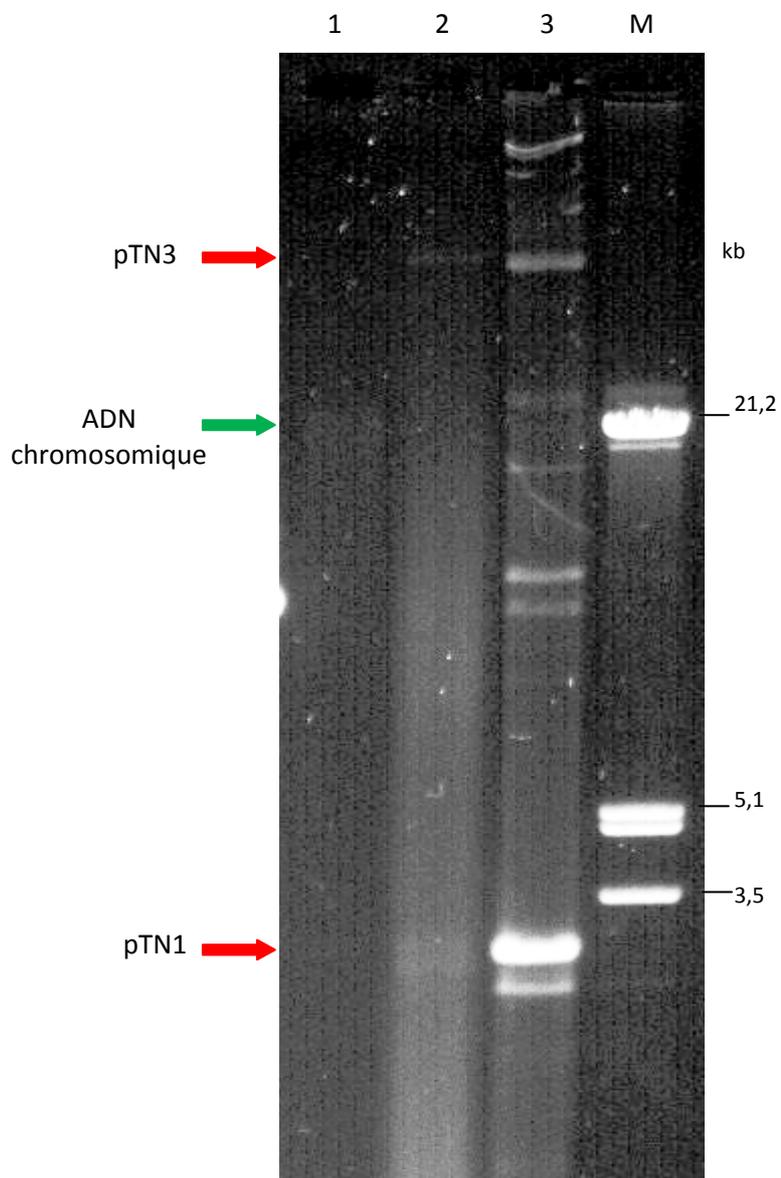


Figure 44 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des VMs de *T. nautilus*, traitées (2) ou non(1) à la DNase I. (3) ADN plasmidique de *T. nautilus*. M : ADN de phage lambda digéré par EcoRI et Hind III (Fermentas).

transportent le plasmide pLC70 dans leur lumen et qu'elles libèrent leur contenu dans les cellules receveuses en fusionnant avec celles-ci.

Dans le cas des VMs de *T. nautilus*, le traitement de 500 μ L de vésicules avec 1 unité de DNase I suffit à éliminer l'ADN externe. L'ADN de ces VMs traitées est ensuite extrait puis mis à migrer sur gel d'agarose. L'ADN de 100 μ L de VMs non traitées à la DNase I est également extrait pour figurer comme témoin. Le profil de l'ADN extrait des VMs traitées à la DNase I révèle la présence des deux plasmides, correspondant à pTN1 et pTN3 d'après le profil d'ADN plasmidique mis à migré parallèlement, ainsi que de l'ADN génomique dégradé par la DNase I (Figure 44, puits 2). Notons que selon le type de gel (grand ou petit, pourcentage en agarose...), la migration de pTN3 se fait de façons différentes. Celui-ci n'apparaît donc pas exactement au même niveau que sur le gel de la figure 40. Cependant, la digestion de cette bande (ADN obtenu avec une autre préparation similaire de VMs) avec les enzymes KpnI et XhoI donne exactement le même profil que celui obtenu sur le gel de la figure 40, indiquant qu'il s'agit bien du plasmide pTN3. Ces observations montrent donc que, de façon similaire au plasmide pLC70, les plasmides pTN1 et pTN3 sont localisés à l'intérieur des VMs produites par *T. nautilus*.

Les résultats de PCRs confirment que les plasmides pTN1 et pTN3 sont localisés dans les VMs

Pour confirmer ces résultats nous avons effectué des amplifications par PCRs (polymerase chain reaction) utilisant des amorces spécifiques d'une séquence de chaque plasmide (pTN1, pTN2 et pTN3) ainsi que du gène ribosomal 30S (TNa2172), utilisé ici comme marqueur d'ADN chromosomique. En effet, bien qu'apportant de nombreuses informations, l'électrophorèse sur gel d'agarose ne permet pas l'identification de bandes correspondant à de l'ADN présent en trop faible quantité. La conception des amorces destinées à l'amplification du plasmide pTN3 sous forme circulaire a nécessité de prendre certaines précautions. En effet, comme cité précédemment, celui-ci, en plus d'être à l'état libre dans la cellule, existe également sous forme intégrée dans le chromosome. L'intégration s'effectue au niveau du gène de l'intégrase par recombinaison homologue entre le site attB du gène codant pour l'ARNt et le site attP présent dans le gène de l'intégrase conduisant à la fragmentation de ce-dernier en deux parties (Figure 45). Afin

de s'assurer que le plasmide amplifié correspond bien à la forme libre, nous avons conçu des amorces spécialisées dans l'amplification du gène entier de l'intégrase (voir sur la figure 45). Les PCRs ont donc été effectuées en prenant comme matrice de l'ADN extrait des VMs de *T. nautilus* traitées à la DNase I (même protocole que celui exposé précédemment). Les témoins positifs ont été réalisés en utilisant les mêmes amorces et en prenant l'ADN total (ADN chromosomique + plasmidique) comme matrice. Les séquences de pTN1, pTN2, pTN3 et du gène ribosomal 30S ont été amplifiées dans ce dernier cas, de même que lorsque l'ADN extrait des VMs traitées à la DNase I a été utilisé comme matrice. Ces résultats confirment la présence des plasmides pTN1 et pTN3 intacts à l'intérieur des VMs et indiquent que le plasmide pTN3, qui n'apparaissait pas sur le profil de l'ADN plasmidique (Figure 40) est en réalité présent, mais certainement en trop faible quantité. Celui-ci est au contraire enrichi dans les VMs, expliquant qu'il soit significativement visible sur le profil d'ADN extrait des vésicules, sans être observable sur le profil d'ADN plasmidique (Figure 40).

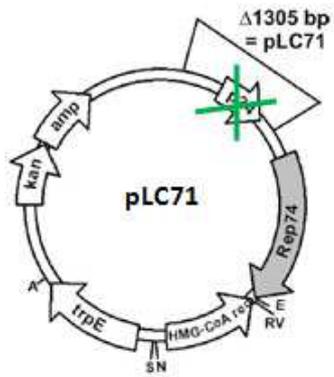
D'autre part, l'amplification du plasmide pTN2 à partir de l'ADN extrait des VMs indique sa présence dans cette préparation, certainement en très faible quantité puisqu'il n'est pas visible sur gel d'agarose (voir figures 40 et 44). Il est cependant difficile de savoir si ce plasmide se trouve intact dans les VMs ou s'il provient de l'ADN dégradé par la DNase I (si sa localisation est externe), qui est resté collé aux VMs (voir figure 44, puits 2). L'amplification du gène ribosomal à partir de l'ADN extrait des VMs est d'ailleurs probablement liée à la présence d'ADN chromosomique dégradé dans la préparation de VMs.

6. L'empaquetage des plasmides pTN1 et pTN3 dans les VMs

La protéine p24 est-elle impliquée dans l'empaquetage des plasmides pTN1 et pTN3 chez *T. nautilus* ?

Le fait que seuls les plasmides pTN1 et pTN3 soient présents de façon significative dans les VMs amène à s'interroger sur la possibilité d'un adressage spécifique. Rappelons que nous avons montré que le plasmide pLC70 est également localisé à l'intérieur des

a



b

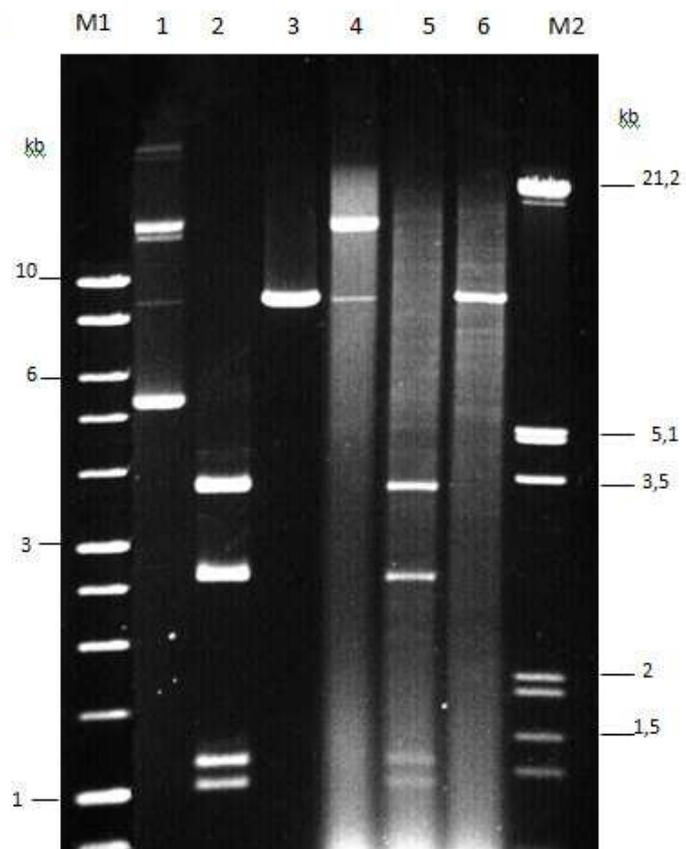


Figure 46 : Transformation de *T. kodakaraensis* KUW1 avec le plasmide pLC71.

a) Schéma du plasmide pLC71. Ce plasmide est dérivé du plasmide pLC70 auquel a été enlevé le site contenant le gène codant pour la p24. b) Electrophorèse sur gel d'agarose du plasmide pLC71 extrait d'*E. coli* (1, 2, 3) et de l'ADN extrait des VMs de *T. kodakaraensis* KUW1 après transformation avec le plasmide pLC71 (4, 5, 6). (2, 5) digestion avec l'enzyme Pst1. (3, 6) digestion avec l'enzyme BamHI. M1 : Smart ladder (Promega). M2 : ADN de phage lambda digéré par EcoRI et Hind III (Fermentas).

VMs produites par la souche *T. kodakaraensis* KUW1 (voir partie II. 3 des résultats). Nous avons donc recherché un élément commun à ces trois plasmides qui puisse expliquer leur empaquetage spécifique au sein des VMs et nous avons trouvé le gène codant la protéine p24. En effet, l'annotation du génome de pTN3 a révélé que l'«ORF» TNa003 code pour un homologue de cette protéine. De plus, le plasmide pLC70, élaboré à partir du plasmide pTN1 contient également le gène codant pour la protéine p24. En outre, comme nous l'avons mentionné précédemment, l'analyse de la séquence de cette protéine révèle qu'elle possède un segment hydrophobe, pouvant l'ancrer à la membrane plasmique, ainsi qu'un domaine à motif en doigt de zinc connu pour sa capacité à lier l'ADN (Figure 37). Ainsi, la protéine p24 apparaît être un très bon candidat pour empaqueter ces plasmides dans les VMs. Cependant, le fait que ces-derniers codent pour une protéine pouvant lier l'ADN et s'ancrer dans la membrane plasmique n'implique pas pour autant la spécificité de leur adressage dans les VMs. Cette spécificité nécessite en effet la présence d'un site particulier d'attachement reconnu par cette protéine qui serait présent uniquement au niveau des plasmides pTN1, pTN3 et pLC70.

Le plasmide pLC71, un plasmide dérivé de pLC70 ne codant pas pour la p24

Nous avons dans un premier temps tenté de déterminer si la protéine p24 constituait bien le bon candidat permettant d'accrocher les plasmides et de les conduire dans les VMs. Pour cela, Jaques Oberto, a construit le plasmide pLC71, dérivé du plasmide pLC70 auquel a été enlevé le gène codant pour la protéine p24. Ainsi, si notre hypothèse s'avérait juste, la souche de *T. kodakaraensis* KUW1 transformée avec le plasmide pLC71, ne devrait plus produire de VMs contenant celui-ci. Après transformation de cette souche avec le plasmide pLC71, nous avons extrait l'ADN des vésicules sécrétées par les cellules (non traitées à la DNase I), puis nous l'avons digéré avec les enzymes de restriction Pst1 (4 sites de restriction) et BamHI (2 sites de restriction). Afin de valider l'identité du plasmide pLC71 dans l'ADN extrait des vésicules, le plasmide pLC71 extrait d'*E. coli* a également été digéré avec les mêmes enzymes. Les profils de restriction obtenus à partir de ce dernier sont tout à fait identiques aux profils obtenus à partir de l'ADN extrait des VMs (Figure46). Ces résultats indiquent que le plasmide pLC71, bien que ne codant pas

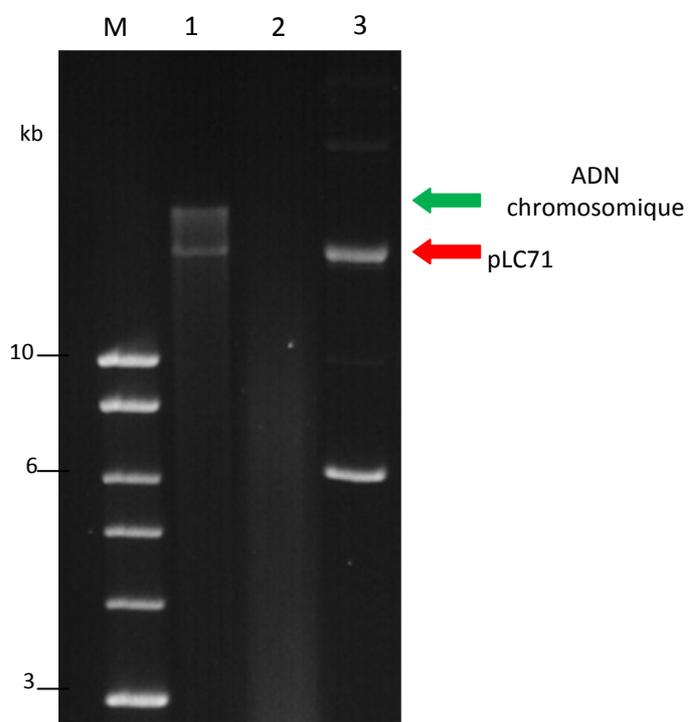


Figure 47 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des VMs de *T. kodakaraensis* KUW1 transformé avec le plasmide pLC71, traitées (2) ou non (1) à la DNase I.

(3) plasmide pLC71 extrait d'*E. coli*. M : Smart ladder (Promega)

pour la protéine p24, est associé aux VMs produites par *T. kodakarensis*.

Cependant, il nous est apparu nécessaire de mieux définir la façon dont ce plasmide est associé aux VMs pour invalider totalement notre hypothèse de départ sur le rôle de la protéine p24. Nous avons donc recherché si le plasmide pLC71 se situe à l'intérieur des VMs ou si celui-ci est simplement adsorbé à leur surface. Pour cela, nous avons procédé au même type d'expérience utilisant la DNase I que précédemment. Nous avons déterminé la quantité de cette enzyme à appliquer sur un volume donné de vésicules pour dégrader l'ADN extérieur aux VMs. Après traitement, nous avons extrait l'ADN de ces vésicules traitées à la DNase I et nous l'avons fait migrer parallèlement à de l'ADN extrait de VMs non traitées (Figure 47). Les profils électrophorétiques ne révèlent aucune bande discrète dans le cas de l'ADN extrait des VMs traitées à la DNase I (puits 2), au contraire des VMs qui n'ont pas été traitées (puits 1). Deux bandes correspondant à l'ADN génomique et au plasmide pLC71 sont particulièrement bien visibles dans ce dernier cas. Ces résultats indiquent que la DNase I a dégradé, en plus de l'ADN chromosomique, le plasmide pLC71 qui se trouvait donc situé à l'extérieur des VMs. Le mode d'association de ce plasmide à la surface des VMs reste cependant indéterminé. Elle peut se faire de façon passive, comme dans le cas probable de l'ADN chromosomique, ou bien d'une façon plus spécifique, impliquant une ou des protéines autres que la protéine p24.

La protéine p24 et l'ancrage des plasmides à la membrane plasmique

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la protéine p24, comportant un segment hydrophobe et un motif en doigt de zinc, constitue un bon candidat pour permettre l'ancrage des plasmides pTN1, pTN3 et pLC70 à la membrane plasmique. Nous avons testé cette hypothèse en comparant la quantité d'ADN correspondant aux plasmides pLC70 (codant, comme les plasmides pTN1 et pTN3, pour la protéine p24) et pLC71 (ne codant pas pour la protéine p24) associée à la membrane plasmique, avec celle contenue dans la fraction cytosolique. Les membranes des cellules de *T. kodakaraensis* KUW1 transformé soit avec pLC70 soit avec pLC71 ont donc été extraites en utilisant la

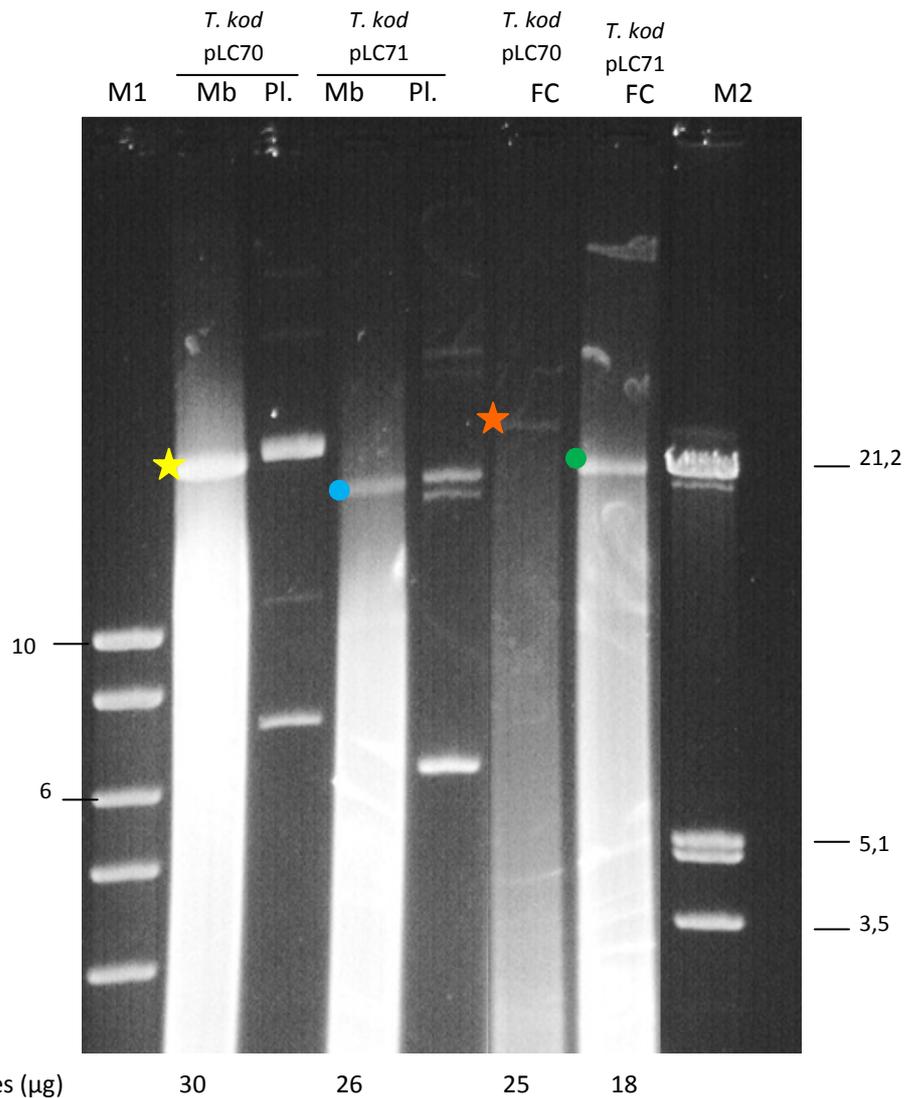


Figure 48 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN extrait des membranes (Mb), de l'ADN extrait des fractions cytosoliques (FC) et de l'ADN plasmidique (Pl.) de *T. kodakaraensis* KUW1 transformé avec le plasmide pLC70 ou avec le plasmide pLC71. La quantité de protéines correspondant au volume de chaque fraction déposée est indiquée sous le gel. M1 : Smart ladder (Promega). M2 : ADN de phage lambda digéré par EcoRI et Hind III (Fermentas). L'étoile jaune indique un enrichissement du plasmide pLC70 au niveau des membranes par rapport à la fraction cytosolique (étoile orange). Au contraire, le plasmide pLC71 est enrichi au niveau de la fraction cytosolique (rond vert) et légèrement appauvri dans la fraction membranaire (rond bleu).

french press et séparées de la fraction cytosolique par centrifugation. De ces différentes fractions ont été extraits les ADNs qui ont ensuite été mis à migrer sur gel d'agarose (Figure 48). Afin de pouvoir normaliser les quantités d'ADN entre les différentes fractions membranaires et entre les différentes fractions cytosoliques, des mesures de la quantité en protéines (dosage au Bradford) de chacune d'entre elles ont été effectuées. Le plasmide pLC70 apparaît ainsi enrichi au niveau des membranes (étoile jaune) et appauvri dans la fraction cytosolique (étoile orange). Le plasmide pLC71 quant à lui apparaît particulièrement enrichi dans la fraction cytosolique (rond vert) par rapport au plasmide pLC70 et légèrement appauvri dans la fraction membranaire (rond bleu). Ces données suggèrent un enrichissement spécifique du plasmide pLC70 au niveau des membranes corroborant l'hypothèse selon laquelle la protéine p24 pourrait être une protéine spécialisée dans l'accrochage de ce plasmide (et donc de pTN1 et pTN3) à la membrane plasmique.

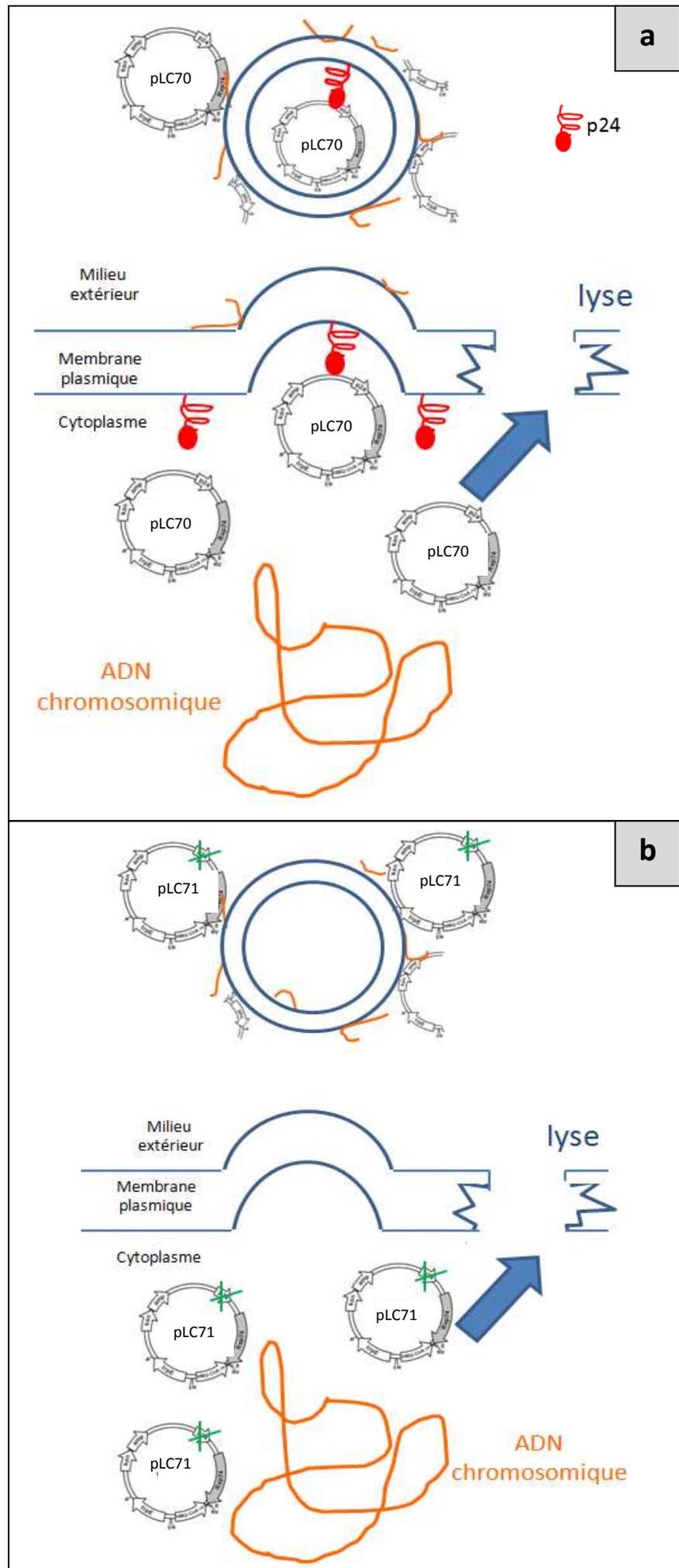
Le schéma de la figure 49 présente un modèle permettant de résumer et d'expliquer l'ensemble de ces premiers résultats. Les plasmides pTN1, pTN3 et pLC70 expriment la protéine p24 (figure 49a), laquelle adresse de façon spécifique ces plasmides à la membrane plasmique. Lorsque celle-ci bourgeonne, les VMs formées internalisent et transportent les plasmides. Cependant, comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, certaines cellules lysent au cours de la croissance, libérant ainsi leurs acides nucléiques, et donc l'ADN chromosomique et l'ensemble des plasmides dans le milieu. Ceux-ci, dégradés par les nucléases environnantes viennent ensuite se coller aux VMs. C'est probablement via ce dernier mécanisme que le plasmide pLC71, n'exprimant pas la protéine p24, se retrouve associé à l'extérieur des VMs en plus de l'ADN chromosomique (Figure 49b). De plus, ce plasmide n'étant pas adressé à la membrane plasmique, se retrouve donc enrichi dans la fraction cytosolique, comme l'indique le gel de la figure 48. Ceci apparaît d'ailleurs cohérent avec l'observation d'un enrichissement du plasmide pTN2 (ne codant pas non plus pour la protéine p24) dans l'ADN plasmidique extrait des cellules de *T. nautilus* (voir gel de la figure 40).

Figure 49 : Modèle hypothétique présentant l'association des plasmides pLC70 et pLC71 avec les VMs.

a) La protéine p24 exprimée par les plasmides pLC70, pTN1 et pTN3 (ici, seul le plasmide pLC70 est illustré) se fixe au niveau de la membrane plasmique et lie les plasmides. Lorsque la membrane bourgeonne, donnant naissance à des VMs, les plasmides sont alors empaquetés à l'intérieur et transportés dans le lumen des VMs.

Au cours de la croissance, certaines cellules lysent libérant leur contenu en acides nucléiques dans le milieu. Ceux-ci viennent s'adsorber sur les VMs.

b) Le plasmide pLC71 qui n'est pas localisé à l'intérieur des VMs (car dégradé par la DNase I lorsque celles-ci sont traitées) peut venir se fixer à l'extérieur des VMs lors de sa libération dans le milieu suite au phénomène de lyse cellulaire.



Détermination des sites de fixation de la protéine p24 sur les plasmides pTN1, pTN3

La compréhension du mécanisme d’empaquetage spécifique des plasmides pTN1 et pTN3 n’est cependant pas totalement élucidée. Une dernière question subsiste : où se fixe la protéine p24 sur ces-derniers ? Nicolas Soler, durant son travail de thèse au laboratoire il y a quelques années, avait déjà cloné, exprimé et purifié la protéine p24 Δ amputée de sa région hydrophobe (plus facile à extraire car soluble). Il avait alors montré, en utilisant la microscopie électronique à transmission en fond noir annulaire, que celle-ci a la capacité de se fixer à l’ADN du phage Φ X174 (Soler et al., 2007). Cependant, les expériences qu’il avait réalisées, bien qu’indiquant une affinité de la protéine p24 pour l’ADN, ne révélaient aucune spécificité d’accrochage sur un site donné.

Plus récemment, Mart Krupovic, post-doctorant dans l’équipe BMGE à l’institut Pasteur, a effectué des analyses bioinformatiques pour essayer d’identifier des sites potentiels de fixation de la protéine p24 sur les plasmides pTN1 (et donc pLC70), et pTN3. Pour cela, il a recherché des séquences homologues dans ces trois plasmides, mais également dans le virus intégré dans le génome de *T. kodakaraensis*, TKV4, codant lui aussi la protéine p24. Sa recherche a abouti sur la découverte de cinq séquences homologues d’une trentaine de bases toutes situées dans des régions intergéniques en amont du gène codant la protéine p24: deux chez le virus TKV4, deux également sur le plasmide pTN3 et une séquence sur le plasmide pTN1⁽⁷⁾ (voir Tableau 10).

Caractérisation biochimique de la fixation de la protéine p24 sur les sites putatifs des plasmides pTN1 et pTN3

Afin de tester ces résultats obtenus *in silico*, nous avons effectué des expériences de retard sur gel, utilisant les séquences des sites putatifs de fixation sur pTN1 et pTN3. A cette occasion, nous avons réexprimé la protéine p24 Δ (clonée dans le vecteur pET-9a) et nous l’avons repurifiée en utilisant un protocole différent de celui utilisé par Nicolas Soler

⁽⁷⁾ Le plasmide pLC71 dérivé de pLC70 (lui-même dérivé de pTN1) et caractérisé par l’absence du gène codant la protéine p24 (voir p 78), est également délété pour le site potentiel de fixation identifié sur le plasmide pTN1. Ceci nous a permis de nous assurer que la protéine p24 codée par le virus intégré chez *T. kodakaraensis*, TKV4, ne pouvait pas être responsable d’un potentiel adressage du plasmide pLC71 dans les VMs.

Plasmide / virus	séquences	Localisation du site potentiel de fixation
TKV4		
Site n°1	GATTCTCCATTTTTCTGGTTCAGTGTTTAAAT	Région intergénique TK1361-TK1360
Site n°2	GATTCTCCATTTTTTTGGTTCAGTACTTAAAA	Région intergénique TK1354-TK1353
pTN1	TAATTCTCCAGTTTTCTGGTTCAGTCTTAAAT	Région intergénique p24-rep74
pTN3		
Site n°1	GTTTTCTCCTTTTTCTGGTTCAGTCTTAAAT	Région intergénique TNa0004-TNa0003
Site n°2	GAATTCTGCACATTCTGGTTCAGTCTTAAAT	Région intergénique TNa2286-TNa2285

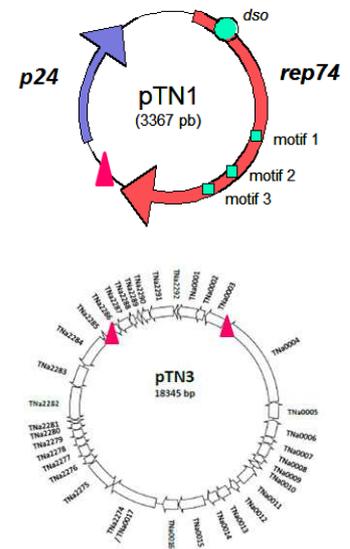


Tableau 10 : Sites potentiels de fixation de la protéine p24.

Les triangles roses indiquent la localisation de ces sites sur les plasmides pTN1 et pTN3.

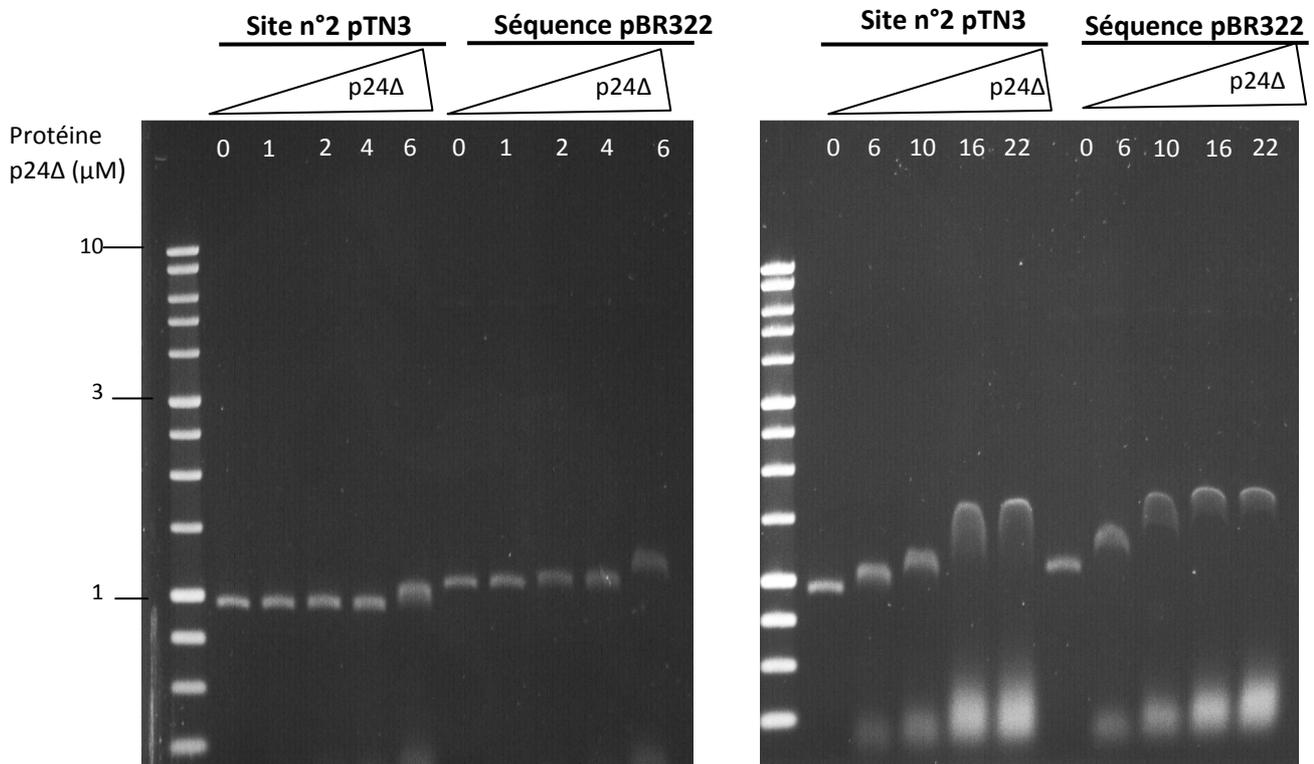


Figure 50 : Expérience de retard sur gel d'agarose afin de détecter l'interaction p24Δ- sites potentiels de fixation (voir Tableau 10).

Chaque fragment fait environ 1 kb (ici : 1095 pb pour pBR322 ; 938 pb pour le site 2 de pTN3). Le mélange ADN-protéine contient 100ng d'ADN et 200 mM de NaCl.

durant sa thèse (voir matériels et méthodes pour un protocole détaillé). Dans un premier temps, ces expériences de retards ont été effectuées sur gels d'agarose en prenant 100 ng de fragments d'ADN d'environ 1 kb incluant chaque site potentiel de fixation obtenus par PCR (Figure 50). Un fragment de 1kb ne contenant pas de séquences homologues aux sites putatifs de fixation de la p24 a également été amplifié à partir du plasmide bactérien pBR322 afin de servir de contrôle négatif. En se plaçant à une concentration en NaCl de 200 mM, les premiers retards ont été observés à partir d'une concentration en protéines p24 Δ de 6 μ M quelque soient la nature des fragments d'ADN, les bandes étant de plus en plus retardées au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en protéine (voir figure 50 où sont représentés les gels retards pour le témoin négatif et le site n°2 du plasmide pTN3). Nous avons alors pensé que l'absence de différences entre les retards effectués sur les fragments contenant les sites putatifs de fixation et le fragment du contrôle négatif pouvait être liée à la propriété de la protéine p24 de se fixer facilement à l'ADN.

Afin d'identifier une possible spécificité plus marquée, nous avons réduit considérablement la taille des fragments d'ADN et réalisé des expériences de retards sur gels polyacrylamides (Figure 51). Des oligonucléotides de 43 et 73 mers ont donc été générés et marqués au 32 P (Phosphore 32, isotope radioactif). 200 Fmol de ces fragments marqués ont ensuite été mélangés avec différentes concentrations de la protéine p24 Δ . Les premières préparations ADN-protéines p24 Δ réalisées à une concentration de 200 mM de NaCl n'ayant pas permis d'identifier de retards sur gel pour des concentrations de protéines inférieures à 10 μ M, nous avons décidé de réaliser les mélanges réactionnels suivants à une concentration molaire en NaCl de 50 mM. Cependant, même à cette concentration, aucun retard marqué n'a pu être identifié quelque soit la nature (séquences provenant du plasmide pTN1, pTN3 ou pBR322) et la longueur des oligonucléotides utilisés (73 ou 43 mers) (Figure 51). En effet, les retards observables apparaissent encore une fois à de fortes concentrations en protéines p24 Δ (à partir de 5 ou 10 μ M) et sans distinction avec les retards effectués sur les fragments obtenus à partir du plasmide pBR322.

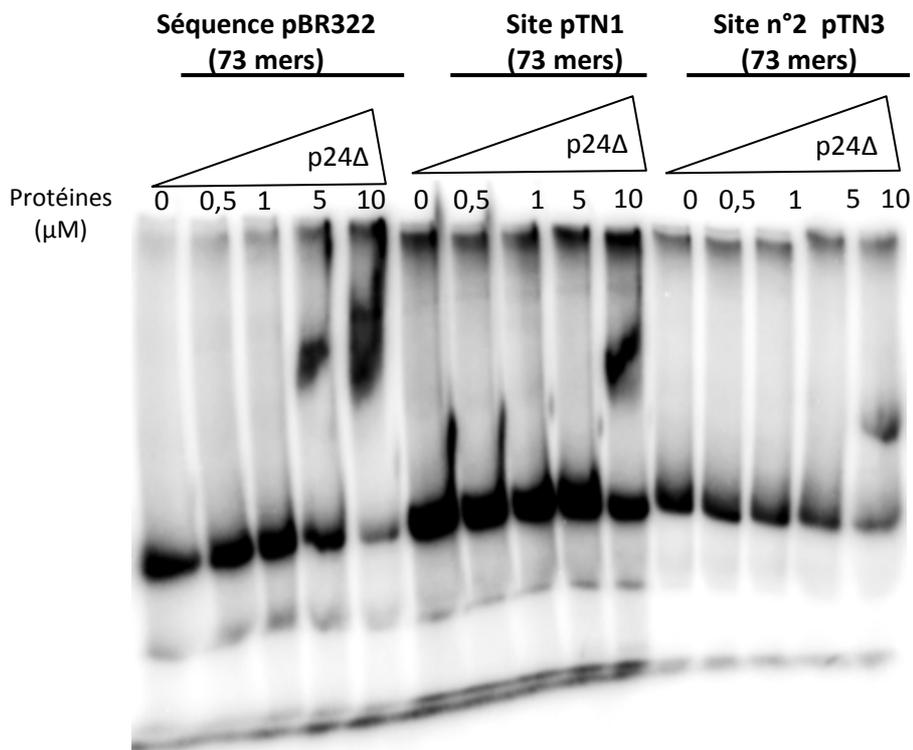
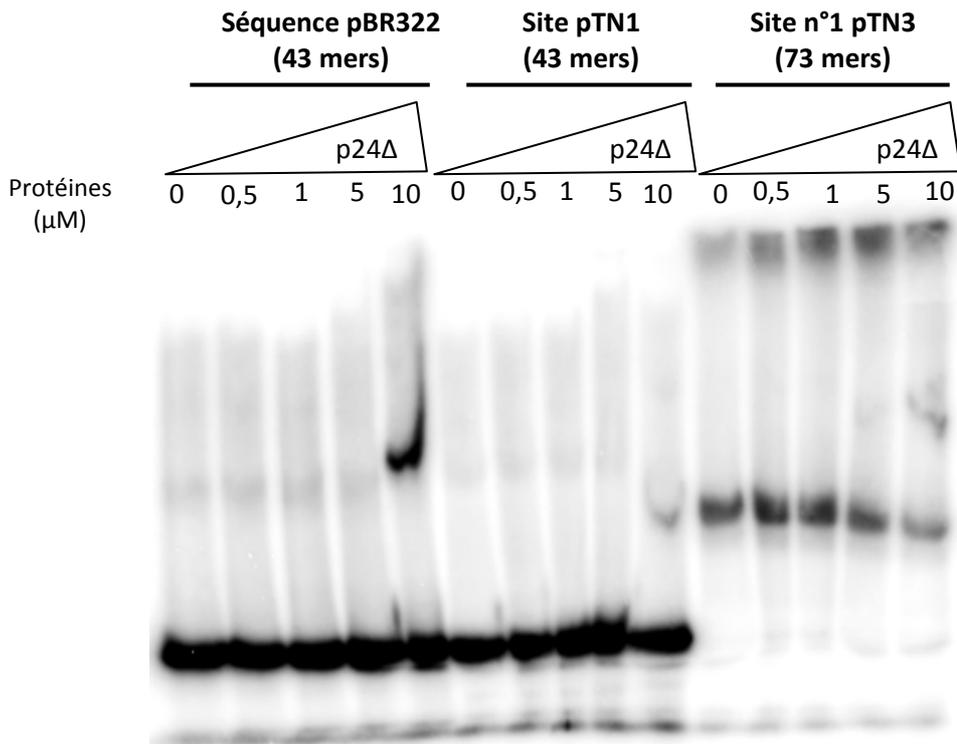


Figure 51 : Expérience de retard sur gel polyacrylamide afin de détecter l'interaction p24Δ- sites potentiels de fixation (voir Tableau 10). Des fragments d'ADN de 43 et 73 mers marqués radioactivement ont été utilisés à une concentration de 200Fmol. Le mélange réactionnel ADN-protéines est réalisé à une concentration molaire en NaCl de 50 mM.

Nous nous sommes alors interrogés sur le fait que cette protéine p24 Δ , dont la fonction assignée est la fixation d'ADN, et qui a été exprimée et purifiée chez *E. coli* puisse être encore associée à de l'ADN bactérien. Une des différences dans la méthode de purification que Nicolas Soler avait employée par rapport à la notre est en effet la digestion préalable de l'extrait bactérien avec l'endonucléase benzonase éliminant toute trace d'acides nucléiques. Pour vérifier que la protéine p24 Δ que nous avons purifiée est associée à de l'ADN d'*E. coli*, nous avons fait migrer 5 μ L de préparation protéique (concentration 145 μ M) sur gel d'agarose et sur gel polyacrylamide contenant de l'urée (gel hautement résolutif permettant l'observation d'acides nucléiques de faible taille). L'observation de ces deux gels révéla la présence d'une bande sur gel d'agarose et d'une trainée d'ADN sur gel polyacrylamide disparaissant avec 0,25 unités de DNase I (mais résistant à la RNase) indiquant que la protéine p24 Δ que nous avons purifiée était en effet associée à de l'ADN d'*E. coli*. La préparation de protéine p24 Δ a donc été traitée à la DNase I afin d'éradiquer toute trace d'ADN, puis repassée sur gel filtration afin d'éliminer l'enzyme. Cependant, même après élimination de l'ADN associé à la protéine, aucun retard n'a pu être observé sur gel polyacrylamide pour les séquences contenant les sites putatifs de fixation de p24 Δ . Ainsi, pour le moment, nous n'avons pas pu valider l'hypothèse selon laquelle ces séquences homologues sont bien les sites de fixation de la protéine p24.

7. La découverte d'une nouvelle caractéristique des VMs de *T. nautilus*

La mise en évidence d'un génome de type viral (pTN3) transporté par les VMs nous a incités à étudier la capacité d'infection de ces VMs. En effet, nous nous demandions si ces « vésicules virales » auraient un effet sur des souches hétérogènes de Thermococcales ou pourraient induire la production de véritables virions. Aurore Gorlas et Claire Geslin travaillant à l'IFREMER à Brest venaient alors de mettre au point une technique permettant de déterminer sur boîte le spectre d'infection d'un virus donné (Gorlas A. et Geslin C., article en préparation). Cette technique consiste à étaler une

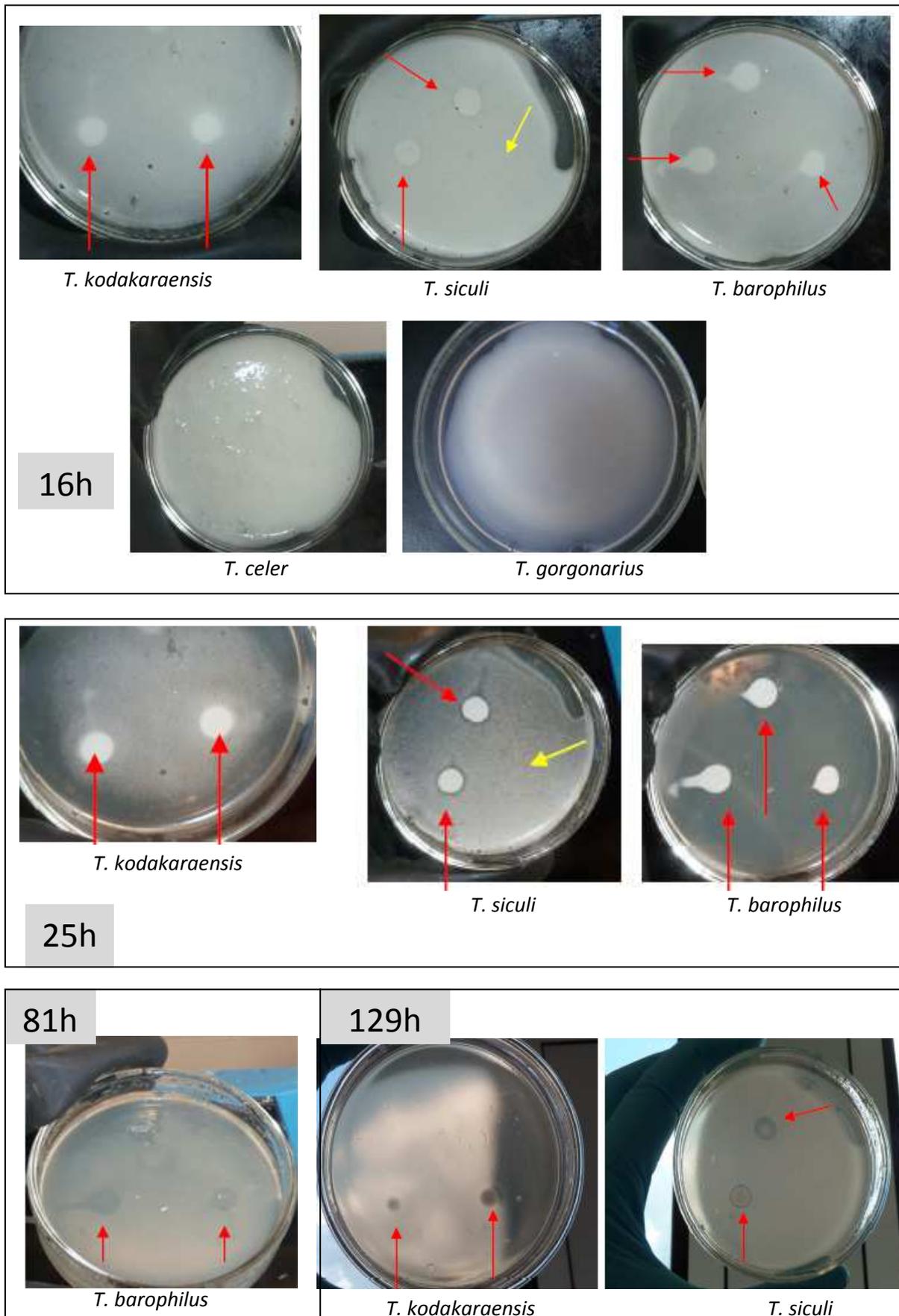


Figure 52 : Résultats des expériences visant à déterminer le pouvoir d'infection des VMs de *T. nautilus* sur différentes souches de Thermococcales.

Les encadrés gris indiquent le temps d'incubation. Les flèches rouges situent l'endroit où les VMs de *T. nautilus* ont été déposées. Le tampon de suspension des VMs a également été déposé afin de servir de témoin (flèche jaune).

première couche de gelrite surmontée d'une deuxième couche contenant du soufre colloïdal mélangé à des cellules d'une souche de Thermococcales à tester, puis à déposer sur cette-dernière des gouttes de solutions virales. Ainsi, si la souche en question est sensible au virus (retard de croissance ou lyse des cellules), celle-ci ne pourra pas métaboliser (ou très lentement) le soufre colloïdal⁽⁸⁾ et des zones plus turbides, riches en soufre, seront alors observables sur boîte (pour cette raison, cette méthode est également qualifiée de plage de lyse inversée).

Afin d'estimer le pouvoir d'infection des VMs produites par *T. nautilus* sur différentes souches de Thermococcales, nous avons donc demandé à Aurore Gorlas d'appliquer cette méthode avec des VMs que nous lui avons fournies. Cinq souches de Thermococcales ont été utilisées en tant qu'hôtes potentiels : *T. kodakaraensis*, *T. siculi*, *T. barophilus*, *T. celer* et *T. gorgonarius*. Plusieurs gouttes de 10µL de préparation de VMs de *T. nautilus* ont été déposées sur chaque culture. Après 16h d'incubation, des zones de soufre colloïdal non métabolisé apparaissent clairement pour les souches *T. kodakaraensis*, *T. siculi* et *T. barophilus* aux endroits où ont été déposées les VMs de *T. nautilus* (Figure 52) suggérant un retard de croissance. Au contraire, le soufre mélangé aux cellules de *T. celer* ou *T. gorgonarius* disparaît totalement, même aux endroits où les VMs ont été déposées, indiquant que la croissance de ces souches n'a pas été inhibée. Cette tendance se confirme avec le temps (voir figure 52 après 25 h d'incubation). Après 81h d'incubation, les reliquats de soufre disparaissent dans le cas du test effectué sur *T. barophilus* et sont remplacés par des taches translucides. Un phénomène similaire se produit dans le cas de *T. kodakaraensis* et *T. siculi*, à partir de 129h d'incubation. Des prélèvements sont effectués au niveau de ces zones translucides et sont observés en microscopie à épifluorescence et au microscope électronique à transmission (Figure 53). Les clichés de microscopie à épifluorescence révèlent la présence de nombreux fragments cellulaires et l'absence de toutes cellules vivantes (Figure 53a). Ces observations suggèrent que les cellules de *T. kodakaraensis*, *T. siculi* et *T. barophilus* ont subi un processus lytique. Afin de savoir si ce phénomène pourrait être lié à la production de virions, induite par la mise

⁽⁸⁾ Les Archées de l'ordre des Thermococcales sont hétérotrophes et utilisent le soufre comme accepteur d'électron, conduisant ainsi, présence d'ions H⁺ à la formation de sulfure d'hydrogène (H₂S).

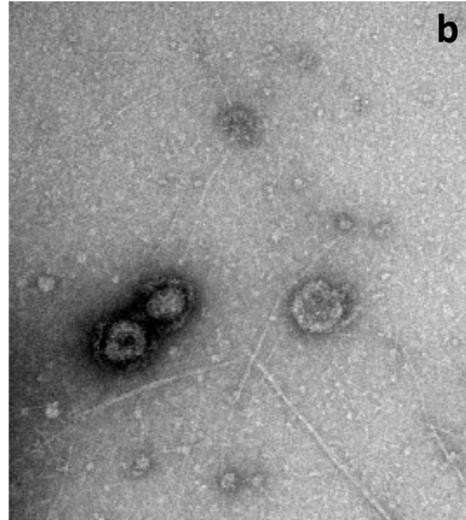
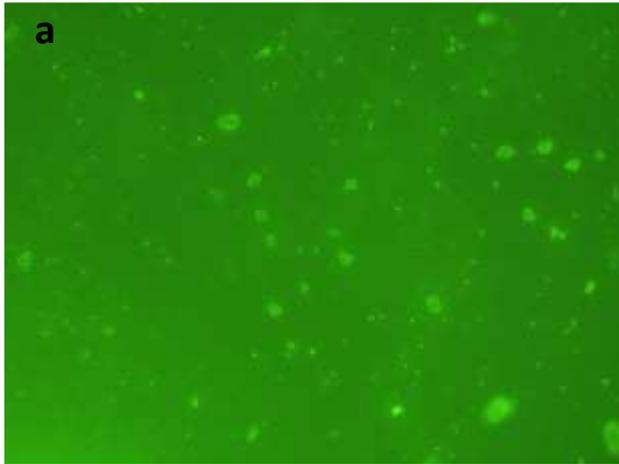


Figure 53 : Portion de gelrite récupérée au niveau de la tache translucide du tapis de *T. kodakaraensis* après 129h d'incubation, observée au microscope à épifluorescence (a) (SYBR green) et au MET (b).

en présence des VMs avec les cellules, des portions de ces zones translucides ont également été observées au microscope électronique à transmission (Figure 53b). Seules des VMs typiques produites par *T. nautilus* ont ainsi pu être observées. Aucun virion muni de capsid (rappelons que pTN3 code pour une protéine majoritaire de capsid) n'apparaît suggérant que le processus lytique ayant affecté les cellules est dû à une autre cause. Il est donc possible que ces VMs transportent des toxines (« thermococcines ») ayant une activité contre certaines Thermococcales. Si cette hypothèse est vérifiée, le spectre d'action de ces VMs nécessitera d'être défini plus amplement, parmi les Thermococcales, les Archées, et même au sein des autres domaines.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'importance des vésicules membranaires est longtemps restée sous-estimée en biologie. Même après l'avènement du microscope électronique au milieu du 20^{ème} siècle, ces structures ont été très souvent considérées comme des débris cellulaires ou des artefacts liés à la microscopie. Les premières publications relatant la libération de VMs dans le milieu datent d'une quarantaine d'années et concernent les Bactéries et les Eucaryotes. C'est surtout dans ce dernier domaine qu'elles ont été le mieux caractérisées ce qui leur vaut d'être mentionnées dans de multiples ouvrages universitaires. Même si de nombreux articles sur les VMs bactériennes ont été publiés ces dernières années (Mashburn-Warren and Whiteley, 2006; Kulp and Kuehn, 2010), celles-ci n'ont toujours pas trouvé leur place dans les livres de microbiologie de référence tels que l'ouvrage « Biology of microorganisms » de Brock. La récente découverte de la sécrétion de VMs chez les Archées (Prangishvili et al., 2000; Reysenbach et al., 2006; Soler et al., 2008; Ellen et al., 2009) souligne cependant que ce phénomène est universel et suggère que le dernier ancêtre commun aux trois domaines, LUCA (Last Universal Common Ancestor), produisait certainement des vésicules.

L'étude des VMs produites par les Archées hyperthermophiles de l'ordre des Thermococcales a débuté au laboratoire il y a quelques années. Les premiers résultats avaient indiqué que ces structures d'une taille généralement comprise entre 50 et 130 nm sont associées à de l'ADN génomique (Soler et al., 2008). Nous avons poursuivi ces premiers travaux afin de caractériser plus en détails le mode de production de ces VMs, leur composition en lipides et en protéines ainsi que leurs rôles, nous focalisant particulièrement sur leur implication potentielle dans le transfert d'ADN entre cellules. Pour réaliser ces travaux, nous avons utilisé les souches *T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans* et *T. sp. 5-4*. Nous nous sommes également intéressés en détail à la souche *T. nautilus* dont les cellules comportent des plasmides. Ayant mis en évidence que certains d'entre eux sont associés aux VMs, nous avons voulu définir et comprendre plus précisément les modalités de cette association.

Les VMs des Thermococcales sont produites par un processus de bourgeonnement similaire à la formation des ectosomes chez les cellules eucaryotes

La combinaison de différentes techniques de microscopie électronique nous a permis de montrer que les VMs produites par les Thermococcales résultent d'un processus de bourgeonnement de l'enveloppe cellulaire rappelant la formation des ectosomes (ou microvésicules) dans les cellules eucaryotes (Mouline et al., 2010; Mrvar-Brecko et al., 2010). Ceci a été confirmé par l'analyse des lipides et des protéines majoritaires des VMs. Ces dernières contiennent notamment les mêmes lipides que ceux identifiés dans la membrane plasmique et leurs protéines majoritaires correspondent à des protéines membranaires et à des protéines associées aux surfaces cellulaires. Ceci s'oppose aux analyses obtenues pour les VMs produites par les cellules du genre *Sulfolobus* dont la composition protéique diffère de façon significative avec celle des membranes cellulaires (Ellen et al., 2009). Malgré les ressemblances biochimiques entre VMs et membranes cellulaires pour une souche donnée de Thermococcale, nous avons observé des différences significatives dans la structure (surtout observables lorsque les coupes ne sont pas contrastées au rouge de ruthénium) et la composition protéique des VMs et des membranes entre les différentes souches étudiées, suggérant que cette divergence d'organisation membranaire pourrait jouer un rôle important dans la spéciation chez les Thermococcales. Nous avons également observé différents types de VMs, avec ou sans S-layer, délimitées par une ou deux membranes, de même que certaines VMs semblant être intracytoplasmiques. D'autre part, les VMs des Thermococcales sont fréquemment produites en groupes ou sous forme de filaments entourés de S-layer et de polysaccharides. Ces dernières structures ressemblent aux nanopodes dont la formation a récemment été décrite chez une bactérie du sol, *Delftia* sp. (Shetty et al., 2011). Shetty *et al.* suggèrent que ces nanopodes sont utilisés par la bactérie « pour protéger les vésicules sur une longue distance à partir des cellules productrices » permettant « l'extension de leur sphère métabolique au travers de leur environnement ». De façon similaire, il est possible que les « nanopodes d'archées » jouent un rôle dans la communication entre cellules au sein des structures poreuses des cheminées hydrothermales.

Le mécanisme moléculaire de la formation des VMs est toujours indéterminé

Toutes ces observations montrent l'importante flexibilité de l'enveloppe cellulaire des Thermococcales et indiquent l'existence de différents mécanismes de formation des VMs, avec comme point commun, le processus de bourgeonnement. Ces observations suggèrent également que la production des VMs chez les Thermococcales résulte d'un processus actif dont le mécanisme précis reste pour l'instant mystérieux. Dans le cas du genre *Sulfolobus*, il est tentant de spéculer que les VMs sont produites par un mécanisme moléculaire similaire à la formation des exosomes chez les Eucaryotes, puisque les VMs produites par ces archées comportent les protéines CdvB et CdvC, respectivement homologues aux protéines eucaryotes formant le complexe ESCRT-III et à l'ATPase Vps4 (Ellen et al., 2009). Chez les Eucaryotes, il a été montré que ces protéines coopèrent pour initier le bourgeonnement menant à la formation des vésicules intraluminales au sein du « multivesicular body » (MVB) (Kieffer et al., 2008). Elles sont également impliquées dans la cytokinèse et le bourgeonnement de virions enveloppés (Carlton and Martin-Serrano, 2007). Nos analyses révèlent que les génomes des Thermococcales que nous avons étudiées ne codent pour aucun homologue des sous-unités du complexe ESCRT-III. Cependant, des homologues de la protéine eucaryote Vps4 peuvent être identifiés (ex : TGAM_1689 ; TK1157). Il serait ainsi intéressant de déterminer si ces-derniers sont impliqués dans la formation des VMs chez les Thermococcales. L'inactivation par mutation des gènes codant les homologues de la protéine Vps4 ainsi que leur immunolocalisation pourraient être ainsi envisagées à cet égard.

L'identification d'un homologue des protéines stomatines eucaryote et bactérienne dans les VMs de *T. kodakaraensis* et *T. sp. 5-4* ainsi que dans les membranes cellulaires de *T. sp. 5-4* (Figure 30 et tableau 7) nous a également interpellés. Comme cité précédemment, ces protéines membranaires sont impliquées dans le bourgeonnement et la formation des VMs chez les Eucaryotes (Hagerstrand et al., 2006; Langhorst et al., 2008; Salzer et al., 2008). De plus, une protéine apparentée, la flotilline, a également été identifiée dans les VMs de Sulfolobales (Ellen et al., 2009). Cependant, l'inactivation par mutation de l'un des deux gènes paralogues codant pour la stomatine chez *T. kodakaraensis* (*tk0348*) indique que celui-ci n'est pas essentiel à la production de VMs.

Toutefois, le niveau d'expression du deuxième gène (*tk1316*) codant ce type de protéine, mériterait d'être évalué afin de déterminer si la délétion du gène *tk0348* n'est pas compensée par une surexpression du gène codant pour la protéine stomatine TK1316. Une expérience plus directe consisterait à réaliser l'inactivation de ces deux gènes par mutation et vérifier s'il y a ou non production de VMs. D'autre part, quelques articles révèlent que les homologues de la stomatine HflK et QmcA chez la bactérie *E. coli* interagissent avec la protéine FstH, un homologue éloigné de la protéine Vps4/CdvC (Kihara et al., 1996; Chiba et al., 2006). Si la protéine stomatine s'avère finalement bien impliquée dans un processus de vésiculation chez les Archées Thermococcales, il serait intéressant de vérifier son interaction (par pull-down, technique de double hybride) avec les homologues des protéines Vps4/CdvC.

L'identification de la protéine OppA dans les VMs suggère leur implication dans le transport de peptides

La découverte la plus significative en termes de composition protéique est certainement l'abondance des protéines de la famille « Oligopeptide-binding proteins A » dans les VMs et les membranes des trois souches étudiées. Des homologues de ces protéines ont également été identifiés dans les VMs de trois espèces de *Sulfolobus* (Ellen et al., 2009). Ces protéines OppA sont également présentes en très grande quantité chez les Bactéries. Il a par exemple été montré que la protéine OppA est la plus abondante des protéines membranaires chez *E. coli* (Higgins and Hardie, 1983). Cependant, d'après nos connaissances, aucune étude ne rapporte la présence de ces protéines dans les VMs bactériennes. Il serait intéressant de vérifier la possibilité d'une telle association puisqu'il a été montré que les protéines OppA sont particulièrement abondantes dans le milieu de culture de diverses bactéries (Monnet, 2003). Le contexte génomique autour des gènes codant les protéines OppA chez les Thermococcales indique que ces protéines font très certainement parties d'un système de transport de type ABC (voir Figure 31). De façon importante, les protéines OppA de deux Crenarchées, *Aeropyrum pernix* (Palmieri et al., 2006) et *Sulfolobus solfataricus* (Gogliettino et al., 2010) ont été caractérisées

biochimiquement et leur propriété de fixation des peptides démontrée. La présence de complexes protéiques contenant ces protéines OppA dans les VMs suggère un rôle de nutrition (par capture et apport des peptides aux cellules) pour ces VMs. Le rôle des VMs dans l'acquisition de nutriments a déjà été suggéré chez certaines bactéries « gram -» produisant des VMs associées à des enzymes de dégradation et des récepteurs contribuant à la survie bactérienne (Thompson et al., 1985; Bauman and Kuehn, 2006; Vasilyeva et al., 2008). Cependant, les observations indiquant que les protéines OppA (TGAM_0331 et TGAM_0876) sont toujours les plus abondantes dans les VMs produites par *T. gammatolerans* cultivée en milieu minimum sans peptides (Figure 33) suggère qu'elles ont certainement un rôle autre que l'acquisition de nutriments pour les cellules. Il serait en effet surprenant que les cellules continuent de dépenser de l'énergie pour produire une telle quantité de protéines OppA en absence de leur substrat.

Une possibilité intéressante pour expliquer cette observation est que les VMs sont peut être impliquées dans la capture de peptides excrétés directement par les cellules. Ces peptides, délivrés aux cellules environnantes, pourraient ainsi avoir un rôle dans la signalisation ou la compétition entre cellules. Chez la bactérie *Bacillus subtilis* par exemple, il a été montré que les peptides extracellulaires transférés dans les cellules, en plus de leur rôle nutritif, sont également impliqués dans la signalisation (Lazazzera, 2001). Des défauts dans ce système de transport des peptides empêchent la mise en place de réponses spécifiques liées au stress comme le développement de la compétence et la formation de spores résistantes.

Les VMs de T. nautilus transportent probablement des peptides antimicrobiens responsables de leur activité toxique

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, l'implication des VMs dans la compétition entre cellules est souvent liée aux toxines qu'elles transportent, celles-ci étant fréquemment de nature protéique ou peptidique (voir partie II.1 de l'introduction). Il a récemment été montré que les toxines (sulfolobocines) transportées par les VMs produites par certaines souches de Sulfolobales sont constituées de deux polypeptides (Ellen et al., 2011). Chez les Archées halophiles, la production de composés

antimicrobiens (halocines) de natures protéique et peptidique a également été décrite (Cheung et al., 1997; Price and Shand, 2000), mais aucune évidence ne rattachait cette production à la sécrétion de VMs. Il a notamment été montré que ces halocines ont une action contre des Euryarchées halophiles mais également contre certains membres du genre *Sulfolobus* suggérant que la cible moléculaire de ces toxines est certainement conservée chez les Euryarchées et les Crénarchées. Nos expériences ont montré que les VMs de *T. nautilus* ont une activité toxique contre certaines souches de Thermococcales, en induisant la lyse des cellules. Cependant, la nature des facteurs responsables de cette toxicité et le spectre d'activité des VMs nécessitent d'être déterminés. Il serait intéressant de tester différentes protéases (trypsine, protéinase K...) sur les VMs afin de déterminer la sensibilité (nature protéique ?) et l'accessibilité (toxines externes ou internes par rapport aux VMs ?) de ces enzymes vis-à-vis des toxines. De façon plus générale, les Thermococcales productrices de toxines ainsi que leur gamme d'activité pourraient être déterminées en répétant les expériences de plages de lyse inversées (voir partie III. 7 des résultats) avec les VMs d'autres souches sur des cellules de Thermococcales, d'autres espèces d'Archées (même ou différent phylum) et même d'autres domaines. La protéine OppA présente en quantité très importante dans les VMs des différentes Thermococcales étudiées (y compris *T. nautilus*) et potentiellement impliquée dans le transport de peptides dans les vésicules pourrait être responsable de l'accumulation de ces toxines dans les VMs. Si la toxicité des VMs de *T. kodakaraensis* vis-à-vis de certaines souches est démontrée, il serait intéressant de construire un mutant d'inactivation pour le gène codant la protéine OppA puis d'effectuer les tests de toxicité avec les VMs produites par cette souche mutée.

A contrario, l'implication des VMs dans un processus de détoxification a également été proposée chez les Bactéries (McBroom and Kuehn, 2007; Dutta et al., 2008). L'accumulation des particules denses aux électrons dans les VMs de *T. kodakaraensis* (Figure 27h, i) suggère que ces VMs pourraient également avoir un rôle de détoxification.

Les VMs de Thermococcales ont un rôle dans le transport d'ADN et la transformation des cellules

La mise en évidence d'une association des VMs de Thermococcales avec de l'ADN génomique (Soler et al., 2008) suggère leur implication dans les transferts de gènes. Le développement d'outils génétiques efficaces chez la souche *T. kodakaraensis* a permis de tester cette hypothèse. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois chez les Archées que les VMs peuvent incorporer un plasmide exogène introduit par transformation et qu'elles peuvent convoier et libérer ce plasmide dans des cellules receveuses. Nous avons cependant identifié uniquement les formes circulaires ouvertes et linéaires des plasmides extraits des VMs ou provenant des cellules transformées avec les VMs, suggérant soit qu'une activité endonucléase est associée à l'encapsulation de l'ADN dans les VMs, soit que l'association du plasmide aux VMs induit une coupure dans l'ADN.

La transformation génétique des cellules utilisant les VMs est un phénomène qui a déjà été observé chez les Bactéries. L'incubation de VMs sécrétées par la bactérie *E. coli* O157:H7 porteuses d'un plasmide comportant un gène codant pour la protéine fluorescente verte (pGFP), avec des cellules d'*E. coli* dénuées de ce plasmide résulte en l'obtention de transformants fluorescents (Yaron et al., 2000). Ces résultats suggèrent que les VMs produites par la bactérie *E. coli* constituent des vecteurs impliqués dans le transport d'ADN. En plus de pouvoir convoier de l'ADN plasmidique, les VMs produites par *E. coli* O157:H7 transportent de l'ADN chromosomique codant notamment pour les gènes de virulence *eae*, *stx1* et *stx2* (Kolling and Matthews, 1999; Yaron et al., 2000). Yaron *et al.* ont montré que ces gènes s'expriment dans les cellules receveuses *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* ou *E. coli* JM109 (Yaron et al., 2000). Cependant les travaux plus récents de Renelli *et al.* indiquent qu'aucune transformation de cellules n'a pu être observée en utilisant les VMs produites par *P. aeruginosa* contenant un plasmide endogène (Renelli et al., 2004). Puisque leur protocole de purification des VMs inclut une étape de filtration assurant l'absence totale de cellules, ils suggèrent que les résultats de transformations positives obtenus dans les études précédentes sont en fait dûs à l'utilisation de préparations de VMs contaminées par des cellules intactes. Notons que

dans le cas des expériences que nous avons réalisées, nous avons constaté la transformation des cellules malgré l'introduction d'une étape de filtration similaire et la vérification de l'absence de cellules intactes dans les préparations de VMs.

Parmi les articles rapportant l'implication de VMs bactériennes dans la transformation de cellules, très peu donnent des indications sur l'efficacité de cette transformation. Yaron *et al.* indiquent par exemple que le taux de transformation via les VMs transportant le plasmide pGFP est de $3 \cdot 10^{-10}$ et que l'efficacité de la transformation est de 10^3 transformants obtenus par μg d'ADN (en supposant que 0,83ng d'ADN est associé à 10 μg de protéines de VMs) (Yaron et al., 2000). L'efficacité de la transformation de *T. kodakaraensis* KUW1 utilisant les VMs associées au plasmide pLC70 n'a pas été pour le moment déterminée. Il serait intéressant de comparer celle-ci avec l'efficacité de la transformation s'effectuant par intégration du plasmide pLC70 libre dans le milieu afin de voir si les vésicules ne permettent pas d'optimiser le transfert du plasmide dans les cellules. Il est en effet possible que la localisation interne du plasmide dans ces VMs le protège de la dégradation par les nucléases présentes dans le milieu et que davantage d'ADN intact parvienne ainsi à transformer les cellules.

Bien que n'ayant observé dans leur étude aucune transformation de cellules en utilisant les VMs produites par *P. aeruginosa*, Renelli et collègues montrent que ces VMs ont la capacité de fusionner avec les cellules receveuses (Renelli et al., 2004). En incubant les VMs préalablement marquées avec de la ferritine cationisée, avec des cellules receveuses non marquées (*P. aeruginosa* PAO1 et *E. coli* DH5 α), ces auteurs observent un marquage des cellules receveuses indiquant que celles-ci ont dû fusionner avec les VMs. Une expérience similaire pourrait être envisagée afin de mettre en évidence une fusion entre les cellules et les VMs de Thermococcales. En effet, même si les expériences de transformation utilisant les VMs sécrétées par *T. kodakaraensis* KUW1 associées au plasmide pLC70 et traitées à la DNase tendent à indiquer une fusion VMs-cellules, ces résultats constituent des preuves indirectes. Du fait de leur nature différente, il est probable que les membranes lipidiques d'Archées ne puissent pas être marquées de la même façon que celles des Bactéries. Il serait cependant envisageable de faire croître les cellules de Thermococcales en présence d'acide mévalonique (un précurseur des lipides

d'Archées) marqué au ^{14}C , puis de collecter les VMs sécrétées. Ces-dernières seraient ensuite incubées en présence de cellules non marquées puis le marquage radioactif des cellules examinées après différents temps d'incubation. Une autre possibilité consisterait à construire des fusions thermostables de la protéine GFP avec la protéine majoritaire associée aux membranes, OppA. Le gène codant la protéine de fusion pourrait être cloné dans le plasmide pLC70 et être ainsi exprimée chez *T. kodakaraensis*. Après délétion du gène chromosomique *oppA*, les VMs produites par les cellules transformées seraient incubées en présence de cellules non marquées et le transfert de fluorescence liée à la protéine OppA dans les membranes cellulaires suivi en utilisant la microscopie à fluorescence. La preuve d'une fusion entre les VMs et les cellules de Thermococcales, en plus de définir plus précisément le mécanisme de transformation des cellules, permettrait d'expliquer l'effet toxique lié aux VMs de *T. nautilus*.

Les expériences utilisant la DNase I pour traiter les VMs associées au plasmide pLC70 libérées par *T. kodakaraensis* K UW1 indiquent que celui-ci est protégé de cette enzyme et de ce fait se trouve probablement à l'intérieur des VMs. La localisation de certains plasmides de *T. nautilus* à l'intérieur des VMs est également suggérée par les observations de microscopie électronique montrant des VMs probablement entrain d'éclater et de libérer leur contenu en ADN sous l'effet d'un traitement salin (voir figure 39). La DNase a également été utilisée d'une manière similaire sur des VMs bactériennes afin de déterminer leur association avec l'ADN. Kolling *et al.* ont montré que l'ADN associé aux VMs produites par *E.coli* O157:H7 est également résistant à la DNase, suggérant que cet ADN est également localisé au sein des VMs (Kolling and Matthews, 1999). Les VMs sécrétées par la bactérie *N. gonorrhoeae* comportent à la fois de l'ADN linéaire et de l'ADN circulaire (Dorward et al., 1989). De façon intéressante, lorsque ces VMs sont traitées à la DNase, l'ADN circulaire reste intact tandis que l'ADN linéaire est dégradé, suggérant un mécanisme de protection spécifique de l'ADN plasmidique au sein des VMs.

Les VMs de *T. nautilus* : le premier exemple de VMs procaryotes potentiellement impliquées dans le transport d'un génome viral

La découverte la plus intrigante concernant les VMs sécrétées par *T. nautilus* est certainement le fait que celles-ci puissent être impliquées dans le transport d'un génome de type viral (pTN3). Bien que celui-ci code pour une protéine majoritaire de capsid (TNa2284) et une ATPase spécialisée dans l'emballage des acides nucléiques viraux dans les virions (TNa2291), aucune protéine de capsid n'a pu être identifiée sur gel SDS-PAGE dans les préparations de VMs. De même, les observations en microscopie électronique ne révèlent aucune structure ressemblant à une capsid icosaédrique. Si nous considérons que la capacité de construire une capsid est la seule caractéristique qui distingue les virus des autres éléments génétiques comme les plasmides, alors les VMs produites par *T. nautilus* ne peuvent pas être considérées comme de véritables virions.

Même si le transport de protéines virales par les VMs produites par les cellules est très documentée, spécifiquement chez les Eucaryotes (Meij et al., 1999; Dukers et al., 2000; Lenassi et al., 2010), très peu d'articles décrivent le transfert d'acides nucléiques viraux (ADN ou ARN) par ces VMs. Pegtel *et al.* par exemple montrent que les cellules infectées par le virus Epstein-Barr sécrètent des exosomes transportant des microARNs d'origine virale (Pegtel et al., 2010). Ces auteurs rapportent que ces acides nucléiques sont internalisés par des cellules cibles (monocytes, cellules dendritiques) où ils conduisent à la répression de gènes immunostimulateurs tels que le gène *CXCL11*. Cependant, dans ce cas, ces microARNs représentent plutôt les fruits de l'expression du génome viral, que le génome viral en lui-même. Ainsi, le cas atypique des VMs de *T. nautilus* n'a, à notre connaissance, jamais été décrit auparavant.

Le fait d'observer la présence d'un génome viral dans des VMs ordinaires soulève de nombreuses questions et ouvre de nouvelles perspectives fascinantes sur l'origine et l'évolution des virus. Les VMs produites par *T. nautilus* constituent-elles une nouvelle forme de virus ? Quels sont les événements qui ont conduit à l'obtention d'un génome viral transporté par des VMs ? Ce génome était-il à l'origine un plasmide qui aurait incorporé par recombinaison des gènes viraux devenus alors incapables de former une

capside (et dans ce cas, que manque-t-il à pTN3 pour construire sa capsid) ? Ou s'agit-il d'un ancien virus qui aurait perdu ses capacités de formation de la capsid et utilise maintenant les VMs pour sa transmission ? Cette dernière possibilité semble la plus probable puisqu'il apparaît plus facile de perdre des gènes codant pour des protéines de capsides plutôt de les acquérir *de novo* pour un plasmide. Nous pourrions envisager certaines expériences permettant de vérifier si la forme virale de pTN3 ne pourrait pas être induite sous certaines conditions telles que le traitement aux UVs, à la mitomycine, des chocs chauds ou froids, la déplétion en nutriments, l'absence d'agitation des cultures...A défaut d'induire la formation de virions, ces modifications pourraient faire varier la production de VMs contenant pTN3.

Ainsi, il semble que le génome viral pTN3 pallie à l'absence de capsid protéique en assurant sa propagation via les VMs. Ce mode de propagation virale est peut être réminiscent d'une des premières formes de transmission des acides nucléiques par les premiers virus, ou « protovirus » suggérée par Jalasvuori et Bamford (Jalasvuori and Bamford, 2008). Caractérisés par l'absence de capsides, ces protovirus se formaient suite à des bourgeonnements des « proto-cellules » grâce auxquels ils assuraient la propagation de leurs acides nucléiques (ARN catalytique).

Un adressage spécifique des plasmides pTN1 et pTN3 dans les VMs de *T. nautilus*

Le séquençage de la souche *T. nautilus* a montré que ses cellules comportent trois plasmides : pTN1, pTN2 et pTN3. Cependant, nous avons observé un net enrichissement des plasmides pTN1 et pTN3 au niveau des membranes cellulaires et des VMs par rapport au plasmide pTN2. Les plasmides pTN1 (et pLC70 qui en dérive) et pTN3 ont la particularité par rapport au plasmide pTN2 de coder pour la protéine p24. Un homologue de cette protéine a par ailleurs été identifié dans le virus intégré chez *T. kodakaraensis*, TKV4. Comportant un motif en doigt de zinc et un domaine hydrophobe, cette protéine constitue le candidat idéal d'adressage des plasmides dans les VMs. Les expériences de transformation de la souche *T. kodakaraensis* KUW1 avec le plasmide pLC70 (codant pour

la protéine p24) ou le plasmide pLC71 (ne codant pas la protéine p24) suivi du traitement à la DNase et de l'extraction d'ADN des VMs indiquent que le plasmide pLC70 est situé à l'intérieur des VMs alors que le plasmide pLC71 semble être situé à l'extérieur. Ce résultat va donc dans le sens de notre hypothèse. Cependant, le fait que le plasmide pTN2 ne soit pas ou peu présent dans les VMs indiquent que la protéine p24 doit reconnaître un site spécifique de fixation, présent sur les plasmides empaquetés. Les expériences de retard sur gel effectuées avec les sites potentiels de fixation identifiés *in silico* n'ont cependant pas permis d'identifier une interaction marquée ADN-protéine. De nombreuses raisons peuvent expliquer l'absence d'interaction *in vitro*. Outre la possibilité que le site identifié ne soit pas celui sur lesquels la protéine p24 vient se fixer, il se peut que le segment hydrophobe d'ancrage à la membrane qui a été tronqué pour purifier la protéine facilement soit essentiel à cette fixation. Même si cela peut s'avérer techniquement plus complexe, la purification de la protéine entière, munie de son domaine hydrophobe pourrait être envisagée. Des méthodes utilisant des détergents doux comme le triton sont peut être des moyens pour récupérer la protéine en dissolvant les membranes, sans que celle-ci ne soit dénaturée. D'autre part, la fixation de la p24 nécessite peut être son interaction avec d'autres protéines. Des expériences de précipitation d'affinité GST (pull-down) et d'immunoprécipitation pourraient être ainsi envisagées afin de déterminer les partenaires potentiels de la protéine p24. Certaines conditions physico-chimiques spécifiques sont peut être également requises. L'addition de certains ions (Mg^{2+} , connu pour stabiliser les interactions ADN-protéines, Zn^{2+} , connu pour jouer un rôle important dans l'organisation de la structure tridimensionnelle des protéines « à doigt de zinc »,...) par exemple pourrait être testée.

L'origine de la protéine p24 est assez intrigante. Avant notre étude, aucun homologue de cette protéine, identifiée dans le plasmide pTN1, n'était connu. Au cours de ce travail, nous avons découvert des homologues de cette protéine dans le génome viral pTN3 et dans le virus intégré chez *T. kodakaraensis*, TKV4. D'autre part, la présence d'un motif en doigt de zinc est un élément important indiquant que cette protéine est potentiellement impliquée dans l'empaquetage des plasmides qui la codent à l'intérieur des VMs. L'encapsulation des virions, particulièrement bien étudiés chez les Retroviridae,

fait souvent intervenir un mécanisme similaire. Le génome de ces virus code pour les protéines Gag (protéine structurale du virion), Pol (l'enzyme de réplication virale) et Env (glycoprotéine de l'enveloppe). Le précurseur polyprotéique Gag comporte la région NC (nucléocapside) caractérisée par deux motifs en doigt de zinc successifs impliqués dans la reconnaissance et dans l'adressage de l'ARN viral au niveau du site de bourgeonnement viral et dans son encapsulation (Lever, 2007). Cet emballage apparaît hautement spécifique puisque les ARNs viraux ne représentent que 1% des ARNs présents dans la cellule durant l'infection virale (Lever, 2000). De plus, les observations de l'association de la protéine p24 Δ avec l'ADN du phage Φ X174 en microscopie électronique à transmission en fond noir annulaire (Soler et al., 2007) révèle que la protéine p24 Δ , en s'oligomérisant, tend à condenser l'ADN. Un comportement similaire est observé pour la protéine de nucléocapside NCp7 qui concentre l'ARN du VIH dans la capsid (Mirambeau et al., 2006).

Le rôle que nous avons assigné à la protéine p24 vis-à-vis des plasmides rappelle également le mécanisme de propagation utilisé par de nombreux virus de plantes à ARN (parfois à ADN) pour se déplacer de cellules à cellules. Le génome viral de ces derniers peut être véhiculé sous forme de virions mais également sous forme de complexe ribonucléoprotéiques constitués de l'association entre l'acide nucléique viral et une protéine dite de mouvement (MP pour « movement protein ») (Lucas, 2006). Cette protéine peut interagir avec le cytosquelette et les plasmodesmes (canal protéique permettant la communication entre deux cellules végétales) de la cellule, permettant la propagation du virus dans la plante. Les protéines de mouvements comportent dans leur séquence des « oligonucleotides-binding fold domains » (OB-fold domains) permettant leur fixation en des sites non spécifiques de l'ARN viral (Melcher, 2000).

Même si nous n'avons pas pu identifier avec certitude les sites de sa fixation de cette protéine sur les plasmides pTN1 et pTN3, la protéine p24, à l'instar des protéines NC et MP peut certainement être qualifiée de protéine de mouvement. Cette caractéristique et le fait que celle-ci soit codée par deux génomes viraux, TKV4 et pTN3, conduit à se demander s'il ne s'agit pas d'une protéine d'origine virale, ce qui expliquerait l'absence d'homologues cellulaires.

Les impacts écologique et évolutif des transferts d'ADN par l'intermédiaire des VMs

La mise en évidence d'une implication des VMs dans le transfert d'ADN soulève certaines questions. Par exemple, nous pouvons nous demander si ces expériences conduites au laboratoire reflètent bien ce qui se passe en milieu naturel. La production de VMs elle-même, observée au laboratoire, existe-elle en milieu naturel ? Des transferts de gènes, de plasmides entre différentes Thermococcales via les VMs existent-ils dans la nature ? Se produisent-ils également entre différentes espèces ? Ces transferts effectués par le biais des VMs ont-ils joué un rôle dans l'évolution ? Même s'il s'avère difficile de répondre à ces questions, nous pouvons tenter d'en savoir plus sur les possibilités de transferts génétiques entre différentes espèces en reproduisant une sorte d'écosystème synthétique composés des organismes vivants dans les mêmes environnements. Dans notre cas, il serait par exemple intéressant de tester les transferts génétiques entre les Archées Thermococcales et Methanococcales, ou entre les Archées Thermococcales et les Bactéries Thermotogales, ces cellules vivant dans la même niche écologique (cheminées hydrothermales). De plus, les Methanococcales et les Thermococcales sont des groupes peu éloignés dans les phylogénies d'Archées basées sur les protéines ribosomales (Brochier-Armanet et al., 2011) et les analyses comparatives *in silico* ont montré que les plasmides de Methanococcales sont évolutivement proches des virus et des plasmides de Thermococcales (Soler et al., 2011) suggérant que ces éléments mobiles peuvent être transférés des Methanococcales vers les Thermococcales et/ou *vice versa*. D'autre part, comme nous l'avons observé, les VMs que nous avons étudiées, en plus d'être impliquées dans le transport d'ADN, comportent (du moins pour certaine d'entre elles) des composants toxiques. Ainsi, le transfert de gènes ne peut certainement s'effectuer qu'en direction de certaines souches spécifiques, non sensibles aux toxines véhiculées. Ceci peut constituer un moyen de diriger l'échange génétique s'effectuant par l'intermédiaire des VMs.

Par ailleurs, il se peut que la transmission de l'information génétique par la fusion de VMs avec des cellules représente un processus plus ancien que la conjugaison, la transduction et la transformation. En effet, ces mécanismes d'échanges génétiques usuellement cités font intervenir de nombreuses protéines, et ont dû apparaître assez

tardivement (au plus tôt lors du deuxième âge du monde à ARN correspondant à l'apparition des ribosomes). Les VMs ont donc certainement joué un rôle important dans les transferts génétiques et dans l'évolution des organismes lors du premier âge du monde à ARN. Si de nombreuses études révèlent que la fusion des membranes nécessite l'implication de protéines spécifiques (Backovic and Jardetzky, 2011; Zhou and Platt, 2011), certains travaux rapportent que les peptides ont également la capacité de déclencher cette fusion (Inaba et al., 2011; Fuhrmans and Marrink, 2012). Ainsi, il est possible que l'apparition primitive de peptides formés de manière abiotique puisse avoir joué un rôle dans les premiers transferts génétiques utilisant les VMs.

En conclusion, ce travail a permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur la sécrétion des vésicules membranaires chez les Archées grâce aux données obtenues en étudiant le groupe des Thermococcales. Si nous avons réussi à entrevoir le mécanisme de formation des vésicules et à déterminer, de façon non exhaustive, leur composition biochimique, nous n'avons pas pu déterminer le mécanisme moléculaire de leur formation. Nous avons cependant pu identifier certains rôles possibles pour ces vésicules, tels que la nutrition, la compétition, la signalisation, les transferts horizontaux de gènes. Ces rôles également rapportés pour les VMs des autres domaines, soulignent l'importance de ces structures dans les interactions entre les cellules et leur environnement. La relation forte entre les VMs et les virus, bien étudiée chez les Eucaryotes, a été également soulignée dans cette étude suite à la découverte d'un génome viral transporté par les VMs. Cette singularité renforce l'idée d'un lien évolutif important entre les VMs et les virus et montre la difficulté de définir d'une façon unilatérale ces entités.

Si nous avons pu répondre à certaines questions, nous en avons soulevé beaucoup d'autres. Une étude transversale des VMs dans les trois domaines du vivant sera certainement le meilleur moyen d'appréhender les réels impacts biologiques de ces entités.

ANNEXES

Annexe 1

Composition du milieu de Wolfram utilisé pour la culture des Thermococcales en anaérobiose

Solution A (pour 500 mL):

NaCl	25,00 g
MgCl ₂ , 6 H ₂ O	5,00 g
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	1,00 g
KCl	0,75 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,50 g
NaBr, 10 H ₂ O	0,05 g
SrCl ₂ , 6 H ₂ O	0,0075 g
FeSO ₄ , 7 H ₂ O	0,002 g

Éléments traces (en µL de solution à 1%, pour 500 mL):

MnCl ₂ , 4 H ₂ O	90
Na ₂ B ₄ O ₇ , 10 H ₂ O	224
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	11
CuCl ₂ , 2 H ₂ O	2,5
Na ₂ MnO ₄ , 2 H ₂ O	1,5
VOSO ₄ , 5 H ₂ O	1,5
CoSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5
NiSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5

Solution B (pour 500 mL):

Yeast extract	1,00 g
Bacto-tryptone	4,00 g
K ₂ HPO ₄	0,06 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Tris-HCl (1M, pH7)	10,0 mL
Résazurine (1 g/L)	1,0 mL

Les deux solutions sont autoclavées 30 min à 105°C. Le milieu de culture est constitué du mélange des deux solutions volume à volume. 0,8% (p/v) de soufre élémentaire est ajouté dans le milieu.

Le Yeast extract est un extrait de levure (extrait de cellules de levure autolysées), qui constitue avec les bacto-tryptones une source de carbone organique.

Le NaCl et les autres sels reconstituent le milieu marin. Le K₂HPO₄, le KH₂PO₄ et le Tris-HCl tamponnent le milieu.

La résazurine est un indicateur d'oxydoréduction. En condition d'oxydation, le milieu est rose, et en condition réductrice le milieu devient jaune. La résazurine permet de vérifier l'absence d'oxygène dans notre milieu de culture.

Le Na₂S est un composé réducteur qui est utilisé pour éliminer les dernières traces d'O₂ après les vides gaz.

Une fois le milieu préparé dans une bouteille de façon stérile, le pH est d'environ 6,5 et le milieu est jaune car en anaérobiose.

Annexe 2

Composition du milieu minimum (25 mL)

×1 Eau de mer artificielle (Artificial Sea Water)	20 ml
×40 Solution d'acides aminés	0.625 ml
Eau sterile	4.375 ml
×10,000 Mélange de vitamines	2 µl
Solution minérale	10 µl
Résazurine 1mg/ml	25 µl
Soufre élémentaire	0.15 g

Dégazer et ajouter 50~100 µl de Na₂S à 5%

Composition de chaque solution

Solution minérale / 1 L

10 g MnSO₄ 7H₂O
2 g CoCl₂
2 g ZnSO₄
0.2 g CuSO₄ 5H₂O
0.2 g AlK(SO₄)₂
0.2 g H₃BO₃
0.2 g Na₂MoO₄ 2H₂O
0.4 g Na₂WO₄ 2H₂O
Compléter à 40 mL avec H₂O MilliQ puis filtrer

×10,000 Mélange de vitamines /100 ml

50 mg Niacine (Acide Nicotinique)
20 mg Biotine
50 mg Pantotenate Ca
50 mg Acide lipoïque
20 mg Acide folique
50 mg Acide p-Aminobenzoïque
50 mg Thiamine (B1)
50 mg Riboflavine (B2)
50 mg Pyridoxine (B6)
50 mg Cobalamine (B12)
Ajuster le pH à 7.0 avec NaOH, compléter à 100 mL avec H₂O MilliQ puis filtrer

**×4 Eau de mer artificielle
(artificial sea water) /1 L**

80 g NaCl
12 g MgCl₂ 6H₂O
24 g MgSO₄ 7H₂O
4 g (NH₄)₂SO₄
0.8 g NaHCO₃
1.2 g CaCl₂ 2H₂O
2 g KCl
1.68 g KH₂PO₄
0.2 g NaBr
0.08 g SrCl₂ 6H₂O
0.04 g Fe(NH₄)₃citrate
Compléter à 1L avec H₂O MilliQ

×40 Solution d'acides aminés/ 40 ml

150 mg Alanine
250 mg Arginine H₂O
200 mg Asparagine H₂O
100 mg Aspartic acid
500 mg Cystein HCl H₂O
100 mg Glutamine
400 mg Glutamic acid
400 mg Glycine
200 mg Histidine HCl H₂O
200 mg Isoleucine
200 mg Leucine
200 mg Lysine HCl
150 mg Methionine
150 mg Phenylalanine
250 mg Proline
150 mg Serine
200 mg Threonine
200 mg Tyrosine
100 mg Valine
150 mg Tryptophan

Ajuster le pH à 8.0 avec NaOH et compléter
à 40 mL avec H₂O MilliQ

Annexe 3

Composition du milieu sélectif utilisé pour les expériences de transformation (25 mL)

×1 Eau de mer artificielle	20 ml (voir composition Annexe 2)
×5 Solution d'hydrolysate de caséine	5 ml (voir composition ci-dessous)
Solution minérale	10 µl (voir composition Annexe 2)
Résazurine (1 g/L)	25 µl
Soufre élémentaire	0.15 g
Solution d'uracile (2mg/ mL)	125µL
Dégazer et ajouter 50~100 µl de Na ₂ S à 5%	

×5 Solution d'hydrolysate de caséine / 1 L

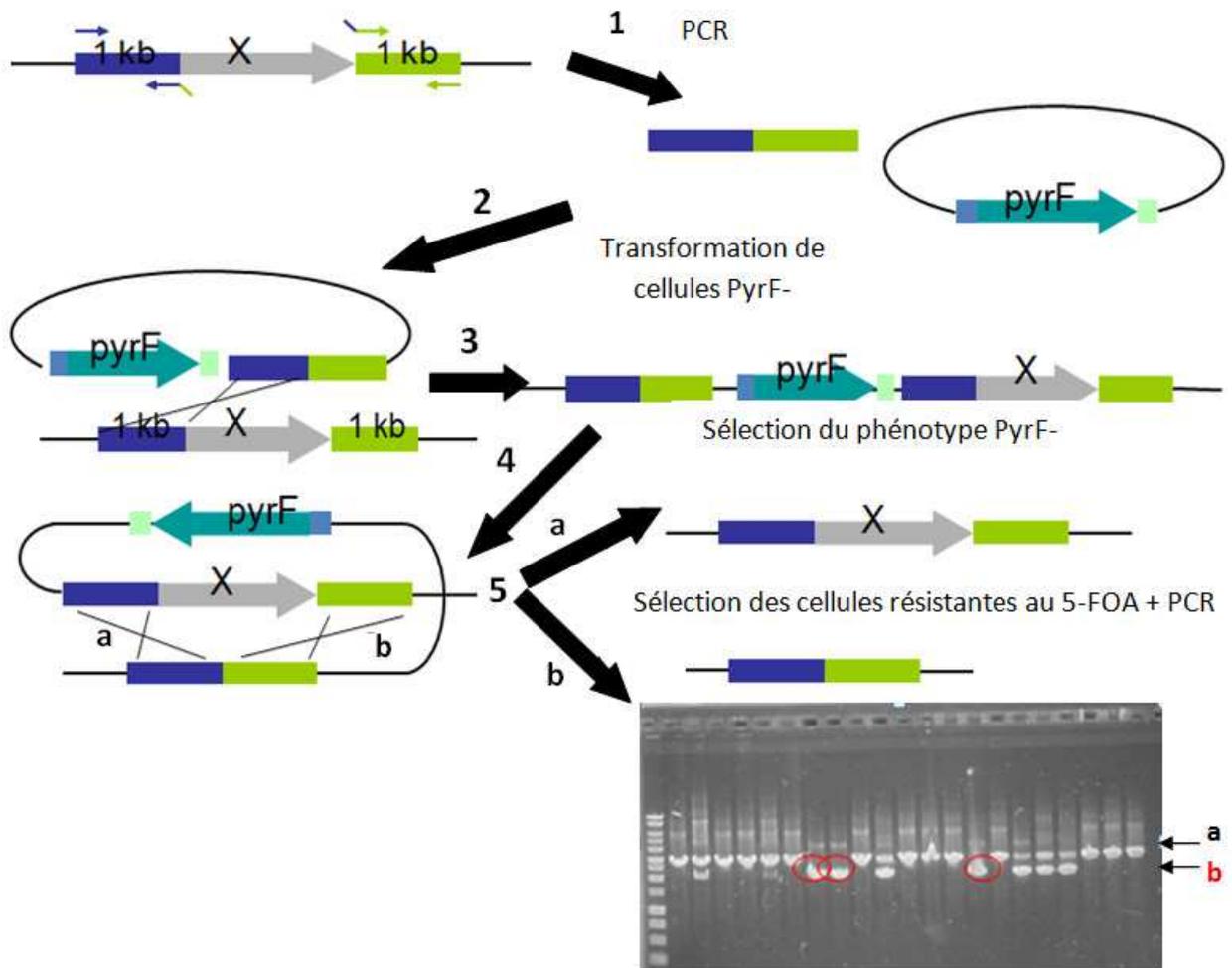
25 g hydrolysate de caséine sans vitamines

5 ml Résazurine (1 g/L)

Compléter à 1L avec H₂O MilliQ et autoclaver

Annexe 4

La construction d'un mutant d'inactivation (Knock out) pour le gène codant la protéine stomatine TK0348 chez *T. kodakaraensis*, KU216



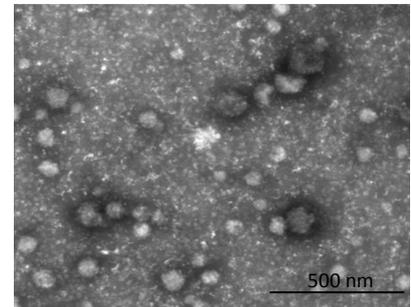
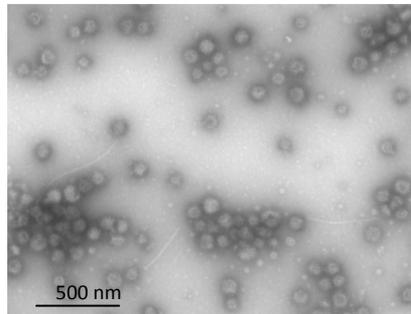
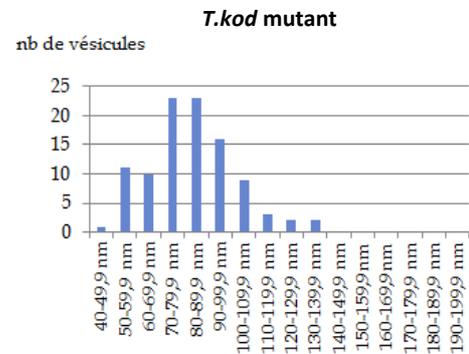
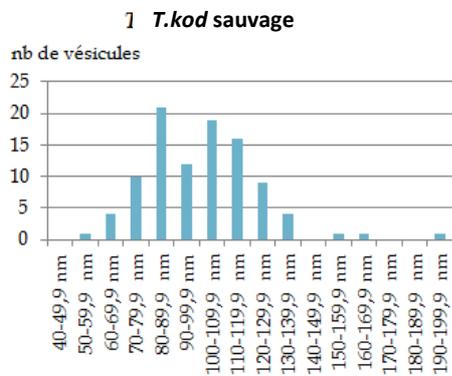
Comparaison de la taille des VMs produites par la souche sauvage de *T. kodakaraensis* et la souche mutée ($\Delta tk0348$)

La première étape consiste à isoler par PCR le gène *tk0348* (indiqué par un X sur la figure) accompagné de deux régions flanquantes de 1 kb. Ce fragment est ensuite inséré dans un plasmide PGEM-T et une deuxième PCR est effectuée pour éliminer le gène *tk0348* du fragment. Le fragment délété du gène *tk0348* est ensuite digéré et inséré dans un plasmide contenant le gène *pyrF* permettant la synthèse d'uracile (1).

Des cellules *T. kodakaraensis pyrF*⁻ sont transformées avec ce plasmide (2) et les cellules ayant intégré le plasmide dans leur chromosome sont sélectionnées par le phénotype *PyrF*⁻ (3).

Deux phénomènes de recombinaison homologue peuvent avoir lieu au sein du chromosome (a ou b) conduisant à la perte du gène *pyrF* (4). La culture des cellules en présence de la drogue 5-FOA (Acide 5-Fluoroorotique, transformant l'uracile en un composé toxique pour les cellules) permet de sélectionner les archées chez qui le phénomène de recombinaison a eu lieu (5). L'amplification par PCR des régions flanquantes du gène *tk0348* permet ensuite de sélectionner les cellules chez qui ce gène a été délété (b).

Sauvage	Mutant
Moyenne= 100,1 nm	Moyenne= 83,4 nm
Nombreuses vésicules	Peu de vésicules
$\sigma = 22,2$	$\sigma = 18,02$
Amplitude: 50,6-192 nm	Amplitude: 47,4-133 nm



L'observation de préparations de VMs purifiées à partir de la souche délétée pour le gène *tk0348* révèle que celle-ci produit des VMs. Cependant certaines différences ont pu être identifiées au sujet de leur taille. Un échantillon de 200 vésicules a été mesuré pour la souche sauvage et pour le mutant (en phase stationnaire). Chez *T. kodakaraensis* sauvage, la moyenne des VMs mesurées est de 100,1 nm tandis qu'elle est de 83,4 nm pour les vésicules produites par le mutant $\Delta tk0348$. De plus, l'écart-type (σ) est moins élevé chez le mutant (18,02 contre 22,2 chez le sauvage). Ceci est corrélé à une amplitude de taille plus importante chez le sauvage (50,6-192 nm contre 47,4-133 nm chez le mutant). Par ailleurs, le mutant $\Delta tk0348$ semble produire une quantité plus faible de VMs (même s'il s'agit ici d'une analyse purement qualitative). En conclusion, les effets rapportés de la délétion du gène *tk0348* sur la vésiculation sont une légère diminution de la taille des VMs, qui semble être plus homogène, ainsi qu'une plus faible production.

Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA

Marie Gaudin,^{1*} Emilie Gailliard,¹ Stefan Schouten,² Ludivine Houel-Renault,³ Pascal Lenormand,⁵ Evelyne Marguet¹ and Patrick Forster^{1,4}

¹Institut de Génétique et Microbiologie, Univ Paris-Sud, CNRS UMR8621, 91405 Orsay Cedex, France.

²NIOZ Royal Netherlands Institute for Sea Research, Department of Marine Organic Biogeochemistry, PO Box 59, 1790 B, Den Burg, The Netherlands.

³Centre de Neurosciences Paris Sud, Univ Paris XI, UMR 8195 CNRS, 91405 Orsay Cedex, France.

⁴Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75015, Paris, France.

⁵Plate-Forme de Protéomique, CNRS URA 2185, Protéopole, Institut Pasteur, Paris, France.

Summary

Thermococcales are hyperthermophilic archaea found in deep-sea hydrothermal vents. They have been recently reported to produce membrane vesicles (MVs) into their culture medium. Here, we have characterized the mode of production and determined the biochemical composition of MVs from two species of *Thermococcales*, *Thermococcus gammatolerans* and *Thermococcus kodakaraensis*. We observed that MVs are produced by a budding process from the cell membrane reminiscent of ectosome (microparticle) formation in eukaryotes. MVs and cell membranes from the same species have a similar protein and lipid composition, confirming that MVs are produced from cell membranes. The major protein present in cell membranes and MVs of both species is the oligopeptide binding protein OppA. This protein is also abundant in MVs from cells grown in minimal medium, suggesting that OppA could be involved in processes other than peptides scavenging. We have previously shown that MVs from *Thermococcales* harbour DNA and protect DNA against thermodegradation. Here, we show that *T. kodakaraensis* cells transformed with the shuttle plasmid pLC70 release MVs harbouring this plasmid. Notably, these MVs can be used to transfer pLC70 into

plasmid-free cells, suggesting that MVs could be involved in DNA transfer between cells at high temperature.

Introduction

Active release of membrane vesicles (MVs) by living cells seems to be an important physiological process that has been extensively studied in *Bacteria* and *Eukarya*. Proteobacteria produce outer membrane vesicles (OMVs) of 50–250 nm diameter that are composed of outer membrane and periplasmic constituents (for reviews see Beveridge, 1999; Mashburn-Warren and Whiteley, 2006; Kulp and Kuehn, 2010). These OMVs are responsible for signal trafficking, delivery of virulence factors into target bacterial or eukaryotic cells, and modulation of host defence and response (Manning and Kuehn, 2011). In *Eukarya*, different types of MVs have been described and extensively studied (for a recent review, see Gyorgy *et al.*, 2011). Exosomes (50–100 nm in diameter) are formed by invagination and budding from the limiting membrane of late endosomes, resulting in the formation of multivesicular bodies (MVB). These MVs are released into the extracellular environment after fusion of the MVB with the plasma membrane. In contrast, ectosomes (also called microparticles) bud directly from the cytoplasmic membrane. These are heterogeneous in size (from 0.05 µm up to more than 1 µm) and their surface displays antigens and other membrane and cytoplasmic constituents of the cell from which they originated. Exosomes and ectosomes are involved in many physiological processes, such as long range signalling, transfer of membrane and cytosolic materials (including DNA, mRNA, siRNA) and modulation of immune response (Holmgren *et al.*, 1999; Stoorvogel *et al.*, 2002; Freyssinet, 2003).

The discovery of MVs in *Archaea*, the third domain of life, is quite recent. In 2000, Prangishvili and colleagues showed that several strains of the crenarchaeon *Sulfolobus islandicus* produced MVs that could function as carriers of proteinaceous toxins, termed sulfobolobins (Prangishvili *et al.*, 2000). The protein and lipid composition of MVs from *Sulfolobus acidocaldarius*, *S. solfatarius* and *S. tokodaii* has been recently described (Ellen *et al.*, 2009) and sulfobolobins associated to their MVs have been purified and characterized (Ellen *et al.*, 2011). In *Ignicoccus*, the only archaeal genus known today

Received 15 December, 2011; accepted 10 April, 2012. *For correspondence. E-mail marie.gaudin@igmors.u-psud.fr. Tel. (+33) 1 69 15 30 59; Fax (+33) 1 69 15 78 08.

whose cell possesses an outer membrane, MVs derived from the cytoplasmic membrane are found in a huge periplasmic space, where they are able to fuse with the outer membrane (Nather and Rachel, 2004).

We have previously reported that MV production is a common feature among *Thermococcales*, an order of hyperthermophilic and anaerobic archaea that belong to the phylum *Euryarchaeota* (Soler et al., 2008). Most strains of *Thermococcales* produce MVs of about 50–150 nm. Some of these MVs are associated with cellular DNA and this DNA is more resistant to thermodegradation than free DNA, suggesting that MVs could be involved in lateral gene transfer at high temperature (Soler et al., 2008). Here, we report the mode of production and the protein and lipid composition of MVs from two different species of *Thermococcales* whose genomes have been sequenced: *T. kodakaraensis* and *T. gammatolerans*. We also investigated the possible role of MVs as carriers of DNA between cells, using the genetically tractable strain *T. kodakaraensis* KUW1, and show that MVs can be used to transfer DNA from cell to cell.

Results and discussion

Membrane vesicles are produced by budding from the cell membrane

Membrane vesicles were first detected in culture supernatants of *Thermococcales* using transmission electron microscopy (TEM) (Soler et al., 2008). Although a few images revealed the presence of vesicles on cell surfaces, the mechanism of MV production could not be clearly identified by TEM of whole cells. We thus decided to prepare and observe thin sections (50 nm) of cells from *T. kodakaraensis* KU216 and *T. gammatolerans* EJ3 by TEM, hoping to directly visualize the formation of MVs (Fig. 1). These thin sections were stained with ruthenium red, a reagent that binds to glycosylated structures and thus defines more precisely the S-layer, an envelope that surrounds the cell and which is composed of glycoproteins (the terms cell membrane or membrane used thereafter will include both the S-layer and the cytoplasmic membrane). We were indeed able to detect MVs and cells producing MVs in thin sections of both *T. kodakaraensis* and *T. gammatolerans*. These MVs were delimited by a cytoplasmic membrane, often surrounded by an S-layer, suggesting that MVs originated from the membrane and packaged cytoplasmic components (Fig. 1A). In some thin sections, we observed the bending of the cell membrane that probably precedes the budding of MVs (Fig. 1B and C). In others, MVs are attached to the cell surface and their membranes are connected to the cell membrane (Fig. 1D).

Protein and lipid composition of membrane vesicles

To determine the protein and lipid content of *Thermococcales* MVs, we first revised our previous protocol (Soler et al., 2008) to obtain cleaner preparations. We tried different approaches (filtration, sucrose gradient, caesium chloride centrifugation) either alone or in combination. We obtained our best result simply by introducing a filtration step with 0.2 µm filters between the two steps of ultracentrifugation at 120 000 g (see *Experimental procedures*). The MV preparations obtained by this procedure were completely depleted of intact cells visible by TEM. Moreover, we could not get any positive culture by inoculating culture medium with these preparations, confirming the absence of viable cells.

Membrane vesicles and cell membranes (obtained after cell lysis with a French press) were loaded on a monodimensional polyacrylamide gel (SDS-PAGE) to identify major proteins. The result of a typical experiment is shown in Fig. 2A. Protein profiles for MVs and membranes were strikingly different between *T. kodakaraensis* and *T. gammatolerans*. In contrast, the profiles were quite similar for MV and membrane samples from the same strain. This is different from the observations made with *Sulfolobus* species where the MVs and membranes have very different protein profiles (Ellen et al., 2009). Both MVs and cell membranes of *Thermococcales* also contained the same types of lipids: glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether (GDGT-0) and glycerol triphityl glycerol tetraether (GTGT-0) lipids, with GDGT-0 being the most abundant in both MVs and membranes (Table S1). The overall similarity between protein and lipid composition of MVs and membrane confirmed that MVs are produced from the cell membrane, in agreement with the EM analysis. However, they also both exhibit some minor differences. MVs were depleted for some polypeptides (labelled with asterisks in Fig. 2A) while others were clearly enriched. MVs were also slightly enriched in GDGT-0, compared with cell membranes. These observations suggest some specificity that could be related to the mechanism of MV formation.

The identity of proteins associated to bands visible on polyacrylamide gels was determined by mass spectrometry. Table 1 gives the list of proteins identified in MV preparations. Interestingly, several have homologues that were previously identified in MVs from *Sulfolobales* (Ellen et al., 2009). The MV proteins identified in *T. gammatolerans* were all known to be associated with cell membranes, whereas in *T. kodakaraensis*, MVs preparations contained both membrane proteins and abundant cytoplasmic proteins. This again confirmed that MVs are produced by budding from the membrane in a process that appears to involve entrapment of cytoplasm.

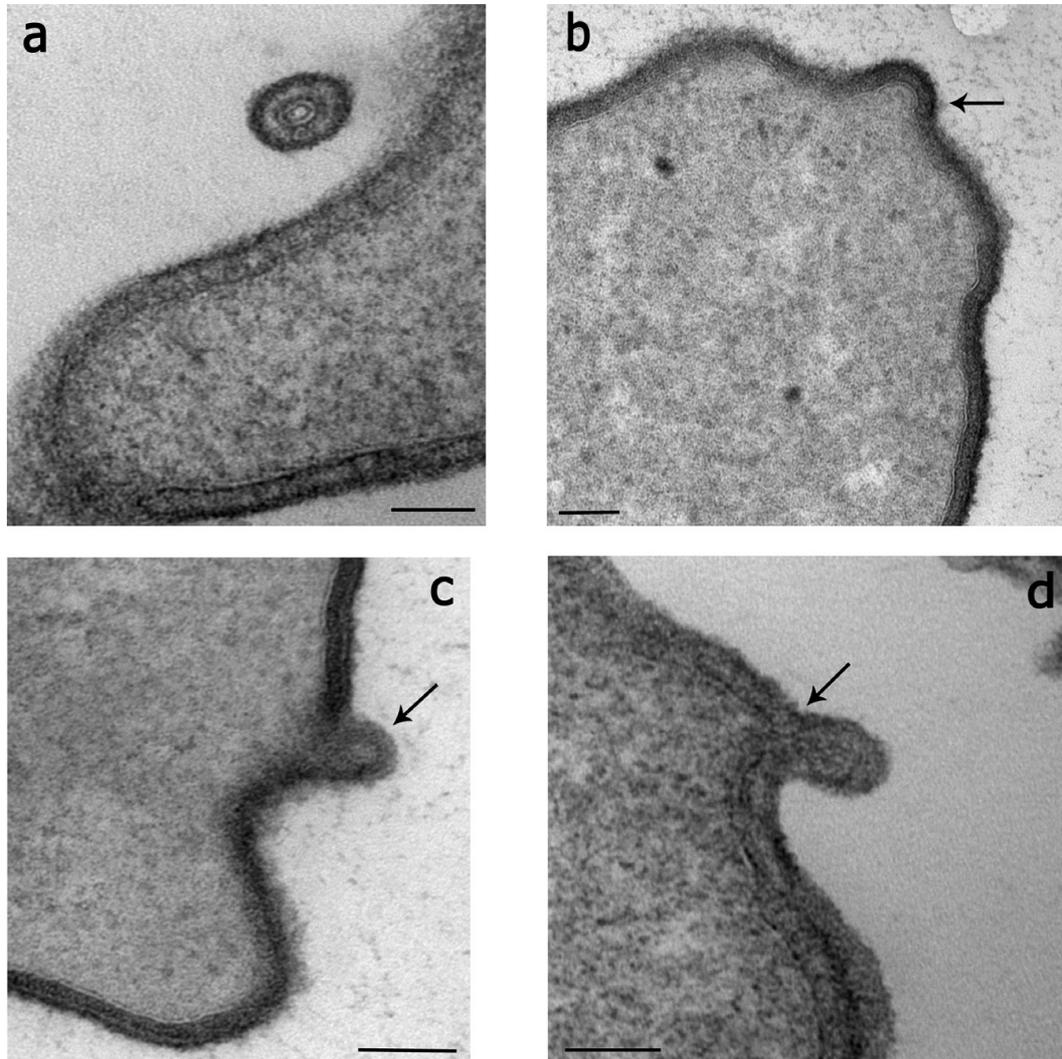


Fig. 1. Thin sections of cells and MVs of *T. gammatolerans* (A and C) and *T. kodakaraensis* (B and D) stained with ruthenium red. MVs are indicated by black arrows. Scale bar: 100 nm.

The major protein of membrane vesicles is the oligopeptide binding protein OppA

The only protein common to MV preparations of the two strains was a putative oligopeptide binding protein homologous to archaeal and bacterial members of the OppA family (TGAM_0331 and TK1804 respectively) (dots in Fig. 2A, Table 1). This protein was also the most abundant in MVs of the two strains, the protein TK1804

being clearly enriched in MVs compared with cell membranes (Fig. 2A). A more distant homologue, TGAM_0876, was also detected in both MVs and cell membranes of *T. gammatolerans* (Fig. 2A; Table 1). Interestingly, four *Sulfolobus* OppA proteins have also been found in MVs produced by *Sulfolobales* (Table 1).

OppA proteins function as ligand binding proteins for ABC transporter complexes for peptide uptake (Monnet, 2003). In addition to OppA, these complexes typically

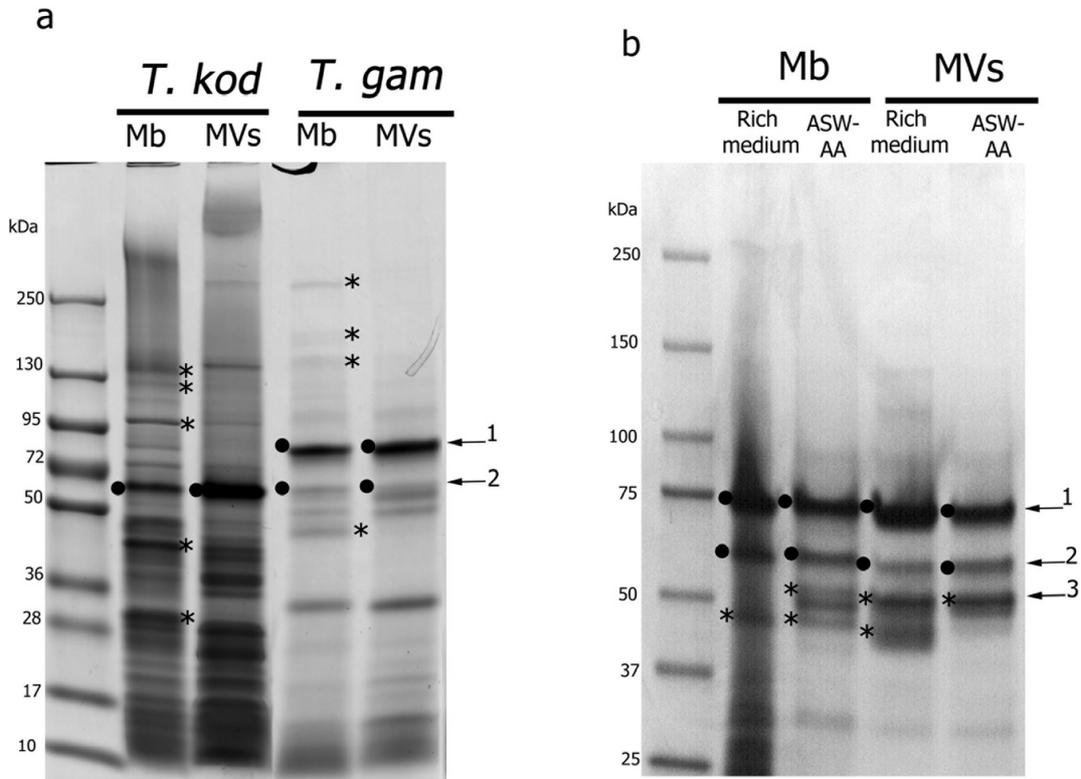


Fig. 2. A. SDS-PAGE of enriched MVs and cell membranes of *T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans*. The major peptides depleted in MVs compared with cell membranes are indicated with an asterisk. OppA-like proteins are indicated with black dots. 1: TGAM_0331; 2: TK1804; TGAM_0876. B. SDS-PAGE of enriched MVs and cell membranes of *T. gammatolerans* cultivated in rich medium (containing peptides) and in ASW-AA (Artificial Sea Water supplemented with a mixture of 20 amino acids). OppA-like proteins are indicated with black dots. Amylopullulanase proteins are indicated with asterisks. 1: TGAM_0331; 2: TGAM_0876; 3: amylopullulanase.

include two transmembrane proteins (OppB, OppC) and two proteins in charge of ATP hydrolysis (OppD, OppF), the five proteins being encoded by genes organized into a single operon (Monnet, 2003). Similar operons were detected in the genomes of the two *Thermococcales* (Fig. S1). Notably, beside OppA, three other proteins encoded in these operons were detected in our MV preparations (dark-coloured arrows Fig. S1).

Since *Thermococcus* strains were grown in rich medium containing peptides, we wondered if the abundance of OppA proteins in MVs was due to their overexpression triggered by these peptides. Therefore, we grew *T. gammatolerans* in a minimal medium with amino acids as carbon source. Remarkably, MVs from *T. gammatolerans* grown in minimal medium had a protein composition very similar to those of MVs prepared in rich-medium, with major proteins being OppA proteins and amylopullulanases (Fig. 2B). This suggests that scavenging peptides cannot

be the major role of these proteins. Alternatively, if MVs take up peptides excreted by *Thermococcales* themselves (from the same or from different species), this could indicate a role in signalling or competition between cells.

Interestingly, it has been recently shown that an OppA protein from *Sulfolobus solfataricus* strongly interacts with a putative attachment protein of the archaeal virus ATV (*Acidianus tailed virus*) (Erdmann *et al.*, 2011). This suggests that MVs could also protect archaeal cells from some viral infection as recently shown in the case of *E. coli*, which can be protected from T4 infection by adding MVs in the culture medium (Manning and Kuehn, 2011).

Transformation of cells with vesicle preparation

We recently observed by electron microscopy that the strain *Thermococcus nautilus*, sp. 30-1, produces MVs containing endogenous plasmids (Soler *et al.*, 2011, fig. 4).

Table 1. Proteins identified by mass spectrometry in MVs of *T. gammatolerans*, *T. kodakaraensis*.

	Annotation	<i>Thermococcales</i> MVs (ORF numbers)	<i>Sulfobales</i> MVs (ORF numbers) ^a
Cell envelope proteins	Peptide binding protein (OppA)	TGAM_0331*	SSO1273, SSO2619,
		TK1804*	Saci_1038, ST2539
	Peptide binding protein (OppA)	TGAM_0876*	SSO1273, SSO2619,
			Saci_1038, ST2539
	ABC transport substrate binding protein ^b	TGAM_1088*	
	Peptide transport, permease protein OppB	TGAM_0332*	
	Peptide transport, permease protein OppC	TGAM_0333*	
	Peptide transport, ATPase component OppD	TK1801*	
	ABC transport, ATPase component	TK2053*	
	Amylopullulanase related protein	TGAM_1390*	
	Amylopullulanase	TGAM_0603*	SSO1172
	Metallophosphoesterase ^c	TGAM_1662*	
	Flagellin	TGAM_1534; TGAM_1533**	Saci_1178
	Stomatin/prohibitin-like protein	TK0348*	Saci_1749
	Hypothetical protein 1 ^d	TGAM_1300*	
	Hypothetical protein 2 ^e	TK0569*	
V-type ATP synthase subunit A	TK1602		
Ferredoxin – NADP ⁺ reductase subunit alpha	TK1326		
Cytoplasmic proteins	Glutamate dehydrogenase	TK1431	SSO1907, ST2241
	Aminotransferase, class III	TK2101	
	Phosphoenolpyruvate synthase	TK1292	
	Translation elongation factor EF-1, alpha subunit	TK0308	Saci_0685; SSO0216
	Thermosome alpha subunit	TK2303	Saci_0666; SSO0282
	50S ribosomal protein L2P	TK1539	
	50S ribosomal protein L4P	TK1541	
	30S ribosomal protein S5P	TK1521	

Proteins identified were compared with those found in MVs of three strains of *Sulfolobus*: *Sulfolobus solfataricus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus tokadaii* (Ellen *et al.*, 2009).

Single-asterisk (*) signals peptide detected by PRED-TAT.

Double-asterisk (**) signals peptide detected by FlaFind.

a. SSO: *Sulfolobus solfataricus*; Saci.: *Sulfolobus acidocaldarius*; ST: *Sulfolobus tokadaii*.

b. Some homologues are annotated as iron binding proteins.

c. Could mediate deglycosylation.

d. Distantly related to amylopullulanases and S-layer proteins.

e. Harbours motives common to amylopullulanases, ABC transporters and phosphoesterases.

This suggested that MVs could be vehicles for plasmid transfer between *Thermococcus* cells. We tested this hypothesis using the genetically tractable strain *T. kodakaraensis* KUW1 (Trp-, Ura-) derived from KU216 by deletion of the *tpE* gene (Sato *et al.*, 2005). This strain can be transformed by the shuttle plasmid pLC70 that harbours the *tpE* gene (Santangelo *et al.*, 2008). Figure 3A shows the migration pattern on agarose gel of pLC70 isolated from transformed cells. Notably, whereas pLC70 isolated from *E. coli* was negatively supercoiled (Fig. 3A, lane 3), pLC70 isolated from *T. kodakaraensis* KUW1 migrated in agarose gel as a ladder of partly relaxed DNA topoisomers (Fig. 3A, lane 2). Previously, this behaviour was shown for endogenous plasmids isolated from other hyperthermophilic archaea (Charbonnier *et al.*, 1992; Lopez-Garcia and Forterre, 1997) and can be explained by the absence of DNA gyrase in *Thermococcales*.

Figure 3B shows that pLC70 was associated to MVs produced by *T. kodakaraensis* transformed with this plasmid, which was a prerequisite to test the transforming capacity of MVs themselves. Plasmid pLC70 isolated

from MVs migrated as form II DNA (nicked circles) with a small amount of linear form over a background of cellular DNA. The pLC70 identity was confirmed by restrictions analysis with NotI (that linearizes pLC70, Fig. 3B, lane 3) and BamHI (producing two bands of 6.7 and 3.7 kb, respectively, Fig. 3B, lanes 4) that were identical to those from *E. coli* (Fig. 3B, lanes 6, 7).

To check if MVs harbouring pLC70 could be used to transform a plasmid-free strain, cells of *T. kodakaraensis* were mixed with MVs containing pLC70 and left 2 h at 85°C (see *Experimental procedures*). Selective medium (without tryptophane) was inoculated with these cells and incubated for 21 h at 85°C. Positive cultures were obtained with cells previously mixed with MVs containing pLC70. We also observed transformation when MVs were previously treated with DNase, suggesting that transformation was due to pLC70 DNA located inside MVs. In contrast, we never observed growth in selective medium in control experiments, i.e. medium inoculated with MVs harbouring pLC70 without recipient cells, with MVs lacking pLC70 plus *T. kodakaraensis* KUW1 or with

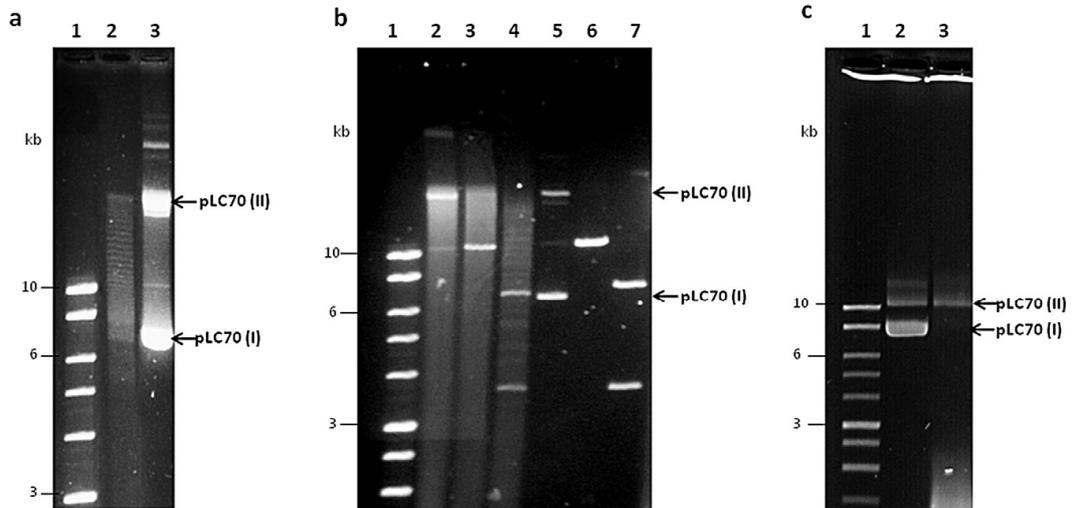


Fig. 3. Transformation of *T. kodakaraensis* (strain KUW1) with the shuttle plasmid pLC70 (A and B) and with vesicles associated with pLC70 (C).
 A. Electrophoretic analysis on agarose gel of plasmid DNA extracted from cells of *T. kodakaraensis* KUW1 after transformation with pLC70 (2) and pLC70 DNA purified from *E. coli* (3).
 B. Electrophoretic analysis on an agarose gel of DNA extracted from MVs of *T. kodakaraensis* KUW1 transformed with pLC70 (2, 3, 4) and pLC70 DNA purified from *E. coli* (5, 6, 7). (3, 6) DNA digested with NotI; (4, 7) DNA digested with BamH1.
 C. Electrophoretic analysis of plasmid DNA extracted from *E. coli* (2) and plasmid DNA extracted from cells of *T. kodakaraensis* KUW1 after transformation with preparations of MVs associated with pLC70 (3). (1) Smart ladder (Promega). pLC70 (I): supercoiled DNA; pLC70 (II): open-circular DNA.

T. kodakaraensis KUW1 alone. Electrophoretic analysis of positive cultures revealed the presence of pLC70 (form II) in cells that had been transformed with MVs associated with this plasmid (Fig. 3C, lane 3), demonstrating that MVs can be used to transfer an exogenous plasmid into recipient cells.

Several authors have previously reported successful transformation of plasmid or chromosomal markers with MVs from different bacteria (Kolling and Matthews, 1999; Yaron *et al.*, 2000). However, Beveridge and co-workers failed to detect transformation with MVs from *P. aeruginosa* obtained after a filtration step (Renelli *et al.*, 2004). They suggested that MVs used previously were contaminated by intact cells. In our case, we observed transformation despite a similar filtration step and the absence of intact cells in our MV preparations.

Conclusion

The combination of electron microscopic techniques with lipid and protein analyses revealed that MVs of *Thermococcales* are produced by a budding process from the cell envelope reminiscent of ectosome formation in eukaryotic cells. Major MV proteins are peptide-binding receptors, suggesting that MVs could play an important

role in peptide metabolism (scavenging and/or signaling). MVs produced by *Thermococcales* contain DNA and protect DNA against thermodenaturation (Soler *et al.*, 2008). Here we have shown that MVs can be used to transfer DNA. This represents a novel mechanism of genetic exchange, where DNA is passed from one cell to another in a protected environment. This would be especially important in the case of hyperthermophiles, since free DNA is expected to be highly unstable at very high temperature. The result of our transformation experiment also indicates that MVs can fuse with recipient cells to deliver their contents. This suggests that MVs could be also used to transfer peptides, proteins and other macromolecules or metabolites from cell to cell. The production of MVs therefore seems to be a universal and important mechanism for cells adaptation to the environment via signalling, nutrient uptake and cellular communication.

Experimental procedures

Strain cultivation

Thermococcus kodakaraensis KU216 and *T. gammatolerans* EJ3 were grown anaerobically overnight (14–16 h) in Wheaton bottles of 1 l, in 500 ml of Zillig's broth (Soler *et al.*,

2008) or synthetic medium (ASW: artificial sea water) supplemented with a mixture of 20 amino acids (Sato *et al.*, 2003).

Membrane vesicle preparation

A 500 ml culture of each strain was centrifuged twice at 8000 *g* for 20 min, then at 16 000 *g* for 20 min, to remove cells. Supernatants were collected and centrifuged at 120 000 *g* for 2 h at 8°C in a Beckman 45 Ti rotor. Pellets containing vesicles were suspended in 4 ml of Mu Buffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 20 mM MgSO₄) and filtered twice with 0.2 µm filters to remove remaining cell debris. The filtrates were again centrifuged at 120 000 *g* for 2 h at 4°C in a Beckman TLA 100.4 rotor. Pellets were then suspended in 500 µl of Mu buffer.

Isolation of cell membranes

A 250 ml culture of each strain was centrifuged at 5000 *g* for 10 min. Cell pellets obtained were suspended in 5 ml of a buffer containing 20 mM Tris-HCl pH 7.5 and 200 mM NaCl. Cells were lysed in a French press at 14 kPsi and cell debris removed from the lysate by centrifugation at 3 000 *g* for 20 min at 4°C. Membranes were collected by centrifugation at 100 000 *g* for 45 min at 4°C in a Beckman TLA 100.4 rotor, suspended in 200 µl of 20 mM Tris-HCl, and 200 mM NaCl and stored at -80°C.

Electron microscopy of cells thin sections

Cells were fixed by incubation in 3% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA, USA), with or without ruthenium red (EMS) at 0.5%, in the culture medium for 60 min. After three washes in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2, cells were postfixed by incubation in 1% osmium tetroxide (EMS), with ruthenium red at 0.5%, in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 for 60 min at room temperature. Cells were washed three times in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 and concentrated into beads of 10% (w/v) gelatin (Sigma Aldrich) in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2 by centrifugation. The samples were dehydrated by passage through a series of graded ethanol baths before embedding in epoxy resin (Embed 812, EMS). Samples were cut with an ultramicrotome (Ultracut, Leica) to obtain 50 nm ultra-thin sections. These thin sections were treated with 0.5% uranyl acetate and lead citrate (ultro-stain 2, Leica) for contrast purposes. The grids were then observed using a Philips EM208 electron microscope operated at 80 kV, coupled with an AMT CCD camera (Hamamatsu).

Protein identification, mass spectrometry analysis

Isolated vesicles and cell membranes were heated at 90°C for 5 min in sample buffer and then subjected to SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels. Proteins were visualized with Coomassie Brilliant Blue G250, then protein bands were excised from the gel, digested by trypsin and analysed by mass spectrometry as described in Stingl and colleagues (2008).

Lipid analysis

Intact polar lipids were extracted from freeze-dried biomass using a modified Bligh and Dyer technique following (Schouten *et al.*, 2008). The extracts were acid hydrolysed and level of glycerol dibiphytanyl glycerol tetraether lipids measured using high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry following Ellen and colleagues (2009).

Transformation experiments

A culture of *T. kodakaraensis* KUW1 was grown until it reached exponential phase. A sample of 10 ml of culture was collected and centrifuged at 5000 *g* for 10 min. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 1 ml of rich medium (Zillig's broth) (Soler *et al.*, 2008). The sample was then mixed with 3 µg of plasmid pLC70 or with 100 µl of MVs associated with pLC70, treated or not with 0.5 u DNase I (DNase I, RNase free, Fermentas) and left at 85°C for 2 h. The mixtures containing either plasmid pLC70 and cells or MVs and cells were used to seed 25 ml of selective medium (ASW-Casein Hydrolysate + Ura) and incubated at 85°C for 21 h.

Acknowledgements

This work was funded by the program 'Marine Genome-Marine Biotechnologie' of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). We are grateful to Anelique Mets (NIOZ) for analytical support in lipid analysis and to Barry Holland for careful and critical reading of the manuscript.

References

- Beveridge, T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725–4733.
- Charbonnier, F., Erauso, G., Barbeyron, T., Prieur, D., and Forterre, P. (1992) Evidence that a plasmid from a hyperthermophilic archaeobacterium is relaxed at physiological temperatures. *J Bacteriol* **174**: 6103–6108.
- Ellen, A.F., Albers, S.V., Huibers, W., Pitcher, A., Hobel, C.F., Schwarz, H., *et al.* (2009) Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles* **13**: 67–79.
- Ellen, A.F., Rohulya, O.V., Fusetti, F., Wagner, M., Albers, S.V., and Driessen, A.J. (2011) The sulfobibin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J Bacteriol* **193**: 4380–4387.
- Erdmann, S., Scheele, U., and Garrett, R.A. (2011) AAA ATPase p529 of *Acidianus* two-tailed virus ATV and host receptor recognition. *Virology* **421**: 61–66.
- Freyssinet, J.M. (2003) Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost* **1**: 1655–1662.
- Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B., *et al.* (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2667–2688.

- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., and Falk, K.I. (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* **93**: 3956–3963.
- Kolling, G.L., and Matthews, K.R. (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1843–1848.
- Kulp, A., and Kuehn, M.J. (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**: 163–184.
- Lopez-Garcia, P., and Forterre, P. (1997) DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol Microbiol* **23**: 1267–1279.
- Manning, A.J., and Kuehn, M.J. (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* **11**: 258.
- Mashburn-Warren, L.M., and Whiteley, M. (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol* **61**: 839–846.
- Monnet, V. (2003) Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2100–2114.
- Nather, D.J., and Rachel, R. (2004) The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem Soc Trans* **32**: 199–203.
- Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J.K., and Zillig, W. (2000) Sulfolobins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J Bacteriol* **182**: 2985–2988.
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., and Beveridge, T.J. (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* **150**: 2161–2169.
- Santangelo, T.J., Cubonova, 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.
- 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.
- Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., and Imanaka, T. (2005) Improved and versatile transformation system allowing multiple genetic manipulations of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3889–3899.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Baas, M., Boumann, H., Standfest, S., Konneke, M., et al. (2008) Intact membrane lipids of 'Candidatus Nitrosopumilus maritimus,' a cultivated representative of the cosmopolitan mesophilic group I Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2433–2440.
- Soler, N., Marguet, E., Verbavatz, J.M., and Forterre, P. (2008) Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order *Thermococcales*. *Res Microbiol* **159**: 390–399.
- Soler, N., Gaudin, M., Marguet, E., and Forterre, P. (2011) Plasmids, viruses and virus-like membrane vesicles from *Thermococcales*. *Biochem Soc Trans* **39**: 36–44.
- Stingl, K., Schauer, K., Ecobichon, C., Labigne, A., Lenormand, P., Rousselle, J.C., et al. (2008) *In vivo* interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *Mol Cell Proteomics* **7**: 2429–2441.
- Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., and Raposo, G. (2002) The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* **3**: 321–330.
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., and Matthews, K.R. (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4414–4420.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. A. Organization of the genomic region around the genes encoding oligopeptide binding protein homologues (OppA family) in *T. kodakaraensis* (TK1804), *T. gammatolerans* (TGAM_0331; TGAM_0876), *S. solfataricus* (SS01273), *A. permix* (oppA_{AP}) and *E. coli* (oppA). Homologous genes are indicated by the same colour pattern. Each cluster encodes an oligopeptide-binding receptor (OppA protein), two transporter permease proteins and two transporter ATP binding proteins. The genes coding for proteins found in MVs are shown with dark-coloured arrows.

B. Domain structure of OppA precursors. ST-linker (stretch of threonine residues), TM-GPI (C-terminal GPI-signal sequence containing a transmembrane domain).

Table S1. Lipid composition of *T. kodakaraensis* cells and secreted MVs. GDGT glycerol dialkyl glycerol tetraethers, GTGT glycerol trialkyl glycerol tetraether. These lipids have no cyclopentane moieties. (a) GTGT-0/GTGT-0 + GDGT-0. (b) GDGT-0/GTGT-0 + GDGT-0.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Admyre, C., Johansson, S.M., Paulie, S., and Gabrielsson, S. (2006) Direct exosome stimulation of peripheral human T cells detected by ELISPOT. *Eur J Immunol* **36**: 1772-1781.
- Aharon, A., and Brenner, B. (2009) Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**: 61-69.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R.S., Allison, A.C., and Rak, J. (2009) Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3794-3799.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRVIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* **10**: 619-624.
- Alba, B.M., and Gross, C.A. (2004) Regulation of the Escherichia coli sigma-dependent envelope stress response. *Mol Microbiol* **52**: 613-619.
- Albuquerque, P.C., Nakayasu, E.S., Rodrigues, M.L., Frases, S., Casadevall, A., Zancoppe-Oliveira, R.M. et al. (2008) Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol* **10**: 1695-1710.
- Aloia, R.C., Tian, H., and Jensen, F.C. (1993) Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5181-5185.
- Andrade-Navarro, M.A., Sanchez-Pulido, L., and McBride, H.M. (2009) Mitochondrial vesicles: an ancient process providing new links to peroxisomes. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 560-567.
- Babst, M. (2005) A protein's final ESCRT. *Traffic* **6**: 2-9.
- Backovic, M., and Jardetzky, T.S. (2011) Class III viral membrane fusion proteins. *Adv Exp Med Biol* **714**: 91-101.
- Bagos, P.G., Nikolaou, E.P., Liakopoulos, T.D., and Tsigirigos, K.D. (2010) Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics* **26**: 2811-2817.
- Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Branski, P. et al. (2006) Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* **55**: 808-818.
- Balestrieri, M., Gogliettino, M., Fiume, I., Pocsfalvi, G., Catara, G., Rossi, M., and Palmieri, G. (2011) Structural and functional insights into *Aeropyrum pernix* OppA, a member of a novel archaeal OppA subfamily. *J Bacteriol* **193**: 620-630.
- Barany, F., and Kahn, M.E. (1985) Comparison of transformation mechanisms of *Haemophilus parainfluenzae* and *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* **161**: 72-79.
- Barreto, A., Rodriguez, L.S., Rojas, O.L., Wolf, M., Greenberg, H.B., Franco, M.A., and Angel, J. (2010) Membrane vesicles released by intestinal epithelial cells infected with rotavirus inhibit T-cell function. *Viral Immunol* **23**: 595-608.
- Bauman, S.J., and Kuehn, M.J. (2006) Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. *Microbes Infect* **8**: 2400-2408.
- Bavari, S., Bosio, C.M., Wiegand, E., Ruthel, G., Will, A.B., Geisbert, T.W. et al. (2002) Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses. *J Exp Med* **195**: 593-602.
- Bell, P.J. (2001) Viral eukaryogenesis: was the ancestor of the nucleus a complex DNA virus? *J Mol Evol* **53**: 251-256.

Beloin, C., Jeusset, J., Revet, B., Mirambeau, G., Le Hegarat, F., and Le Cam, E. (2003) Contribution of DNA conformation and topology in right-handed DNA wrapping by the *Bacillus subtilis* LrpC protein. *J Biol Chem* **278**: 5333-5342.

Bergsmeth, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M.J., Spetz, A.L., and Holmgren, L. (2001) Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 6407-6411.

Bernadac, A., Gavioli, M., Lazzaroni, J.C., Raina, S., and Llobes, R. (1998) *Escherichia coli* tol-pal mutants form outer membrane vesicles. *J Bacteriol* **180**: 4872-4878.

Beveridge, T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* **181**: 4725-4733.

Beyer, C., and Pisetsky, D.S. (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* **6**: 21-29.

Bhatnagar, S., and Schorey, J.S. (2007) Exosomes released from infected macrophages contain *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids and are proinflammatory. *J Biol Chem* **282**: 25779-25789.

Bhatnagar, S., Shinagawa, K., Castellino, F.J., and Schorey, J.S. (2007) Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. *Blood* **110**: 3234-3244.

Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Moller, T., Matteoli, M., and Verderio, C. (2005) Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol* **174**: 7268-7277.

Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E. et al. (2009) Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J* **28**: 1043-1054.

Bieniasz, P.D. (2006) Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**: 55-63.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.

Bishop, D.G., and Work, E. (1965) An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions. *Biochem J* **96**: 567-576.

Blanco, J., Bosch, B., Fernandez-Figueras, M.T., Barretina, J., Clotet, B., and Este, J.A. (2004) High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. *J Biol Chem* **279**: 51305-51314.

Blom, J., Nielsen, C., and Rhodes, J.M. (1993) An ultrastructural study of HIV-infected human dendritic cells and monocytes/macrophages. *APMIS* **101**: 672-680.

Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., and Thery, C. (2011) Exosome secretion: molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic* **12**: 1659-1668.

Booth, A.M., Fang, Y., Fallon, J.K., Yang, J.M., Hildreth, J.E., and Gould, S.J. (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* **172**: 923-935.

Bouchard, C. (1889) Influence qu'exerce sur la maladie charbonneuse l'inoculation du bacille pyocyanique. *Compt rend* **106**: 713.

Brochier-Armanet, C., Forterre, P., and Gribaldo, S. (2011) Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Curr Opin Microbiol* **14**: 274-281.

Brown, E.L., and Lyles, D.S. (2003) A novel method for analysis of membrane microdomains: vesicular stomatitis virus glycoprotein microdomains change in size during infection, and those outside of budding sites resemble sites of virus budding. *Virology* **310**: 343-358.

Brugger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F.T., and Krausslich, H.G. (2006) The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2641-2646.

Buschow, S.I., Liefhebber, J.M., Wubbolts, R., and Stoorvogel, W. (2005) Exosomes contain ubiquitinated proteins. *Blood Cells Mol Dis* **35**: 398-403.

- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007) Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**: 1908-1912.
- Charbonnier, F., Erauso, G., Barbeyron, T., Prieur, D., and Forterre, P. (1992) Evidence that a plasmid from a hyperthermophilic archaebacterium is relaxed at physiological temperatures. *J Bacteriol* **174**: 6103-6108.
- Chen, B.J., and Lamb, R.A. (2008) Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology* **372**: 221-232.
- Chen, B.J., Leser, G.P., Morita, E., and Lamb, R.A. (2007) Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived virus-like particles. *J Virol* **81**: 7111-7123.
- Cheung, J., Danna, K.J., O'Connor, E.M., Price, L.B., and Shand, R.F. (1997) Isolation, sequence, and expression of the gene encoding halocin H4, a bacteriocin from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei* R4. *J Bacteriol* **179**: 548-551.
- Chiba, S., Ito, K., and Akiyama, Y. (2006) The *Escherichia coli* plasma membrane contains two PHB (prohibitin homology) domain protein complexes of opposite orientations. *Mol Microbiol* **60**: 448-457.
- Choi, D.S., Kim, D.K., Choi, S.J., Lee, J., Choi, J.P., Rho, S. et al. (2011) Proteomic analysis of outer membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Proteomics* **11**: 3424-3429.
- Clayton, A., Turkes, A., Navabi, H., Mason, M.D., and Tabi, Z. (2005) Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* **118**: 3631-3638.
- Combes, V., Simon, A.C., Grau, G.E., Arnoux, D., Camoin, L., Sabatier, F. et al. (1999) In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* **104**: 93-102.
- de Parseval, N., and Heidmann, T. (2005) Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res* **110**: 318-332.
- Deatherage, B.L., Lara, J.C., Bergsbaken, T., Rassoulian Barrett, S.L., Lara, S., and Cookson, B.T. (2009) Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol Microbiol* **72**: 1395-1407.
- Del Conde, I., Shrimpton, C.N., Thiagarajan, P., and Lopez, J.A. (2005) Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**: 1604-1611.
- Dignat-George, F., and Boulanger, C.M. (2011) The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**: 27-33.
- Dignat-George, F., Freyssinet, J.M., and Key, N.S. (2009) Centrifugation is a crucial step impacting microparticle measurement. *Platelets* **20**: 225-226; author reply 227-228.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2012) Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol* **78**: 1-6.
- Doherty, G.J., and McMahon, H.T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* **78**: 857-902.
- Dolo, V., Ginestra, A., Cassara, D., Violini, S., Lucania, G., Torrì, M.R. et al. (1998) Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res* **58**: 4468-4474.
- Dorward, D.W., Garon, C.F., and Judd, R.C. (1989) Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* **171**: 2499-2505.
- Dorward, D.W., Schwan, T.G., and Garon, C.F. (1991) Immune capture and detection of *Borrelia burgdorferi* antigens in urine, blood, or tissues from infected ticks, mice, dogs, and humans. *J Clin Microbiol* **29**: 1162-1170.
- Dubern, J.F., and Diggle, S.P. (2008) Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species. *Mol Biosyst* **4**: 882-888.

Dubey, G.P., and Ben-Yehuda, S. (2011) Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* **144**: 590-600.

Dukers, D.F., Meij, P., Vervoort, M.B., Vos, W., Scheper, R.J., Meijer, C.J. et al. (2000) Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* **165**: 663-670.

Dutta, S., Kolli, B.K., Tang, A., Sassa, S., and Chang, K.P. (2008) Transgenic Leishmania model for delta-aminolevulinic acid-inducible monospecific uroporphyrin: cytolytic phototoxicity initiated by singlet oxygen-mediated inactivation of proteins and its ablation by endosomal mobilization of cytosolic uroporphyrin. *Eukaryot Cell* **7**: 1146-1157.

Ellen, A.F., Zolghadr, B., Driessen, A.M., and Albers, S.V. (2010) Shaping the archaeal cell envelope. *Archaea* **2010**: 608243.

Ellen, A.F., Rohulya, O.V., Fusetti, F., Wagner, M., Albers, S.V., and Driessen, A.J. (2011) The sulfobacin genes of *Sulfolobus acidocaldarius* encode novel antimicrobial proteins. *J Bacteriol* **193**: 4380-4387.

Ellen, A.F., Albers, S.V., Huibers, W., Pitcher, A., Hobel, C.F., Schwarz, H. et al. (2009) Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome sorting complex components. *Extremophiles* **13**: 67-79.

Erauso, G., Prieur, D., Godfroy, A. and Raguénès, G. (1995) Plate cultivation technique for strictly anaerobic, thermophilic, sulfur-metabolizing Archaea. *Archaea : a Laboratory Manual*: 25-29.

Fackler, O.T., and Peterlin, B.M. (2000) Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol* **10**: 1005-1008.

Fang, Y., Wu, N., Gan, X., Yan, W., Morrell, J.C., and Gould, S.J. (2007) Higher-order oligomerization targets plasma membrane proteins and HIV gag to exosomes. *PLoS Biol* **5**: e158.

Feng, D., Zhao, W.L., Ye, Y.Y., Bai, X.C., Liu, R.Q., Chang, L.F. et al. (2010) Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* **11**: 675-687.

Fiocca, R., Necchi, V., Sommi, P., Ricci, V., Telford, J., Cover, T.L., and Solcia, E. (1999) Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. *J Pathol* **188**: 220-226.

Fisher, R.D., Chung, H.Y., Zhai, Q., Robinson, H., Sundquist, W.I., and Hill, C.P. (2007) Structural and biochemical studies of ALIX/AIP1 and its role in retrovirus budding. *Cell* **128**: 841-852.

Forterre, P., and Prangishvili, D. (2009) The origin of viruses. *Res Microbiol* **160**: 466-472.

Fuhrmans, M., and Marrink, S.J. (2012) Molecular view of the role of fusion peptides in promoting positive membrane curvature. *J Am Chem Soc* **134**: 1543-1552.

Fujikane, R., Ishino, S., Ishino, Y., and Forterre, P. (2010) Genetic analysis of DNA repair in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus kodakaraensis*. *Genes Genet Syst* **85**: 243-257.

Gasser, O., Hess, C., Miot, S., Deon, C., Sanchez, J.C., and Schifferli, J.A. (2003) Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res* **285**: 243-257.

Geminard, C., De Gassart, A., Blanc, L., and Vidal, M. (2004) Degradation of AP2 during reticulocyte maturation enhances binding of hsc70 and Alix to a common site on TFR for sorting into exosomes. *Traffic* **5**: 181-193.

Geslin, C., Le Romancer, M., Erauso, G., Gaillard, M., Perrot, G., and Prieur, D. (2003) PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic euryarchaeote, "*Pyrococcus abyssi*". *J Bacteriol* **185**: 3888-3894.

Gogliettino, M., Balestrieri, M., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Natale, L., Rossi, M., and Palmieri, G. (2010) A highly selective oligopeptide binding protein from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* **192**: 3123-3131.

Gould, S.J., Booth, A.M., and Hildreth, J.E. (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10592-10597.

Grange, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M.C. et al. (2011) Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* **71**: 5346-5356.

Gruenberg, J. (2001) The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 721-730.

Gruenberg, J., and Stenmark, H. (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 317-323.

Gyorgy, B., Szabo, T.G., Pasztoi, M., Pal, Z., Misjak, P., Aradi, B. et al. (2011) Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2667-2688.

Hagerstrand, H., Mrowczynska, L., Salzer, U., Prohaska, R., Michelsen, K.A., Kralj-Iglic, V., and Iglic, A. (2006) Curvature-dependent lateral distribution of raft markers in the human erythrocyte membrane. *Mol Membr Biol* **23**: 277-288.

Harding, C., Heuser, J., and Stahl, P. (1983) Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* **97**: 329-339.

Heijnen, H.F., Schiel, A.E., Fijnheer, R., Geuze, H.J., and Sixma, J.J. (1999) Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* **94**: 3791-3799.

Higgins, C.F., and Hardie, M.M. (1983) Periplasmic protein associated with the oligopeptide permeases of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **155**: 1434-1438.

Hoekstra, D., van der Laan, J.W., de Leij, L., and Witholt, B. (1976) Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **455**: 889-899.

Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., and Falk, K.I. (1999) Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* **93**: 3956-3963.

Horstman, A.L., and Kuehn, M.J. (2000) Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* **275**: 12489-12496.

Huotari, J., and Helenius, A. (2011) Endosome maturation. *EMBO J* **30**: 3481-3500.

Hurley, J.H. (2008) ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 4-11.

Hurley, J.H., and Emr, S.D. (2006) The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**: 277-298.

Inaba, T., Tatsu, Y., and Morigaki, K. (2011) Fusion of lipid vesicles with planar lipid bilayers induced by a combination of peptides. *Langmuir* **27**: 12515-12520.

Izquierdo-Useros, N., Puertas, M.C., Borrás, F.E., Blanco, J., and Martínez-Picado, J. (2011) Exosomes and retroviruses: the chicken or the egg? *Cell Microbiol* **13**: 10-17.

Izquierdo-Useros, N., Naranjo-Gomez, M., Archer, J., Hatch, S.C., Erkizia, I., Blanco, J. et al. (2009) Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway. *Blood* **113**: 2732-2741.

Jalasvuori, M., and Bamford, J.K. (2008) Structural co-evolution of viruses and cells in the primordial world. *Orig Life Evol Biosph* **38**: 165-181.

Jarrell, K.F., Jones, G.M., Kandiba, L., Nair, D.B., and Eichler, J. (2010) S-layer glycoproteins and flagellins: reporters of archaeal posttranslational modifications. *Archaea* **2010**.

Junglas, B., Briegel, A., Burghardt, T., Walther, P., Wirth, R., Huber, H., and Rachel, R. (2008) *Ignicoccus hospitalis* and *Nanoarchaeum equitans*: ultrastructure, cell-cell interaction, and 3D reconstruction from serial sections of freeze-substituted cells and by electron cryotomography. *Arch Microbiol* **190**: 395-408.

Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1995) Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J Bacteriol* **177**: 3998-4008.

- Kadurugamuwa, J.L., and Beveridge, T.J. (1996) Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics. *J Bacteriol* **178**: 2767-2774.
- Kahn, M.E., Maul, G., and Goodgal, S.H. (1982) Possible mechanism for donor DNA binding and transport in *Haemophilus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 6370-6374.
- Kahn, M.E., Barany, F., and Smith, H.O. (1983) Transformasomes: specialized membranous structures that protect DNA during *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 6927-6931.
- Kato, S., Kowashi, Y., and Demuth, D.R. (2002) Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microb Pathog* **32**: 1-13.
- Kesimer, M., Scull, M., Brighton, B., DeMaria, G., Burns, K., O'Neal, W. et al. (2009) Characterization of exosome-like vesicles released from human tracheobronchial ciliated epithelium: a possible role in innate defense. *FASEB J* **23**: 1858-1868.
- Kesty, N.C., Mason, K.M., Reedy, M., Miller, S.E., and Kuehn, M.J. (2004) Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. *EMBO J* **23**: 4538-4549.
- Khatua, A.K., Taylor, H.E., Hildreth, J.E., and Popik, W. (2009) Exosomes packaging APOBEC3G confer human immunodeficiency virus resistance to recipient cells. *J Virol* **83**: 512-521.
- Kieffer, C., Skalicky, J.J., Morita, E., De Domenico, I., Ward, D.M., Kaplan, J., and Sundquist, W.I. (2008) Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding. *Dev Cell* **15**: 62-73.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1996) A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J* **15**: 6122-6131.
- Kobayashi, H., Uematsu, K., Hirayama, H., and Horikoshi, K. (2000) Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *J Bacteriol* **182**: 6451-6455.
- Koga, K., Matsumoto, K., Akiyoshi, T., Kubo, M., Yamanaka, N., Tasaki, A. et al. (2005) Purification, characterization and biological significance of tumor-derived exosomes. *Anticancer Res* **25**: 3703-3707.
- Kolling, G.L., and Matthews, K.R. (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1843-1848.
- Krishnamoorthy, L., Bess, J.W., Jr., Preston, A.B., Nagashima, K., and Mahal, L.K. (2009) HIV-1 and microvesicles from T cells share a common glycome, arguing for a common origin. *Nat Chem Biol* **5**: 244-250.
- Kulp, A., and Kuehn, M.J. (2010) Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annu Rev Microbiol* **64**: 163-184.
- Kuwabara, T., Minaba, M., Iwayama, Y., Inouye, I., Nakashima, M., Marumo, K. et al. (2005) *Thermococcus coalescens* sp. nov., a cell-fusing hyperthermophilic archaeon from Suiyo Seamount. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**: 2507-2514.
- Langhorst, M.F., Reuter, A., Jaeger, F.A., Wippich, F.M., Luxenhofer, G., Plattner, H., and Stuermer, C.A. (2008) Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. *Eur J Cell Biol* **87**: 211-226.
- Lavialle, F., Deshayes, S., Gonnet, F., Larquet, E., Kruglik, S.G., Boisset, N. et al. (2009) Nanovesicles released by *Dictyostelium* cells: a potential carrier for drug delivery. *Int J Pharm* **380**: 206-215.
- Lazizzera, B.A. (2001) The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides* **22**: 1519-1527.
- Lee, E.Y., Choi, D.Y., Kim, D.K., Kim, J.W., Park, J.O., Kim, S. et al. (2009) Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: proteomics-based characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. *Proteomics* **9**: 5425-5436.

Lee, M., and Cheung, H.T. (1996) Isolation and characterization of *Caenorhabditis elegans* extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 503-509.

Lee, S., Joshi, A., Nagashima, K., Freed, E.O., and Hurley, J.H. (2007) Structural basis for viral late-domain binding to Alix. *Nat Struct Mol Biol* **14**: 194-199.

Lenassi, M., Cagney, G., Liao, M., Vaupotic, T., Bartholomeeusen, K., Cheng, Y. et al. (2010) HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. *Traffic* **11**: 110-122.

Lepage, E., Marguet, E., Geslin, C., Matte-Tailliez, O., Zillig, W., Forterre, P., and Tailliez, P. (2004) Molecular diversity of new Thermococcales isolates from a single area of hydrothermal deep-sea vents as revealed by randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1277-1286.

Leroyer, A.S., Anfosso, F., Lacroix, R., Sabatier, F., Simoncini, S., Njock, S.M. et al. (2010) Endothelial-derived microparticles: Biological conveyors at the crossroad of inflammation, thrombosis and angiogenesis. *Thromb Haemost* **104**: 456-463.

Lever, A.M. (2000) HIV RNA packaging and lentivirus-based vectors. *Adv Pharmacol* **48**: 1-28.

Lever, A.M. (2007) HIV-1 RNA packaging. *Adv Pharmacol* **55**: 1-32.

Li, Z., Clarke, A.J., and Beveridge, T.J. (1996) A major autolysin of *Pseudomonas aeruginosa*: subcellular distribution, potential role in cell growth and division and secretion in surface membrane vesicles. *J Bacteriol* **178**: 2479-2488.

Li, Z., Clarke, A.J., and Beveridge, T.J. (1998) Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. *J Bacteriol* **180**: 5478-5483.

Little, K.M., Smalley, D.M., Harthun, N.L., and Ley, K. (2010) The plasma microparticle proteome. *Semin Thromb Hemost* **36**: 845-856.

Liu, Y., Shah, S.V., Xiang, X., Wang, J., Deng, Z.B., Liu, C. et al. (2009) COP9-associated CSN5 regulates exosomal protein deubiquitination and sorting. *Am J Pathol* **174**: 1415-1425.

Lonhienne, T.G., Sagulenko, E., Webb, R.I., Lee, K.C., Franke, J., Devos, D.P. et al. (2010) Endocytosis-like protein uptake in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 12883-12888.

Lopez-Garcia, P., and Forterre, P. (1997) DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol Microbiol* **23**: 1267-1279.

Lucas, W.J. (2006) Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**: 169-184.

Luketic, L., Delanghe, J., Sobol, P.T., Yang, P., Frotten, E., Mossman, K.L. et al. (2007) Antigen presentation by exosomes released from peptide-pulsed dendritic cells is not suppressed by the presence of active CTL. *J Immunol* **179**: 5024-5032.

Mack, M., Kleinschmidt, A., Bruhl, H., Klier, C., Nelson, P.J., Cihak, J. et al. (2000) Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med* **6**: 769-775.

Manning, A.J., and Kuehn, M.J. (2011) Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* **11**: 258.

Marsh, M., and van Meer, G. (2008) Cell biology. No ESCRTs for exosomes. *Science* **319**: 1191-1192.

Martin-Serrano, J., Eastman, S.W., Chung, W., and Bieniasz, P.D. (2005) HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* **168**: 89-101.

Mashburn-Warren, L., Howe, J., Garidel, P., Richter, W., Steiniger, F., Roessle, M. et al. (2008) Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol Microbiol* **69**: 491-502.

Mashburn-Warren, L.M., and Whiteley, M. (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol* **61**: 839-846.

Mashburn, L.M., and Whiteley, M. (2005) Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature* **437**: 422-425.

Mathivanan, S., and Simpson, R.J. (2009) ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* **9**: 4997-5000.

Mathivanan, S., Ji, H., and Simpson, R.J. (2010) Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* **73**: 1907-1920.

Mayrand, D., and Grenier, D. (1989) Biological activities of outer membrane vesicles. *Can J Microbiol* **35**: 607-613.

McBroom, A.J., and Kuehn, M.J. (2007) Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol* **63**: 545-558.

McBroom, A.J., Johnson, A.P., Vemulapalli, S., and Kuehn, M.J. (2006) Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J Bacteriol* **188**: 5385-5392.

Meckes, D.G., Jr., and Raab-Traub, N. (2011) Microvesicles and viral infection. *J Virol* **85**: 12844-12854.

Meij, P., Vervoort, M.B., Aarbiou, J., van Dissel, P., Brink, A., Bloemena, E. et al. (1999) Restricted low-level human antibody responses against Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 in a subgroup of patients with EBV-associated diseases. *J Infect Dis* **179**: 1108-1115.

Melcher, U. (2000) The '30K' superfamily of viral movement proteins. *J Gen Virol* **81**: 257-266.

Mirambeau, G., Lonnais, S., Coulaud, D., Hameau, L., Lafosse, S., Jeusset, J. et al. (2006) Transmission electron microscopy reveals an optimal HIV-1 nucleocapsid aggregation with single-stranded nucleic acids and the mature HIV-1 nucleocapsid protein. *J Mol Biol* **364**: 496-511.

Mochizuki, S., and Okada, Y. (2007) ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci* **98**: 621-628.

Monnet, V. (2003) Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2100-2114.

Mori, Y., Koike, M., Moriishi, E., Kawabata, A., Tang, H., Oyaizu, H. et al. (2008) Human herpesvirus-6 induces MVB formation, and virus egress occurs by an exosomal release pathway. *Traffic* **9**: 1728-1742.

Morita, E., and Sundquist, W.I. (2004) Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**: 395-425.

Mouline, C.C., Quincey, D., Laugier, J.P., Carle, G.F., Bouler, J.M., Rochet, N., and Scimeca, J.C. (2010) Osteoclastic differentiation of mouse and human monocytes in a plasma clot/biphasic calcium phosphate microparticles composite. *Eur Cell Mater* **20**: 379-392.

Mrvar-Brecko, A., Sustar, V., Jansa, V., Stukelj, R., Jansa, R., Mujagic, E. et al. (2010) Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells Mol Dis* **44**: 307-312.

Namork, E., and Brandtzaeg, P. (2002) Fatal meningococcal septicaemia with "blebbing" meningococcus. *Lancet* **360**: 1741.

Nather, D.J., and Rachel, R. (2004) The outer membrane of the hyperthermophilic archaeon *Ignicoccus*: dynamics, ultrastructure and composition. *Biochem Soc Trans* **32**: 199-203.

Nguyen, D.G., Booth, A., Gould, S.J., and Hildreth, J.E. (2003) Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**: 52347-52354.

Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y. et al. (2010) Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One* **5**: e13247.

Ono, A., and Freed, E.O. (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13925-13930.

Ott, D.E. (2008) Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol* **18**: 159-175.

Palmieri, G., Casbarra, A., Fiume, I., Catara, G., Capasso, A., Marino, G. et al. (2006) Identification of the first archaeal oligopeptide-binding protein from the hyperthermophile *Aeropyrum pernix*. *Extremophiles* **10**: 393-402.

- Pan, B.T., and Johnstone, R.M. (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**: 967-978.
- Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., and Johnstone, R.M. (1985) Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* **101**: 942-948.
- Pap, E. (2011) The role of microvesicles in malignancies. *Adv Exp Med Biol* **714**: 183-199.
- Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A. et al. (2009) Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* **284**: 34211-34222.
- Pasteur, L. (1877) « Étude sur la maladie charbonneuse ». *Comptes rendus de l'Académie des sciences, séance du 30 avril 1877* **84**: pp. 900-906.
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L. et al. (2010) Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 6328-6333.
- Pelchen-Matthews, A., Raposo, G., and Marsh, M. (2004) Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* **12**: 310-316.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J. et al. (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**: 734-736.
- Piccin, A., Murphy, W.G., and Smith, O.P. (2007) Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* **21**: 157-171.
- Pietila, M.K., Atanasova, N.S., Manole, V., Liljeroos, L., Butcher, S.J., Oksanen, H.M., and Bamford, D.H. (2012) Virion architecture unifies globally distributed pleolipoviruses infecting halophilic archaea. *J Virol*.
- Pilzer, D., Gasser, O., Moskovich, O., Schifferli, J.A., and Fishelson, Z. (2005) Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol* **27**: 375-387.
- Pizzirani, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandona, D., Savaglio, E., and Di Virgilio, F. (2007) Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1beta-loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood* **109**: 3856-3864.
- Platta, H.W., and Stenmark, H. (2011) Endocytosis and signaling. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 393-403.
- Prangishvili, D., Forterre, P., and Garrett, R.A. (2006) Viruses of the Archaea: a unifying view. *Nat Rev Microbiol* **4**: 837-848.
- Prangishvili, D., Holz, I., Stieger, E., Nickell, S., Kristjansson, J.K., and Zillig, W. (2000) Sulfolobins, specific proteinaceous toxins produced by strains of the extremely thermophilic archaeal genus *Sulfolobus*. *J Bacteriol* **182**: 2985-2988.
- Price, L.B., and Shand, R.F. (2000) Halocin S8: a 36-amino-acid microhalocin from the haloarchaeal strain S8a. *J Bacteriol* **182**: 4951-4958.
- Raivio, T.L. (2005) Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* **56**: 1119-1128.
- Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P., and Geuze, H. (2002) Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**: 718-729.
- Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., and Ratajczak, M.Z. (2006) Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* **20**: 847-856.
- Ravot, G., Ollivier, B., Magot, M., Patel, B., Crolet, J., Fardeau, M., and Garcia, J. (1995) Thiosulfate reduction, an important physiological feature shared by members of the order thermotogales. *Appl Environ Microbiol* **61**: 2053-2055.

- Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., and Beveridge, T.J. (2004) DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* **150**: 2161-2169.
- Reynwar, B.J., Illy, G., Harmandaris, V.A., Muller, M.M., Kremer, K., and Deserno, M. (2007) Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions. *Nature* **447**: 461-464.
- Reysenbach, A.L., Liu, Y., Banta, A.B., Beveridge, T.J., Kirshtein, J.D., Schouten, S. et al. (2006) A ubiquitous thermoacidophilic archaeon from deep-sea hydrothermal vents. *Nature* **442**: 444-447.
- Rivera, J., Cordero, R.J., Nakouzi, A.S., Frases, S., Nicola, A., and Casadevall, A. (2010) *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19002-19007.
- Rodrigues, M.L., Nakayasu, E.S., Oliveira, D.L., Nimrichter, L., Nosanchuk, J.D., Almeida, I.C., and Casadevall, A. (2008) Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. *Eukaryot Cell* **7**: 58-67.
- Rozmyslowicz, T., Majka, M., Kijowski, J., Murphy, S.L., Conover, D.O., Poncz, M. et al. (2003) Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS* **17**: 33-42.
- Salzer, U., Zhu, R., Lutten, M., Isobe, H., Pastushenko, V., Perkmann, T. et al. (2008) Vesicles generated during storage of red cells are rich in the lipid raft marker stomatin. *Transfusion* **48**: 451-462.
- Santangelo, T.J., Cubonova, 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.
- Schaar, V., Nordstrom, T., Morgelin, M., and Riesbeck, K. (2011) *Moraxella catarrhalis* outer membrane vesicles carry beta-lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 3845-3853.
- Schmitt, A.P., and Lamb, R.A. (2004) Escaping from the cell: assembly and budding of negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**: 145-196.
- Schouten, S., Hopmans, E.C., Baas, M., Boumann, H., Standfest, S., Konneke, M. et al. (2008) Intact membrane lipids of "*Candidatus Nitrosopumilus maritimus*," a cultivated representative of the cosmopolitan mesophilic group I Crenarchaeota. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2433-2440.
- Scita, G., and Di Fiore, P.P. (2010) The endocytic matrix. *Nature* **463**: 464-473.
- Shaw, K.L., Lindemann, D., Mulligan, M.J., and Goepfert, P.A. (2003) Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J Virol* **77**: 2338-2348.
- Shetty, A., Chen, S., Tocheva, E.I., Jensen, G.J., and Hickey, W.J. (2011) Nanopods: a new bacterial structure and mechanism for deployment of outer membrane vesicles. *PLoS One* **6**: e20725.
- Silverman, J.M., and Reiner, N.E. (2011) Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. *Cell Microbiol* **13**: 1-9.
- Silverman, J.M., Clos, J., de'Oliveira, C.C., Shirvani, O., Fang, Y., Wang, C. et al. (2010) An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages. *J Cell Sci* **123**: 842-852.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M. et al. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* **10**: 1470-1476.
- Soler, N., Marguet, E., Verbavatz, J.M., and Forterre, P. (2008) Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales. *Res Microbiol* **159**: 390-399.
- Soler, N., Gaudin, M., Marguet, E., and Forterre, P. (2011) Plasmids, viruses and virus-like membrane vesicles from Thermococcales. *Biochem Soc Trans* **39**: 36-44.

Soler, N., Justome, A., Quevillon-Cheruel, S., Lorieux, F., Le Cam, E., Marguet, E., and Forterre, P. (2007) The rolling-circle plasmid pTN1 from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus nautilus*. *Mol Microbiol* **66**: 357-370.

Soler, N., Marguet, E., Cortez, D., Desnoues, N., Keller, J., van Tilbeurgh, H. et al. (2010) Two novel families of plasmids from hyperthermophilic archaea encoding new families of replication proteins. *Nucleic Acids Res* **38**: 5088-5104.

Sonntag, I., Schwarz, H., Hirota, Y., and Henning, U. (1978) Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol* **136**: 280-285.

Stingl, K., Schauer, K., Ecobichon, C., Labigne, A., Lenormand, P., Rousselle, J.C. et al. (2008) In vivo interactome of *Helicobacter pylori* urease revealed by tandem affinity purification. *Mol Cell Proteomics* **7**: 2429-2441.

Subra, C., Laulagnier, K., Perret, B., and Record, M. (2007) Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie* **89**: 205-212.

Suzuki, H., Nishimura, Y., Yasuda, S., Nishimura, A., Yamada, M., and Hirota, Y. (1978) Murein-lipoprotein of *Escherichia coli*: a protein involved in the stabilization of bacterial cell envelope. *Mol Gen Genet* **167**: 1-9.

Szotowski, B., Antoniuk, S., Goldin-Lang, P., Tran, Q.V., Pels, K., Rosenthal, P. et al. (2007) Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res* **73**: 806-812.

Tashiro, Y., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2011a) Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol*.

Tashiro, Y., Ichikawa, S., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2010a) *Pseudomonas* quinolone signal affects membrane vesicle production in not only gram-negative but also gram-positive bacteria. *Microbes Environ* **25**: 120-125.

Tashiro, Y., Sakai, R., Toyofuku, M., Sawada, I., Nakajima-Kambe, T., Uchiyama, H., and Nomura, N. (2009) Outer membrane machinery and alginate synthesis regulators control membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **191**: 7509-7519.

Tashiro, Y., Ichikawa, S., Shimizu, M., Toyofuku, M., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T. et al. (2010b) Variation of physicochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3732-3739.

Tashiro, Y., Inagaki, A., Shimizu, M., Ichikawa, S., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T. et al. (2011b) Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 605-607.

Tashiro, Y., Nomura, N., Nakao, R., Senpuku, H., Kariyama, R., Kumon, H. et al. (2008) Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**: 3969-3978.

Thery, C., Zitvogel, L., and Amigorena, S. (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* **2**: 569-579.

Thery, C., Ostrowski, M., and Segura, E. (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**: 581-593.

Thery, C., Amigorena, S., Raposo, G., and Clayton, A. (2006) Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **Chapter 3**: Unit 3 22.

Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., and Amigorena, S. (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* **166**: 7309-7318.

Thomas, R., Grimsley, N., Escande, M.L., Subirana, L., Derelle, E., and Moreau, H. (2011) Acquisition and maintenance of resistance to viruses in eukaryotic phytoplankton populations. *Environ Microbiol* **13**: 1412-1420.

Thompson, S.S., Naidu, Y.M., and Pestka, J.J. (1985) Ultrastructural localization of an extracellular protease in *Pseudomonas fragi* by using the peroxidase-antiperoxidase reaction. *Appl Environ Microbiol* **50**: 1038-1042.

Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z., and Xiao, Z. (2010) Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem* **111**: 488-496.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F. et al. (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**: 1244-1247.

Trams, E.G., Lauter, C.J., Salem, N., Jr., and Heine, U. (1981) Exfoliation of membrane ectoenzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* **645**: 63-70.

Trocoli Torrecilhas, A.C., Tonelli, R.R., Pavanelli, W.R., da Silva, J.S., Schumacher, R.I., de Souza, W. et al. (2009) *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes Infect* **11**: 29-39.

Utsugi-Kobukai, S., Fujimaki, H., Hotta, C., Nakazawa, M., and Minami, M. (2003) MHC class I-mediated exogenous antigen presentation by exosomes secreted from immature and mature bone marrow derived dendritic cells. *Immunol Lett* **89**: 125-131.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**: 654-659.

Vasilyeva, N.V., Tsfasman, I.M., Suzina, N.E., Stepnaya, O.A., and Kulaev, I.S. (2008) Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles. *FEBS J* **275**: 3827-3835.

Wai, S.N., Lindmark, B., Soderblom, T., Takade, A., Westermark, M., Oscarsson, J. et al. (2003) Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. *Cell* **115**: 25-35.

Walker, J.D., Maier, C.L., and Pober, J.S. (2009) Cytomegalovirus-infected human endothelial cells can stimulate allogeneic CD4+ memory T cells by releasing antigenic exosomes. *J Immunol* **182**: 1548-1559.

Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985) An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**: 831-840.

Wang, J.M., Wang, Y., Huang, J.Y., Yang, Z., Chen, L., Wang, L.C. et al. (2007) C-Reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH4-dependent NO formation. *J Vasc Res* **44**: 241-248.

Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C., and Mattick, J.S. (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.

Wilen, C.B., Tilton, J.C., and Doms, R.W. (2012) Molecular Mechanisms of HIV Entry. *Adv Exp Med Biol* **726**: 223-242.

Williams, G.D., and Holt, S.C. (1985) Characteristics of the outer membrane of selected oral *Bacteroides* species. *Can J Microbiol* **31**: 238-250.

Williams, R.L., and Urbe, S. (2007) The emerging shape of the ESCRT machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 355-368.

Wolf, P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **13**: 269-288.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C. et al. (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* **7**: 297-303.

Wubbolts, R., Leckie, R.S., Veenhuizen, P.T., Schwarzmann, G., Mobius, W., Hoernschemeyer, J. et al. (2003) Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* **278**: 10963-10972.

- Wysoczynski, M., and Ratajczak, M.Z. (2009) Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer* **125**: 1595-1603.
- Yaron, S., Kolling, G.L., Simon, L., and Matthews, K.R. (2000) Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4414-4420.
- Yokoyama, H., Fujii, S., and Matsui, I. (2008) Crystal structure of a core domain of stomatin from *Pyrococcus horikoshii* illustrates a novel trimeric and coiled-coil fold. *J Mol Biol* **376**: 868-878.
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K. et al. (2009) Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC Microbiol* **9**: 197.
- Zhang, F., Sun, S., Feng, D., Zhao, W.L., and Sui, S.F. (2009) A novel strategy for the invasive toxin: hijacking exosome-mediated intercellular trafficking. *Traffic* **10**: 411-424.
- Zhou, L., Srisatjaluk, R., Justus, D.E., and Doyle, R.J. (1998) On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 223-228.
- Zhou, X., and Platt, J.L. (2011) Molecular and cellular mechanisms of mammalian cell fusion. *Adv Exp Med Biol* **713**: 33-64.
- Zomer, A., Vendrig, T., Hopmans, E.S., van Eijndhoven, M., Middeldorp, J.M., and Pegtel, D.M. (2010) Exosomes: Fit to deliver small RNA. *Commun Integr Biol* **3**: 447-450.

RESUME

La sécrétion de vésicules membranaires (VMs) constitue un processus physiologique important qui a été particulièrement étudié chez les Bactéries et les Eucaryotes. La récente découverte de la production de VMs chez les Archées souligne cependant que ce phénomène est universel et suggère que le dernier ancêtre commun aux trois domaines, LUCA (Last Universal Common Ancestor), produisait certainement des VMs. Les VMs des Archées n'ayant pour le moment été étudiées que chez certaines Crénarchées (ex : *G/ Sulfolobus*), nous avons entrepris de caractériser les VMs produites par un groupe d'Euryarchées hyperthermophiles anaérobies, les Thermococcales.

Dans la première partie de cette étude, nous avons examiné le mécanisme de production ainsi que la composition en lipides et en protéines des VMs de trois espèces de Thermococcales: *Thermococcus kodakaraensis*, *Thermococcus gammatolerans* et *Thermococcus* sp. 5-4. Nous avons observé que les VMs sont sécrétées par un processus de bourgeonnement à partir de l'enveloppe cellulaire similaire à la formation des ectosomes par les cellules eucaryotes. De plus, les VMs sont fréquemment libérées en groupes, formant de grosses protubérances ou des filaments ressemblant aux nanopodes récemment décrits chez les Bactéries. Des différences de structure et de composition protéique sont observées entre les VMs des trois souches étudiées. Cependant, les VMs et les membranes cellulaires d'une même souche ont des compositions protéique et lipidique très proches, confirmant que les VMs sont produites à partir des membranes des cellules. Les VMs et les membranes cellulaires des trois souches comportent notamment un récepteur de peptides de la famille OppA (Oligopeptide-binding protein A) et des homologues de cette protéine ont été identifiés dans les VMs de certaines souches de *Sulfolobus*.

Les VMs sécrétées par les Thermococcales sont associées à de l'ADN et cette association les protège contre la thermodégradation. Nous montrons dans notre étude que les cellules de *T. kodakaraensis* transformées avec le plasmide navette pLC70 relâchent des VMs comportant ce plasmide. De façon intéressante, ces VMs peuvent être utilisées pour transférer pLC70 à des cellules dénuées de plasmides, suggérant que les VMs pourraient être impliquées dans le transfert d'ADN entre cellules à haute température.

Dans la seconde partie de cette étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la souche *Thermococcus nautilus*, une Thermococcale produisant des VMs associées de manière sélective à deux plasmides contenus dans la cellule. L'un d'eux correspond notamment à un génome viral défectueux de la lignée d'adenovirus PRD1. Ceci indique que les VMs peuvent être un moyen de transport pour des génomes viraux et suggère que la production de VMs par des cellules ancestrales pourraient avoir joué un rôle dans l'apparition des virus.

En plus d'être impliquées dans le transport de plasmides/virus, les VMs produites par *T. nautilus* exercent un effet toxique sur certaines souches de Thermococcales, probablement dû au convoyage de toxines. Même si ces « thermococcines » nécessitent d'être caractérisées, il s'agit de la première mise en évidence d'une activité toxique liée aux VMs chez les Thermococcales.

Mots-clés : vésicules membranaires, ectosome, OppA, Thermococcales, Archées, transfert de gènes, hyperthermophiles, virus, plasmides, toxines

SUMMARY

Secretion of membrane vesicles (MVs) is an important physiological process that has been extensively studied in Bacteria and Eukarya. The recent discovery that Archaea produce MVs shows that this process is universal and suggests that the Last Universal Common Ancestor, LUCA, certainly produced MVs. As these archaeal MVs have been only studied in some Crenarchaeota (ex: *G/ Sulfolobus*), we started characterizing MVs produced by Thermococcales, a group of hyperthermophilic anaerobic Euryarchaeota.

In the first part of this study we examined the mechanism of production as well as the protein and lipid composition of MVs produced by three strains of Thermococcales: *Thermococcus kodakaraensis*, *Thermococcus gammatolerans* and *Thermococcus* sp. 5-4. We observed that MVs are released by a budding process from the cell envelope that is similar to ectosome formation in eukaryotic cells. Moreover, clusters of MVs often form filamentous structures and protuberances on cell surfaces, resembling recently described bacterial nanopods. Differences in structure are observable between MVs of the three species, as well as in their protein composition. However, MVs and cell membranes from the same species have a quite similar protein and lipid composition, confirming that MVs are produced from cell membranes. A major protein present in cell membranes and MVs from the three strains is the oligopeptide-binding proteins (OppA), which has homologues in MVs from *Sulfolobus* species.

Thermococcales MVs harbor DNA and protect this DNA against thermodegradation. Here, we show that *T. kodakaraensis* cells transformed with the shuttle plasmid pLC70 release MVs harboring this plasmid. Interestingly, these MVs can be used to transfer pLC70 into plasmid-free cells, suggesting that MVs could be involved in DNA transfer between cells at high temperature.

In the second part of this study, we were specially interested in the strain *Thermococcus nautilus*, a Thermococcale that produces MVs selectively enriched in two plasmids from the cell. Notably, one of them corresponds to the genome of a defective virus from PRD1-adenovirus lineage. This indicates that MVs can be used as vehicles for the transport of viral genomes and suggests that production of MVs by ancestral cells could have played a role in the origin of viruses.

In addition to be involved in transport of plasmids/viruses, MVs from *T. nautilus* display a toxic effect on some strains of Thermococcales, maybe due to the delivery of toxins. Even if these “thermococcins” remain to be characterized, this is the first time that a toxic activity associated with MVs has been shown in Thermococcales.

Key-words: membrane vesicles, ectosome, OppA, Thermococcales, Archaea, genes transfer, hyperthermophiles, virus, plasmids, toxins