



**HAL**  
open science

# Exploration des communautés virales thermophiles dans les écosystèmes chauds des terres australes et antarctiques françaises

Kaarle Joonas Parikka

► **To cite this version:**

Kaarle Joonas Parikka. Exploration des communautés virales thermophiles dans les écosystèmes chauds des terres australes et antarctiques françaises. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2013. Français. NNT : 2013BRES0066 . tel-01629201

**HAL Id: tel-01629201**

**<https://theses.hal.science/tel-01629201>**

Submitted on 6 Nov 2017

**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.

# UBO

université de bretagne  
occidentale



THÈSE / UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne*

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE

*Mention : Microbiologie*

École Doctorale des Sciences de la Mer

présentée par

**Kaarle Joonas Parikka**

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

## Exploration des communautés virales thermophiles dans les écosystèmes chauds des Terres australes et antarctiques françaises

**Thèse soutenue le 28 mars 2013**

devant le jury composé de :

**Hélène Montanié (Rapporteur)**

Maître de Conférences, HDR, Université de La Rochelle

**Michael DuBow (Rapporteur)**

Professeur, Université Paris-Sud 11

**Stéphane Jacquet (Examinateur)**

Directeur de Recherche, INRA, UMR CARRTEL

**Thierry Bouvier (Examinateur)**

Chargé de Recherche CNRS, Université de Montpellier 2

**Christine Paillard (Examinateur)**

Directrice de Recherche CNRS, Université de Bretagne Occidentale

**Marc Le Romancer (Directeur de thèse)**

Maître de Conférences, HDR, Université de Bretagne Occidentale









# Remerciements

*Cette thèse a été financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.*

*Je voudrais remercier l'ancienne et la nouvelle direction du LMZE : Daniel Prieur, Anne Godfroy et Mohamed Jebbar (qui m'a lancé dans la génomique), de m'avoir accueilli au sein du laboratoire afin de pouvoir effectuer ce travail. Merci Daniel Prieur également d'avoir été mon directeur de thèse la première année de ma thèse.*

*J'aimerais exprimer ma gratitude à Marc Le Romancer, qui m'a recruté du Plat Pays pour venir travailler sur un sujet de thèse très exotique, qui m'a permis de découvrir la virologie extrêmophile. Je lui suis reconnaissant également pour m'avoir pris avec lui à 13 000 km de Brest pour échantillonner aux Terres australes et antarctiques françaises, la terre des « oubliés ». A ce titre, je tiens à remercier également l'Institut Paul Emile Victor qui a organisé cette expédition.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux rapporteurs, Mikael DuBow et Hélène Montanié ainsi qu'aux examinateurs, Stéphan Jacquet, Thierry Bouvier et Christine Paillard pour avoir bien voulu accepter de juger ce travail.*

*Je voudrais remercier nos collaborateurs : Stéphan Jacquet de l'Equipe BioFEEL de la Station d'Hydrobiologie Lacustre, à Thonon, pour les analyses en cytométrie en flux ; Gunnar Bratbak, Mikal Heldal et Jessica Ray du Laboratoire de Microbiologie Marine à l'Université de Bergen en Norvège pour m'avoir accueilli pour un séjour pour me familiariser aux techniques de dénombrement microbienne et virale en cytométrie en flux, en microscopie à épifluorescence et en microscopie électronique à transmission ; Télésphore Sime-Ngando et Jonathan Colombet pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire, le Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement à Clermont-Ferrand, pour faire des analyses préliminaire en cytométrie en flux et en microscopie électronique à transmission. Je remercie également CAREX de m'avoir accordé une bourse qui m'a permis de réaliser la visite chez Gunnar Bratbak en Norvège.*

*Merci au comité de thèse, composé de Christine Paillard et Dario Moraga, pour avoir partagé leurs opinions sur mes travaux.*

*Je remercie également Patrick Le Chevalier et Christine David qui ont permis l'échantillonnage (et autre...) à Saint Paul.*

*Je tiens à remercier l'Ecole Doctorale des Sciences de la Mer : Fred Jean et Elisabeth Bondu pour leur soutien et leur aide.*

*J'exprime ma reconnaissance également au Plateforme d'Imagerie et de Mesure en Microscopie géré par Gérard Siquin et Philippe Eliès.*

*Je désirerais remercier Jean-Louis Birrien pour son aide (en bon humour) au début de ma thèse. Merci également pour ta participation au programme HOTVIR.*

*Je remercie également la Bibliothèque La Pérouse pour ses efforts dans la requête des articles cités dans cette thèse.*

*Merci également à Sandy (l'ouragan), Thierry et Manu du service informatique.*

*Un grand merci à toute l'équipe du LM2E qui m'a permis, sur un terme journalier, de travailler dans des conditions correctes et détendus : les chercheurs Karine Alain (qui, toujours disponible tout de suite, a accepté d'amener ses correction à la description de souche), Frédérique Duthoit (toujours avec un sourire), Claire Geslin (merci pour les discussions virales stimulantes), Odile « Didi » Trambouze Van (merci pour ta préoccupation presque parentale) et Gwenaëlle Le Blay (toujours disponible). Merci Stéphanie « la meilleure secrétaire » Renard ; L'équipe « ITA » Stéphane « Zcandalle » L'Haridon, Nadège « Okk » Quintin, Mikael « Mike » Beauverger, Morgane « miaou » Chalopin, Wafae « les chaussures » Roussel, Annaïck « Nanik » Barbou, Marianne « blonde » Guégan, Claire « ha ! » Hémon.*

*Merci aussi à toute l'équipe Ifremer dans son intégralité.*

*Je n'aurais certainement pas travaillé aussi bien sans l'ambiance créée par les Thésard : merci à Pauline Vannier (qui m'a accepté, presque sans préjugés ;-), et avec qui j'ai bien rigolé trois ans), à Maria Ciobanu (Mc Deep Sea, tu m'as apporté beaucoup dans tes conseils scientifiques et personnels), Aurore Gorlas (toujours disponible pour m'aider dans la virologie et pour ses fous rires), Julien « viroboy » Lossouarn (merci Bobby pour les nombreuses discussions de tout domaines, que je ne détaillerai pas, qui ont forger une partie de mes idées), Grégoire « Chimichanga » Michoud (ton cynisme humoristique m'a permis de découvrir un casier d'humour que je ne connaissais pas), Frédéric Gaboyer (qui n'est pas de l'école d'ingé'. Enfin un confrère écolo, que la révolution continue), Matthieu Landreau (les jeux de mots sont un signe d'intelligence, peu importe ce que disent les autres). Merci aussi aux post docs : Yann Reynaud, Audrey Gramain et Axel Thiel et aux stagiaires : Céline, François « Bra », Jordan « mofob », Sarah « Ben... », Méline, Samuel, Coraline, Delphine et Julie, ma stagiaire de M1. Merci surtout à mes deux autres stagiaires Julien « apprenti viroboy » Farasin et Simon « Jolicoeur ».*

*Je tiens à remercier les « Lemariens » : JP (merci mec pour tout, on aurait pu démonter et remonter tout Plouzané si on avait voulu. Mais la Journée Marcel était déjà un bon début), Bichon (Tu contestes ? Prépare ton testament pitchoune), Séb « c'est dégeu ce que tu racontes », Cédric « tout à fait » (merci à vous deux également pour l'azote liquide fourni quand j'en avais le plus besoin), Mélanie « check gangnam », Camille « Kamillll », Adeline, Morgana, Maloche « check musicale », Tony « Le tigre », Romain (confrère blond), Boulaïs, Lama Lama et Violette. Merci aussi à Marco « guacamole » et Nolwenn. Mon respect aussi à 1-K, peu importe soient leurs identités.*

*Je désirerais remercier particulièrement ma famille qui m'a soutenu tout au long de mon parcours scientifique, cette thèse incluse. Sans leur soutien, la fin de la thèse ne se serait pas passé de la même manière. Un grand merci.*

*Je boucle ces remerciements avec ceux adressés à Nina. Merci pour ton soutien et ta patience pendant ces trois années, ainsi que pour les coups de mains scientifiques qui viennent compléter le soutien moral.*

*Post scriptum : si j'ai oublié d'exprimer ma gratitude à quelqu'un, ce n'était pas de mon intention. Je suis reconnaissant de toute aide qui m'a été adressée pendant ces trois années.*



# Table des matières

Préambule : .....	1
Introduction : .....	3
1. Définitions et vocabulaire .....	3
1.1. Terminologie moderne associée aux virus de procaryotes.....	4
2. La découverte des phages.....	9
3. La classification des virus .....	9
3.1. La classification des virus de procaryotes .....	11
3.2. La nomenclature des virus des procaryotes.....	15
4. Les cycles viraux .....	16
5. La génomique des virus des procaryotes.....	19
5.1. La génomique des bactériophages.....	19
5.2. Le mosaïsisme des génomes viraux.....	21
5.3. La génomique des virus d'archées .....	22
6. L'évolution des virus – comparaison structurale.....	23
7. L'origine des virus .....	27
8. Les méthodes de détection et de dénombrement des virus de procaryotes.....	28
8.1. Les méthodes indirectes .....	29
8.2. Les méthodes directes .....	32
8.2.1. La microscopie électronique à transmission .....	32
8.2.2. La microscopie à épifluorescence .....	36
8.2.3. La cytométrie en flux.....	39
8.3. Les méthodes moléculaires de détection virale .....	41
9. L'abondance virale dans les milieux aquatiques .....	47
10. Les interactions hôtes-virus dans les milieux aquatiques.....	50
10.1. La virulence et ses implications .....	50
10.2. Les enjeux de la lysogénie .....	52
10.3. Les enjeux de lapseudolysogénie.....	55
11. Les virus dans les milieux à haute température .....	57
11.1. L'abondance dans les sources hydrothermales terrestres et marines .....	57
11.2. La diversité morphologique des virus thermophiles.....	62

12.	Les communautés microbiennes des sources hydrothermales.....	64
12.1.	Les <i>Thermococcales</i> , les <i>Thermotogales</i> et leurs virus.....	64
12.1.1.	Les <i>Thermotogales</i> .....	64
12.1.2.	Les <i>Thermococcales</i> .....	65
12.2.	La niche écologique et la classification des <i>Geobacillus</i> .....	68
12.2.1.	Les virus des <i>Geobacillus</i> .....	71
13.	Introduction aux travaux de thèse.....	73
13.1.	Les Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF).....	74
13.2.	Le projet HOTVIR.....	79
13.2.1.	Les travaux menés sous le programme Hotvir.....	80
13.3.	L'organisation de la thèse.....	86
	Matériel et méthodes : .....	91
1.	L'échantillonnage lors des campagnes.....	91
1.1.	Les campagnes précédentes.....	92
1.1.1.	La préparation des cryotubes pour l'étude de l'abondance microbienne et virale .	92
1.1.2.	La préparation des échantillons pour la réalisation de cultures d'enrichissements.	93
1.2.	La campagne 2011 :.....	93
1.2.1.	La préparation des cryotubes pour l'étude de l'abondance microbienne et virale ..	93
1.2.2.	Les précipitations virales <i>in situ</i> .....	94
2.	Les méthodes culturales.....	94
2.1.	L'anaérobiose.....	94
2.1.1.	Les milieux.....	94
2.1.2.	La culture liquide et solide en anaérobiose.....	95
2.2.	L'aérobiose.....	98
2.2.1.	Milieux.....	98
2.2.2.	La culture liquide et solide en aérobiose.....	98
3.	L'étude de l'abondance microbienne et virale dans les échantillons bruts.....	101
3.1.	Le dénombrement microbien et viral par microscopie à épifluorescence.....	101
3.2.	Le dénombrement microbien et viral par cytométrie en flux.....	103
3.3.	La comparaison des méthodes de dénombrement.....	105
3.4.	Le dénombrement et les observations virales par microscopie électronique à transmission.....	105
4.	La diversité des VLP dans les isolats procaryotiques.....	108
4.1.	Le criblage des souches procaryotiques pour la présence de virus.....	108

5.	La description d'un système hôte-virus.....	110
5.1.	Les cultures virales et les tests d'induction .....	110
5.1.1.	La culture de la souche SP <sub>4</sub> SD de <i>Geobacillus thermoleovorans</i> et de son phage GTV1.....	110
5.1.2.	La culture de la souche MC6 de <i>Thermosipho africanus</i> et de sa VLP .....	111
5.2.	Purification et concentration du virus de <i>Geobacillus thermoleovorans</i> et des VLP de <i>Thermosipho africanus</i> .....	112
5.2.1.	La concentration par ajout de PEG 6000.....	113
5.2.2.	La concentration par ajout de FeCl <sub>3</sub> .....	114
5.2.3.	La purification par utilisation de chlorure de césium.....	115
5.2.4.	La purification par l'utilisation d'iodixanol .....	116
5.2.5.	La purification par l'utilisation d'une solution de sucrose .....	116
5.3.	Les cinétiques de croissance de la souche SP <sub>4</sub> SD avec et sans induction.....	117
5.3.1.	L'induction par ajout de la mitomycine C.....	117
5.3.2.	L'induction par anoxie .....	118
5.3.3.	L'induction par choc osmotique - NaCl .....	118
5.3.4.	Le dénombrement bactérien et viral des cultures induites.....	118
6.	L'analyses des acides nucléiques.....	119
6.1.	Les solutions utilisées : .....	119
6.2.	L'extraction de l'ADN total des bactéries .....	120
6.3.	Extraction ADN circulaire fermé de manière covalente (ou ADNccc).....	120
6.4.	L'extraction de l'ADN viral.....	121
6.5.	Les digestions enzymatiques de l'ADNccc et de l'ADN viral.....	122
6.6.	L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR .....	122
6.7.	Préparation de gel d'agarose et électrophorèse .....	124
7.	L'analyse du génome du virus GTV1.....	124
	Résultats et Discussion : .....	127
1.	L'abondance des Microorganismes.....	127
1.1.	Les analyses préliminaires d'abondance microbienne et virale.....	127
1.1.1.	Les analyses préliminaires par microscopie à épifluorescence .....	127
1.1.2.	Les analyses préliminaires par cytométrie en flux.....	129
1.2.	Les analyses sur les échantillons de la campagne 2011 .....	130
1.2.1.	Cas des sources côtières de Saint Paul.....	131
1.2.2.	Autres sources de Saint Paul.....	138

1.2.3.	Cas des sources chaudes terrestres de Val Travers - Kerguelen.....	140
1.3.	Comparaison des deux méthodes de dénombrement : Microscopie à épifluorescence et cytométrie en flux.....	143
2.	La diversité des Microorganismes .....	147
2.1.	La diversité des VLP dans les échantillons bruts .....	147
2.2.	La diversité des VLP dans les cultures d'enrichissement d'isolats bactériens et archéens thermophiles .....	152
2.3.	La diversité des VLP dans les isolats anaérobies.....	168
2.3.1.	Le criblage des souches de <i>Thermococcales</i> .....	168
2.3.2.	L'étude des VLP de <i>Thermosiphon africanus</i> .....	170
2.4.	Criblage des souches aérobies pour la présence de VLP .....	186
2.4.1.	Description de la souche OLG <sub>2</sub> <sup>T</sup> .....	186
2.4.2.	La découverte de bactériovirus dans les isolats de <i>Geobacillus</i> .....	187
3.	La description du système hôte-virus SP <sub>4</sub> SD .....	189
3.1.	La relation de GTV <sub>1</sub> et de son hôte SP <sub>4</sub> SD .....	193
3.1.1.	La cinétique de croissance de l'hôte avec et sans induction par ajout de mitomycine C.....	195
3.1.2.	La cinétique de croissance de l'hôte avec et sans induction par la mise en condition d'anaérobiose .....	198
3.1.3.	La cinétique de croissance de l'hôte avec et sans induction par ajout de NaCl .....	200
3.2.	La génomique .....	204
	Conclusion et perspectives : .....	211
	Références Bibliographiques .....	225
	Annexe .....	249

# Liste des Figures et des Tableaux

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Schéma représentant la production de a) GTA et b) phages effectuant de la transduction.....	7
<b>Figure 2.</b> Représentation schématique de cinq membres d'une classe polythétique caractérisés par cinq propriétés .....	10
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique des morphologies des virions des virus de procaryotes.....	14
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique des cycles viraux.....	18
<b>Figure 5.</b> Représentation des tailles de génome de phages.....	20
<b>Figure 6.</b> Représentation des lignées virales selon la comparaison structurale des capsides.....	25
<b>Figure 7.</b> Représentation des lignées polyphylétiques virales et monophylétique cellulaire.....	25
<b>Figure 8.</b> Représentation des lignées virales selon la comparaison structurale des capsides.....	26
<b>Figure 9.</b> Représentation de la biomasse et de l'abondance relative des microorganismes et des virus.....	29
<b>Figure 10.</b> Photo de microscope électronique, prise à un grossissement de 14 000 x d'une cellule d' <i>Escherichia coli</i> entourée de particules virales.....	32
<b>Figure 11.</b> Photo de microscope électronique de particules virales T2.....	33
<b>Figure 12.</b> Représentation schématique des principales étapes du protocole suivi pour collecter les particules virales sur grille MET.....	34
<b>Figure 13.</b> Visualisation des virus et des bactéries, colorés à l'acétate d'uranyle provenant d'un échantillon d'eau brut de la Mer Adriatique.....	35
<b>Figure 14.</b> Photos prises en microscopie à épifluorescence avec différents fluorochromes.....	37
<b>Figure 15.</b> Représentation schématique du modèle en « banque » proposé par Breitbart et Rohwer.....	45
<b>Figure 16.</b> Représentation schématique de la relation entre les métagénomes, les modules de phages, les opérons et les éléments génétiques mobiles.....	46
<b>Figure 17.</b> Représentation schématique du rôle des virus dans les cycles biochimiques et dans la catalyse, par lyse virale, du transfert des nutriments dans un « pool » de matière organique dissoute (MOD) et particulaire (MOP).....	51
<b>Figure 18.</b> Représentation schématique des morphotypes de virus de procaryote thermophile.....	63
<b>Figure 19.</b> Image prise en MET d'une cellule de <i>Thermotoga elfii</i> .....	65

<b>Figure 20.</b> Image prise en MET d'une cellule de <i>Thermococcus alcaliphilus</i> .....	<b>65</b>
<b>Figure 21.</b> Photos de MET représentant les « virus-like vesicles » observées par Soler et collaborateurs.....	<b>67</b>
<b>Figure 22.</b> Représentation schématique de la géolocalisation des Terres australes et antarctiques françaises. .....	<b>75</b>
<b>Figure 23.</b> Carte topographique des Îles Kerguelen.....	<b>76</b>
<b>Figure 24.</b> Des manifestations hydrothermales à Rallier du Baty.....	<b>76</b>
<b>Figure 25.</b> Source Val Travers n°1.....	<b>77</b>
<b>Figure 26.</b> Carte topographique de l'île Saint Paul.....	<b>78</b>
<b>Figure 27.</b> Photo prise depuis la gorfoutière, au nord de l'île Saint Paul.....	<b>78</b>
<b>Figure 28.</b> Arbre phylogénétique représentant les groupes (clusters) de séquences d'archées (hyper)thermophiles présentes dans les sources hydrothermales terrestres (eaux, vapeurs et fumerolles) de Rallier du Baty (RB21, RB rivière et RB46).....	<b>84</b>
<b>Figure 29.</b> Deux photos prises en ME sur des échantillons de la source VT <sub>3</sub> de Val Travers.....	<b>128</b>
<b>Figure 30.</b> Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviation standard, dans les échantillons du transect fait à la source SP1.....	<b>133</b>
<b>Figure 31.</b> Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviation standard, dans les échantillons du transect fait à la source SP2.....	<b>135</b>
<b>Figure 32.</b> Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviation standard, dans les sources SP2 bis, SP09, SP12 et SP13.....	<b>139</b>
<b>Figure 33.</b> Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviations standard, dans les sources VT <sub>1</sub> (61°C), VT <sub>2</sub> (61°C) et VT <sub>3</sub> (60°C).....	<b>141 et 142</b>
<b>Figure 34.</b> Comparaison de l'abondance microbienne (A) et virale (B) dénombrée en utilisant la méthodologie de microscopie à épifluorescence et de cytométrie en flux.....	<b>144</b>
<b>Figure 35.</b> Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après une coloration négative) dans les échantillons Plage du Feu Joie (a - d) et SP1 (e-h).....	<b>148</b>
<b>Figure 36.</b> Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) dans les échantillons de sédiments du Lac Pavin.....	<b>150</b>
<b>Figure 37.</b> Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) sur le surnageant des cultures d'enrichissements faites avec SP1 sur milieu Ravot à 70°C (a - d), avec SP3 sur milieu Ravot à 70°C (e) et 80°C (f - h) et avec SP09 sur milieu Ravot à 70°C (i).....	<b>153</b>
<b>Figure 38.</b> Photos de « virus-like vesicles », colorées négativement, observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission dans les surnageants des souches de <i>Thermococcales</i> .....	<b>152</b>

<b>Figure 39.</b> Des virus de morphotype vésiculaire et la production de vésicules de bactéries thermophiles visualisées en microscopie électronique à transmission (coloration négative).....	<b>156</b>
<b>Figure 40.</b> Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) dans la culture d'enrichissement PFJ2, sur milieu Niederberger à 70°C (a - d).....	<b>157</b>
<b>Figure 41.</b> Photos de morbillivirus prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative).....	<b>158</b>
<b>Figure 42.</b> Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) dans le surnageant de la culture d'enrichissement SP11, sur milieu Ravot à 70°C (a - d).....	<b>159 et 160</b>
<b>Figure 43.</b> Photos de capsides de PAV1 prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative).....	<b>162</b>
<b>Figure 44.</b> Photos de microscopie électronique à transmission (coloration négative) de capsides du virus ATV.....	<b>163</b>
<b>Figure 45.</b> Photo de l'ADN du phage $\phi 29$ de <i>Bacillus subtilis</i> prise à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative à l'acétate d'uranyle).....	<b>164</b>
<b>Figure 46.</b> Photo du phage Sol P11 prise à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative).....	<b>165</b>
<b>Figure 47.</b> Photos de nucléocapsides de virus animaux prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission de différents virus animaux.....	<b>166</b>
<b>Figure 48.</b> Photos du virion du virus ACV prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission.....	<b>166</b>
<b>Figure 49.</b> Photo de microscopie électronique du virus PSV en coloration négative.....	<b>165</b>
<b>Figure 50.</b> Photos de vésicules colorées négativement en microscopie électronique à transmission.....	<b>169</b>
<b>Figure 51.</b> Photos de VLP (colorés négativement) visualisées au microscope électronique à transmission dans la souche MC6, <i>Thermosipho africanus</i> .....	<b>171 et 172</b>
<b>Figure 52.</b> Photos d'un flagelle de <i>Thermosipho africanus</i> (souche MC6) visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative).....	<b>174</b>
<b>Figure 53.</b> Photos de flagelles de <i>Thermosipho africanus</i> (souche MC6) visualisés au microscope électronique à transmission (coloration négative).....	<b>175</b>
<b>Figure 54.</b> Photos d'un flagelle de <i>Vibrio metchnikovii</i> visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative) à un grossissement de 125 000 x.....	<b>176</b>
<b>Figure 55.</b> Photos des flagelle de <i>Pseudomonas rhodos</i> visualisés au microscope électronique à transmission (coloration négative).....	<b>177</b>

<b>Figure 56.</b> Photos de flagelle de <i>T. africanus</i> (MC6), visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative).....	<b>178</b>
<b>Figure 57.</b> Photos de flagelle d' <i>Escherichia coli</i> , visualisé au microscope électronique à transmission (coloration au phosphotungstène).....	<b>178</b>
<b>Figure 58.</b> Représentation schématique du point d'ancrage d'un flagelle de bactérie Gram négative.....	<b>179</b>
<b>Figure 59.</b> Visualisation par MET (coloration négative) du point d'ancrage d'un flagelle de <i>T. africanus</i> (MC 6).....	<b>179</b>
<b>Figure 60.</b> Représentation schématique du système de sécrétion de type III de <i>Salmonella typhimurium</i> , traversant la membrane interne et la membrane externe.....	<b>180</b>
<b>Figure 61.</b> Représentation schématique du système de sécrétion de type III de <i>Shigella flexneri</i> .....	<b>181</b>
<b>Figure 62.</b> Représentation schématique d'un pili de type IV de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , traversant la membrane interne et la membrane externe.....	<b>182</b>
<b>Figure 63.</b> Le virus TTV1 de la crénarchée hyperthermophile, <i>Thermoproteus tenax</i> , attaché vraisemblablement à un pili, photographié en MET et coloré négativement (photographie du haut) et ombré au phosphotungstène.....	<b>183</b>
<b>Figure 64.</b> Photo de flagelle de <i>T. africanus</i> (MC 6), visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative).....	<b>184</b>
<b>Figure 65.</b> Photo du phage PBS de <i>Bacillus subtilis</i> , visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative).....	<b>185</b>
<b>Figure 66.</b> Photographie prise en MET (coloration négative) du surnageant de culture de RB39 C1.....	<b>188</b>
<b>Figure 67.</b> Photographies prises en MET (coloration négative) du phage de SP4 SD.....	<b>188</b>
<b>Figure 68.</b> Figure représentant le positionnement de la souche <i>Geobacillus</i> SP4 SD au sein de différents taxons du genre <i>Geobacillus</i> dans un arbre phylogénétique construit avec les séquences codant pour l'ARNr 16S par la méthode de neighbour-joining.....	<b>190</b>
<b>Figure 69.</b> Photographie prise en microscopie électronique à transmission du virus GTV1.....	<b>192</b>
<b>Figure 70.</b> Graphique représentant un suivi de croissance de la souche SP4 SD et la production du virus GTV1 en fonction du temps.....	<b>195</b>
<b>Figure 71.</b> Graphique représentant les VBR de la culture non induite et de la culture induite à la mitomycine C en fonction du temps.....	<b>197</b>
<b>Figure 72.</b> Graphique représentant un suivi de croissance de la souche SP4 SD et la production du virus GTV1 en fonction du temps.....	<b>198</b>
<b>Figure 73.</b> Graphique représentant les VBR de la culture non induite et de la culture induite par anaérobiose en fonction du temps.....	<b>199</b>

<b>Figure 74.</b> Graphique représentant un suivi de croissance de la souche SP <sub>4</sub> SD et la production du virus GTV <sub>1</sub> en fonction du temps.....	<b>200</b>
<b>Figure 75.</b> Graphique représentant les VBR de la culture non induite et de la culture induite par ajout de NaCl [30 g/l] en fonction du temps.....	<b>201</b>
<b>Figure 76.</b> Profils de digestion de l'ADN de GTV <sub>1</sub> purifié (A) et de l'ADNccc, présent dans la souche <i>G. thermoleovorans</i> SP <sub>4</sub> SD (B) par enzymes de restriction, visualisés sur un gel d'agarose à 1 % après électrophorèse.....	<b>205</b>
<b>Figure 77.</b> Schéma représentant différents types de particule contenant des acides nucléiques dans l'environnement et pouvant fluorescer lors des analyses en microscopie à épifluorescence.....	<b>216</b>

## **Liste des tableaux**

<b>Tableau 1.</b> Tableau récapitulatif des avantages et désavantages des différentes méthodologies de dénombrement virales.....	<b>31</b>
<b>Tableau 2.</b> Tableau récapitulatif de l'abondance procaryotique et virale dans différentes sources hydrothermales.....	<b>57</b>
<b>Tableau 3.</b> Liste de genres appartenant à la famille des <i>Bacillaceae</i> , dont le genre <i>Geobacillus</i> , qui est subdivisé en 24 espèces.....	<b>69</b>
<b>Tableau 4.</b> Description de quelques caractéristiques du genre <i>Geobacillus</i> .....	<b>70</b>
<b>Tableau 5.</b> Tableau récapitulatif des phages infectant les espèces du genre <i>Geobacillus</i> .....	<b>72</b>
<b>Tableau 6.</b> Tableau récapitulatif de la nature des sources hydrothermales échantillonnées dans les Terres australes et antarctiques françaises.....	<b>81</b>
<b>Tableau 7.</b> Taxons détectés par approches moléculaires dans les d'échantillons bruts et analysées par méthodologie de la DGGE .....	<b>83</b>
<b>Tableau 8.</b> Souches bactériennes et archéennes isolées en anaérobiose sur le milieu Ravot modifiée.....	<b>85</b>
<b>Tableau 9.</b> Tableau récapitulatif des cultures d'enrichissement effectuées en anaérobiose.....	<b>97</b>
<b>Tableau 10.</b> Tableau récapitulatif des échantillons analysés en épifluorescence pour déterminer l'abondance virale et microbienne.....	<b>102</b>
<b>Tableau 11.</b> Tableau récapitulatif des échantillons analysés en microscopie électronique à transmission pour déterminer l'abondance ainsi que la diversité morphotypique virale.....	<b>107</b>
<b>Tableau 12.</b> Tableau récapitulatif des souches criblées pour la présence de VLP.....	<b>109</b>
<b>Tableau 13.</b> Tableau récapitulatif des souches testées pour les expériences de plages de lyse.....	<b>111</b>

<b>Tableau 14.</b> Tableau récapitulatif des données d'abondance microbienne et virale des transects SP1 et SP2.....	<b>132</b>
<b>Tableau 15.</b> Tableau récapitulatif des données d'abondance microbienne et virale des autres sources de Saint Paul.....	<b>138</b>
<b>Tableau 16.</b> Tableau récapitulatif des données d'abondance microbienne et virale des autres sources de Val Travers.....	<b>141</b>
<b>Tableau 17.</b> Comparaison des abondances microbienne et virale, mesurées en utilisant la microscopie à épifluorescence (ME) et la cytométrie en flux (CMF).....	<b>143</b>
<b>Tableau 18.</b> Tableau représentant la variance des concentrations des cellules de procaryotes et de particules virales dans les sources hydrothermales des TAAF.....	<b>146</b>
<b>Tableau 19.</b> Différents morphotypes et dimensions de VLP observés dans différents échantillons bruts.....	<b>149</b>
<b>Tableau 20.</b> Différents morphotypes et dimensions de VLP observés dans différentes cultures d'enrichissement.....	<b>154</b>
<b>Tableau 21.</b> Différents morphotypes et dimensions de VLP observés dans la culture d'enrichissement SP11.....	<b>161</b>
<b>Tableau 22.</b> Différents morphotypes et dimensions de VLP observés en MET dans les surnageants de la culture de la souche MC6, <i>Thermosipho africanus</i> .....	<b>171</b>
<b>Tableau 23.</b> Tableau récapitulatif des souches de <i>Geobacillus</i> séquencées et accessibles dans la base de données NCBI.....	<b>191</b>
<b>Tableau 24.</b> Tableau représentant les cadres ouverts de lecture (ORF) putatifs du virus GTV1.....	<b>206-207</b>

# Liste des Abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNr 16S</b>	Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité du ribosome
<b>Bet</b>	Bromure d'éthidium
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>CEO</b>	Capsid-encoding organism
<b>CMF</b>	Cytométrie en flux
<b>CRISPR</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
<b>DAPI</b>	4', 6'-diamidino-2-phénylindole
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DSMZ</b>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires)
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>EDTA</b>	Ethylène diamine-tétraacétate
<b>GTA</b>	Gene transfert agent
<b>g, mg, µg</b>	Gramme, milligramme, microgramme (« g » est également l'unité d'accélération utilisé pour les centrifugations)
<b>h</b>	Heure
<b>ICTV</b>	International Committee on Taxonomy of Viruses
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>l, ml, µl</b>	Litre, millilitre, microlitre
<b>M, mM</b>	Molaire et millimolaire
<b>ME</b>	Microscopie épifluorescence
<b>MET</b>	Microscopie électronique à transmission
<b>min</b>	Minute
<b>MOD</b>	Matière organique dissoute
<b>MOP</b>	Matière organique particulaire
<b>MV</b>	Membrane vesicles
<b>nt</b>	Nucléotide
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>NPP</b>	Nombre le plus probable
<b>ORF</b>	Open Reading Frame (Cadre ouvert de lecture)
<b>RdB</b>	Rallier du Baty
<b>REO</b>	Ribosome-encoding organism
<b>pb, kpb (kb)</b>	Paire de base, kilopaire de base
<b>PCI</b>	Phénol Chloroform Isoamylque
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction

<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PFJ</b>	Plage du Feu de Joie
<b>PIPES</b>	Piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulfonic acid)
<b>s</b>	Seconde
<b>SDS</b>	Sulphate dodécyle sulfate
<b>SP</b>	Saint Paul
<b>TAAF</b>	Terres australes et antarctiques françaises
<b>TAE</b>	Tris-HCl/acetate/EDTA
<b>TE</b>	Tampon Tris-EDTA
<b>U</b>	Unité (pour DNase)
<b>U.V.</b>	Ultra-violet
<b>v</b>	Volume
<b>VT</b>	Val Travers
<b>VLP</b>	Virus-likeParticle

*“Science is the one language game we are playing, where we get really straight and rigorous about what constitutes evidence [...] where you actually win points by proving yourself wrong” - Sam Harris*

*“We must have a height advantage and a mass advantage of trillions on a virus and yet it can take you down, it can kill you...It’s like Luke Skywalker taking out the Death Star in a little X-wing-fighter” - Brian Malow*







# Préambule :

L'abondance virale excède d'environ un ordre de grandeur le prochain type de plancton le plus abondant des systèmes aquatiques : le bactérioplancton (Wommack & Colwell, 2000). Les microorganismes jouent un rôle majeur dans les cycles des nutriments et de l'énergie et constituent plus de 90 % de la biomasse vivante dans la mer. Il est estimé que les virus sont la cause de la mortalité d'approximativement 20 % de cette biomasse par jour. Outre leur rôle en tant qu'agents de la mortalité, les virus représentent également un des plus grands réservoirs de diversité génétique inexplorée sur la Terre (Suttle, 2007).

Les virus peuvent être retrouvés partout où de la vie se manifeste. Ainsi, le viroplancton est un constituant des écosystèmes même les plus extrêmes. La présence de particules virales a été notamment détectée dans de la glace dans les milieux polaires, dans des déserts arides, dans des salines, dans des sources hydrothermales, ainsi que dans une variété d'autres types d'écosystème considérés comme extrêmes. Si l'abondance virale peut atteindre jusqu'à  $10^9$  particules/ml dans certains de ces milieux (Le Romancer *et al.*, 2007), elle semblerait être généralement faible dans les sources hydrothermales. Paradoxalement, l'exploration des sources hydrothermales a permis la découverte de plusieurs familles virales avec des morphotypes inconnus. Ces environnements pourraient encore abriter une diversité virale inattendue. Cependant, il existe actuellement dans la littérature encore très peu d'études consacrées à l'abondance et la dynamique des populations virales et de leurs hôtes dans ces milieux.

Le Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes se consacre en particulier à l'étude des écosystèmes à haute température. Dans ce contexte, les éléments génétiques mobiles retiennent un intérêt particulier pour la compréhension du transfert latéral de gènes au sein des communautés microbiennes qui les peuplent, ainsi que pour l'étude de la régulation de ces communautés par la lyse virale. Ce travail de thèse a eu comme objectif l'exploration des communautés procaryotiques et virales par l'étude de leur abondance et de leur diversité dans différentes sources hydrothermales d'une part et par la caractérisation d'un couple hôte-virus d'autre part. Le site d'étude choisi pour ce travail de thèse est situé dans les Terres australes et antarctiques françaises, qui abritent des sources hydrothermales terrestres et marines côtières.



# Introduction :

## 1. Définitions et vocabulaire

Plusieurs définitions de « virus » ont été proposées au cours du temps en fonction des progrès et des découvertes. A l'origine, aucune différence n'était faite entre les virus et les autres microbes, tout agent causant une maladie était désigné sous le vocable « virus ». Beijerinck vit le premier la différence entre les « microbes » et le « fluide principe infectieux » (« fluid infectious principle »), lorsqu'en 1898 il confirma la filtrabilité du virus de la mosaïque du tabac, découvert par Iwanowsky en 1891 (Lwoff, 1953, 1957). Il a fallu que d'autres biologistes arrivent à la même conclusion, principalement en filtrant des microbes, pour que la différence soit faite entre les virus et les autres microorganismes. Ces « ultra-virus » ou « virus filtrables invisibles » ont alors été distingués des agents infectieux visibles, qui ont perdu le nom de « virus » (Lwoff, 1957). L'impossibilité de cultiver des virus de bactérie sans hôte bactérien les a ensuite distingués de nouveau en tant que parasites obligatoires des autres microorganismes lors des travaux de Twort et d'Hérelle (Twort, 1915; d'Herelle, 1917). Inévitablement, les chercheurs proposant différentes définitions des « virus » ont dû se positionner par rapport à l'inclusion ou l'exclusion de ceux-ci dans l'arbre du vivant, sujet suscitant encore aujourd'hui des débats intenses (pour exemple, voir « *Ten reasons to exclude viruses from the tree of life* » (Moreira & Lopez-Garcia, 2009) et les réponses à cette publication (Claverie & Ogata, 2009; Hegde *et al.*, 2009; Koonin *et al.*, 2009; Lopez-Garcia & Moreira, 2009; Ludmir & Enquist, 2009; Navas-Castillo, 2009; Raoult, 2009)).

Lwoff définit, en 1957, un virus comme étant une « *Entité strictement intracellulaire et potentiellement pathogène avec une phase infectieuse et 1) ayant seulement un type d'acide nucléique, 2) se multipliant sous la forme de leur matériel génétique, 3) incapable de pousser et de subir une fission binaire, 4) n'ayant pas de système Lipmann<sup>1</sup>* » (Lwoff, 1957).

Dans l'ouvrage pédagogique de biologie général «Biologie » de Campbell et Reese, le virus est défini comme « *Une particule infectieuses constituée d'acide nucléique enfermée dans une coque de protéines et, dans certains cas, dans une membrane* » (Campbell & Reece, 2001).

---

<sup>1</sup>Système de Lipmann = Lwoff définit le « système de Lipmann » comme un système d'enzymes que possèdent les microorganismes et qui permet de convertir l'énergie potentielle des produits alimentaires en liaisons à haute énergie, nécessaires pour des synthèses biologiques (Lwoff, 1957).

L'« International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) » définit un virus simplement comme étant « *une véritable entité physique produite par l'évolution biologique et génétique* » (base de données ICTV).

Suite à la récente découverte des virus « géants » au début des années 2000 (La Scola *et al.*, 2003), et à l'accumulation de connaissances sur les archées, leurs virus et les bactéries intracellulaires, Raoult et Forterre ont récemment proposé une nouvelle définition du virus : celui-ci devient « *un organisme codant une capsid, composé de protéines et d'acides nucléiques, s'auto-assemblant en une nucléocapside et utilisant un organisme codant des ribosome pour l'achèvement de son cycle de vie* ». Il en émerge deux concepts : les « *organismes codant pour des capsides* » (Capsid-encoding organisms ou CEO) et les « *organismes codant pour des ribosomes* » (Ribosome-coding organisms ou RCO) qui seraient deux types d'organismes vivants. Les auteurs considèrent que les virus ne sont pas que des acides nucléiques parasites et que les ribosomes, d'une part, et les capsides, de l'autre, formeraient des bases pour la classification des êtres vivants (Raoult & Forterre, 2008).

## **1.1. Terminologie moderne associée aux virus de procaryotes**

### Virus de procaryotes

Le terme « bactériophage », ensuite devenu simplement « phage », a été inventé par d'Hérelle lorsqu'il a découvert les virus de bactéries (d'Herelle, 1917). Etant donné qu'une dichotomie Procaryote/Eucaryote régnait jusqu'à la découverte, en 1977, du domaine des Archaea (Woese & Fox, 1977), il semblait logique d'utiliser des termes différents pour désigner les virus de bactéries (procaryotes) de ceux des eucaryotes. Par habitude, les termes « phages » pour distinguer les virus de procaryotes, et « virus » pour désigner les virus d'eucaryotes, sont restés dans le langage scientifique. Avec la découverte des archées, à priori, il ne semble plus cohérent d'utiliser deux termes différents pour désigner les virus des trois domaines du vivant (Comeau *et al.*, 2008). S'appuyant sur ces arguments, ainsi que sur l'exceptionnelle diversité des virus d'archées, Forterre et Prangishvili ont proposé d'utiliser les termes « archeovirus », « bacteriovirus » et « eukaryavirus » (Forterre & Prangishvili, 2009). Ces termes ne sont toutes fois pas encore courants dans le langage scientifique. Cependant, on peut constater que la différence entre les virus d'archées et les virus de bactéries est de plus en plus présente dans la littérature, notamment avec l'utilisation des termes « archaeal virus » ou « archeovirus » pour désigner les virus d'archées et « prokaryote viruses » au lieu de « phages » pour désigner les virus des procaryotes en général (Pour exemple, on peut comparer les revues faites régulièrement par H.W. Ackermann sur les virus de procaryotes (Ackermann, 1992, 1996, 2001, 2007), et la revue la plus récente de 2012 (Ackermann & Prangishvili, 2012)).

## Microbe

Le terme « microbe<sup>2</sup> » a été introduit par Sédillot en 1878 (Sédillot, 1878) suite aux découvertes de Pasteur et désignait « les organismes microscopiques répandus dans l'atmosphère qui sont la cause des fermentations attribuées à l'air ». Aujourd'hui, les « microbes » désignent dans le langage courant les microorganismes invisibles à l'œil nu. Ils sont souvent associés aux organismes unicellulaires et virus pathogènes (Robert, 2007). Cependant, en microbiologie la signification est différente. Depuis le développement de la virologie, une différence est faite entre les virus et les microorganismes unicellulaires. Ainsi, les « microbes » désignent les archées, les bactéries et les eucaryotes unicellulaires (Forterre, 2008). C'est également dans ce sens que ce terme sera utilisé dans ce manuscrit.

## Virion

La différence entre un « virus » et un « virion » est conceptuelle : un virus est l'« organisme » dans son ensemble (vision holistique) et un virion ne désigne que la particule virale (constituée d'un génome viral protégé par une structure protéique associée, ou pas, à des lipides). Les définitions de la vie basées sur la théorie cellulaire, *Omnia cellula e cellula*, ont classiquement exclu les virus des organismes vivants (Forterre, 2010). Cependant pour Bandea (Bandea, 1983), c'est la phase intracellulaire de la réplication virale qui définit ontologiquement la phase mature des virus. Il fait ainsi la distinction entre un virus, qui présente un « métabolisme », une croissance et une reproduction, et un virion, qui est inerte avec un potentiel infectieux et qui peut être considéré comme un analogue à la spore cellulaire. Ce point de vue a ensuite été adopté par Forterre, qui a introduit le concept de « virocell », pour désigner la phase « mature » virale, par opposition aux virions (Forterre, 2010).

## Prophage

Les virus de type tempéré lysogène peuvent prendre la forme de prophages. Il s'agit du génome des phages tel qu'il existe lors du cycle lysogène. Les prophages sont formés au cours de l'infection et peuvent s'insérer dans le chromosome de la cellule hôte ou résider dans la cellule hôte sous forme plasmidique. Un prophage peut être considéré également comme une forme non infectieuse qui est doué de continuité génétique, perpétué par la cellule lysogénisée lors de sa propre réplication (Lwoff, 1953). Il peut être perdu soit lors d'une induction de la cellule hôte ou par curage de ce virus. Lors de l'infection simultanée par plusieurs prophages de type différent, on parle de « polylysogénie » (Ackermann & DuBow, 1987).

---

<sup>2</sup>Microbe = n.m.-1878 ; du grec *mikros* « petit », pour « microscopique », et *bios* « vie » (d'après Robert, 2007)

## Provirus

Terme utilisé pour désigner les virus analogues aux prophages, retrouvés chez d'autres organismes cellulaires que les bactéries (Lwoff, 1953). La signification du terme « provirus » est donc la même que celle du « prophage », la différence étant de nature linguistique (« phage » faisant spécifiquement référence aux virus de bactéries). En outre, Lwoff fait remarquer que le terme correct utilisé devrait être « Prévirus », l'étymologie du mot « virus<sup>3</sup> » étant latine et *pro*-<sup>4</sup> grec (à la différence du « prophage » dont les deux parties *pro*- et *phage*<sup>5</sup> proviennent toutes les deux du grec). L'auteur accepte, cependant, que le terme « provirus » soit utilisé notamment pour son analogie au mot « prophage » (Lwoff, 1953). Actuellement, le mot « provirus » est couramment utilisé dans la littérature de microbiologie aquatique pour désigner l'équivalent des prophages des archées.

## Virus-like particle (VLP)

Plusieurs usages différents sont faits du terme « Virus-like particle » (VLP). En microbiologie clinique, les VLP sont des « virions de virus démunis de génome et donc sans capacité répliquative ». Ils peuvent être ainsi impliqués dans plusieurs procédés, comme les vaccins (Liu *et al.*, 2012). En microbiologie environnementale, les VLP peuvent être définies comme « des petits points fluorescents observés en microscopie à épifluorescence lors du dénombrement viral ». On utilise alors ce terme car la nature virale *sensu stricto* des points fluorescents n'est pas connue et la confusion peut être faite entre ces derniers et des acides nucléiques libres (Breitbart & Rohwer, 2005). Les VLP sont également définies comme étant des « particules qui se comportent comme des virus, mais dont l'infectiosité n'a pas encore été établie » (Porter *et al.*, 2008). Généralement, le terme « Virus-like particle » est utilisé selon un mélange des deux dernières définitions dans la littérature de microbiologie marine, et sera également utilisé dans ce sens dans ce manuscrit.

## Gene transfer agent

Un « gene transfer agent » (GTA) est défini comme une entité de type phagique avec les propriétés suivantes : elle contient des fragments aléatoires du génome de la cellule qui la produit et la quantité d'ADN qu'elle encapside est insuffisante pour encoder les protéines nécessaires pour formation de la particule même. Un GTA ne contient donc pas forcément des gènes codant pour lui-même, l'empêchant de transférer à la cellule réceptrice l'ensemble des gènes structuraux nécessaires à sa propagation. De ce fait, la transmission des GTA ne se fait pas suite à une infection de type phagique (transmission horizontale), mais plutôt par transmission verticale. La distinction entre les GTA et les phages effectuant

---

<sup>3</sup>Virus = n.m. – 1478 ; mot latin « suc, venin, poison »

<sup>4</sup>Pro- = Élément, du grec ou du latin *pro* « en avant »

<sup>5</sup>-Phage= Élément du grec *-phagos* « manger »

(d'après Robert ; 2007)

de la transduction généralisée réside dans le fait que dans la transduction généralisée l'encapsidation de fragments d'ADN de la cellule hôte ne se fait qu'occasionnellement par certaines particules phagiques parmi une population de phages. Une autre différence est la taille des fragments encapsidés lors de la transduction généralisée, qui correspond approximativement à la taille du génome du phage (Figure 1). L'expression des gènes de GTA semblerait être sous le contrôle de régulateurs cellulaires, ce qui implique que les GTA ne peuvent pas être induits. Des GTA ont été observés chez les bactéries et les archées (Lang *et al.*, 2012).

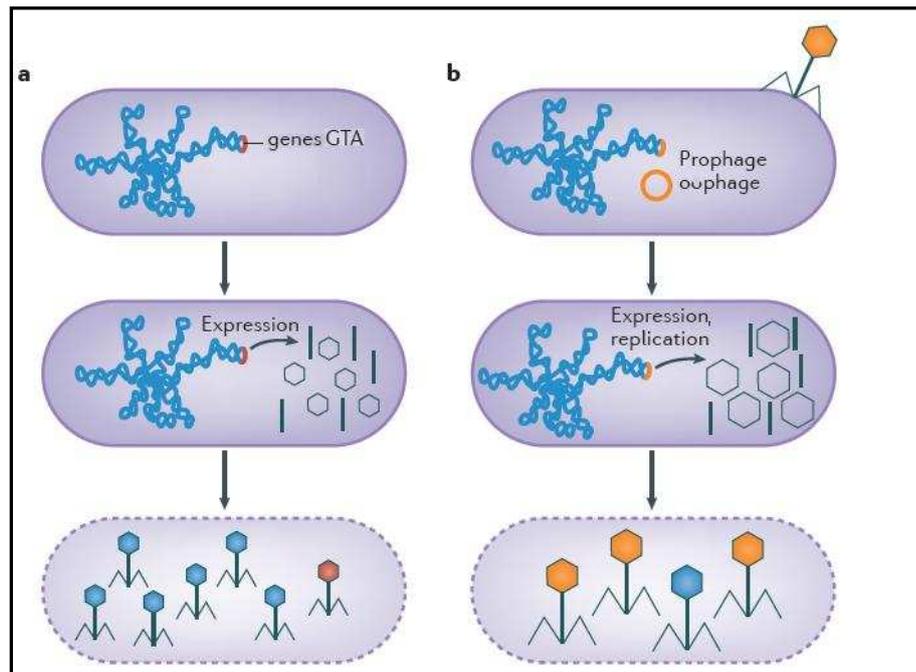


Figure 1. Schéma représentant la production de a) GTA et b) phages effectuant de la transduction. Les GTA sont codés par un cluster de gènes qui permet la formation de particules de type virales. Ces particules sont généralement plus petites que les phages (représentées dans ce schéma par des particules plus petites que les vrais phages) et encapsident que de petits fragments aléatoires de l'ADN de l'hôte (en bleu). Occasionnellement, elles peuvent encapsider des gènes de GTA (en rouge), mais jamais la totalité, ce qui leur empêche la propagation horizontale. Les phages sont capable de se répliquer dans la cellule hôte et de se transmettre verticalement (phages virulents et tempérés) et horizontalement (phages virulents). Occasionnellement, une partie de la population virale peut encapsider des fragments de l'ADN de l'hôte correspondant approximativement à la taille du génome phagique. La transduction peut donc ensuite avoir lieu dans la cellule réceptrice. A l'heure actuelle, il est supposé que les particules de GTA sont relarguées dans l'environnement suite à une lyse cellulaire qu'elles provoqueraient (schématisée par les contours de la cellule en discontinu) (d'après Lang *et al.*, 2012)

### Phage-like particle

Un « phage-like particle » est une entité similaire au GTA ; elle encapside également des fragments de l'ADN de la cellule hôte qui la produit et la quantité d'ADN qu'elle encapside est également insuffisante pour encoder les protéines nécessaires pour formation de la particule. A la différence des GTA, les « phage-like particles » encapsident généralement des fragments d'ADN plus grands (de l'ordre d'une dizaine de kb contre

quelques kb encapsidés par les GTA). Les « phage-like particles » encapsident également des fragments d'ADN de l'hôte provenant souvent d'une région spécifique, plutôt qu'aléatoire. Dans ce sens, les « phage-like particles » sembleraient être des éléments intermédiaires entre les vrais phages et les GTA. Certains de ces éléments, tel que le PBSX de *Bacillus subtilis*, sont également capables de tuer des cellules filles qui, après division cellulaire, n'hériteraient pas les gènes codant pour le PBSX. A l'heure actuelle, la capacité de transfert de gènes n'a pas encore été démontrée chez des « phage-like particles » (Lang *et al.*, 2012).

#### Virus-like vesicles

Décrites récemment chez des archées hyperthermophiles de l'ordre des *Thermococcales*, les « Virus-like vesicles » sont des particules vésiculaires, dont le diamètre varie entre 50 et 150 nm, auxquelles est associé de l'ADN chromosomique et extra-chromosomique de la cellule hôte qui les produit. Il n'a pas encore été démontré avec certitude si les vésicules, bourgeonnant de leurs hôtes, contiendraient de l'ADN de la cellule hôte à l'intérieur plutôt qu'à l'extérieur d'elles-mêmes. Ces vésicules rappelleraient les « membrane vesicles » décrites chez les bactéries et les exosomes chez eucaryotes (Soler *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 2011) et ont été renommées de ce fait « membrane vesicles » (Gaudin *et al.*, 2012).

#### Membrane vesicles

Ces sont des vésicules sphériques (50-200 nm de diamètre) produites par bourgeonnement de la structure pariétale de protéobactéries ou des archées. Les « membrane vesicles » (MV) associées aux archées étaient initialement nommées les « virus-like vesicles » et ont été récemment identifiées en tant que vésicules membranaires. Elles peuvent fusionner avec des cellules réceptrices et transporter de l'ADN cellulaire ou plasmidique. Les vésicules membranaires peuvent présenter des similarités morphologiques avec certains virus sphériques non caudés (Forterre *et al.*, 2012).

#### Membrane vesicle-like particles

Ce vocable désigne des vésicules isolées et observées dans des écosystèmes marins, qui contiennent de l'ADN et qui ont la capacité d'induire leur propre production dans les cellules réceptrices. Ces dernières seraient plus larges que les vésicules membranaires précédemment décrites et contiendraient des fragments assez longs d'ADN de leurs hôtes (de l'ordre de 350 kb contre 3.3 kb à 36 kb dans les vésicules membranaires « classiques »). Les « membrane vesicle-like particles » seraient capables de transduction conduisant à la capacité par les cellules réceptrices de leur production. Ces particules n'ont cependant été caractérisées qu'à partir d'échantillons bruts marins, mais n'ont pas encore été étudiées en association à des souches bactériennes pures (Chiura *et al.*, 2011; Lang *et al.*, 2012).

## Hyper/thermophile

La notion de « thermophilie » est utilisée pour désigner des organismes vivant à haute température. On distingue les thermophiles « modérés » qui sont des organismes, dont la température optimale de croissance est comprise entre 45°C et 80°C, et les « hyper » thermophiles, dont la température optimale de croissance excède 80°C (Amend *et al.*, 2004).

## **2. La découverte des phages**

La découverte de virus de bactérie est attribuée à deux chercheurs : Frederick William Twort et Félix d'Hérelle. Twort constata, dans son article de 1915 "*An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses*", l'apparition de « zones vitreuses » dans des cultures de microcoque et démontra l'infectiosité du « matériel transparent » lors du transfert de ce dernier sur des cultures fraîches de microcoque (Twort, 1915).

En 1917, dans son article "*Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques*", Félix d'Hérelle décrit « un microbe anti-Shiga » invisible qui se développait dans ses cultures de shigelles en lysant ces dernières. Il conclut que le « microbe antidysentérique » était un « bactériophage obligatoire », parasite strictement spécifique des shigelles (d'Herelle, 1917).

La découverte des phages a été sujette à controverse, la gloire de la découverte ayant suscité des disputes dès 1921. La difficulté d'interprétation des preuves qu'il s'agissait bien de phages dans les deux articles alimentait les débats, qui ne sont toujours pas vraiment tranchés aujourd'hui (Duckworth, 1976). Twort et d'Hérelle demeurent donc tous les deux découvreurs indépendants des bactériophages.

## **3. La classification des virus**

Depuis la dernière mise à jour de la taxonomie virale par l'ICTV en 2011, les virus sont classifiés en 6 ordres, 94 familles, 22 sous-familles, 395 genres et 2480 espèces. Parmi les 94 familles, 72 familles n'appartiennent à aucun ordre (base de données ICTV).

La notion d' « espèce virale », établie comme le niveau le plus bas dans la hiérarchie taxonomique virale, est définie comme étant « une classe polythétique de virus constituant une lignée de réplication et occupant une niche écologique particulière » (base de données ICTV). Il est important de noter que cette définition ne se limite pas aux critères purement

phénétiques des caractéristiques partagées entre virus. Elle souligne également l'importance d'une continuité (ancêtre-descendant) dans les populations virales qui partagent une niche biotique commune. Il est également important de remarquer que l'espèce virale est définie comme une « classe polythétique » de virus, à la différence d'une « classe universelle » traditionnelle chez les organismes vivants. Une « classe polythétique » est définie comme un groupe constitué de membres partageant plusieurs caractéristiques en commun, mais n'ayant aucune caractéristique spécifique commune partagée simultanément par tous les membres de ce groupe (Figure 2) (Van Regenmortel & Mahy, 2004).

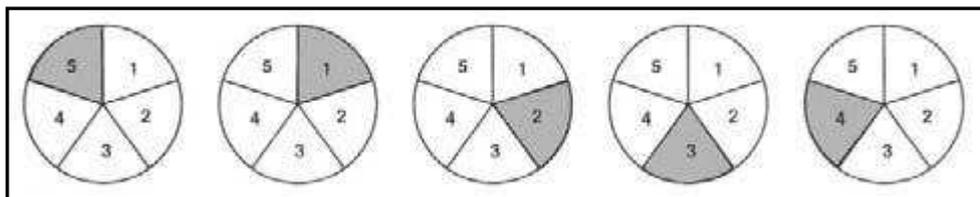


Figure 2 : Représentation schématique de cinq membres d'une classe polythétique caractérisés par cinq propriétés 1-5. Le secteur gris représente une propriété manquante. Chaque membre possède plusieurs de ces propriétés, mais aucune propriété n'est partagée simultanément par tous les membres. (D'après Van Regenmortel & Mahy, 2004)

Ce type de définition rend la classification des virus difficile. Tout en définissant les virus comme « de véritables entités physiques produites par l'évolution biologique et génétique », l'ICTV reconnaît que la notion d'« espèce virale » et les taxons supérieurs sont des concepts abstraits produits par la pensée rationnelle et logique.

En 1943, Ruska proposa de classer les virus à l'aide de la microscopie électronique à transmission (Ruska, 1943). En 1948, Holmes classifia les virus en trois familles, dont celle des phages (les *Phagineae*). Cette classification était basée sur la gamme d'hôtes du virus et les symptômes de la maladie qu'il causait (Holmes, 1948).

En 1962, une autre classification des virus, nommé LHT (pour Lwoff-Horne-Tournier) a été proposée. Elle est basée sur la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN), la structure de cet acide nucléique (monocaténaire, bicaténaire, linéaire ou circulaire), la symétrie de la capsid (binaire, cubique ou hélicoïdale), la présence ou l'absence d'enveloppe lipidique et le mode de répllication. Ces critères ont ensuite été utilisés pour classer les virus en sous-phyla, classes, ordres, sous-ordres et familles (Lwoff *et al.*, 1962).

Suite à une polémique concernant la classification LHT, d'autres systèmes de classification virale ont été proposés. En 1965 et 1967, Bradley proposa un système de classification des bactériophages reposant à la fois sur l'architecture du virion et la nature du génome viral en les regroupant dans six groupes différents (de A à F) (Bradley, 1965, 1967). Sa proposition fût acceptée par la majorité de la communauté scientifique et demeure la

base de la classification actuelle. Il apporta quelques modifications à ces groupes en 1971 (Bradley, 1971).

Baltimore proposa en 1971, sur la base de virus animaux, un système (nommé « Baltimore ») de classification qui consiste à classer les virus en six groupes selon la stratégie de réplication qui dépend de la structure du génome : Le groupe I (virus à ADN double brin), le groupe II (virus à ADN simple brin positif), le groupe III (virus à ARN double brin), le groupe IV (les virus à ARN simple brin positif), le groupe V (virus à ARN simple brin négatif) et le groupe VI (les rétrovirus à simple brin) (Baltimore, 1971). Un groupe supplémentaire (groupe VII), comprenant les virus à ADN double brin ayant une étape de rétrotranscription lors de la réplication, a été ajouté plus tard.

La classification actuelle repose essentiellement sur la classification LHT, mais reste cependant inspirée par les autres classifications proposées. Ainsi, les virus sont classifiés selon le type et l'organisation du génome viral, sa stratégie de réplication et la structure de son virion. Une classification plus spécifique est ensuite appliquée pour les virus afin de discriminer les différentes espèces virales. Les critères permettant la distinction des espèces sont notamment les similarités de séquences entre génomes viraux, la gamme d'hôtes, les propriétés physico-chimiques des virions, les propriétés antigéniques, etc...(Büchen-Osmond, 2003a).

Ainsi, les virus sont classés en ordre (suffixe-*virales*), famille (suffixe-*viridae*), sous-famille (suffixe-*virinae*), genre (suffixe-*virus*) et espèce. L'ICTV gère une base de données référençant tous les virus décrits et est chargée de la mise à jour de la classification des virus (Büchen-Osmond, 2003b).

### **3.1. La classification des virus de procaryotes**

Depuis le début des observations de phage en microscopie électronique à transmission, grâce à l'application de la coloration négative dès 1959, au moins 6300 virus de procaryotes (dont 6196 phages et 88 archéovirus) ont été décrits morphologiquement (Ackermann & Prangishvili, 2012). La majorité (96.3 %) des virus de procaryotes observés ont un virion de morphologie binaire, composé d'une « tête » icosaédrique ainsi que d'une « queue », ce qui justifie leur appartenance à l'ordre des « *Caudovirales* », et seulement 230 virus (ou 3.7 %) sont de morphologie polyédrique, filamenteuse, ou pléomorphe (Figure 3).

L'ordre des *Caudovirales* est divisé en trois familles : les *Siphoviridae*, les *Myoviridae* et les *Podoviridae*. La famille des *Siphoviridae* est la famille ayant le plus de représentants, soit 57.3 % de la totalité des virus de procaryotes décrits. Elle est caractérisée par une capsid icosaédrique et une longue queue flexible, mais non contractile. La famille des

*Myoviridae*, qui regroupe 24.8 % des virus de procaryotes, a également une morphologie constituée d'une capsidie icosaédrique. A la différence des siphovirus, la queue des myovirus est contractile. La troisième famille, les *Podoviridae*, représentent 14.2 %, du nombre total des virus de procaryotes. Elle est morphologiquement différente des deux autres familles du fait que la queue est petite et non contractile. La capsidie icosaédrique des *Caudovirales*, qui enferme un génome viral composé d'ADN double brin, peut parfois être allongée, ce qui est notamment le cas chez les virus d'entérobactéries (Ackermann & Prangishvili, 2012).

Les virus de procaryotes à morphologie polyédrique peuvent être divisés en cinq familles : *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* et *Cystoviridae*. La capsidie polyédrique, sans queue, contient un génome viral qui peut être de l'ADN ou de l'ARN, simple ou double brin, selon la famille. On note également chez certaines familles la présence de lipides, sous forme d'enveloppe interne/externe ou inséré dans le core du virion. Les microvirus et les levivirus n'ont pas de lipides dans leurs virions et ont un génome composé de simples brins d'ADN (circulaire) et d'ARN (linéaire), respectivement. Les membres de la famille des *Cystoviridae* ont un génome (linéaire segmenté) constitué d'ARN double brin et une enveloppe lipidique externe entourant la capsidie, alors que les membres de la famille des *Tectiviridae* ont un génome constitué d'ADN double brin (linéaire), entouré par une enveloppe lipidique interne. Les corticovirus, ayant également un génome à ADN double brin (mais circulaire), ont une capsidie avec des lipides insérés dans le core protéique. Deux virus de procaryotes découverts récemment possèdent également une capsidie polyédrique, mais n'ont pas encore été classifiés : il s'agit du *Sulfolobus turreted icosahedral virus* (STIV) et du *Spherical halovirus 1* (SH1). Les structures apicales du STIV, ainsi que son génome, sont des propriétés qui pourraient potentiellement le distinguer des autres familles pour en créer une nouvelle (Ackermann & Prangishvili, 2012).

Quatre familles regroupent les virus de procaryotes à morphologie filamenteuse : les *Inoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Rudiviridae* et les *Clavaviridae*. La famille des *Clavaviridae* est composée de virus « bacilliformes » possédant un génome à ADN double brin circulaire. Les *Lipothrixviridae* et les *Rudiviridae* sont des virus filamenteux à ADN double brin linéaire. A la différence des *Rudiviridae*, dont les virions ont une apparence similaire à celle du virus de la mosaïque du tabac, les *Lipothrixviridae* sont flexibles et ont une enveloppe lipidique externe. Malgré ces différences apparentes, ainsi que les différences dans les stratégies répliquatives, des études génomiques et structurales suggèrent que ces deux dernières seraient issues d'un ancêtre commun. L'ordre des « *Ligamenvirales* », regroupant les familles des *Rudiviridae* et des *Lipothrixviridae*, a donc été proposé (Prangishvili & Krupovic, 2012).

Les *Inoviridae* sont caractérisés par deux types de virions qui diffèrent par la taille: longs et fins ainsi que petits et plus épais (Plectovirus). La capsidie entoure de l'ADN simple brin circulaire (Ackermann & Prangishvili, 2012). Enfin, un nouveau virus récemment décrit, l'*Aeropyrum coil-shaped virus* (ACV), dont l'hôte est l'archée hyperthermophile *Aeropyrum pernix*, a un virion composé d'un filament nucléoprotéique surenroulé de manière

hélicoïdale et formant un cylindre. Cette capsidie entoure un génome à ADN simple brin circulaire. C'est donc le seul virus hyperthermophile découvert à ce jour possédant ce type de génome. Les auteurs de cette découverte supposent que la stabilité de l'ADN simple brin pourrait résulter de sa taille (24.8 kb). Ce génome est deux fois plus grand que celui de l'inovirus Pf4 (12.4 kb), considéré avant la découverte de l'ACV comme étant le plus grand virus à ADN simple brin (Mochizuki *et al.*, 2012).

Un autre groupe est constitué de virus pléomorphes, composé de familles infectant des bactéries et des archées. Tous ont pour trait commun de posséder un génome composé d'ADN double brin, circulaire ou linéaire. La seule famille de virus pléomorphes de bactérie est celle des *Plasmaviridae*. Les autres familles ont pour hôte des archées, dont la particularité est d'être extrémophile. Ainsi sont reconnues aujourd'hui les familles suivantes : *Fuselloviridae* (virus fusiforme), *Guttaviridae* (virus en forme de gouttelette), *Ampullaviridae* (virus en forme de bouteille), *Globuloviridae* (virus sphériques) ainsi que les *Bicaudaviridae* (virus capables de subir une métamorphose caractérisée par la protrusion d'appendices latéraux, et ceci uniquement lorsque le virus est à l'extérieur de son hôte (Prangishvili *et al.*, 2006c). Deux virus isolés de la même espèce archéenne halophile *Haloarcula hispanica* n'ont pas encore été classés : le virus His1 a une morphologie qui ressemble à celle des fusellovirus (morphologie du type citron), mais n'appartient pas à cette famille mais à un genre orphelin, les *Salterprovirus* (Bath & Dyal-Smith, 1998; Bath *et al.*, 2006) et le virus « Haloarcula Hispanica Pleomorphic Virus-1 » (HHPV-1) est un virus pléomorphe qui demeure encore non classé (Ackermann & Prangishvili, 2012).

Compte tenu de l'histoire de la microbiologie et de la découverte relativement récente du domaine des Archaea en 1977 (Woese & Fox, 1977), la grande majorité des virus de procaryotes, soit 98.5 %, décrits à ce jour a pour hôte des représentants du domaine Bacteria, mais cela reflète en grande partie la facilité de la « culture des virus » de bactérie et l'effort qui leur a été alloué. Il est cependant surprenant de constater la diversité morphologique exceptionnelle des virus d'archées (qui ne représente pourtant que 1.5 % des virus de procaryotes décrits) comparée à celle des virus de bactéries. Etant donné le faible nombre de virus décrits chez les archées, la faible diversité des hôtes à partir desquels des virus ont été isolés et la diversité morphologique de ces virus, il est probable que cette diversité morphologique ne représente qu'une petite fraction des types morphologiques encore à découvrir. Malgré l'expansion de l'exploration de différents types d'habitat, peu de type d'environnement ont été étudiées à ce jour. Il est donc très probable que notre connaissance de la diversité virale augmente avec l'exploration de nouveaux environnements (Ackermann & Prangishvili, 2012).

## Taxons viraux infectant les bactéries et les archées

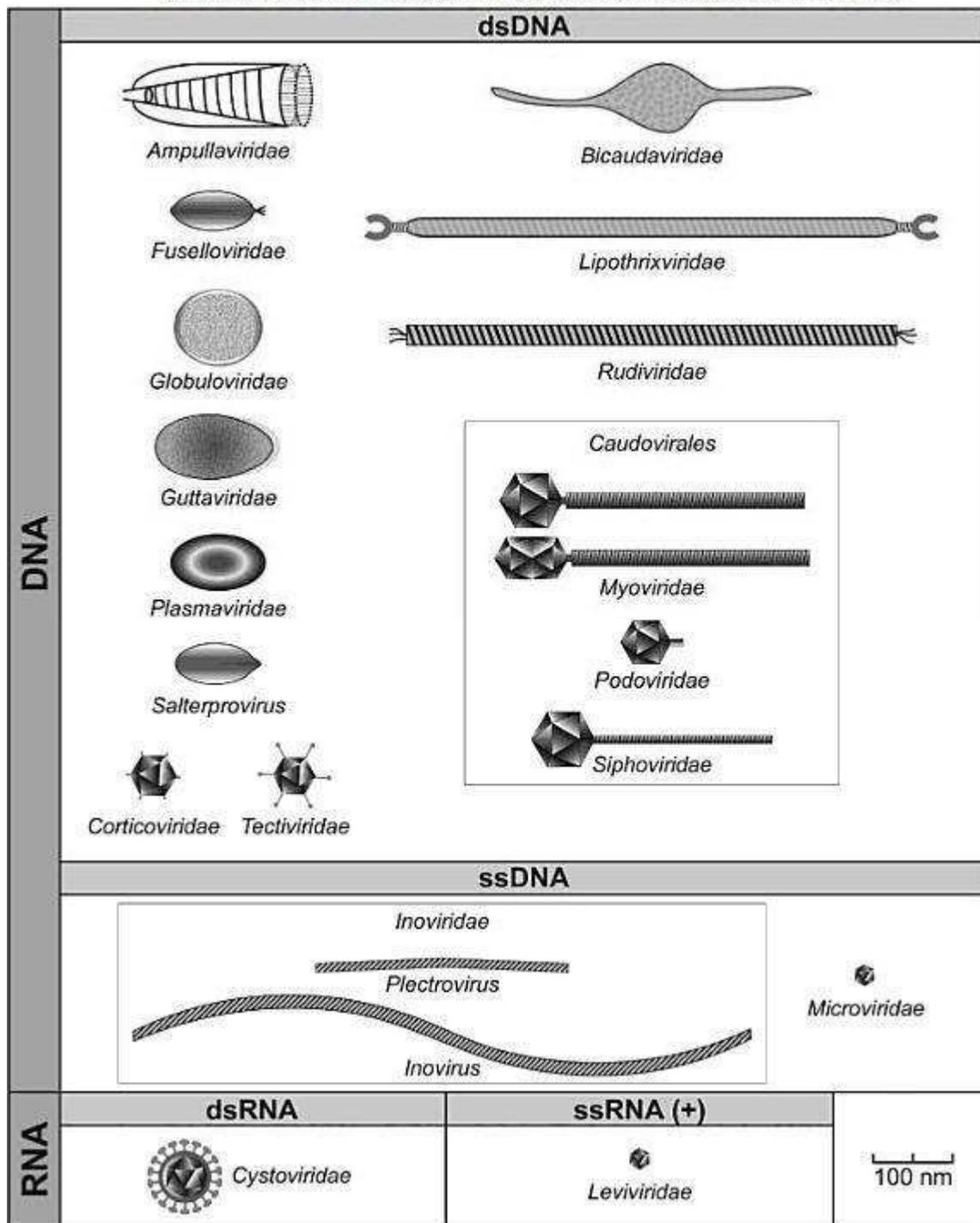


Figure 3. Représentation schématique des morphologies des virions des virus de procaryotes (King *et al.*, 2011).

### 3.2. La nomenclature des virus des procaryotes

Différentes approches pour la nomenclature virale ont été proposées. Pour l'instant, les virus de bactérie ont été nommés en utilisant des lettres grecques (ex :  $\phi, \lambda, \dots$ ) ou romaines, des codes numériques (ex. phage 68), des morphologies particulières (ex. Rosebush), des références à des personnes ou des sources d'isolement (ex. Twort, Berlin) et même d'après des créatures imaginaires (ex. Tweety) (Kropinski *et al.*, 2009). Alors que la créativité des noms n'est pas remise en cause, un problème fondamental se présente car il n'existe pour l'instant pas de nomenclature rationnelle de virus utilisée par le monde scientifique. L'ICTV propose une nomenclature des taxons viraux, mais pas de nomenclature pour des virus individuels. Cette nomenclature repose sur l'utilisation des noms de taxon d'ordre supérieur déjà existant quand cela est possible, l'abandon des noms faisant référence à des personnes, l'utilisation des noms faciles (avec peu de syllabes et de caractères peu communs) et l'abandon de l'utilisation de caractères spéciaux (lettre grecque, indice, exposant, trait d'union, bar oblique) sauf les sigles couramment utilisés (ex. en médecine) (base de données ICTV).

Une nomenclature, basée les propriétés biologiques et structurales des virus, a été proposée en 1966 par les auteurs Gibbs, Harrison, Watson et Wildy (système de nomenclature dit « G.H.W.W. ») (Gibbs *et al.*, 1966). Cette nomenclature s'exprime sous la forme d'un cryptogramme. Ainsi, le virus de l'herpès est identifié ainsi :

$$\text{virus de l'herpès} = \frac{D}{2}, \frac{74}{X}, \frac{S}{S}, \frac{V}{0}$$

où "D" signifie ADN, "2" le nombre de brin, "74" le poids moléculaire de l'ADN, "X" le pourcentage d'acide nucléique, "S" la forme sphérique de la particule virale et la forme sphérique du nucléocapside, "V" pour l'hôte qui est un vertébré et "o" signifie qu'aucun vecteur n'est connu pour ce virus. Bien que plus structuré, ce type de nomenclature a été critiqué pour sa complexité par les défenseurs de la nomenclature binomiale, comme Lwoff (Lwoff, 1967).

Une nomenclature plus récente sous forme d'un code a été proposée pour les virus de procaryotes par Kropinski, Prangishvili et Lavigne (Kropinski *et al.*, 2009). Le nom du virus serait alors constitué :

- a) d'un préfixe basé sur le domaine de la cellule hôte (Bactérie/Archée) sous forme de vB (pour bactérie) et vA (pour archée)
- b) d'une abréviation désignant l'hôte (Genre-Espèce) et analogue à la nomenclature des enzymes de restriction (ex. Eco pour *Escherichia Coli*)
- c) d'une lettre désignant la famille du virus (ex. A pour *Ampullaviridae* – les auteurs proposent un tableau avec des lettres associées aux familles virales)
- d) d'un nom commun choisi par le laboratoire qui caractérise le virus (les auteurs proposent qu'une combinaison de lettres/numéros soit longue d'au moins de trois caractères et que soient évités : l'alphabet grec (celui-ci peut être écrit comme sous forme latine, "φ" devenant " phi "), les nombres romains, les nombres "0" et "1" et les lettres "O" et "I" (ces dernières pouvant être confondues entre elles), ainsi que les indices et exposants.

Ainsi, en utilisant ce système, le phage P<sub>1</sub> deviendrait vB\_EcoM-P<sub>1</sub> pour « virus de bactérie, *Escherichia coli*, *Myoviridae*, virus P<sub>1</sub> ».

Malgré les différents systèmes de nomenclature proposés, aucun n'est encore majoritairement utilisé à ce jour.

## 4. Les cycles viraux

Les virus de procaryotes peuvent se multiplier selon plusieurs stratégies différentes : le cycle lytique, le cycle lysogène, l'interaction pseudolysogène et l'infection chronique (Ackermann & DuBow, 1987; Weinbauer, 2004).

Les virus utilisant le cycle lytique comme mode de multiplication sont dénommés « virulents » ou « lytiques ». Le cycle lytique peut être divisé en quatre étapes : l'adsorption, l'infection, la multiplication et la libération des particules virales. La première étape consiste en la reconnaissance de récepteurs viraux sur la surface de la cellule hôte par les particules virales (inertes), suivi de l'attachement de ces particules. Au cours de la deuxième étape, le génome viral est injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte, la structure capsidiale du virus restant vide sur la surface cellulaire. Chez les myovirus, cela est associé à la contraction de la queue du virion. La phase de la multiplication des particules virales, correspondant à la

phase de latence dans un suivi de croissance viral, correspond au moment où la machinerie répliquative de la cellule hôte est détournée par le virus infectant afin de répliquer son propre génome, suivi par fabrication de particules virales par la cellule hôte et enfin l'encapsidation des nouveaux génomes viraux dans les capsides protéiques. Après la maturation des virions, ceux-ci sont libérés par lyse cellulaire causée par des lysozymes viraux. Le nombre de virions libérés par cellule, ou « Burst Size », dépend des virus. Pour le bactériophage T<sub>1</sub>, le nombre de particules virales libérées varie entre 20 et 1000, mais ce nombre peut aller jusqu'à 10250 chez les *Leviviridae* (Ackermann & DuBow, 1987).

Le cycle lysogène est réalisé par les virus « lysogènes » ou « tempérés ». Les deux premières phases du cycle sont identiques (adsorption, infection) à celle du cycle lytique. Le virus peut ensuite poursuivre en cycle lytique ou devenir un prophage. Dans ce cas, il peut loger sous forme de plasmide dans la cellule ou s'intégrer dans le chromosome de la cellule hôte. Les gènes codant pour le cycle lytique sont alors réprimés. La cellule devient « lysogène » et le génome du prophage est répliqué de manière synchrone avec le génome de la cellule, à priori, indéfiniment. L'équilibre peut être rompu en cas d'induction, où des conditions le plus souvent défavorables à l'hôte font que le prophage bascule vers le cycle lytique. La répression génique est levée et l'expression des gènes du cycle lytique est engagée. Il en résulte l'excision du prophage du génome de l'hôte et sa répllication de la manière décrite dans le cas du cycle lytique. La lysogénie peut apporter des bénéfices à la cellule hôte, comme l'immunité à la surinfection d'autres phages le plus souvent apparentés. En revanche, si les phages ne sont pas homoimmunes, en général plusieurs prophages peuvent loger simultanément dans le génome de l'hôte, on parle alors de « polylysogénie » (Ackermann & DuBow, 1987).

Les virus peuvent interagir avec leurs hôtes dans un état dit de « pseudolysogénie ». Il s'agit d'un état où le virus persiste sous forme de génome libre dans la cellule hôte, se maintenant de manière stable dans la lignée cellulaire dont le cycle se déroule sans aucune dégradation du génome viral. Cet état permet ainsi le redémarrage ultérieur du développement du virus (Los & Wegrzyn, 2012). Ripp et Miller (Ripp & Miller, 1997) décrivent la pseudolysogénie comme étant un état transitoire, entre l'état lysogène et l'état virulent, qui devient persistant sous certaines conditions. Dans ce modèle, l'hôte doit être en carence nutritive et donc d'énergie. Lors de l'infection, le virus injecte son génome dans la cellule hôte, mais est incapable de devenir lysogène ou d'entamer un cycle lytique. Il se maintient donc sous forme libre dans la cellule. Lorsque les conditions changent, l'expression des gènes lysogènes ou lytiques définira ensuite le cycle qu'entamera le virus. La cellule hôte peut être curée du phage lors de l'infection lysogène par excision sans cycle lytique ou de l'infection pseudolysogène par ségrégation (Ackermann & DuBow, 1987; Weinbauer, 2004).

Enfin, dans le cas de figure d'une « infection chronique », le virus se maintient dans la cellule hôte qui produit régulièrement des virus. Les cellules hôtes, dans un « état porteur », semblent se diviser normalement tout en produisant des particules infectieuses par bourgeonnement (sans lyse cellulaire), phénomène notamment observé chez les archées halophiles (Porter *et al.*, 2007) et thermophiles (Geslin *et al.*, 2003a). Dans le cas du virus SDNV infectant *Sulfolobus neozealandicus*, il existe probablement un équilibre entre la croissance de la population hôte et la production virale qui, une fois rompue, aboutit à la lyse cellulaire ou, au contraire, à une lignée cellulaire curée.

Les différents types de cycles viraux sont résumés dans la Figure 4.

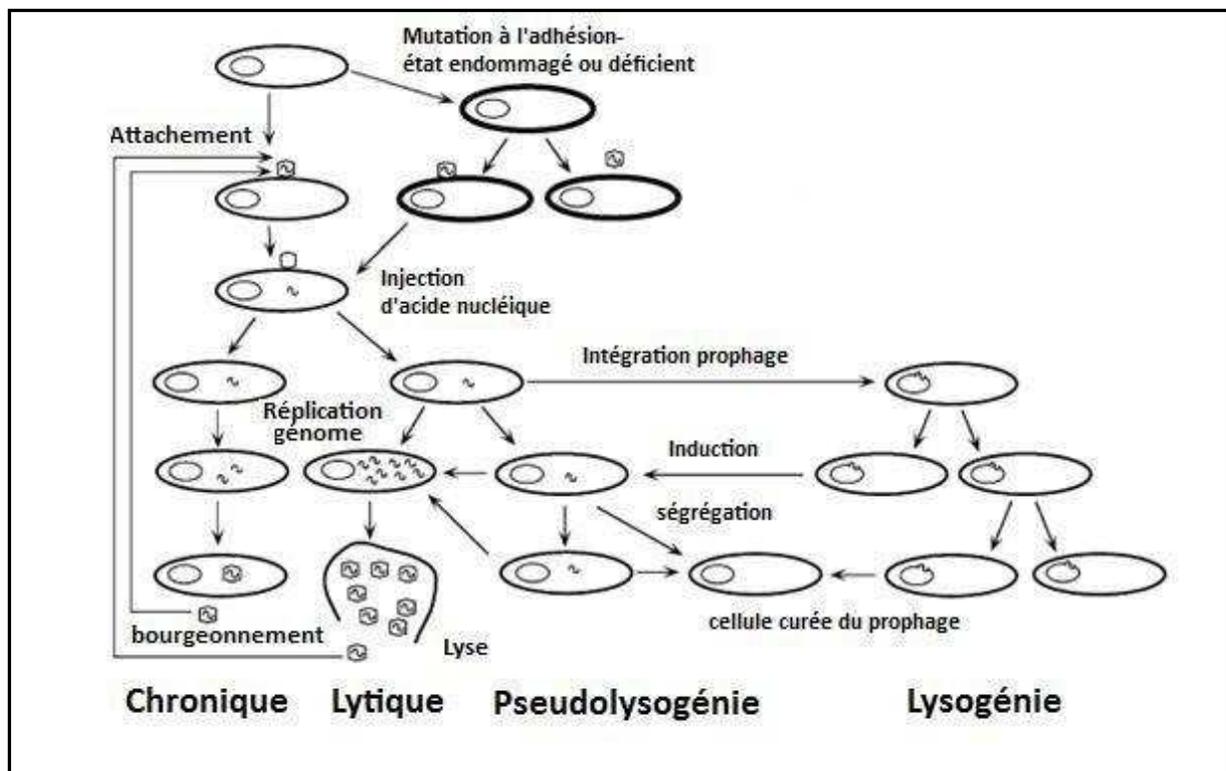


Figure 4 : Représentation schématique des cycles viraux, de gauche à droite : cycle chronique, cycle lytique, cycle pseudolysogène et cycle lysogène (d'après Weinbauer, 2004).

## 5. La génomique des virus des procaryotes

A l'heure actuelle (02.2013), il existe dans la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI) 3027 génomes de virus séquencés, dont 2268 génomes d'eucaryavirus, 721 génomes de bactériovirus et seulement 38 génomes d'archéovirus. Le nombre de génomes complets séquencés d'eucaryotes est de 158, de 2351 bactéries et de 144 d'archées. On peut constater que le nombre de génomes séquencés de virus d'eucaryotes est environ 14 fois plus important que le nombre de génomes d'organismes eucaryotes, ce qui pourrait s'expliquer par la grande taille des génomes eucaryotes d'une part et par l'intérêt médical de séquencer des génomes de virus d'eucaryotes d'autre part. En revanche, le nombre de génomes de bactérie séquencés excède largement le nombre de génomes de phage séquencés (2531 contre 722), ceci étant probablement le reflet de l'intérêt médical porté envers les bactéries potentiellement pathogènes. Dans les bactéries séquencées logent également un grand nombre de prophages, dont le nombre pourrait excéder celui des phages séquencés (Hatfull, 2008). La découverte récente des archées et la découverte encore plus récente de leurs virus expliquent, sans doute, le faible nombre des deux types de génomes séquencés proportionnellement aux autres.

### 5.1. La génomique des bactériophages

En 1976 a été publié le tout premier génome viral (à ARN) d'un virus infectant un procaryote, le bactériophage MS2 (Fiers *et al.*, 1976) et en 1977 le premier génome viral à ADN infectant une bactérie, le virus  $\phi$ X174 (Sanger *et al.*, 1977). Le génome du virus  $\phi$ X174 est également le premier génome synthétisé *in vitro*, ayant donné des virus viables, à partir de fragments d'ADN de 5-6 kb par ligation séquentielle et réaction de PCR (Smith *et al.*, 2003).

Les génomes des bactériophages varient considérablement en taille, allant de 2435 bp chez le phage L5 de *Leuconostoc* à 316 674 bp chez le phage 201-phi2-1 infectant le genre *Pseudomonas*. Par contre, la distribution des tailles de génome n'est pas uniforme (Figure 5); il y a une prédominance sur trois gammes de taille de génome : entre 30 kb et 50 kb (constituant environ 50 % des génomes séquencés), entre 5 kb et 10 kb (représentant environ 20 % des génomes séquencés) et entre 100 kb et 200 kb (environ 6 % des génomes séquencés). Il est très probable que cette distribution ne reflète pas la réalité, mais résulte d'un biais imputable aux méthodes d'isolement des virus et des technologies de séquençage disponibles au moment de leur séquençage (Hatfull, 2008).

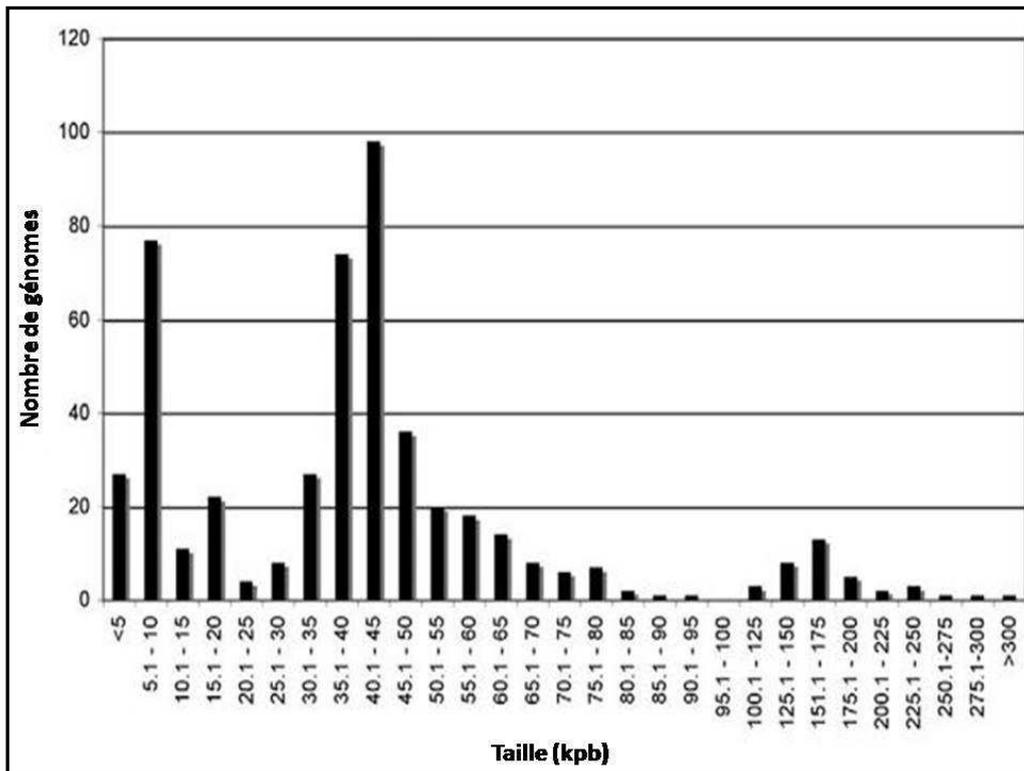


Figure 5 : Représentation des tailles de génome de phages (d'après Hatfull, 2008).

La diversité génomique des phages semble remarquable et ceci malgré un échantillon de génomes séquencés hautement biaisé par rapport au nombre total de particules virales estimé de  $\sim 10^{31}$  (Hendrix, 2003; Hatfull, 2008). En général, les séquences génomiques de phage, dont la gamme d'hôte ne se chevauche pas, partagent rarement des similarités de séquence. Il est donc probable que ces phages soient, au moins transitoirement, isolés génétiquement l'un de l'autre (Hatfull, 2008). Il se pourrait même que les séquences de gènes vraisemblablement homologues aient divergé à ne plus pouvoir en reconnaître l'homologie au cours de l'évolution. Un exemple appuyant cette hypothèse est l'étude structurale de la protéine majeure de la capsid des phages P22 et HK97 par microscopie cryoélectronique, qui démontre une conformation identique entre les sous-unités capsidiques de ces deux phages et ce malgré l'absence de similarité de séquences entre ces sous-unités (Hendrix, 2003; Jiang *et al.*, 2003).

## 5.2. Le mosaïsme des génomes viraux

Des études de génomique comparative menées chez les bactériophages caudés, notamment chez les virus de bactéries lactiques, les mycobactériophages et les phages dits « lambdaïdes » de bactéries entériques (Juhala *et al.*, 2000; Proux *et al.*, 2002; Pedulla *et al.*, 2003), suggèrent une architecture génomique des phages de type mosaïque. Selon ce modèle, les génomes de phage seraient organisés en modules génétiques codant pour des fonctions (morphogénèse de la capside, encapsidation du génome, établissement de la lysogénie, réplication du génome et recombinaison et régulation de transcription) qui subissent des modifications et des échanges par recombinaison génétique avec des modules d'autres phages. Chaque génome peut alors être considéré comme une combinaison unique de ces modules (Hendrix, 2003; Hatfull, 2008; Krupovic *et al.*, 2011). La taille ainsi que le taux d'échange de ces modules varient beaucoup selon les phages de morphologies différentes, selon la taille des phages et selon leur gamme d'hôte (Hendrix *et al.*, 1999). Ces modules peuvent être des groupes de gènes régulés par un promoteur commun, mais sont le plus souvent constitués d'un seul gène. Les modules les plus petits peuvent être composés de simples fragments de gènes codant uniquement pour des domaines protéiques, alors que les plus grands peuvent être constitués de larges blocs de gènes, qui peuvent faire jusqu'à la moitié du génome du phage. Deux modèles ont été proposés pour ce type d'échange génétique horizontal. Le premier propose qu'il existe de courtes séquences conservées entourant les modules, qui serviraient de site pour la recombinaison homologue. Bien que de courtes séquences conservées de ce type aient été décrites, leur rôle demeure ambigu et le modèle proposé expliquerait difficilement la plupart des échanges de module constatés. Selon le second modèle, les recombinaisons se produiraient aléatoirement et de manière non-homologue, donnant naissance à un grand nombre de descendants non-viables. Seules les « bonnes » recombinaisons, se faisant de manière à ne pas handicaper les fonctions importantes et de manière à ce que le génome résultant ait une taille « viable », soient alors sélectionnées. Ces recombinaisons se font donc à des jonctions neutres, tels que les jonctions entre les gènes, et peut donner l'impression d'un processus prémédité. Les recombinaisons multiples, ainsi que l'importante abondance des phages, permettraient de contrebalancer la faible fréquence des recombinaisons viables (Hendrix, 2003; Hatfull, 2008). La recombinaison entre prophages logeant dans le même génome bactérien a également été décrite. La comparaison des génomes de deux souches d'*Escherichia coli* suffisamment divergés a permis d'identifier le même nombre de prophages, localisés dans les mêmes sites, dans les deux génomes bactériens. Malgré le nombre et les sites de prophages conservés entre les deux génomes, les séquences des prophages présentent cependant des différences dues à de la recombinaison entre prophages du même génome hôte (Casjens, 2003). Étant donné que les phages subissent de la recombinaison avec des prophages lors d'une infection, la recombinaison entre prophages est une source de diversité retrouvée chez les phages. Les

bactériophages strictement lytiques constituent un cas particulier. Etant donné que les phages lytiques ne deviennent à priori jamais des prophages, se pose la question de l'accès à ces échanges de gènes chez les phages virulents. L'ADN de l'hôte étant dégradé lors du cycle lytique, la possibilité d'un transfert horizontal via la recombinaison diminue probablement nettement par rapport aux phages tempérés. Certaines études suggèrent que les phages virulents pourraient former des groupes cohérents du fait du nombre d'échanges limités qu'ils ont avec des séquences extérieures à leur groupe (Hendrix, 2003).

Outre les échanges génétiques qui se font par recombinaison non homologue, les génomes viraux peuvent également augmenter de taille par l'addition de « morons ». Les morons (pour « more DNA ») sont des fragments d'ADN composés d'un gène flanqué entre un promoteur de transcription et un terminateur de transcription facteur-indépendant, ce qui permet leur expression autonome même à partir d'un prophage réprimé. La composition en nucléotides (comme le pourcentage de G+C par exemple) des morons est différentes de celle des gènes avoisinants, ce qui suggère fortement leur arrivée récente dans les génomes viraux où ils se trouvent. Le mécanisme par lequel ils s'intègrent n'est pas clair, mais une hypothèse plausible est la recombinaison non homologue, responsable des échanges de modules (Hendrix *et al.*, 2000; Juhala *et al.*, 2000; Hendrix *et al.*, 2003).

### 5.3. La génomique des virus d'archées

Tous les archéovirus décrits jusqu'à présent n'infectent que des représentants de deux des principaux phyla du domaine des Archées : Les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota*. Les virus des crenarchées ne partagent pratiquement aucune similarité de séquences avec les virus d'euryarchées et sont souvent, de ce fait, discutés séparément (Krupovic *et al.*, 2011; Pina *et al.*, 2011). Tous les virus d'archées contiennent de l'ADN double brin (excepté deux virus, dont un hyperthermophile et un halophile, dont le génome est constitué d'ADN simple brin) et on ne connaît pour beaucoup de familles de virus d'archées qu'un seul représentant. En conséquence, peu d'études comparatives et de scénarios évolutifs ont pu être menés jusqu'à présent. De plus, une des propriétés communes à tous les virus d'archées est la très faible proportion des gènes dont la fonction peut être inférée par comparaison avec des gènes disponibles dans les bases de données (Krupovic *et al.*, 2011; Krupovic *et al.*, 2012).

La diversité des morphotypes des virus associés aux euryarchées est considérée comme étant moins importante que celle des crenarchées. Tous les virus d'euryarchées isolés peuvent être répartis en trois groupes morphologiques: les virus à morphologie tête-queue (ressemblant aux virus bactériens de l'ordre des *Caudovirales*), les virus icosaédriques sans queue et les virus en forme de citron ou pléomorphes. Les analyses comparatives ont

révélé que l'évolution des génomes des virus d'archées de morphologie du type tête-queue est régie par les mêmes mécanismes que ceux décrits chez leurs homologues bactériens. Ils subissent également des recombinaisons non homologues, de l'acquisition de gènes provenant de différentes sources et des réarrangements intergénomiques (Krupovic *et al.*, 2011).

Les virus à ADN double brin des crenarchées hyperthermophiles sont pour leur part très diversifiés morphologiquement et génétiquement. Des études de génomique comparative ont pu démontrer que ces virus de familles différentes partagent néanmoins un petit pool de gènes commun, ainsi qu'avec leurs hôtes. La plupart de ces gènes communs codent pour des protéines impliquées dans les processus génétiques, tels que la réplication d'ADN, la recombinaison, la régulation transcriptionnelle, ainsi que dans le métabolisme des acides nucléiques et de leurs modifications. Ces gènes sont vraisemblablement échangés entre virus non apparentés et entre les virus et leurs hôtes qui partagent une même niche écologique (Prangishvili *et al.*, 2006b; Krupovic *et al.*, 2011; Krupovic *et al.*, 2012). Les virus filamenteux de la famille des *Rudiviridae* et de la famille des *Lipothrixviridae* partagent au moins 9 gènes en commun. Des études structurales ont également permis de découvrir des ressemblances au niveau de la protéine majeure constitutive de la capsid des deux familles de virus, ce qui semblait a priori contre-intuitif. En effet, les lipothrixvirus possèdent des virions flexibles et enveloppés dans une couche lipidique, alors que les virions de rudivirus ne sont ni enveloppés, ni flexibles. S'appuyant sur ces résultats, l'ordre des « *Ligamenvirales* » a été proposé pour regrouper ces deux familles (Krupovic *et al.*, 2011; Prangishvili & Krupovic, 2012).

## 6. L'évolution des virus – comparaison structurale

La comparaison de génomes viraux permet de reconstruire des phylogénies de gènes et d'observer les relations entre génomes. Par contre, cette approche n'est applicable qu'à des systèmes relativement proches sur l'échelle temporelle de l'évolution, ou qui s'échangent du matériel génétique, afin que les similarités de séquence puissent être détectables et comparables. Pour des périodes de temps plus étendues, en raison d'un taux d'évolution relatif élevé, les séquences virales deviennent trop éloignées pour être comparées. Malgré cela, on peut constater des similarités de structure chez les différents virus. En se basant sur ces constatations et sur l'hypothèse que les virus sont des entités apparues très tôt dans l'évolution, les auteurs Bamford, Burnett et Stuart (Bamford *et al.*, 2002) proposent de s'appuyer sur des critères de similarité structurale pour postuler la parenté des différentes familles virales et créer des lignées virales. En effet, par comparaison des protéines majeures de capsid entre des virus d'animaux et des virus de bactéries, les auteurs constatent une similarité conformationnelle dans le repliement de ces

protéines, s'étendant jusqu'aux détails. Ils parlent alors d'un « moi » virale (« self » en anglais) qui reste le même à travers le temps, malgré les modifications constantes des génomes viraux. Ils proposent ainsi trois lignées de virus : les virus icosaédriques à ADN double brin du type PRD<sub>1</sub>/Adeno, les virus caudés à ADN double brin (incluant le virus de l'herpès) du type HK97 et les virus à ARN double brin du type BTV (Bamford *et al.*, 2002; Bamford *et al.*, 2005) (Figure 6). Après la découverte du virus icosaédrique STIV infectant l'archée hyperthermophile *Sulfolobus solfataricus*, la morphologie icosaédrique a pu être observée chez des virus infectant les trois domaines de la vie (Rice *et al.*, 2004). Des études structurales sur le virion du STIV ont en effet révélé des similarités importantes avec les protéines structurales des virus de la lignée du type PRD<sub>1</sub> (Bamford *et al.*, 2005; Maaty *et al.*, 2006). Par ces observations, Bamford propose un modèle évolutif où les cellules modernes seraient issues d'une lignée monophylétique tardive et les virus proviendraient de lignées polyphylétiques (Figure 7) (Bamford, 2003; Bamford *et al.*, 2005). Une quatrième lignée a été ensuite ajoutée, regroupant les virus du type « picorna » (Figure 8) (Abrescia *et al.*, 2010; Abrescia *et al.*, 2012).

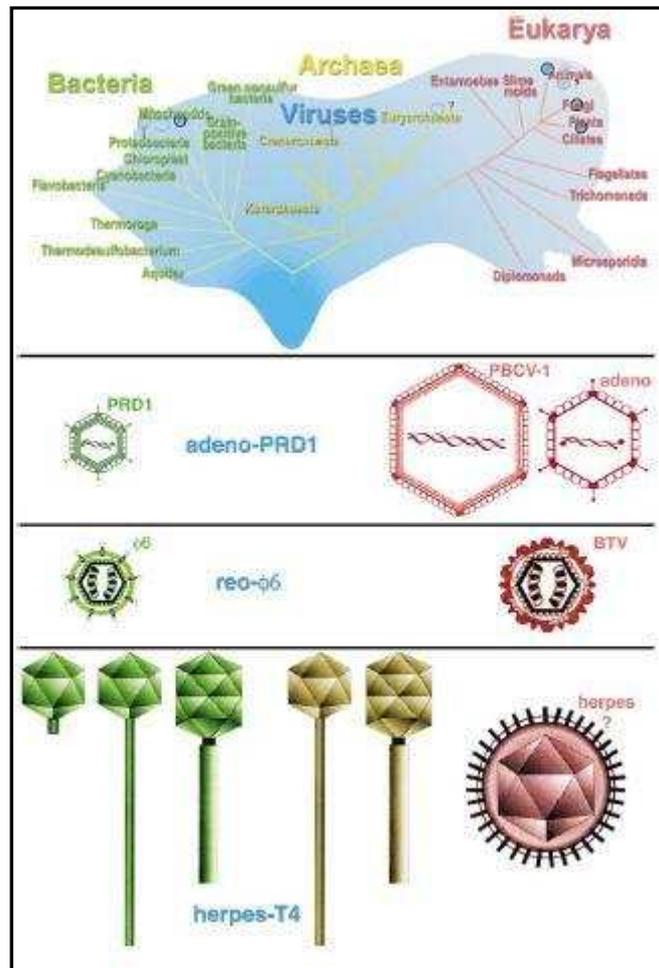


Figure 6 : Représentation des lignées virales selon la comparaison structurale des capsides (d'après Bamford *et al.*, 2002)

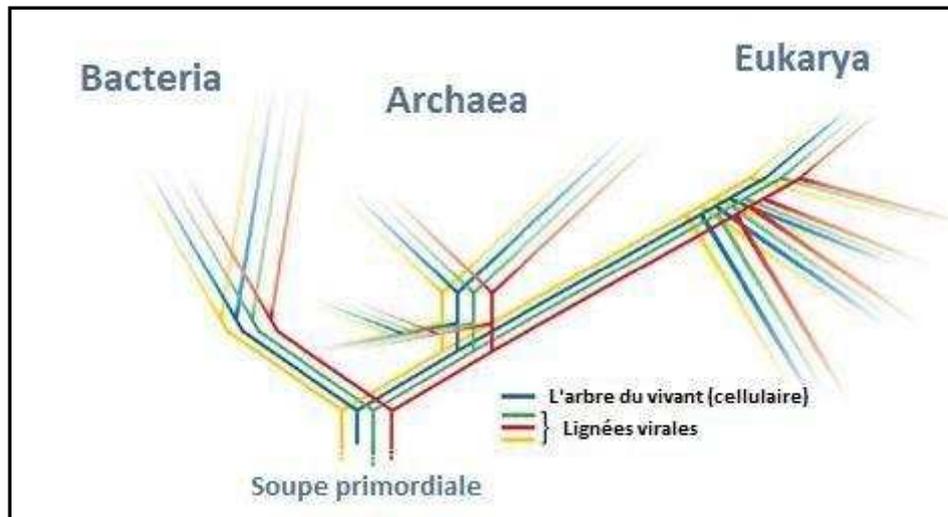


Figure 7 : Représentation des lignées polyphylétiques virales et monophylétique cellulaire (d'après Bamford, 2003).

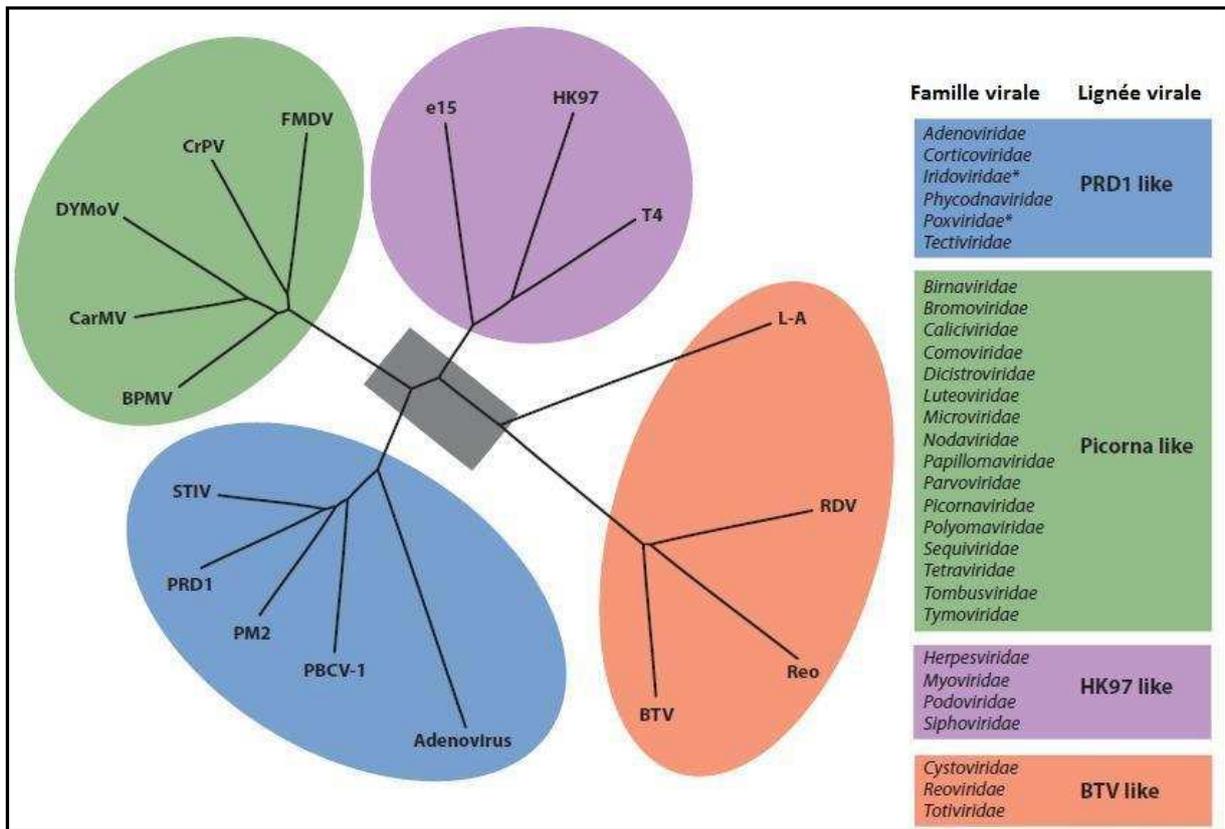


Figure 8 : Représentation des lignées virales selon la comparaison structurale des capsides (d'après Abrescia *et al.*, 2012).

## 7. L'origine des virus

L'origine des virus demeure énigmatique. Le caractère ancien des virus est soutenu par certaines propriétés des virus, comme par exemple l'existence de virus à génome composé d'ARN simple ou double brin infectant des cellules d'eucaryotes et de bactéries (et ceux-ci étant homologues entre eux). Les génomes à ARN pourraient être des reliques d'un monde ancien antérieur à l'ADN, le monde à ARN « RNA world ». A partir de cette supposition, trois hypothèses pour l'apparition des virus ont été postulées : 1) l'hypothèse « le virus d'abord », 2) l'hypothèse « de la réduction », 3) l'hypothèse « d'échappement » (Forterre, 2006, 2009).

L'hypothèse du « virus d'abord » propose que lors du règne du monde à ARN, des réplicons individuels existaient dans une soupe primordiale et les virus auraient émergé comme parasites à ces réplicons. Cette hypothèse suppose une apparition des lipides membranaires, et donc des cellules, relativement tardive sur l'échelle de l'évolution (d'où le nom de l'hypothèse du « virus d'abord » par rapport à l'apparition des cellules). Cette hypothèse permettrait d'expliquer, au moins partiellement, l'origine des membranes cellulaires des archées et des bactéries dont la stéréochimie est différente. Malgré la possibilité du caractère parasite des virus primitifs, cette hypothèse est remise en question pour son modèle de métabolisme. L'apparition des ribosomes a dû précéder l'apparition des capsides et l'hypothèse de ribosomes libres dans la soupe primordiale semble peu probable (Forterre, 2006, 2009).

L'hypothèse « de la réduction » part d'une supposition d'un monde à ARN où les cellules seraient apparues sous forme de cellules à ARN. Parmi les proto-cellules auraient existé des cellules à ARN phagocytées par d'autres cellules qui auraient vécu avec ces dernières en endosymbiose. Les endosymbiontes auraient ensuite perdu leur machinerie répliquative et auraient utilisé celle de l'hôte. La capside, qui ressemble à la couche S des bactéries actuelles, aurait été formée par réduction membranaire. Par sélection Darwinienne, les endosymbiontes seraient devenues parasites d'autres cellules, des virus. La transformation de cellules en virus, dans cette hypothèse, est supposée être plus simple dans un monde ancestrale à ARN que dans le monde actuel (Forterre, 2006, 2009).

L'hypothèse de « l'échappement » suppose également un monde ancestral à ARN, où règnent les cellules à ARN et où la transformation de cellules en virus se ferait théoriquement plus facilement que dans le monde actuel. Dans cette hypothèse, les proto-cellules auraient eu un génome fragmenté. Ces fragments se seraient répliqués de manière semi-autonome et se seraient distribués dans des cellules filles de manière aléatoire. Par acquisition de la capacité d'encoder une capside, des fragments d'ARN auraient pu ensuite

être transféré d'une cellule à une autre et seraient devenus parasites (Forterre, 2006). Cette hypothèse viendrait rejoindre la théorie des morons de Hendrix et co-auteurs, dans laquelle ils émettent l'hypothèse d'un gène ayant muté pour donner naissance à une protéine qui se rassemble pour former une capsid. Cette capsid engloberait ensuite un réplicon, ce qui lui conférerait un avantage. Ensuite, par ajout de morons, des entités virales naîtraient (Hendrix *et al.*, 2000).

Les trois hypothèses ne prennent en compte que la naissance de virus à ARN. D'autres hypothèses ont été élaborées pour expliquer l'apparition des virus à ADN. Il est possible qu'ils soient apparus indépendamment les uns des autres, ce qui serait en accord avec le caractère polyphylétique proposé par Bamford (Bamford, 2003). Par contre, les homologues détectés au niveau structural et mécanique entre les répliques/transcriptases à ARN viral, les transcriptases inverses et ADN polymérases et les hélicases d'ARN et d'ADN suggèrent que les virus à ADN auraient évolué à partir des virus à ARN. Ceci serait également en accord avec l'existence de formes intermédiaires comme les rétrovirus et les hépadnavirus. En prenant en considération la diversité des virus à ADN, il n'est pas non plus exclu que les virus à ADN auraient évolué à partir des virus à ARN et qu'ensuite d'autres virus à ADN aient évolué à partir de cellules primitives à ADN en subissant des mécanismes de réduction similaires à ceux décrits dans l'hypothèse de « réduction ». La découverte du mimivirus plaiderait en faveur de ce type de scénario (Forterre, 2006).

D'autres hypothèses concernant l'évolution des virus et leur rôle dans l'établissement des lignées cellulaires actuelles postulent notamment que l'ADN aurait été inventé par les virus avant d'être transféré aux cellules (Forterre, 2001), ce transfert ayant été à l'origine des trois domaines du vivant (Bacteria, Archaea et Eukarya) (Forterre, 2006) et que les virus seraient à l'origine du noyau des eucaryotes (Bell, 2001; Takemura, 2001) et aussi à l'origine de la machinerie réplique des mitochondries et des chloroplastes (Filee & Forterre, 2005; Forterre, 2006).

## **8. Les méthodes de détection et de dénombrement des virus de procaryotes**

La quantité de particules virales estimée dans les océans est de l'ordre de  $10^{30}$  particules (Suttle, 2005). Il a été estimé que cette abondance de particules virales excéderait en moyenne d'un ordre de grandeur les particules planctoniques les plus abondantes après les virus, à savoir les bactéries. L'abondance des virus fluctue dans les différents écosystèmes aquatiques entre  $10^4$  et au-delà de  $10^8$  particules/ml (Wommack & Colwell, 2000). La connaissance de l'abondance virale n'apporte cependant pas d'information quant à l'infectiosité des particules virales. Certaines études suggèrent qu'une quantité non

négligeable de particules pourrait rester infectieuses malgré les dommages infligés par le rayonnement UV du soleil, notamment grâce à la photoréactivation de la cellule hôte (Wilhelm *et al.*, 1998). Des particules virales pourraient même garder leur caractère infectieux pendant des dizaines d'années, voir une centaine d'années, dans les sédiments (Suttle, 2005). Les microorganismes constituent 90 % de la biomasse vivante (Figure 9) dans les océans et jouent un rôle primordial dans les cycles nutritifs et énergétiques. Il est estimé que 20 % de cette biomasse est détruite tous les jours par les virus, révélant ainsi l'importante incidence des virus dans le flux de matière et d'énergie, ainsi que leur rôle dans la régulation des populations microbiennes (Suttle, 2007).

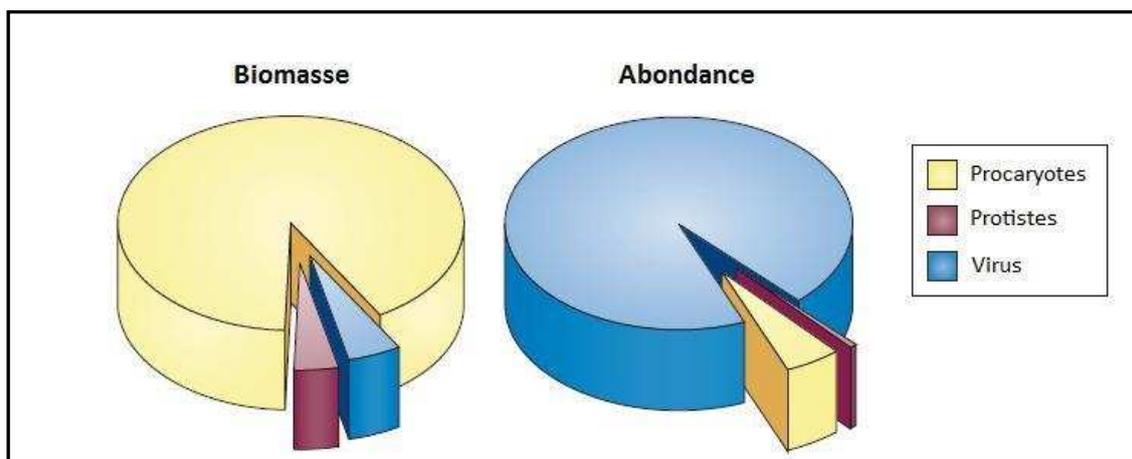


Figure 9 : Représentation de la biomasse et de l'abondance relative des microorganismes et des virus (d'après Suttle, 2007).

Il existe actuellement cinq méthodes qui sont utilisées pour quantifier les virus de procaryotes : i) la technique de plages de lyse, ii) la technique du nombre le plus probable, iii) la microscopie électronique à transmission, iv) la microscopie à épifluorescence et v) la cytométrie en flux. Les deux premières méthodes, qui sont des techniques de dénombrement culturales, sont dites « indirectes », à la différence des autres méthodes, qui sont qualifiées de « directes » car reposant sur des observations en microscopie (Tableau 1).

### 8.1. Les méthodes indirectes

La technique de plages de lyse consiste à utiliser des échantillons naturels qui sont mélangés à du milieu de culture nutritif chauffé et contenant un agent gélifiant. A ce mélange sont ensuite ajoutées des cellules d'une souche microbienne choisie. Le tout est ensuite coulé dans une boîte de Pétri contenant déjà une couche composée du même milieu nutritif, ainsi que d'un taux plus élevé d'agent gélifiant. On obtient ainsi une boîte avec une double couche, qui est mise à incuber. Cette méthode peut être également faite en simple couche. L'apparition des plages de lyse permet ensuite le dénombrement viral sous forme « d'agent formant des plages » (« Plaque-forming units » ou PFU). Le titre est ainsi déterminé et exprimé sous forme de PFU/ml dans l'échantillon de départ (Grabow, 2001; Suttle, 2007). L'autre technique culturale pour le dénombrement des virus est la méthode

du nombre le plus probable (NPP, ou en anglais MPN pour « most probable number »). Cette méthode est également basée sur la mise en culture de l'échantillon brut avec une souche choisie. Le milieu de culture sous forme liquide permet la culture des souches qui ne poussent pas sur milieu solide. Une gamme de dilution de l'échantillon dans le milieu est établie avec plusieurs réplicats par dilution. Les réplicats avec une absence de croissance de la souche, ou avec une croissance de la souche suivie par une lyse, sont considérés comme contenant au moins une particule virale. Le nombre de réplicats lysés peut être utilisé pour calculer le nombre de particules virales. Etant donné que cette technique est basée sur l'utilisation de souches spécifiques, elle peut être utilisée pour la détection de phages dans l'eau potable. Ce système favorise la sensibilité de détection de phages, celle-ci étant plus sensible en milieu liquide qu'en milieu gélifié. Les phages des lysats peuvent être ensuite isolés et caractérisés (Kott, 1965; Grabow, 2001; Suttle, 2007).

Ces deux méthodes de dénombrement par approche culturale reposent sur l'utilisation de souches particulières. De ce fait, elles ne sont applicables qu'à certains types de virus spécifiques des souches choisies. Parmi ces virus, ces méthodes ne permettent la détection que des virus lytiques et ayant gardé leur capacité infectieuse. Elles ne fournissent aucune information quant à l'abondance totale des particules virales dans l'échantillon de départ. Les particules détectées pouvant être, dans un second temps, purifiées et caractérisées, les techniques de plages de lyse et du NPP sont donc plutôt adaptées à des études qualitatives que quantitatives (Grabow, 2001; Suttle, 2007).

Technique	Avantages	Désavantages
<b><u>Techniques indirectes:</u></b>	Bonne limite de détection	Forte sous-estimation de l'abondance totale de virus
<i>Plages de lyses et nombre le plus probable</i>	Discrimination entre virus infectieuses et virus non "viables"	Détection limitée aux virus lytiques et ayant gardés leur capacité infectieuse
	Possibilité d'isolement de virus	Obligation de l'isolement et culture des cellules hôtes
	Possibilité de la caractérisation morphologique et biochimique des virus	
<b><u>Techniques directes:</u></b>	Dénombrement de l'abondance totale des virus	Equipement coûteux nécessaire
<i>Microscopie électronique à transmission (MET)</i>	Discrimination entre virus et acides nucléiques libres et particules colloïdales associées à de l'ADN	Application sur le terrain impossible
	Identification morphologique des virus et possibilité de découverte de nouveaux types de virus	Pas d'information quant à la capacité infectieuse des particules dénombrées
		La matière particulaire peut masquer les particules virales
		Virus à morphologies inconnues potentiellement négligés
		Méthodologie exigeante en temps
		Faible précision et faible limite de détection
<b><u>Communs aux techniques basées sur la fluorescence</u></b>	Dénombrement de l'abondance totale des virus	Pas d'information quant à la capacité infectieuse des particules dénombrées
	Méthodologies peu exigeantes en temps	Discrimination entre virus et particules colloïdales associées à de l'ADN difficile/impossible
	Haute précision	Pas d'information sur la morphologie des particules virales
	Possibilité d'application sur le terrain	Distinction entre les procaryotes et les virus basée sur la taille et l'intensité des particules fluorescentes
<i>Spécifiques à la Microscopie à épifluorescence (ME)</i>	Matériel nécessaire relativement peu coûteux	
<i>Spécifiques à la Cytométrie en flux (CMF)</i>	Pas de limite de détection pour échantillons naturels	Equipement spécial nécessaire
	Distinction entre différentes classes de taille de génome	Nécessité d'expertise de cette méthodologie

Tableau 1. Tableau récapitulatif des avantages et désavantages des différentes méthodologies de dénombrement virales (adapté et modifié d'après Weinbauer, 2004).

## 8.2. Les méthodes directes

### 8.2.1. La microscopie électronique à transmission

En 1940, Ruska, Pfankuch et Kausche ont publié dans le même journal deux articles présentant les premières photos prise au microscope électronique à transmission (MET) de bactériophages (Pfankuch & Kausche, 1940; Ruska, 1940) (Figure 10).

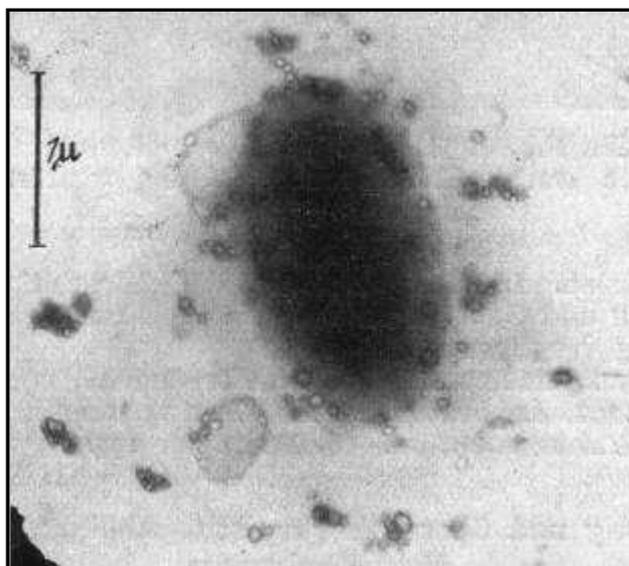


Figure 10 : Photo de microscope électronique, prise à un grossissement de 14 000 x d'une cellule d'*Escherichia coli* entourée de particules virales (d'après Ruska, 1940).

La coloration négative appliquée aux virus en microscopie électronique à transmission (MET) a été introduite en 1955 par le chercheur Hall, qui appliqua cette méthode pour visualiser des virus de plantes grâce à une coloration négative à l'acide phosphotungstique (Hall, 1955). En 1959, Brenner et Horne appliquèrent la coloration négative à la visualisation de bactériophages T2 d'*E. coli* (voir Figure 11) (Brenner *et al.*, 1959). Aujourd'hui, le phosphotungstate et l'acétate d'uranyle sont utilisés presque exclusivement lors des observations en microscopie électronique à transmission (Ackermann & Tiekotter, 2012).

Si la microscopie électronique est essentiellement consacrée aux études descriptives : l'identification et la caractérisation de virus, d'autres applications de la microscopie électronique incluent notamment la microscopie électronique à balayage, la cryo-microscopie électronique (avec ou sans reconstruction en trois dimensions), l'immunomicroscopie électronique, le sectionnement des cellules infectées et la technique d'ombrage des particules ou digestions enzymatiques sur grilles de microscopes. Cependant, ces techniques ne sont souvent pratiquées que par certains laboratoires spécialisés et sont de ce fait moins courantes. La MET est l'outil le plus couramment utilisé parmi les techniques de microscopie électronique appliquée à la virologie et permet

d'effectuer à la fois des études descriptives de virus et aussi du dénombrement (Ackermann & Haldal, 2010).

Les premiers dénombrements viraux directs ont été faits en MET et ont de suite révélé une abondance inattendue de particules virales (Torrella & Morita, 1979; Ewert & Paynter, 1980, 1980b), jusqu'à  $10^7$  fois plus élevée que l'abondance virale décrite dans les milieux aquatiques en utilisant la méthode indirecte des plages de lyse (Bergh *et al.*, 1989).

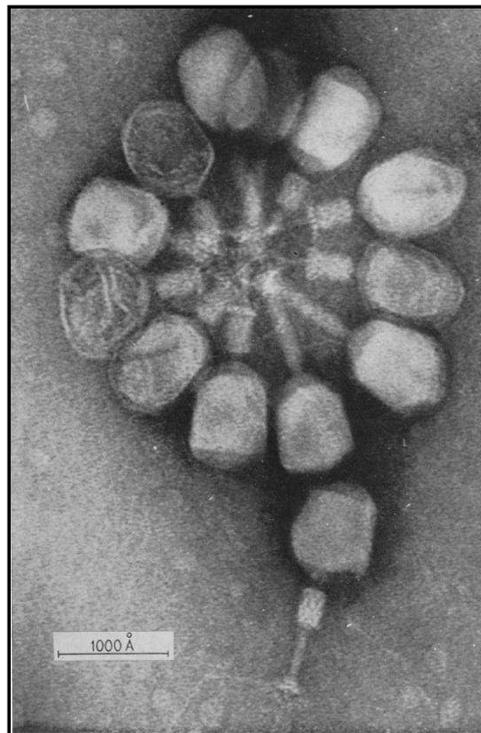


Figure 11 : Photo de microscope électronique de particules virales T2 (Brenner, 1959).

Plusieurs méthodes pour le dénombrement viral par la MET ont été développées. La première méthode a été développée par Riedel et Ruska, qui capturaient les virus en utilisant un spray d'agar à volume connu et qui passaient ensuite les gouttes au microscope électronique à transmission [(Riedel & Ruska, 1941) dans (Kellenberger & Arber, 1957)]. Sharp a ensuite développé une méthode de dépôt de particules virales par centrifugation sur des films collodion pour leur dénombrement [(Sharp, 1949), d'après (Kellenberger & Arber, 1957)]. Ewert et Paynter appliquent cette méthode pour le dénombrement des bactériophages dans les systèmes aquatiques. La sédimentation des particules virales est faite par ultracentrifugation à l'aide d'un rotor spécial permettant la sédimentation des particules sur de l'agar. Une empreinte à l'aide d'un film de collodion est faite à partir de la surface des blocs d'agar, puis contrastée et enfin observée au microscope (Ewert & Paynter, 1980b).

La méthodologie la plus communément utilisée actuellement en MET pour le dénombrement viral est la sédimentation des particules virales à partir des échantillons

d'eau brute, non filtrés et fixés au glutaraldéhyde, directement sur des grilles de MET, en cuivre recouvert d'un film Formvar (Wommack & Colwell, 2000). Les techniques développées se basent sur la centrifugation des particules virales à l'aide d'une ultracentrifugeuse. Les tubes à ultracentrifugation contiennent un support sur lequel sont fixées les grilles de MET à l'aide d'un scotch double-face. L'échantillon est ensuite ajouté dans ces tubes et l'ultracentrifugation permet de sédimenter les particules virales directement sur les grilles. Une fois la centrifugation terminée, les grilles sont récupérées et contrastées avec un agent contrastant tels que l'acétate d'uranyle à 2% et le dénombrement viral peut être fait (Borsheim *et al.*, 1990; Sime-Ngando *et al.*, 1996) (Figure 12 et 13).

La matière du support des grilles peut être une résine Epoxy (une colle à deux composants) (Borsheim *et al.*, 1990) ou un mélange commercial adéquat d'une résine polyester préaccélérée de type GTS et d'un durcisseur, le peroxyde d'éthylméthylcétone (Soloplast-Vosschemie, France) (Sime-Ngando *et al.*, 1996). L'ultracentrifugation se fait entre 80 000 g - 120 000 g entre 90 min et 2h dans un rotor de type « Swing-bucket » (Borsheim *et al.*, 1990; Sime-Ngando *et al.*, 1996) ce qui permet à priori la sédimentation des particules virales de manière perpendiculaire par rapport au fond des tubes.

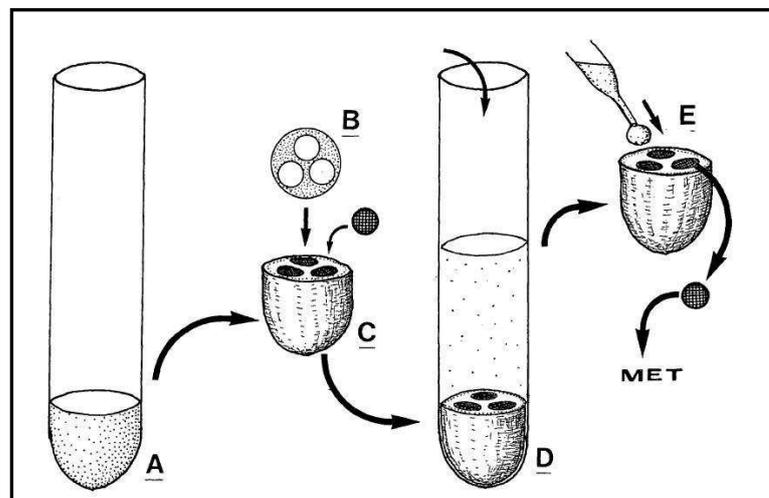


Figure 12 : Représentation schématique des principales étapes du protocole suivi pour collecter les particules virales sur grille MET. A) Le support est coulé dans un tube à ultracentrifugation et laissé durcir. B) Le support est enlevé du tube et du scotch double-face ayant trois trous est collé sur le support. Les grilles sont placées dans les trous du scotch. C) Le support est mis dans un tube à ultracentrifugation avec les grilles vers le haut du tube. D) L'échantillon à analyser est ajouté par-dessus le support et le tout est mis à centrifuger. E) Après centrifugation, les grilles sont récupérées, colorées et observées en MET (d'après Sime-Ngando *et al.*, 1996).

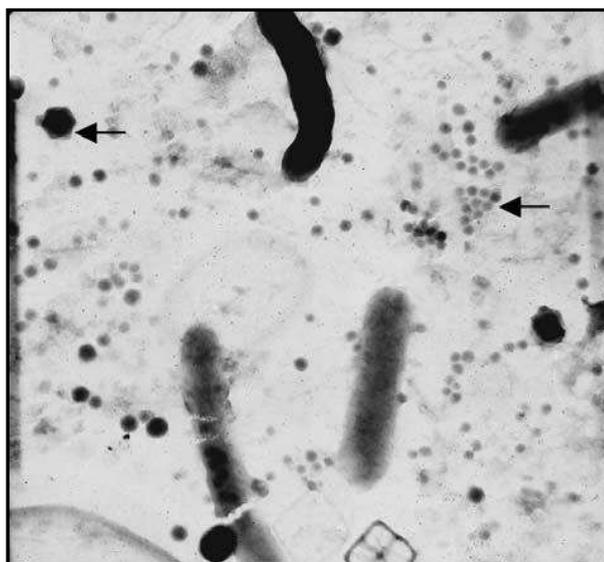


Figure 13 : Visualisation des virus et des bactéries, colorés à l'acétate d'uranyle provenant d'un échantillon d'eau brut de la Mer Adriatique. Les deux flèches indiquent deux particules virales de tailles différentes. Le virus en haut à gauche a une taille approximative de 150 nm (d'après Weinbauer 2004).

Alternativement, Montanié et collaborateurs passent par une étape de clarification par centrifugation à 3000 g pour se débarrasser des cellules avant de concentrer les particules virales. Après, les auteurs ultracentrifugent le surnageant à 150 000 g pour concentrer les virus, qui sont ensuite resuspendus dans un volume d'une solution tampon qui est déposée sur des grilles de MET. Les virus sont adsorbés sur les grilles et observés en MET après avoir été contrastés au phosphotungstate (Montanié *et al.*, 2002).

La limite de détection des particules virales, en utilisant la MET, est de l'ordre de  $10^4$  particules/ml (Ewert & Paynter, 1980b). L'un des désavantages de l'utilisation de la MET pour estimer l'abondance virale est la difficulté de détection des particules virales dans des échantillons qui ont une haute concentration en matière particulaire, tels que les débris cellulaires, qui masquent les virus. Ce problème a été soulevé notamment par Wommack et collaborateurs dans les échantillons marins de Chesapeake Bay (Wommack *et al.*, 1992). Un autre problème rencontré est la sous-estimation du taux de virus dans un échantillon ceci étant imputable à deux facteurs : la sédimentation inégale des particules virales lors de la centrifugation des échantillons et la coloration inégale du contrastant (menant à un défaut d'identification des particules virales) (Wommack & Colwell, 2000). La sédimentation des virus lors de la centrifugation ne se fait pas forcément de manière parallèle aux bords du tube, mais plutôt avec un biais vers les bords des tubes, ce qui conduit à une distribution inégale des particules virales sur la surface de la grille. Ce biais peut être corrigé en dénombrant sur plusieurs grilles, mais rend le travail laborieux. Les virus de petite taille ne sont pas toujours récupérables sur les grilles avec une efficacité de 100 %, ce qui s'ajoute au biais (Suttle, 1993; Wommack & Colwell, 2000). Les observations en MET sont également rendues difficiles par la présence d'artéfacts divers, qui peuvent mener à des estimations

d'abondance virale imprécises (Hennes & Suttle, 1995; Weinbauer & Suttle, 1997). De par les grossissements utilisés en MET lors des observations, la limite de détection pratique serait de ce fait plutôt de l'ordre de  $10^5$  particules/ml, ce qui rendrait cette méthode difficilement applicable aux échantillons de milieux oligotrophes avec peu de particules virales (Jiang & Paul, 1995; Wommack & Colwell, 2000).

### 8.2.2. La microscopie à épifluorescence

La limitation pratique de la MET est l'équipement nécessaire pour faire des observations : un microscope électronique à transmission et une ultracentrifugeuse. Même pour les laboratoires qui ont accès à ce type d'équipement, la méthodologie de dénombrement par la MET prend beaucoup de temps. Ce sont ces raisons qui ont été les principales causes du développement de la méthodologie de dénombrement par microscopie à épifluorescence (ME), utilisée couramment aujourd'hui pour estimer l'abondance virale dans des échantillons d'eau et de sédiment (Suttle & Fuhrman, 2010).

La microscopie à épifluorescence pour estimer l'abondance virale est une variation de la méthodologie, appliquée originellement pour dénombrer des bactéries (Francisco *et al.*, 1973). Dans cette technique, des virus sont capturés sur un filtre de porosité de  $0.02 \mu\text{m}$  et leurs acides nucléiques sont marqués à l'aide d'un fluorochrome. Les filtres sont ensuite visualisés au microscope optique à un grossissement  $\geq \times 1000$ , le fluorochrome fixé aux acides nucléiques étant excité par une source lumineuse à une longueur d'onde précise. Le fluorochrome émet à son tour un signal lumineux (fluorescence) et les virus sont alors visualisables sous forme de petits points luminescents (Wommack & Colwell, 2000) (Figure 14).

Après avoir été adaptés pour la détection des bactéries (Porter & Fei, 1980), le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a été utilisé en tant que fluorochrome pour l'estimation de l'abondance des particules virales dans des échantillons naturels (Suttle & Fuhrman, 2010). Des comparaisons initiales des techniques de dénombrement viral en MET et en ME, en utilisant le DAPI comme fluorochrome, ont été faites sur des échantillons marins côtiers et pélagiques du Japon. Les résultats obtenus étaient en accord, avec un rapport ME/MET comprise entre 1.0 et 1.6 (Hara *et al.*, 1991; Hara *et al.*, 1996). Une concordance entre les résultats obtenus par les deux méthodes a également été constatée dans une étude portant sur l'effet des lysats de virus T<sub>3</sub> et T<sub>4</sub> sur des bactéries marines (Proctor & Fuhrman, 1992). Cependant, la fluorescence du DAPI était souvent trop faible pour des observations directes, nécessitant une étape de photomicrographie ou d'intensification d'image avant dénombrement, ce qui avait pour effet de rendre ce dernier difficile (Noble & Fuhrman, 1998).

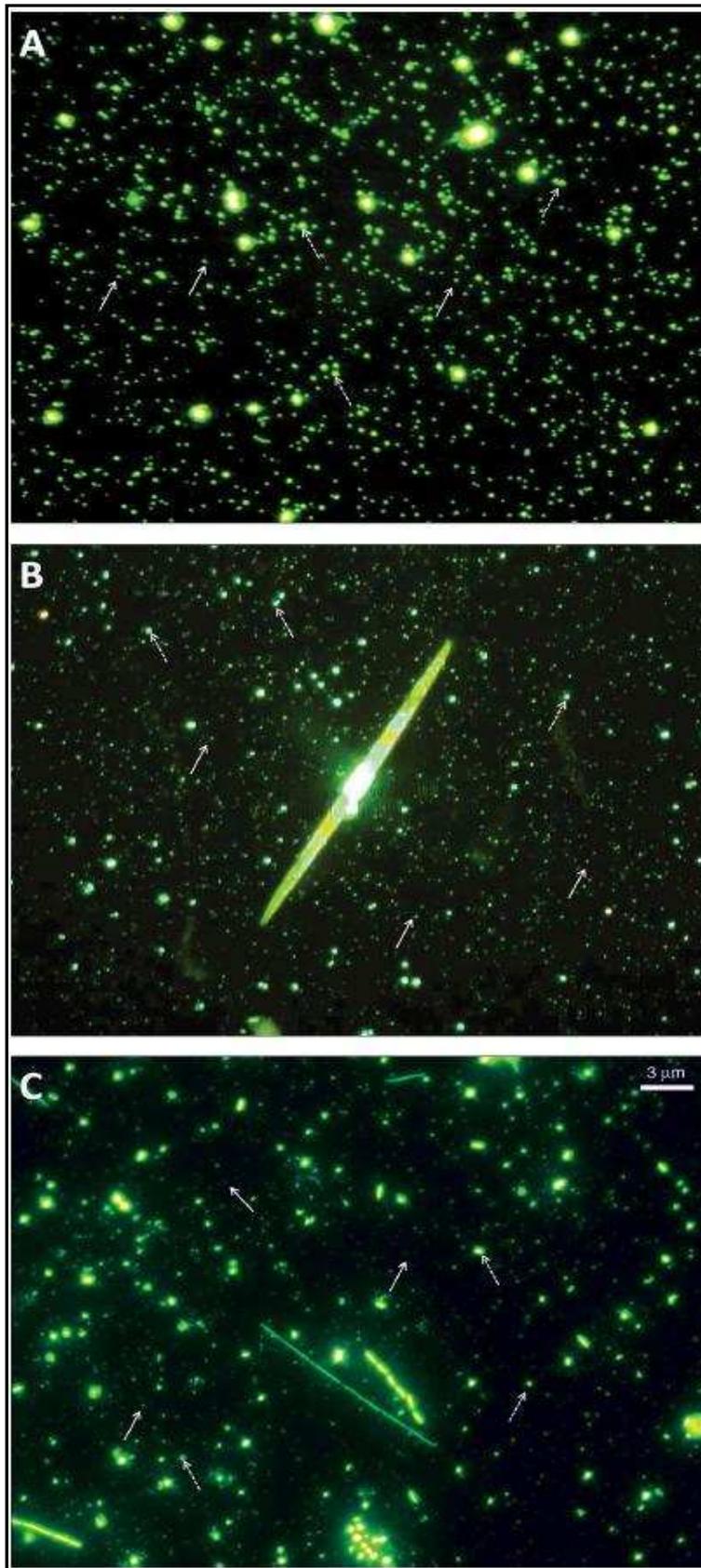


Figure 14. Photos prises en microscopie à épifluorescence avec différents fluorochromes : A) le Yo-Pro-1, B) le SYBR Green 1 et C) le SYBR Gold. Les flèches pleines désignent les virus (petits points lumineux) et les flèches discontinues désignent des cellules procaryotiques (des points lumineux plus grands par rapport aux virus) (d'après Suttle et Fuhrman, 2010).

Les fluorochromes Yo-Pro-1, SYBR Green I et SYBR Gold peuvent également être utilisés en microscopie à épifluorescence. Noble et Fuhrman (Noble & Fuhrman, 1998) ont comparé l'utilisation de la MET mettant en œuvre du SYBR Green I avec la ME, pour dénombrer des bactéries et des virus. Leurs résultats indiquent également la probabilité d'une sous-estimation de l'abondance virale par l'utilisation de la MET comparativement à celle de la ME avec du SYBR Green, le rapport ME/MET étant de 1.3. Parallèlement la comparaison entre le fluorochrome SYBR Green I et l'acridine orange (utilisé initialement pour le dénombrement bactérien en épifluorescence (Francisco *et al.*, 1973)) a révélé des résultats pratiquement identiques ( $103 \pm 4.2$  %) lors de dénombrements bactériens. Le SYBR Green n'interfère ni avec le sel ni les aldéhydes et de ce fait, les échantillons ne nécessitent pas de traitements spéciaux avant analyse, comme c'est le cas lors de l'utilisation du Yo-Pro-1. Les auteurs argumentent également que le SYBR Green I ne colore pas les débris, comme le fait le Yo-Pro-1, et qu'il peut être utilisé pour les études de dénombrement dans les sédiments. Enfin, la période d'incubation du SYBR Green I est nettement plus courte que celle du Yo-Pro-1 (15 min contre 48h), il se fixe à de l'ADN et à de l'ARN et est peu cher (Noble & Fuhrman, 1998), ce qui en fait un fluorochrome de choix. Le SYBR Gold est un fluorochrome qui se fixe également à de l'ADN et de l'ARN et est aussi sensible que le SYBR Green I. Sa fluorescence, lors de son excitation, dure cependant plus longtemps que celle du SYBR Green I (Chen *et al.*, 2001; Shibata *et al.*, 2006), mais moins que celle du Yo-Pro-1. Ce défaut mineur peut être corrigé grâce à l'utilisation d'un agent « anti-fading » constitué d'un mélange de PBS/Glycérol/Phénylènediamine (Noble & Fuhrman, 1998; Shibata *et al.*, 2006).

Dans une étude méthodologique comparative de dénombrement viral, Bettarel et collaborateurs ont comparé l'utilisation de la MET et celle de la ME en association avec les fluorochromes DAPI, Yo-Pro-1 et SYBR Green I (Bettarel *et al.*, 2000). Les résultats concordent une fois encore avec les études précédentes, montrant une abondance moins élevée de virus lors de l'utilisation de la MET par rapport à la ME, quelque soit le fluorochrome utilisé, et une variabilité plus importante des résultats en MET. Des trois fluorochromes utilisés, les résultats d'abondance virale étaient les plus faibles en utilisant le DAPI. Lors de l'utilisation des deux autres fluorochromes, les résultats étaient similaires jusqu'à un seuil de  $5 \times 10^7$  particules/ml, à partir duquel les concentrations obtenues avec le SYBR Green I étaient moins élevées. Les auteurs pensent que cette différence serait induite et par une plus courte durée de fluorescence du SYBR Green I par rapport au Yo-Pro-1. Les comptages seraient donc sujets à un biais pour peu qu'aucun logiciel d'analyse d'image ne soit utilisé pour fixer rapidement une image. L'hypothèse d'acides nucléiques libres, pouvant expliquer les différences de résultats entre la MET et la ME, a également été suggérée et examinée. Les auteurs ont alors traité leurs échantillons à la RNase et à la DNase et ont constaté une diminution de 39 % à 53 % du nombre de particules considérées comme virales en ME. Ceci concorde avec les résultats de Hara et collaborateurs (Hara *et al.*, 1991) qui ont observé une abondance virale supérieure d'un tiers en ME avec du DAPI

comparativement à l'emploi de la MET sur des échantillons marins pélagiques de Sagami Bay. Par contre, Hennes et collaborateurs, ainsi que Drake et collaborateurs, qui ont comparé les résultats d'abondance virale en ME avec et sans traitement à la DNase sur des échantillons marins du Golfe du Mexique et de la Baie de Chesapeake, respectivement, n'ont noté aucune différence significative (Hennes & Suttle, 1995; Drake *et al.*, 1998). Bettarel et collaborateurs ont cependant estimé que seul 15.4 % du biais de la surestimation d'abondance virale pouvaient être imputés aux acides nucléiques libres. Ils avancent l'hypothèse que les diminutions de l'abondance virale observées, suite à des traitements à la RNase ou à la DNase, seraient la conséquence de la dégradation des particules virales par ces enzymes. Des études comparatives entre échantillons traités et non traités à la DNase ou la RNase ont été faites en MET et en ME. En moyenne, les auteurs ont observé une diminution d'abondance virale de 16.1 % en MET et 26.4 % en ME et concluent que le traitement des échantillons à l'aide de ces enzymes devraient être évité (Bettarel *et al.*, 2000). La dégradation des particules virales par la DNase est également l'hypothèse suggérée par Jiang et collaborateurs (Jiang & Paul, 1995) pour expliquer la diminution entre 33 % et 48 % de l'ADN encapsidé dans les cultures du phage T2 et dans le plancton du Golfe du Mexique.

### 8.2.3. La cytométrie en flux

Appliquée initialement aux cellules eucaryotes (Gray *et al.*, 1975), ensuite aux bactéries (Bailey *et al.*, 1977) et enfin aux phages (Hercher *et al.*, 1979), la cytométrie en flux (CMF) est également une technique, qui peut être employée pour le dénombrement direct microbien et viral. Elle est également basée sur la détection de luminescence ou de fluorescence. La fluorescence peut être obtenue comme en ME, en utilisant des fluorochromes qui se fixent sur les acides nucléiques. L'excitation se fait ensuite grâce à une lampe à mercure, ou le plus souvent, grâce à un laser. La détection des particules fluorescentes se fait à l'aide de photomultiplicateurs, qui amplifient le signal fluorescent avant qu'il ne soit numérisé. Des milliers de signaux par seconde peuvent être captés (Wang *et al.*, 2010). Les signaux peuvent être ensuite analysés par des logiciels sur ordinateur, permettant ainsi le dénombrement des particules fluorescentes.

Plusieurs fluorochromes peuvent être utilisés, selon le type d'analyse désirée. Les fluorochromes utilisés pour le bactérioplancton non pigmenté incluent notamment le SYTO 13, le YOYO-1, le Yo-Pro-1, le PicoGreen, le TOTO-1, le TO-PRO et les fluorochromes de la série du SYBR (Vives-Rego *et al.*, 2000). Dans le protocole mis en place pour dénombrer des virus dans les milieux aquatiques, Marie et collaborateurs utilisent le SYBR Green I comme fluorochrome (Marie *et al.*, 1999). Le SYBR Gold peut être utilisé comme fluorochrome alternatif à SYBR Green I et est réputé pour avoir une fluorescence plus stable que le SYBR Green I (Chen *et al.*, 2001). En revanche, après comparaison entre plusieurs fluorochromes,

à savoir le SYBR Green I, le SYBR Green II, le PicoGreen et l'OliGreen, Brussaard et collaborateurs concluent que le fluorochrome le mieux adapté aux analyses cytométriques des virus aquatiques est le SYBR Green I (Brussaard *et al.*, 2000), avec des résultats meilleurs que ceux obtenus avec le SYBR Gold (Brussaard, 2004).

Lors de la comparaison des trois méthodes directes de dénombrement viral, à savoir la MET, la ME et la CMF, une assez bonne corrélation a pu être observée par Marie et collaborateurs (Marie *et al.*, 1999). Les résultats acquis par la CMF étaient généralement plus élevés que ceux issus des deux autres méthodes. Toutefois, les mesures par ME, avec du DAPI ou du SYBR Green I, étaient pourtant plus élevées que celles obtenues avec la CMF, mais uniquement en présence de faibles concentrations virales, mais 35 % moins élevées pour de hautes concentrations virales. La sous-estimation de l'abondance virale en utilisant la MET par rapport à la CMF était de l'ordre de 15 %. Une forte corrélation entre les méthodes de la microscopie à épifluorescence et la cytométrie en flux a également été constatée sur des échantillons marins probablement dominés par des bactériophages (Brussaard *et al.*, 2010), ce qui est en accord avec les résultats obtenus sur les grands virus de l'algue *Phaecystis* par Marie et collaborateurs (Marie *et al.*, 1999). Lors de ces analyses, l'importance de la conservation (mode et durée) des échantillons a été soulevée. Wen et collaborateurs constatent une perte d'abondance virale, par analyse en ME, de 16.4 % dès la première heure après fixation et entre 20 % et 35 % au bout de 4h (Wen *et al.*, 2004). Pour éviter de telles pertes, il est à présent recommandé de plonger les échantillons dans de l'azote liquide (technique dite de « flash-freeze ») et de conserver les échantillons à -80°C si les analyses ne peuvent être faites dans l'heure qui suit la fixation (Marie *et al.*, 1999; Brussaard, 2004; Wen *et al.*, 2004).

Un des avantages de la cytométrie en flux est la possibilité de discerner plusieurs populations de virus. Ces populations peuvent être identifiées par des analyses biparamétriques, en observant l'intensité de la fluorescence en fonction du « side scatter » qui exprime la taille et la structure des particules. Cependant, aucune corrélation linéaire entre la taille du génome et l'intensité de la fluorescence n'a été établie (Marie *et al.*, 1999; Brussaard *et al.*, 2000). D'autres avantages sont notés comme une meilleure précision, un seuil de détection bas, une rapidité d'acquisition des données (permettant de manipuler un grand nombre d'échantillons par jour) et la possibilité d'analyses multiparamétriques. Parmi les limitations, la cytométrie en flux partage avec la microscopie à épifluorescence le manque d'information sur la capacité infectieuse des particules analysées. La confusion potentielle entre les particules virales infectieuses, les particules colloïdales associées à des acides nucléiques, les particules virales défectives et les GTA est difficile à éviter. D'autres désavantages sont la nécessité d'avoir le matériel nécessaire (dont l'entretien peut être coûteux) et le besoin de personnel possédant une expertise dans le domaine pour les analyses (Marie *et al.*, 1999; Brussaard *et al.*, 2000; Vives-Rego *et al.*, 2000; Weinbauer, 2004; Brussaard *et al.*, 2010).

### 8.3. Les méthodes moléculaires de détection virale

Il existe des techniques moléculaires complémentaires aux techniques de dénombrement qui permettent la détection de virus, via leur génome, dans des échantillons divers. Celles-ci sont essentiellement de deux types: séquence-dépendante et séquence-indépendante. Parmi les techniques séquence-dépendantes, figure la PCR (ou « Polymerase Chain Reaction ») ainsi que l'utilisation de puces à ADN. Ces techniques reposent sur la connaissance des génomes des virus recherchés. Ainsi, la PCR nécessite l'utilisation d'amorces, ce qui induit la connaissance des séquences génomiques virales pour créer des amorces. Ceci limite donc la détection aux virus connus ou proches, mais ne permet pas l'accès aux virus inconnus (Mokili *et al.*, 2012). Une méthode consiste à utiliser des amorces consensus. A partir d'alignements multiples de séquences conservées, les nucléotides les plus fréquents à chaque position sont retenus et définissent la séquence de l'amorce. L'utilisation de ces amorces est limitée à la détection de séquences relativement conservées. Une autre approche consiste à utiliser des amorces dégénérées, faites d'un mélange d'amorces dessinées à partir des différentes séquences retrouvées dans les alignements multiples. Elles permettent la détection de plusieurs séquences différentes. Le problème rencontré dans l'utilisation de ces amorces est la chute de concentration d'amorces dans la réaction de PCR lorsque plusieurs séquences différentes sont présentes dans l'échantillon. Les amorces sont alors vite épuisées lors des premiers cycles de réaction de PCR et les amorces restantes se concentrent pouvant donner naissance à l'amplification d'artéfacts (Rose *et al.*, 1998). La méthodologie de PCR a été utilisée notamment pour détecter des virus pathogènes de poisson (Arakawa *et al.*, 1990), d'entérovirus, de l'hépatite A et du HIV en utilisant la RT-PCR (ou Reverse Transcription PCR) (Ansari *et al.*, 1992; Kopecka *et al.*, 1993; Tsai *et al.*, 1993; Griffin *et al.*, 1999) et des phages dans l'industrie lactique (Brussow *et al.*, 1994). Chen et Suttle (Chen & Suttle, 1995) ont appliqué cette approche pour la détection de virus d'algues dans des échantillons environnementaux. Les auteurs ont utilisé des amorces dégénérées pour l'amplification et l'identification du gène codant pour l'ADN polymérase (*pol*) des virus qui infectent trois genres de micro-algue.

L'utilisation de puces à ADN appliquées à la virologie a été développée par Wang et collaborateur (Wang *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003). Pour la détection de virus, les puces sont préparées avec des sondes qui s'hybrident avec des séquences virales connues et des séquences de virus potentiellement nouveaux à condition que la similarité de séquence soit suffisante. La méthode a été appliquée pour détecter des virus connus ainsi que des virus de nouveaux taxons, surtout en virologie clinique (Mokili *et al.*, 2012).

Contrairement à la détection de virus par PCR ou puce à ADN, les approches métagénomiques et la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) sont séquence-indépendantes. La PFGE repose sur la concentration de la fraction virale extraite à partir

d'un échantillon. Cette fraction est ensuite déposée dans de l'agarose puis traitée à la protéinase et soumise à l'action de détergents. Les acides nucléiques viraux sont ensuite séparés par électrophorèse. Cette technique permet d'avoir une empreinte de la diversité virale par l'obtention de bandes électrophorétiques de tailles différentes, correspondant aux différents génomes viraux. Ainsi, des échantillons différents peuvent être comparés. Des bandes d'intérêt peuvent être ultérieurement récupérées et séquencées (Santos *et al.*, 2012).

Dans la métagénomique microbienne, l'ADN total d'un échantillon peut être extrait et le gène codant pour l'ARNr 16S peut être amplifié. Etant donné que les virus sont acellulaires et polythétiques, ils ne partagent donc ni gène ribosomique, ni gène universel, ce qui empêche toute amplification de ceux-ci. Pourtant, plusieurs techniques d'amplification et de comparaison de gènes viraux ont été développées notamment en virologie clinique (Mokili *et al.*, 2012), mais également en écologie virale dans différents écosystèmes (Breitbart *et al.*, 2002). Ces approches passent par une première étape de concentration de la fraction virale. Une fois le compartiment viral isolé, une banque dite « LASL » (ou « Linker-Amplified Shotgun Library ») est construite. Ceci nécessite la réalisation d'une extraction des génomes viraux et de leur fragmentation, suivi de leur amplification par PCR à l'aide de linkers auxquels les fragments sont associés. Les fragments amplifiés sont ensuite clonés et séquencés, puis les séquences sont analysées par comparaison aux bases de données *in silico*. L'étape de fragmentation et d'amplification par PCR permet de contourner différents problèmes, comme la toxicité de certains fragments (codant par exemple pour les lysozymes) et permet de convertir l'ADN modifié (contenant par exemple des acides nucléiques alternatifs) des virus en de l'ADN non-modifié (Breitbart *et al.*, 2002; Edwards & Rohwer, 2005). L'approche métagénomique a l'avantage de permettre la détection des virus « cultivés », mais aussi des « non cultivés ». L'application de cette approche a abouti au constat que 70 % des séquences obtenues ne présentaient aucune homologie dans les bases de données et même les séquences présentant des similarités avec d'autres séquences, présentent souvent moins de 50 % de similarité. Cependant, environ 30 % des ORF (« Open Reading Frame ») des virus cultivables séquencés ne présentent aucun homologue (Rosario & Breitbart, 2011). Le faible taux de similarité peut également être interprété comme la résultante de la faible représentativité des virus actuellement connus comparativement à la connaissance des communautés microbiennes, dont seulement 10 % des séquences n'ont pas d'homologues dans les bases de données. Outre la dimension identitaire, la réalisation de bases de données métagénomiques virales permet d'accéder à la vision de la diversité globale et de l'abondance relative des génotypes viraux présents dans un échantillon donné. Ainsi, certaines analyses métagénomiques, basées sur des modèles mathématiques, suggèrent quelles communautés virales non cultivées sont parmi les communautés les plus diversifiées sur terre (Breitbart *et al.*, 2002; Breitbart & Rohwer, 2005).

La première étude de métagénomique virale appliquée à des échantillons naturels a été effectuée par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2002). Elle a permis de révéler une très large diversité virale dans les échantillons issus de deux écosystèmes marins, le Mission Bay et le Scipps Pier à San Diego. La majorité (65 %) des séquences obtenues ne présentait aucune similarité de séquence avec les banques de données. Parmi les autres séquences, des similarités ont pu être identifiées au sein de toutes les familles de phages caudés à ADN double brin, ainsi que parmi des familles de virus d'algues. En s'appuyant sur des modèles mathématiques, il est apparu que le génome viral le plus abondant constituait 2-3 % de la population totale des deux communautés virales étudiées, l'une contenant approximativement 374 types viraux et l'autre environ 7114. Dans une étude ultérieure par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2004a), les auteurs ont isolé la fraction virale d'un kilogramme de sédiment du Mission Bay et construit une banque de données métagénomiques virales. Trois quart des séquences ne présentaient aucune similarité avec les séquences accessibles dans les bases de données. Parmi le quart restant, la majorité des hits appartenait à des phages à ADN double brin. Grâce à un échantillonnage fait en parallèle pour l'étude de la communauté virale de la colonne d'eau sus-jacente (Breitbart *et al.*, 2002), la communauté virale des sédiments a pu être comparée aux communautés virales marines, dont celle de la colonne d'eau sus-jacente. Une composition très différente a pu être constatée. Les auteurs notent un « trait marin » commun entre les virus détectés qui pourrait suggérer une descendance phylogénétique commune. En analysant les séquences issues du métagénome viral des sédiments, Breitbart et collaborateurs ont également constaté un taux important de séquences présentant des similarités avec des séquences lysogènes, ce qui suggérerait une prédominance d'un mode de vie tempéré dans les sédiments (Breitbart *et al.*, 2004a). Les modèles mathématiques ont estimé la population virale à plus de  $10^4$  parmi les  $10^{12}$  particules virales dans le kilogramme de sédiment, ce qui suggérerait que les communautés virales des sédiments marins représenteraient un des plus grands réservoirs de séquences nucléotidiques inexplorées.

Dans une étude métagenomique menée à plus grande échelle, 184 assemblages viraux (le terme « assemblage » étant utilisé au lieu de « communauté » par préférence linguistique des auteurs) ont été obtenus à partir de 68 sites provenant de quatre régions océaniques (Angly *et al.*, 2006). Les échantillonnages ont été effectués en Colombie-Britannique, au Golfe du Mexique, dans la mer des Sargasses et dans l'Océan Arctique et ceci à plusieurs profondeurs (entre 0 m et 3246 m). Comparativement aux études précédentes, une plus grande proportion de séquences, 91.4 %, ne partageait aucune similarité avec celles disponibles dans les bases de données. Les auteurs ont attribué cette forte proportion à un biais méthodologique. En effet, ces derniers ont préféré l'utilisation du pyroséquençage (454 Life Sciences), qui génère de courts fragments de ~100 pb, comparativement à la méthodologie de Sanger utilisée, entre autre, par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2002; Breitbart *et al.*, 2004a), qui génère des fragments plus longs de ~650 pb. De manière générale, la majorité des séquences provenant des

échantillons de l'Océan Arctique, de la Colombie Britannique et du Golfe de Mexique présentait des similarités avec des séquences de bactéries. Les auteurs proposent que ceci soit pour partie dû à un biais reposant sur la nature des séquences disponibles dans les banques de données, aux prophages encore non-identifiés parmi ces séquences et à un taux élevé de transfert horizontal entre phages et hôtes. Les échantillons présentant le plus de similarité avec séquences disponibles dans les bases de données étaient ceux provenant de l'Océan Arctique, qui semblaient être dominés par des séquences de prophages. Les échantillons de la mer des Sargasses étaient majoritairement constitués de séquences de cyanophages et d'un nouveau clade de phage à ADN simple brin (Angly *et al.*, 2006).

Globalement, cette étude a suggéré une diversité générale très élevée, les échantillons étant constitués probablement de plusieurs centaines de milliers d'espèces, variant régionalement sur un gradient Nord-Sud en latitude. Cependant la plupart des espèces virales semblait être très répandue. Avec une majorité d'espèces virales partagées entre les différentes régions océaniques, la plupart des différences entre les assemblages viraux semblaient être expliquées par la variation de la fréquence des espèces les plus communément présentes et non par l'exclusion de génomes viraux. Ces résultats appuient la notion d'un « trait marin » postulée par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2002). Ils suggèrent également que les virus sont globalement très dispersés et que les conditions environnementales locales impriment une pression sélective favorisant certains types viraux par rapport à d'autres (Angly *et al.*, 2006). Cette étude semble appuyer, de ce fait, l'hypothèse postulée par Breitbart et Rohwer (Breitbart & Rohwer, 2005) selon laquelle « tout est partout ». D'après cette hypothèse, qui s'appuie sur l'analyse de résultats de métagénomiques viraux ciblant l'abondance virale du globe et sur les déplacements des virus à travers des biomes (Breitbart *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2004; Breitbart *et al.*, 2004a; Cann *et al.*, 2005), les virus seraient ubiquitaires sur le globe et la domination de certains types viraux en un lieu donné serait expliquée par la pression sélective locale. Les auteurs proposent un modèle de « banque » (Figure 15) où les virus dominants sont actifs et les autres types viraux demeurent dans un état de quiescence. Les types viraux dominants changent constamment suivant la domination des populations hôtes et les conditions environnementales. Les virus maintenus à l'état quiescent permettent d'alimenter la fraction active.

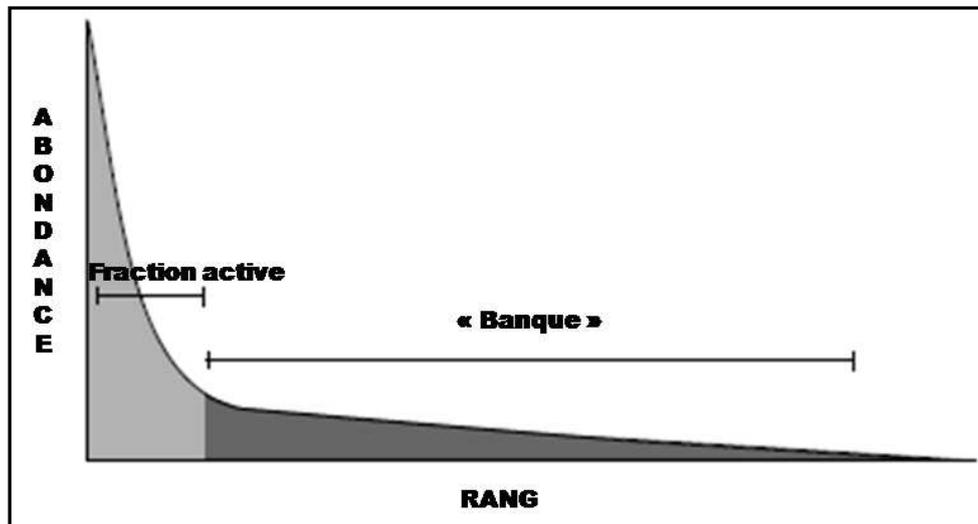


Figure 15. Représentation schématique du modèle en « banque » proposé par Breitbart et Rohwer. Le schéma représente la distribution génotypique virale, en fonction de l'abondance du rang, au sein d'une communauté. Le génotype le plus abondant est placé en « 1 » sur le rang, le second génotype le plus abondant est placé en deuxième position ainsi de suite. Les génotypes les moins présents constituent la « banque » qui alimente la fraction active lors des changements de conditions locales, telles que les variations de domination des souches hôtes (adapté à partir de Breitbart et Rohwer, 2005).

La nature de la fraction inactive de virus, en revanche, est inconnue. Les auteurs s'appuient sur le fait que malgré que la dégradation des particules virales soit généralement élevée, elle a tendance à diminuer avec le temps. Une alimentation de différents types viraux pourraient également provenir de lysogènes et de manière allochtone. Breitbart et Rohwer notent également que les métagénomes ne tiennent pas forcément compte du phénotype de la communauté échantillonnée car l'expression et l'interaction des gènes dépendent de leurs arrangements au sein des génomes. En effet, les unités de base de l'organisation dans les génomes sont les opérons dans les génomes microbiens et les modules (en mosaïque) chez les phages. Bien que différentes, ces unités (ou clusters de gènes) sont semblables, relativement autonomes et peuvent se déplacer tout en conservant leur fonctionnalité (Figure 16) (Breitbart & Rohwer, 2005).

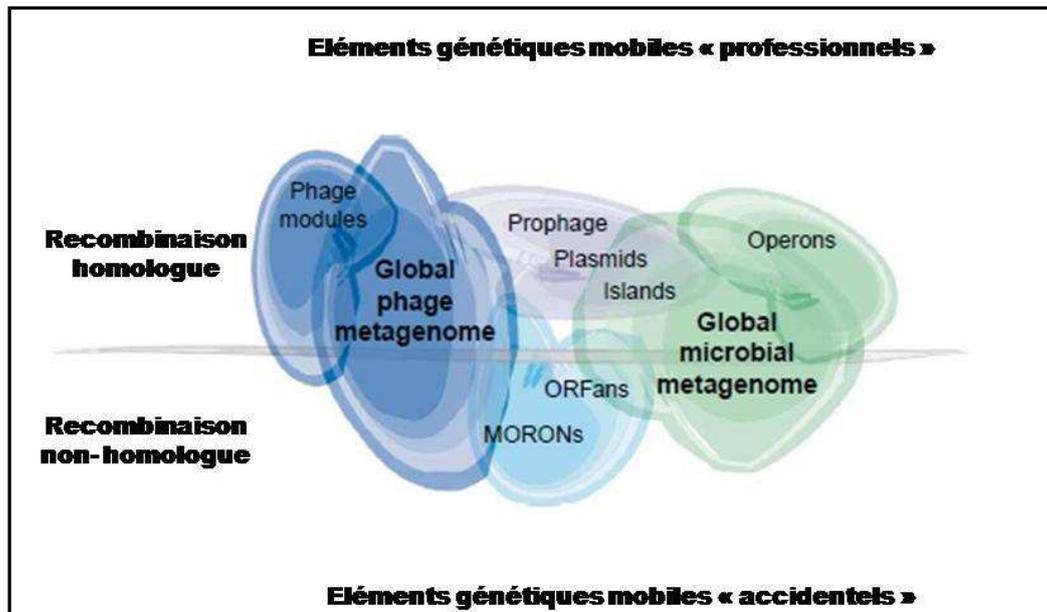


Figure 16. Représentation schématique de la relation entre les métagénomes, les modules de phages, les opérons et les éléments génétiques mobiles. Les métagénomes sont des populations de gènes dans un échantillon particulier. L'arrangement de base de ces gènes est constitué de modules de phages et d'opérons de microbes. Les éléments génétiques mobiles « professionnels » facilitent le déplacement des modules et des opérons au sein des génomes. Tout gène peut potentiellement devenir un élément génétique mobile « accidentel » via la recombinaison non-homologue (adapté à partir de Breitbart et Rohwer, 2005).

La métagénomique virale représente un domaine d'études permettant d'apporter beaucoup d'information quant à la diversité des virus dans les échantillons, ainsi qu'à leur distribution à un niveau plus global. Une difficulté majeure de cette approche est d'arriver à obtenir toute la fraction virale sans perdre trop de matériel ni inclure des contaminations. Un autre inconvénient provient du volume important d'échantillon à traiter pour obtenir une fraction virale analysable, 200 l d'eau ou 1 kg de sol étant recommandés (Edwards & Rohwer, 2005). Les techniques de séquençage à haut débit, ainsi que le développement de nouvelles techniques d'amplification, ont permis d'améliorer la construction de banques métagénomiques virales. La détection des virus à ARN ou à ADN simple brin est ainsi à présent possible et le développement des technologies de séquençage permet maintenant d'éviter l'étape de clonage. Les avancées technologiques ont accéléré la construction de métagénomes viraux, au point qu'aujourd'hui au moins 24 banques couvrant de nombreux environnements différents et représentant 810 Mpb sont disponibles (Rosario & Breitbart, 2011).

## 9. L'abondance virale dans les milieux aquatiques

L'abondance virale dans les systèmes aquatiques est très variable. Selon l'écosystème étudié, la densité virale peut être à peine détectable ( $\leq 10^4$  virus/ml) ou peut atteindre une abondance importante excédant  $10^8$  virus/ml. La densité virale augmente généralement avec la productivité et la concentration en nutriments du milieu. L'importante variabilité de l'abondance virale suggère que les virus sont un composant actif du plancton (Wommack & Colwell, 2000).

Quelque soit la méthode utilisée pour le dénombrement viral, certaines tendances peuvent être observées. Ainsi, dans les écosystèmes marins, la densité décroît des côtes ( $\sim 10^6 - 10^7$  VLP/ml) vers le large ( $\sim 10^5 - 10^6$  VLP/ml) et de la surface vers les couches inférieures de la zone euphotique et atteint un minimum au niveau de l'océan profond ( $\sim 10^4 - 10^5$  VLP/ml) (Paul & Kellogg, 2000; Sime-Ngando & Colombet, 2009). Dans l'océan profond, les sources hydrothermales peuvent toutefois faire exception avec une abondance qui peut être plus élevée (Ortmann & Suttle, 2005).

L'abondance virale varie également en fonction du temps et selon la profondeur de l'océan. Hara et ses collaborateurs (Hara *et al.*, 1996) ont échantillonné l'Océan Pacifique Nord subarctique et subtropical à des profondeurs entre 0 m et 5000 m. Ainsi, dans les échantillons de la zone subarctique, l'abondance virale variait entre  $6.0 \times 10^4$  VLP/ml à 5000 m de profondeur et  $3.8 \times 10^6$  VLP/ml à 50 m de profondeur et les ratios virus:bactéries (« Virus-to Bacteria Ratio » ou VBR) était compris entre 1.6 et 7.5, respectivement. Dans les échantillons de la zone subtropicale, la densité virale était comprise entre environ  $4.0 \times 10^5$  VLP/ml à partir de 400 m de profondeur et environ  $1.9 \times 10^6$  VLP/ml à 50 m de profondeur et avec des VBR oscillant entre 1.0 et 8.7, le chiffre maximal étant atteint à 5000 m de profondeur.

L'abondance virale suit également une certaine saisonnalité. Dans une étude de suivi de l'abondance virale dans des échantillons côtiers de la mer Adriatique au cours du temps, Weinbauer et collaborateurs (Weinbauer *et al.*, 1994) ont observé un pic d'abondance virale en été et à l'automne (jusqu'à  $9.5 \times 10^7$  VLP/ml), abondance qui diminuait ensuite en dessous de  $10^6$  VLP/ml en hiver. Une variabilité saisonnière du VBR a été également constatée avec des chiffres compris entre 0.9 et 89.1 (en automne) et 15.0 en moyenne. Selon ces auteurs, les pics d'abondance pourraient correspondre aux blooms phytoplanctoniques. Une variation temporelle à l'échelle de la journée a pu également être observée et les auteurs ont pu calculer une mortalité bactérienne variant entre 39.6 % et 212.2 %. Le VBR paraissait diminuer avec la profondeur de 0 m à 22 m, ce qui aurait pu être mis en relation avec une densité de population microbienne dans la couche thermocline de

la surface, dont la production virale aurait donné des valeurs importantes de VBR pour la surface (Weinbauer *et al.*, 1994).

Dans les milieux dulçaquicoles, l'abondance virale est généralement plus élevée que dans les écosystèmes marins et augmente avec l'eutrophisation (Maranger & Bird, 1995). Dans 22 lacs échantillonnés au Québec, Maranger et Bird ont trouvé une abondance virale moyenne de  $2.5 \times 10^8$  VLP/ml (Maranger & Bird, 1995). La variabilité temporelle reste cependant importante comme l'indique par exemple les travaux de Hofer et Sommaruga (Hofer & Sommaruga, 2001) qui ont calculé une densité en virus dans un lac oligotrophe d'Autriche variant sur l'année entre  $< 2 \times 10^4$  VLP/ml après la fonte de la glace et  $4.6 \times 10^6$  VLP/ml sous la glace, avec un VBR compris entre 0.1 et 11. Dans une autre étude réalisée sur le réservoir Sep, un lac oligo-mésotrophe, Pradeep Ram et collaborateurs (Pradeep Ram *et al.*, 2005) ont observé une variation d'abondance allant de  $0.6 \times 10^7$  à  $1.3 \times 10^8$  VLP/ml, le VBR variant entre 2 et 12.

Il est important de noter que la différence entre les milieux marins et d'eau douce ne se limite pas à une simple différence de la concentration en NaCl, mais couvre un large éventail de facteurs biologiques, physiques et chimiques. En outre, les environnements limnétiques comprennent une variété d'habitats y compris, par exemple, des ruisseaux, des sources chaudes et des lacs alpins. Certaines des propriétés physico-chimiques qui les différencient globalement de la plupart des écosystèmes marins sont de plus grands gradients temporels et spatiaux et des facteurs tels que la température, le pH, la salinité, la saturation en oxygène, des concentrations plus élevées de matières organiques dissoutes et la délimitation physique des lacs, limitant les échanges de matériel génétique avec les autres environnements (Middelboe *et al.*, 2008).

Dans une étude réalisée sur un estuaire tropical où se produit un mélange d'eau douce et marine, Cissoko et collaborateurs (Cissoko *et al.*, 2008) ont noté une diminution abrupte de la concentration cellulaire et corrélativement une augmentation de l'abondance virale quand des bactéries issues d'eau douce étaient mises dans un environnement marin, ce qui suggère une activation des virus tempérés engageant un cycle lytique. À l'opposé, l'ajout d'eau douce dans des échantillons marins a eu pour conséquence une croissance bactérienne suivie d'une augmentation de l'abondance virale. Les auteurs expliquent ce phénomène par une résistance plus forte aux variations d'osmose des communautés microbiennes marines par rapport aux communautés microbiennes dulcicoles. Une autre étude détaillée réalisée par Auguet et collaborateurs (Auguet *et al.*, 2006) rapporte des données précisant les variations saisonnières de la structure du virioplancton le long un gradient de salinité au niveau de l'estuaire de la rivière Charente (France). Des pics d'abondance virale similaires ont été observés en été à la fois dans la rivière et dans l'estuaire, où la densité virale atteignait respectivement  $20.8 \times 10^7$  VLP/ml et  $8.0 \times 10^7$  VLP/ml. Les densités virales étaient plus faibles en hiver, diminuant à  $3.6 \times 10^7$  VLP/ml dans

la rivière et à  $1.4 \times 10^7$  VLP/ml dans l'estuaire. Ces auteurs ont aussi pu démontrer par des techniques d'analyse complémentaires, la MET et la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis), la variabilité saisonnière de la structure des communautés virales en rapportant l'existence d'une variabilité de la taille des génomes viraux et des capsides virales selon les saisons. Leurs résultats suggèrent une variation, et donc une diversité, importante du viroplancton liée aux changements d'activité et de structure des communautés microbiennes.

D'autres études menées le long de gradients de salinité suggèrent également une importante dynamique virale liée à une variation de salinité. Ainsi, Bettarel et collaborateurs ont constaté une diminution de la densité procaryotique et virale, par ailleurs intercorrélée, de l'amont de la rivière Bach Dang (Vietnam), vers l'aval où se fait le contact avec la mer (Bettarel *et al.*, 2011a). L'abondance procaryotique déclinait de  $1.9 \times 10^7$  cellules/ml pour la partie en amont à  $4.2 \times 10^6$  cellules/ml au niveau de la partie en aval. Corrélativement, la densité virale déclinait de  $1.5 \times 10^8$  VLP/ml de l'amont à  $6.5 \times 10^7$  VLP/ml à l'aval. La proportion de cellules lysogènes variait entre 0 % et 5.4 % en présence d'une salinité nulle ou faible, cependant qu'à partir d'un taux de salinité<sup>6</sup> de 21, la fraction de cellules lysogènes augmentait jusqu'à un maximum de 27.1 % dans le site le plus en aval. Une corrélation négative entre la production lytique de virus et la salinité a également été notée par ces auteurs, qui ont suggéré que les virus marins tempérés étaient induits sous l'effet de la baisse de la salinité engendrée par l'afflux d'eau douce. La diminution de la fraction cellulaire inductible retrouvée en amont de la rivière serait alors due à l'induction progressive de ces derniers suite aux variations de la salinité. Dans une seconde étude consacrée à l'incidence de la variation de concentration en NaCl, Bettarel et collaborateurs (Bettarel *et al.*, 2011b) ont étudié la relation virus-procaryote le long d'un gradient de salinité allant de 10 ‰ à une concentration proche de la saturation du sel, soit 360 ‰. Au-delà d'une salinité de 240 ‰, les auteurs ont constaté une augmentation considérable, jusqu'à 50 fois par rapport à une salinité proche de zéro, de la densité procaryotique et virale, ainsi que l'apparition d'haloarchées de morphologie cubique et de virus pléomorphes (principalement fusiformes et linéaires). La fraction de cellules lysogéniques était positivement corrélée avec la proportion de cellules de morphotype carré. La fraction des cellules infectées lytiquement oscillait entre 0.8 % et 20.1 % entre 10 ‰ et 140 ‰ et n'était plus détectable à des salinités supérieures à 190 ‰. Les auteurs expliquent ces résultats par une croissance bactérienne jusqu'à une salinité avoisinant les 250 ‰, à partir de laquelle la concentration en sel favorise la croissance des archées halophiles. L'abondance virale atteignait une valeur de  $6.8 \times 10^8$  VLP/ml dans ces milieux hypersalins, une abondance probablement liée à la stabilité des particules virales dans ce type d'environnement. Une forte abondance virale dans les milieux hypersalés pourrait s'expliquer par la stabilité des

---

<sup>6</sup>Les auteurs ne précisent pas l'unité qu'ils utilisent pour la mesure de la salinité. Ils utilisent sans doute la salinité (S) d'un échantillon d'eau qui est donnée par le rapport K de la conductivité électrique de cet échantillon d'eau de mer à 15 °C et à la pression atmosphérique normale

particules virales dans des conditions de forte concentration ionique, ainsi que par le manque de prédateurs microeucaryotes du type brouteurs qui diminuerait cette abondance virale dans des conditions moins hostiles.

## **10. Les interactions hôtes-virus dans les milieux aquatiques**

### **10.1. La virulence et ses implications**

Les virus constituent une des principales causes de mortalité bactérienne dans les écosystèmes aquatiques par l'intermédiaire de la phase lytique de leur développement. Par simple observation de virus en microscopie, il n'est pas possible de discerner les virus tempérés des virus virulents. Différentes approches ont donc été développées pour estimer la fraction des virus lytiques, dont i) l'observation par MET des cellules visiblement infectées, ii) le dénombrement de virions néoformés après une lyse de cellules bactériennes infectées, iii) l'estimation de taux d'élimination des virus (ou « decay rate » qui suppose que les virus se dégradent vite et donc que leur détection est la conséquence d'une production récente) et iv) l'utilisation de traceurs viraux fluoromarkés par exemple (Sime-Ngando & Colombet, 2009). Par ces différentes approches, il est estimé que 10 % à 50 % de la production bactérienne journalière sont détruits par les virus dans les eaux marines et entre 10 % et 20 % de la production bactérienne journalière dans l'ensemble des systèmes aquatiques (Wommack & Colwell, 2000). La fluctuation de ces taux se fait entre des valeurs proches de zéro et 100 % selon l'écosystème étudié (Weinbauer, 2004).

Les virus jouent également un rôle indirect important dans les cycles biogéochimiques en raison de leur implication dans la mortalité bactérienne. Des modèles mettent en évidence que les virus catalysent et accélèrent la transformation de la matière de l'état particulaire (« particulate organic matter », ou POM, comprenant par exemple les organismes vivants, matière détritiques, etc...) en matière dissoute (« dissolved organic matter », ou DOM, comprenant les produits de la lyse virale, dont les virus, les organites cellulaires, molécules organiques et inorganiques, etc...), cette dernière étant principalement recyclé par les bactéries hétérotrophes (Fuhrman, 1999; Wilhelm & Suttle, 1999; Middelboe *et al.*, 2003). En conséquence, les virus « court-circuitent » une partie des transferts trophiques, ce qui augmente la respiration globale et diminue le transfert du carbone vers les niveaux trophiques supérieurs (Figure 17). La conversion par la lyse virale de la matière organique particulaire en agrégats organiques peut influencer la proportion des nutriments (carbone, azote, phosphore, fer). En effet, une partie la matière organique à fort potentiel de sédimentation tend à séquestrer le carbone, ainsi que d'autres éléments, ceux-ci devenant donc peu disponible au recyclage (Suttle, 2005). Toute la matière n'étant pas

forcément séquestrée, une partie peut également stimuler la croissance de certains groupes d'hétérotrophes et d'eucaryotes auxotrophes (Weitz & Wilhelm, 2012).

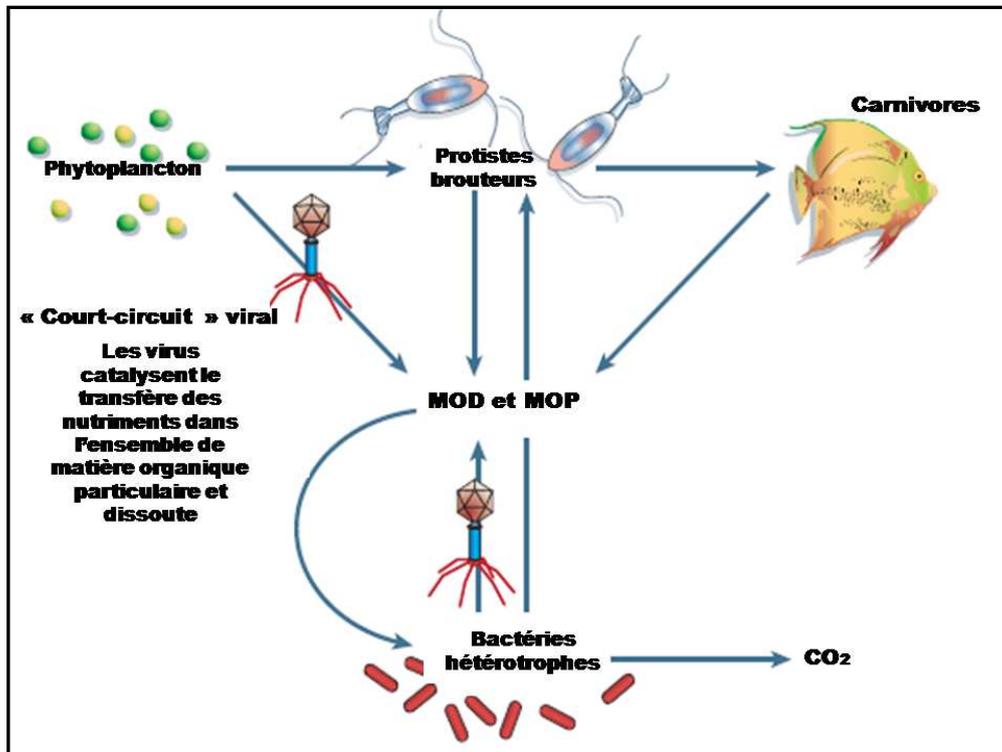


Figure 17. Représentation schématique du rôle des virus dans les cycles biochimiques et dans la catalyse, par lyse virale, du transfert des nutriments dans un « pool » de matière organique dissoute (MOD) et particulaire (MOP) (d'après Suttle, 2005).

Les bactéries forment une composante importante et diversifiée de la biomasse marine et la structuration de leurs communautés en fonction des conditions biotiques et abiotiques est encore relativement peu connue (Polz *et al.*, 2006). Selon la théorie « killing the winner », la diversité au sein des communautés microbiennes serait maintenue par l'infection virale et la lyse des espèces dominantes les plus compétitives. La rencontre entre les virus et les cellules hôtes dépendant principalement de la densité de la population hôte, les espèces dominantes seraient alors plus exposées que les dominées à l'infection virale et leur destruction permettrait de maintenir les populations dominées dans l'écosystème. Ce modèle reposant principalement sur la lyse cellulaire, la lysogénie y est difficilement intégrable (Thingstad & Lignell, 1997; Thingstad, 2000). Le modèle de la réserve en « banque » de Breitbart et Rohwer s'appuie essentiellement sur cette théorie du « killing the winner » (Breitbart & Rohwer, 2005).

## 10.2. Les enjeux de la lysogénie

Certains résultats de recherche de prophage dans les souches bactériennes séquencées suggèrent qu'environ 60 % des bactéries portent au moins un prophage (Casjens, 2003; Edwards & Rohwer, 2005). D'après les études faites par Jiang et Paul, environ 40 % des bactéries marines seraient effectivement lysogéniques (Jiang & Paul, 1994; Jiang & Paul, 1998; Paul, 2008). La lysogénie peut être considérée comme une stratégie avantageuse quand la densité cellulaire (et les ressources nutritives) est trop faible pour une infection lytique (Stewart & Levin, 1984) ou quand le taux de dégradation des particules virales libres est trop fort pour une propagation de type lytique (Lenski, 1988). Ces suppositions reposent sur l'hypothèse selon laquelle la fréquence de rencontre entre les particules virales et les cellules hôtes est trop faible pour qu'une production de virus par cycle lytique puisse maintenir une population virale. Le virus se loge alors dans la cellule hôte sous forme de prophage et peut ainsi bénéficier d'une protection générale face à l'environnement, notamment grâce à au système de maintenance génomique de la cellule qui l'héberge. Cette interaction est contraignante pour la cellule, car elle utilise des ressources pour la réplication et la maintenance de matériel génétique supplémentaire et elle coure un risque de lyse en cas d'induction. Le virus tempéré sous forme de prophage, en revanche, est contraint de se répliquer au même rythme que l'hôte dans lequel il est (Marsh & Wellington, 1994; Weinbauer, 2004).

Cependant, certains avantages peuvent être apportés aux cellules hôtes par les prophages. Parmi les avantages acquis par conversion phagique, il y a entre autres une immunité envers d'autres phages apparentés, l'acquisition de résistance aux antibiotiques et de facteurs de virulence, ainsi que des modifications antigéniques et métaboliques (Ackermann & DuBow, 1987). Un autre bénéfice potentiel pourrait être l'élimination des populations bactériennes non lysogènes, favorisant ainsi la croissance des bactéries lysogènes. En effet, suite à la lyse virale, les cellules peuvent relarguer des enzymes lytiques parmi les particules virales. Les populations cellulaires non immunisées par la présence d'un prophage et sensibles aux enzymes lytiques seraient potentiellement éliminées, laissant plus de ressources aux populations lysogénisées (Stewart & Levin, 1984).

Etant donné qu'il n'est pas possible de distinguer les particules virales lysogènes des particules lytiques dans une population virale, l'approche utilisée pour quantifier la lysogénie dans la nature est la mesure de la fréquence de lysogénie dans les souches hôtes (marines) isolées. L'identification des lysogènes implique de soumettre les cellules à un stress capable de provoquer une induction virale. Il existe de multiples agents inducteurs dont les effets vont de la création de dommages physiques à la molécule d'ADN, en passant par l'inhibition de la synthèse d'ADN et l'impact nocif sur le métabolisme. Parmi les agents causant des dommages directs à l'ADN, il y a entre autres des antibiotiques comme la mitomycine C (Shiba *et al.*, 1959; Levine, 1961; Reich *et al.*, 1961), les radiations comme les

UV (Lwoff *et al.*, 1950) et les agents mutagènes comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Jiang & Paul, 1996). Hormis l'utilisation de la mitomycine C, l'inhibition de la synthèse de l'ADN peut aussi être obtenue à l'aide d'agent antigrase comme la novobiocine ou par la carence en thymine (Ackermann & DuBow, 1987). D'autres agents inducteurs reconnus sont notamment la pression (Rutberg, 1965), le NaCl (Shkilnyj & Koudelka, 2007), le peroxyde d'hydrogène (Lwoff & Jacob, 1952; Selva *et al.*, 2009), l'acide ascorbique et les chocs thermiques (Ackermann & DuBow, 1987). Les agents inducteurs les plus couramment utilisés restent malgré tout la mitomycine C et les UV (Ackermann & DuBow, 1987), la mitomycine C étant plus efficace (Weinbauer & Suttle, 1996; Jiang & Paul, 1998).

Dans des études portant sur des isolats bactériens marins, les chercheurs Jiang et Paul ont constaté une plus grande fraction de lysogènes parmi les souches bactériennes isolées de milieux marins oligotrophiques, que parmi celles isolées du milieu côtier et estuarien. Environ 40 % des 167 isolats analysés contenaient des prophages. Ces auteurs pensent également que ce nombre pouvait être une sous-estimation du nombre réel, la mitomycine C pouvant être parfois inefficace dans l'induction de certains prophages. Mais ils n'écartent pas non plus l'hypothèse d'une plus grande sensibilité à l'induction des isolats issus de milieux oligotrophes (Jiang & Paul, 1994; Jiang & Paul, 1998).

Une autre manière d'estimer l'abondance des lysogènes en milieu naturel repose sur le dénombrement viral après induction d'échantillons naturels. Dans une étude menée par Jiang et Paul (Jiang & Paul, 1996), des échantillons marins côtiers, estuariens et oligotrophes du large ont été induits à l'aide de plusieurs agents, tels que la mitomycine C, les radiations UV, la lumière solaire, les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques, la température et la pression. Les études de dénombrement avant et après induction indiquent un taux de lysogénie plus élevé dans les échantillons estuariens et côtiers, avec 11 échantillons inductibles sur 15 testés, par rapport aux échantillons oligotrophes. Le taux de lysogénie variait de 10.5 et 67.3 % dans les échantillons estuariens et entre 26.5 et 78.3 % dans les échantillons côtiers contre seulement entre 13.2 à 25 % dans les échantillons oligotrophes. Ces résultats vont à l'encontre d'autres observations par ces mêmes auteurs après culture pour lesquelles ils constatèrent un pourcentage de lysogénie plus élevé en milieu oligotrophe par rapport aux milieux côtier et estuarien (Jiang & Paul, 1994; Jiang & Paul, 1998). Ces auteurs proposent quelques explications pour ces résultats contradictoires: les bactéries issues de milieux estuarien et côtier seraient métaboliquement plus actives et donc plus inductibles, ce qui causerait un biais de dénombrement. Les bactéries en milieu oligotrophe pourraient être plus sensibles aux agents inducteurs et donc mourir sous l'effet toxique avant d'être induites. Une explication alternative repose sur la possibilité d'obtenir des résultats plus variés en raison d'une plus faible densité cellulaire en milieu oligotrophe, ce qui se traduirait par un biais de dénombrement. Par ailleurs, les auteurs ont également constaté une induction par la température, au contraire de l'utilisation de la lumière solaire

et de la pression, ce qui suggérerait que ces derniers sont de faibles agents inducteurs (Jiang & Paul, 1996). La plupart des études, effectuées notamment en soumettant des échantillons aux rayonnements solaires ou UV, à différentes températures ou encore par ajout de nutriments, ne sont pas arrivées à des données aisément interprétables (Wommack & Colwell, 2000).

La lysogénéisation de l'hôte, ou la « décision lysogénie », dépend de la multiplicité des infections à laquelle est soumis l'hôte, à son statut nutritionnel et à son taux de croissance (Herskowitz & Banuett, 1984; Wilson & Mann, 1997). Dans un modèle développé avec le phage  $\lambda$ , le cycle lytique est entamé par le phage lorsque la croissance de l'hôte est élevée alors que le cycle lysogène l'est lorsque les cellules sont en carence nutritive, donc quand l'énergie disponible n'est pas suffisante pour une haute production virale [(Gottesmann & Oppenheim, 1994) dans (Weinbauer, 2004)]. Lenski fait également remarquer que la distinction entre phage lysogène et phage lytique est quelque peu artificielle dans la mesure où les conditions environnementales peuvent faire entamer le cycle lytique à des phages lysogènes (Lenski, 1988).

Si plusieurs études ont été effectuées sur des échantillons provenant de milieu marin, les milieux dulçaquicoles paraissent moins bien étudiés (Middelboe *et al.*, 2008). Cependant, Jacquet et collaborateurs (Jacquet *et al.*, 2005) ont comparé attentivement l'impact des virus et des protozoaires sur la mortalité du bactérioplancton du lac du Bourget (France). Les résultats obtenus par ces auteurs ont suggéré une mortalité plus importante suite à l'impact viral par rapport à la mortalité suite au broutage par les protozoaires. Les VBR calculés ont oscillé entre 9 et 134, des rapports plus élevés que ceux trouvés dans d'autres lacs étudiés, où ils étaient compris entre 0 et 50. De leur côté, Clasen et collaborateurs (Clasen *et al.*, 2008) ont trouvé des VBR variant entre 0.4 et 32 et de 2.9 de moyenne, ce qui était plus faible que les rapports trouvés dans les autres études. Dans une étude comparative entre populations virales marines et d'eaux douces, les auteurs Maranger et Bird (Maranger & Bird, 1995) ont observé un plus grand VBR dans les échantillons d'eau douce, à savoir 22.5, que dans les échantillons marins, de l'ordre de 2.5. Les auteurs n'ont pas constaté de corrélation entre la richesse trophique des milieux et le VBR.

En général, le taux de lysogènes semble fluctuer entre 0.1 % et 16 % dans les lacs tempérés ou tropicaux et entre 0 % et 73 % dans les lacs en Antarctique (Sime-Ngando & Colombet, 2009).

Globalement, le bénéfice que peut apporter la lysogénie à la cellule hôte est ambigu dans la littérature. Certaines études proposent que la lysogénie est bénéfique aux cellules en raison des événements de la conversion lysogénique, d'autres que les cellules lysogéniques ont un taux de survie plus faible que les non-lysogènes et encore d'autres qu'il

n'y pas de différence d'abondance entre les lysogènes et les non-lysogènes. La haute densité de cellules-hôtes a également été décrite comme un facteur déstabilisant dans le processus d'interaction entre virus lytiques et cellules-hôtes. Ceci impliquerait alors que la lysogénie aurait *a contrario* un effet stabilisant en présence d'une forte densité bactérienne ; ce qui à son tour serait contradictoire par rapport aux hypothèses postulant que la lysogénie est au contraire privilégiée en cas de faible abondance cellulaire. Tout ceci mérite d'être exploré plus en détail pour bien cerner les relations entre populations hôtes et populations virales et l'incidence des facteurs influençant les stratégies lytiques et lysogènes dans divers écosystèmes (Weinbauer, 2004).

### 10.3. Les enjeux de la pseudolysogénie

La plupart des études effectuées *in situ* et en laboratoire suggère que la contribution des virus lysogènes à la production totale du virioplancton est peu importante, alors qu'environ 40 % des cellules bactériennes contiennent des prophages. Cependant, le mode de propagation lytique semble incompatible dans beaucoup de milieux aquatiques où la concentration en nutriments, et par conséquent en cellules-hôtes, est faible. Une stratégie alternative au cycle lytique et à la lysogénie, mais expliquant une production virale continue dans des conditions défavorables, est la pseudolysogénie (Wommack & Colwell, 2000). Certaines observations seraient compatibles avec ce type de coexistence entre phages et bactéries, notamment une production virale et cellulaire constante établissant un certain état d'équilibre, ou « steady-state ». Les populations cellulaires et virales peuvent également être constituées d'un mélange de cellules sensibles et résistantes aux phages, ainsi que de phages lytiques et lysogènes. Cette hypothèse peut être compatible avec la définition de la pseudolysogénie (Ackermann & DuBow, 1987; Williamson *et al.*, 2001; Weinbauer, 2004). Les conditions environnementales jouent certainement un rôle important dans l'établissement de la pseudolysogénie. La concentration en nutriments, tels que les acides aminés comme source d'azote, de carbone et d'énergie, peut agir comme déclencheur métabolique pour la production lytique des pseudolysogènes. A la différence des vrais lysogènes, les pseudolysogènes sont définis comme ne pouvant pas être induits par des agents déclenchant la réponse SOS de la cellule hôte, tels que la mitomycine C (Wommack & Colwell, 2000; Los & Wegrzyn, 2012). Ainsi, lors de l'étude du phage UT1 de *Pseudomonas aeruginosa*, les chercheurs Ripp et Miller ont pu démontrer qu'après 15 jours de culture, au moins 20 % des cellules portaient le phage. Seule une fraction de ces cellules produisaient des virions et le pré-prophage (ou le phage pseudolysogène) était transmis aléatoirement lors des divisions cellulaires. Dans des conditions de carence nutritive, peu de production virale peut être observée. Toutefois, après ajout de nutriments, une production croissante du phage UT1 a été constatée. Ainsi, l'infection des cellules de *P. aeruginosa* par le phage UT1 a montré des résultats différents selon les conditions nutritionnelles : dans un milieu riche en nutriments, les phages ont entamé un cycle lytique alors qu'en carence

nutritive, ils sont entrés dans un état pseudolysogène (Ripp & Miller, 1997). Un autre exemple dans lequel l'environnement joue un rôle clé dans la détermination du choix du cycle viral est apporté par les études effectuées sur l'archée *Halobacterium salinarium* (Torsvik & Dundas, 1980). A des concentrations élevées en NaCl (25 % - 30 %), qui favorisent le développement des cellules, le virus HS 1 n'a pratiquement pas été produit. A des concentrations en NaCl inférieures à 25 %, les chercheurs Torsvik et Dundas ont constaté une production lytique importante de HS1. Afin d'expliquer ces résultats, les auteurs ont proposé une stratégie de survie du virus dans laquelle celui-ci se propage de manière lytique lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables pour l'hôte, c'est à dire quand le taux de NaCl chute, ce qui, à terme, doit permettre d'assurer ainsi la survie du virus. A des concentrations plus importantes de NaCl, les cellules se multiplient normalement et les virus demeurent dans les cellules en évitant ainsi de tuer les cellules-hôtes. Alors que les détails concernant les différents aspects de la pseudolysogénie ne sont pas encore connus, ce phénomène trouve une signification biologique attirante permettant le maintien d'une production virale constante dans des conditions défavorables à la propagation lytique des virus. Il est possible que la pseudolysogénie permette aux phages de réagir rapidement aux conditions environnementales. La pseudolysogénie peut également constituer une étape évolutive des virus dans l'établissement d'une lysogénie permanente (Wommack & Colwell, 2000). En revanche, les mécanismes influençant la décision du cycle lytique-lysogène des phages tempérés dans les milieux naturels reste malgré tout peu connus. La définition de la pseudolysogénie n'étant pas clairement établie, une confusion entre les vrais lysogènes et les pseudolysogènes est toujours possible actuellement. Différentes stratégies de survie virale semblent être incluses dans le terme « pseudolysogénie », générant ainsi une confusion qui masque son vrai rôle dans l'environnement (Weinbauer, 2004; Los & Wegrzyn, 2012).

## 11. Les virus dans les milieux à haute température

### 11.1. L'abondance dans les sources hydrothermales terrestres et marines

Si plusieurs études ont été publiées décrivant l'abondance des microorganismes dans les différents écosystèmes aquatiques, l'abondance des communautés microbiennes et virales dans les sources hydrothermales a été peu étudiée. Quelques données obtenues dans des sources hydrothermales terrestres et marines sont cependant disponibles (Tableau 2).

Source hydrothermale	Site d'étude	Température (°C)	Abondance procaryotique (cellulesx 10 <sup>5</sup> /ml)	Abondance virale (VLPx 10 <sup>5</sup> /ml)	VPR <sup>7</sup>	Références
<b>Marine profonde</b>	Gorda Ridge	ND	~ 0.1	~0.1 - 10	0.96 - 2.20	Juniper <i>et al.</i> 1998
	East Pacific Rise (9°N)	ND	0.98 - 2.64	3.13 - 14.8	1.19 - 3.73	Wommack <i>et al.</i> 2004
			1.8 <sup>m</sup>	54 <sup>m</sup>	ND	Williamson <i>et al.</i> 2008
Endeavour Ridge	1.8 – 90	1.3 - 44.6	1.5 - 990	6.4 - 10.0	Ortmann <i>et Suttle</i> 2005	
<b>Marine côtière</b>	Ile de Panarea	38 – 110	1.1 <sup>m</sup>	1.9 <sup>m</sup>	1.0 - 5.4	Manini <i>et al.</i> 2008
	et Nord de Sulawesi		1800 – 12800 <sup>s</sup>	2700 – 5200 <sup>s</sup>	0.8 - 12.7	
<b>Terrestre</b>	Japon	ND	1.7 <sup>m</sup>	141 <sup>m</sup>	ND	Chiura <i>et al.</i> 2002
	Californie	73 - 84	1.0 - 1.8	0.7 - 70	ND	Breitbart <i>et al.</i> 2004
	Yellowstone	74 - 93	9.0 – 43.0	3.07– 14.4	0.33 - 0.34	Schoenfeld <i>et al.</i> 2008

Tableau 2. Tableau récapitulatif de l'abondance procaryotique et virale dans différentes sources hydrothermales. VPR = Virus-to prokaryote ratio (= ratio virus/procaryote), ND = non déterminé, m = moyenne, s = sédiment (unité = g<sup>-1</sup>)

Les sites d'échantillonnage marins ciblés pour l'étude de l'abondance microbienne et virale sont majoritairement situés au niveau des dorsales océaniques.

<sup>7</sup>VPR = Virus-to prokaryote ratio. Ce rapport remplace celui du VBR sans doute car il prend en compte les cellules archéennes en plus de celles des bactéries.

Juniper et collaborateurs (Juniper *et al.*, 1998) ont prélevé des échantillons d'eau de panaches hydrothermaux sur Gorda Ridge, au large de la Californie, afin d'étudier l'abondance microbienne et virale liée à des anomalies de température. Par rapport à l'eau de mer environnante, une abondance bactérienne significativement plus élevée dans les eaux du panache a été constatée, alors qu'une abondance virale plus faible pour un panache jeune et plus élevée pour deux panaches plus âgés a été observée. Bien que des chiffres exacts ne soient pas communiqués par les auteurs, une abondance bactérienne de l'ordre de  $10^4$  cellules/ml et une concentration de virus de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  VLP/ml a été constatée. Le VBR calculé a oscillé entre 0.96 et 2.20. Dans une étude menée par Wommack et collaborateurs (Wommack *et al.*, 2004) sur le fonctionnement d'un instrument de prélèvement d'eau, les auteurs ont échantillonné la ride médio-océanique du Pacifique, l'« East Pacific Rise 9°N » par 3700 m de profondeur. Les fluides hydrothermaux ont présenté une abondance microbienne comprise entre  $0.98 \times 10^5$  bactéries/ml et  $2.64 \times 10^5$  bactéries/ml et une abondance virale mesurée variant entre  $3.13 \times 10^5$  VLP/ml et  $14.8 \times 10^5$  VLP/ml. Un VBR de 1.19 pour la valeur minimale et 3.73 pour la maximale a été calculé. Ortmann et Suttle (Ortmann & Suttle, 2005) ont également calculé l'abondance microbienne et virale dans des échantillons de fluides hydrothermaux profonds au large de la côte ouest de l'Amérique du Nord, au niveau de la ride d'Endeavour. Les échantillons ont été prélevés dans les fluides sortant de fumeurs noirs et blancs ainsi que dans l'eau environnante. Leurs résultats montrent une abondance oscillant entre  $1.30 \times 10^5$  et  $4.46 \times 10^6$  cellules/ml pour les procaryotes et  $1.45 \times 10^5$  et  $9.90 \times 10^7$  VLP/ml pour les virus. Le VBR d'une valeur minimale de 6.4 et maximale de 10.0 a pu être observée. Les auteurs ont détecté peu de microorganismes dans le fluide hydrothermal, mais ont cependant constaté que l'eau environnante moins chaude est plus chargée en microorganismes. Ils suggèrent que la baisse de température favoriserait le développement de communautés microbiennes. Ortmann et Suttle constatent également une faible abondance en virus dans l'eau à proximité directe des sources hydrothermales. Ils proposent l'hypothèse de l'adsorption des virus aux particules qui précipitent lors de l'entrée en contact des fluides hydrothermaux avec l'eau de mer environnante, diminuant ainsi la concentration virale (Suttle & Chen, 1992; Ortmann & Suttle, 2005).

Deux études de métagénomique virale ont été menées dans les sources hydrothermales océaniques profondes. Dans des échantillons provenant également de la ride d'Endeavour, Williamson et collaborateurs (Williamson *et al.*, 2008) ont révélé une fraction inductible allant parfois jusqu'à la totalité des cellules provenant d'un site de prélèvement, ce qui suggère un haut taux de lysogénie dans ce type d'écosystème. Environ 51 % des séquences virales obtenues ne présentaient aucune homologie avec les séquences accessibles dans les bases de données, ce qui suggère une grande diversité de communautés virales. Ainsi, les virus lysogènes joueraient un rôle clé dans la structuration des communautés procaryotiques dans les écosystèmes extrêmes géothermiques de l'océan profond. Pour leurs analyses de métagénomique virale, Anderson et collaborateurs

(Anderson *et al.*, 2011) ont utilisé une base de données de CRISPR (ou « *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat* ») pour comparer leurs séquences métagénomiques virales obtenues de la ride Juan de Fuca, dans le nord-est du Pacifique. Le système CRISPR est un mécanisme potentiellement impliqué dans l'immunité antivirale et que l'on retrouve à la fois chez les archées et les bactéries. Il consiste généralement en une série de répétitions courtes, d'environ 20-50 pb de longueur, entre coupées par des séquences dites « spacers » d'environ 25-75 pb. L'immunité serait créée lorsque des courtes séquences dérivées des envahisseurs de type viraux ou plasmidique seraient incorporées entre les séquences répétées par des gènes impliqués dans la réponse CRISPR, connus sous le nom « CRISPR associated (cas) genes ». Lorsque les éléments génétiques mobiles seraient identiques à des séquences préexistantes du type CRISPR déjà présentes dans le génome de l'hôte, ces éléments seraient reconnus comme envahissants et clivés par le système CRISPR/Cas (Deveau *et al.*, 2010; Horvath & Barrangou, 2010; Anderson *et al.*, 2011). La majorité des séquences obtenues (67.14 %) par Anderson et collaborateurs n'avaient pas d'homologues dans la base de données SEED. Les analyses comparatives de viromes montrent quelles séquences CRISPR issues des isolats provenant de cheminées hydrothermales présentent plus de similarité de séquence avec des viromes obtenus à partir de cheminées hydrothermales par rapport aux viromes issus d'autres types de sources chaudes marines ou terrestres. Toutefois, un pourcentage élevé de similarité avec les spacers issus de communautés microbiennes mésophiles suggère que le virome de la ride Juan de Fuca est composé de virus qui pourraient potentiellement infecter divers groupes taxonomiques, à la fois bactériens et archéens (Anderson *et al.*, 2011).

Parmi les sources chaudes marines, l'abondance microbienne et virale a également été étudiée dans des sources côtières en Méditerranée aux îles de Panarea (3 m de profondeur), et au nord de Sulawesi en Indonésie (jusqu'à 20 m de profondeur). Manini et collaborateurs (Manini *et al.*, 2008) ont constaté une abondance procaryotique et virale faible dans les échantillons d'eau et de sédiment analysés. Dans les échantillons de fluides hydrothermaux méditerranéens, l'abondance moyenne procaryotique était de  $1.1 \times 10^5$  cellules/ml, contre  $2.0 \times 10^5$  cellules/ml dans les échantillons de contrôle d'eau de mer. Dans les sédiments des cheminées hydrothermales des deux sites étudiés, l'abondance procaryotique était plus élevée dans les précipités de sels sulfureux (entre  $1.8 \times 10^8$  et  $12.8 \times 10^8$  cellules/g) que dans les sédiments environnants (entre  $0.83 \times 10^8$  et  $4.01 \times 10^8$  cellules/g). Un gradient décroissant d'abondance procaryotique a été constaté dans les sédiments des deux sites à partir du cœur de la cheminée jusque dans un rayon de 200 cm. Une abondance virale moyenne de  $1.9 \times 10^5$  VLP/ml a été mesurée dans les sources hydrothermales de la Méditerranée, par rapport une concentration de  $8.8 \times 10^5$  VLP/ml dans les échantillons témoin d'eau de mer. Un gradient décroissant d'abondance virale a également été constaté dans les sédiments du Pacifique en s'éloignant du cœur de la cheminée alors qu'un gradient inverse à celui-ci a été noté dans les sédiments de la Méditerranée, où la densité virale était plus importante dans les sédiments environnants. Des VPR (« virus-to-procaryote ratio » ou

rapport virus/procaryotes) compris entre environ 1.0 et 5.4 ont été calculés dans les échantillons liquides, contre 4.6 calculé dans les témoins. Dans les sédiments, un VPR oscillant entre 0.8 et 12.7 a pu être constaté, les valeurs maximales étant atteintes dans les précipités à 200 cm du cœur des sources. En se basant sur les résultats de l'étude, les auteurs suggèrent que les virus seraient moins tolérants aux hautes températures que les procaryotes, ce qui expliquerait la faible abondance des virus comparée aux autres systèmes côtiers étudiés. Par conséquent, l'impact des virus sur l'abondance et la diversité des communautés microbiennes serait faible dans ce type de milieu (Manini *et al.*, 2008).

Si dans les sources chaudes marines les abondances procaryotiques et virales sont globalement moins élevées que dans les systèmes aquatiques mésophiles, elles sembleraient l'être encore moins dans les sources hydrothermales terrestres. Rice et collaborateurs (Rice *et al.*, 2001) n'ont pas réussi à détecter de VLP par filtration directe et visualisation par microscopie à épifluorescence dans des échantillons bruts issus des sources acido-thermophiles de Yellowstone aux Etats-Unis. Zillig et collaborateurs (Zillig *et al.*, 1994) ont dû concentrer  $10^4$  fois leurs échantillons de solfatares d'Islande afin de pouvoir détecter des VLP en microscopie électronique transmission (Prangishvili, 2006a). Dans les sources acido-thermophiles, l'abondance des VLP a été estimée, par Ortmann et collaborateurs (Ortmann *et al.*, 2006) en microscopie à épifluorescence, à des valeurs comprises entre  $10^3$  et  $10^5$  VLP/ml. Cependant, dans des sources chaudes japonaises, Chiura et collaborateurs (Chiura *et al.*, 2002) ont observé une densité procaryotique moyenne de  $1.7 \times 10^5$  cellules/ml et une abondance de VLP moyenne de  $1.41 \times 10^7$  VLP/ml. Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2004b) ont mené une étude sur la dynamique des populations de phage dans des sources chaudes (et de pH neutre) terrestres de la Californie. Les auteurs ont observé à l'aide de la ME une concentration de procaryotes allant de  $1.0 \times 10^5$  à  $1.8 \times 10^5$  cellules/ml. La densité de VLP minimale était de  $0.07 \times 10^6$  VLP/ml et maximale de  $7.0 \times 10^6$  VLP/ml. Des tests d'induction par la mitomycine C dans certains de ces échantillons a permis d'augmenter la concentration de VLP de 1.2 à 1.4 fois. Ceci suggérerait un taux de 1 à 9 % de cellules portant un prophage, en prenant comme hypothèse la production de 20 virions par cellule en moyenne. Une densité de VLP moins importante a été observée dans des échantillons hydrothermaux plus chauds, par rapport à celle dénombrée dans des échantillons dont les températures étaient en dessous de la limite maximale viable connue pour les eucaryotes (62°C). Toutefois, quelques exceptions à cette règle ont été constatées, où la concentration de VLP mesurée a atteint des valeurs d'environ  $3.0 \times 10^6$  VLP/ml à 73° C et à 82°C. Les auteurs font remarquer que dans les conditions de thermophilie extrême, les virus constituent les seuls prédateurs des procaryotes, aucun protiste n'ayant encore été observé dans ces conditions à ce jour. Les auteurs ont également estimé la production microbienne à des valeurs oscillant entre  $8.0 \times 10^6$  et  $1.75 \times 10^8$  cellules  $l^{-1}$  jour $^{-1}$  et une production virale variant entre  $1.0 \times 10^9$  et  $1.5 \times 10^9$  VLP  $l^{-1}$  jour $^{-1}$ . Breitbart et collaborateurs ont finalement estimé un taux de dégradation des particules virales qui s'élevait à 25 % lors de transfert d'échantillons hydrothermaux dans

des sources plus fraîches ou sur glace, mais à 70 % - 82 % lors du transfert dans des conditions bouillantes. Ces auteurs émettent l'hypothèse que les phages thermophiles pourraient constituer des vecteurs de transduction lors de leurs déplacements entre biomes. Ceci concorde avec les observations de Chiura qui a démontré la capacité de transfert de gènes entre une VLP issue d'une source chaude et *E. coli* et *B. subtilis* (Chiura, 2002; Breitbart *et al.*, 2004b).

Une étude de métagénomique virale sur les sources hydrothermales terrestres de Yellowstone a été publiée par Schoenfeld et collaborateurs (Schoenfeld *et al.*, 2008). Dans cette étude, les auteurs ont pu calculer les concentrations procaryotiques et virales en effectuant une concentration de 400-600 litres d'eau à un volume de 100 ml. Dans la source Bear Paw (74°C, pH 7.34) les auteurs trouvent une abondance procaryotique de  $4.3 \times 10^6$  cellules/ml et virale de  $1.44 \times 10^6$  VLP/ml. Dans la source plus chaude et plus alcaline Octopus (93°C, pH 8.14) les auteurs obtiennent une abondance procaryotique de  $9.0 \times 10^5$  cellules/ml et virale de  $3.07 \times 10^5$  VLP/ml. Dans les deux sources, le rapport virus/procaryote est inférieur à 1 (respectivement 0.33 et 0.34 pour Bear Paw et Octopus). Les auteurs pensent que ces faibles rapports pourraient être expliqués par le fait que la majorité des virus thermophiles ne sont pas lytiques. En revanche, les résultats des analyses métagénomiques suggèrent que le mode de propagation lytique pourrait être plus commun qu'estimé actuellement. Une forte similarité de séquences virales à des séquences issues d'autres sources thermoacidophiles a été constatée, bien que celles-ci aient été limitées à quelques ORFs seulement. Environ 25 % des séquences issues de sources différentes ont présenté des similarités importantes, suggérant une origine souterraine commune. Globalement, les résultats ont montré une diversité virale moins importante qu'attendue, se rapprochant de la diversité virale rencontrée dans les milieux tempérés. Une conservation importante de séquences virales a été notée au niveau local et global au sein de sources présentant pourtant différentes propriétés physiques et biogéochimiques. Les mécanismes de conservation pourraient être dus à une adaptation des virus, ayant des gènes communs, à des hôtes différents, ou pourraient provenir d'une dispersion virale colonisant des sources hydrothermales différentes. Les auteurs proposent une hypothèse sur la dispersion des virus selon laquelle une grande partie de celle-ci se ferait de manière sous terrain. Une abondance similaire mesurée dans des sources qui n'apparaissent que brièvement soutiendrait une connexion des eaux souterraines et une dispersion des virus dans celles-ci (Schoenfeld *et al.*, 2008).

## 11.2. La diversité morphologique des virus thermophiles

Si les virus de morphologie caudée représentent environ 96.3 % des virus de procaryotes décrits (Ackermann & Prangishvili, 2012), la diversité morphologique des virus isolés dans les milieux extrêmophiles est remarquable, particulièrement chez les archées hyperthermophiles (Geslin *et al.*, 2005; Le Romancer *et al.*, 2007) (Figure 18). Les virus infectant des représentants des *Euryarchaeota* sont majoritairement composés de morphotypes caudés et fusiformes, que l'on rencontre chez les méthanogènes et les halophiles (Dyall-Smith *et al.*, 2003; Prangishvili & Garrett, 2005). Seuls deux virus d'euryarchées hyperthermophiles ont été décrits. Ces derniers présentent également un morphotype fusiforme (Geslin *et al.*, 2003a; Gorlas *et al.*, 2012).

La majorité des nouvelles familles de virus caractérisées par de nouvelles morphologies a été découverte associée à des espèces hyperthermophiles et acidophiles qui appartiennent au phylum des *Crenarchaeota* (Prangishvili & Garrett, 2005). Ces virus représentent actuellement huit nouvelles familles : les *Fuselloviridae* et les *Bicaudaviridae* (fusiforme), les *Clavaviridae* (bacilliforme), les *Guttaviridae* (en forme de goutte), les *Globuloviridae* (sphérique), les *Ampullaviridae* (en forme de bouteille), les *Rudiviridae* et les *Lipothrixviridae* (de morphologie filamenteuse formant ensemble l'ordre proposé de *Ligamenvirales*) (Ackermann & Prangishvili, 2012; Prangishvili & Krupovic, 2012). Une neuvième famille a été proposée récemment : les *Spiraviridae* (également en forme de bâtonnet) (Mochizuki *et al.*, 2012). La présence d'appendices évolutifs chez le virus icosaédrique STIV est un argument justifiant la création d'une nouvelle famille (Ackermann & Prangishvili, 2012).

Comparativement, la diversité morphologique des virus de bactéries thermophiles est plus restreinte. Des virus thermophiles n'ont été décrits qu'à partir de trois genres : *Thermus*, *Geobacillus* et *Rhodothermus* (Liu *et al.*, 2009). Ces virus sont essentiellement caudés et appartiennent aux familles classiques des *Siphoviridae* et des *Myoviridae*. Un seul virus de morphotype filamenteux de la famille de *Inoviridae* et infectant *Thermus thermophilus* a été décrit (Pederson *et al.*, 2001). Des virus icosaédriques de la famille des *Tectiviridae* ont été reconnus dans des isolats de *Thermus* provenant de sources alcalines d'Islande (Yu *et al.*, 2006), tout comme des virus sphériques ont été associés à des *Aquificales* (Chiura *et al.*, 2002).

Pour l'instant, tous les virus thermophiles décrits possèdent un génome à ADN double brin, mis à part le virus ACV d'*Aeropyrum pernix* dont le génome est simple brin (Mochizuki *et al.*, 2012). Alors que les séquences de 721 génomes de bactériovirus sont accessibles aujourd'hui dans les bases de données, seuls dix génomes de phages thermophiles dont six de *Thermus*, trois de *Geobacillus* et une de *Rhodothermus* sont

disponibles. Paradoxalement, 30 génomes d'archéovirus sur les 38 séquencés sont thermophiles, indiquant que l'effort porté sur ces nouveaux virus est plus important que sur les virus caudés de bactéries thermophiles. Les hôtes de ces archéovirus thermophiles appartiennent pour 11 d'entre eux au genre *Acidianus*, 13 à *Sulfolobus*, un à *Pyrobaculum*, un à *Thermoproteus*, 2 à *Methanothermobacter*, un à *Pyrococcus* et un à *Thermococcus* (base de données NCBI).

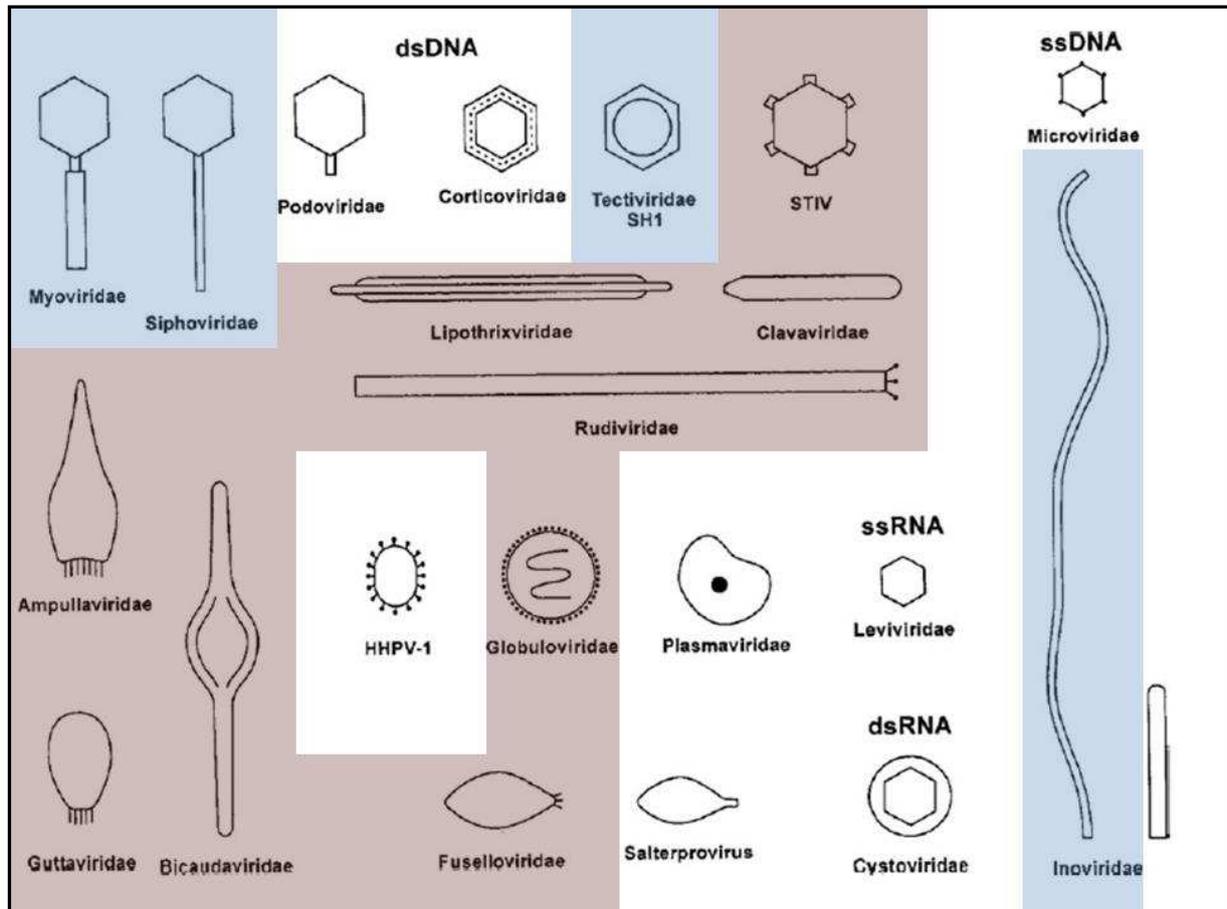


Figure 18. Représentation schématique des morphotypes de virus de procaryote thermophile. Les archéovirus sont colorés en mauve et les bactériophages en bleu (adapté à partir d'Ackermann et Prangishvili, 2012).

## 12. Les communautés microbiennes des sources hydrothermales

### 12.1. Les *Thermococcales*, les *Thermotogales* et leurs virus

Les *Thermotogales* et les *Thermococcales* constituent des communautés microbiennes découvertes dans les cheminées hydrothermales océaniques profondes. Ces communautés sulfato-réductrices cohabitent dans des conditions d'anaérobiose à haute température (Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya, 2006). Les archées *Thermococcales* et les bactéries *Thermotogales* partagent la même niche écologique, ce qui a pu donner lieu à des transferts horizontaux de gènes entre ces deux communautés (Le Fourn *et al.*, 2011) et où les conditions de vie pourraient se rapprocher de celles qui régnaient lorsque la vie est apparue sur Terre (Wagner & Wiegel, 2008).

#### 12.1.1. Les *Thermotogales*

L'ordre des *Thermotogales* est actuellement représenté par la famille des *Thermotogaceae*, qui lui-même est composé de 11 genres (base de données NCBI). Les *Thermotogales* représentent une lignée phylogénétiquement ancestrale dans le domaine des bactéries. Celle-ci est composée de microorganismes organotrophes, anaérobies stricts et de modérément thermophiles à hyperthermophiles (Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya, 2006). Les cellules se présentent sous forme de bâtonnets entourés par une gaine (Reysenbach, 2001) (Figure 19). De nombreux représentants des *Thermotogales* ont été isolés dans les sources hydrothermales océaniques profondes (Miroshnichenko & Bonch-Osmolovskaya, 2006; Nakagawa & Takai, 2006).

Récemment, des représentants mésophiles ont été découverts et cultivés (Nesbo *et al.*, 2006; Nesbo *et al.*, 2010; Ben Hania *et al.*, 2011). Suite à cette découverte, le genre « *Mesotoga* » a été créée (Nesbo *et al.*, 2012).

A l'heure actuelle, aucun virus n'a encore été décrit chez les *Thermotogales*.



Figure 19. Image prise en MET d'une cellule de *Thermotoga elfii*. La gaine, ou la toge, est visible aux extrémités de la cellule. La barre représente 1  $\mu\text{m}$  (d'après (Ravot *et al.*, 1995)).

### 12.1.2. Les Thermococcales

Le phylum des *Euryarchaeota* est actuellement divisé en neuf classes, dont celle des *Thermococci*. Seul ordre représentant les *Thermococci*, les *Thermococcales*, est composé d'une seule famille, les *Thermococcaceae*, qui est à son tour subdivisée en trois genres : *Paleococcus*, *Pyrococcus* et *Thermococcus* (base de données NCBI). Ce sont des archées en forme de coque (Figure 20), sulfato-réductrices, hétérotrophes et anaérobies. Elles sont également hyperthermophiles et neutrophiles. Des représentants de chaque genre ont été isolés dans les sources hydrothermales océaniques (Prieur *et al.*, 2004).

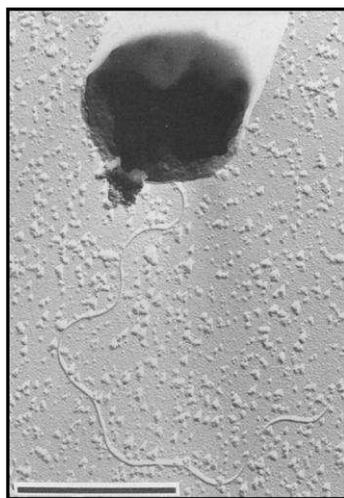


Figure 20. Image prise en MET d'une cellule de *Thermococcus alkaliphilus*. Un flagelle monotriche est visible à une extrémité de la cellule en forme de coque. La barre représente 1  $\mu\text{m}$  (d'après (Keller *et al.*, 1995)).

## Les virus des Thermococcales

Deux virus ont été décrits chez les *Thermococcales*: PAV<sub>1</sub> et TPV<sub>1</sub> (Geslin *et al.*, 2003a; Gorlas *et al.*, 2012). Le premier virus décrit chez les euryarchées hyperthermophiles a été découvert dans une souche de *Pyrococcus abyssi* isolée à partir d'une source hydrothermale profonde. Le virus PAV<sub>1</sub> a une forme de citron, de morphologie similaire aux *Fuselloviridae* et contient un génome composé d'ADN double brin circulaire de 18 kb. Le virus semble se maintenir dans son hôte en état porteur (Geslin *et al.*, 2003a). Récemment, un deuxième virus a été décrit chez les *Thermococcales*, TPV<sub>1</sub> (Gorlas *et al.*, 2012). Ce virus a été découvert dans une nouvelle espèce de *Thermococcus*, *Thermococcus prieurii*, isolée également à partir d'une cheminée hydrothermale océanique profonde. TPV<sub>1</sub> présente également une morphologie fusiforme similaire aux virus de la famille des *Fuselloviridae* et son génome est aussi constitué d'ADN double brin circulaire d'une taille de 21.5 kb. Si TPV<sub>1</sub> est produit de manière chronique, similairement à PAV<sub>1</sub>, les analyses du génome viral laissent supposer que le virus s'intègre au génome de l'hôte.

A côté de ces deux virus, d'autres VLP potentielles ont été observées chez les *Thermococcales*. Geslin et collaborateurs (Geslin *et al.*, 2003b) ont réalisé des cultures d'enrichissement à partir d'échantillons de cheminée hydrothermale sur un milieu favorisant la croissance des *Thermococcales* et ont ensuite analysé les surnageants de cultures en MET. Les auteurs ont pu distinguer neuf morphotypes distincts de VLP dans 15 enrichissements sur 89. Ces morphotypes étaient essentiellement de deux types : fusiformes et filamenteux. Tous les isolats obtenus à partir de ces enrichissements appartenaient aux *Thermococcales*.

Un autre type d'élément de transfert de gènes potentiel a été décrit chez les *Thermococcales* : Les *virus-like vesicles* (Soler *et al.*, 2008) (Figure 21). Découvertes lors du criblage de souches de *Thermococcales* pour la présence de virus par MET, ces vésicules présentent des caractéristiques parfois proches des virus, c'est à dire une morphologie grossièrement sphérique et une taille comprise entre 50 nm et 100 nm de diamètre. A la différence des virus, différentes tailles de vésicules ont été observées au sein d'une souche productrice. Les *virus-like vesicles* ont été observées également sous forme de chaîne ou « collier de perles » (Figure 21). Soler et collaborateurs ont également pu extraire de l'ADN cellulaire à partir de ces vésicules et postulent que ces entités puissent participer à des échanges de gènes. Par conséquent, la taille étant globalement de l'ordre de celle des virus et la présence d'ADN font que ces entités donnent un signal similaire à ceux de virus en microscopie à épifluorescence. L'ADN extrait de ces vésicules était de l'ordre de 20 kb et correspondait à de l'ADN chromosomique ou plasmidique. Les auteurs n'ont pas pu déterminer si l'ADN était intra-vésiculaire ou attaché à l'extérieur des vésicules, même si des observations en MET de vésicules en rupture suggère que l'ADN est intra-vésiculaire (Soler *et al.*, 2011).

Ces auteurs ont trouvé 26 souches de *Thermococcales* productrices de vésicules parmi les 34 criblées, dont *T. gammatolerans*, *T. nautilus* et *T. kodakaraensis*, ce qui suggère que la production de vésicules est une caractéristique répandue chez les *Thermococcales*. La production de particules de type vésiculaire a également été décrite chez les eucaryotes sous forme d'exosomes et chez les procaryotes sous forme de vésicules membranaires, ce qui suggère que cette caractéristique est universelle dans les trois domaines du vivant (Soler *et al.*, 2008).

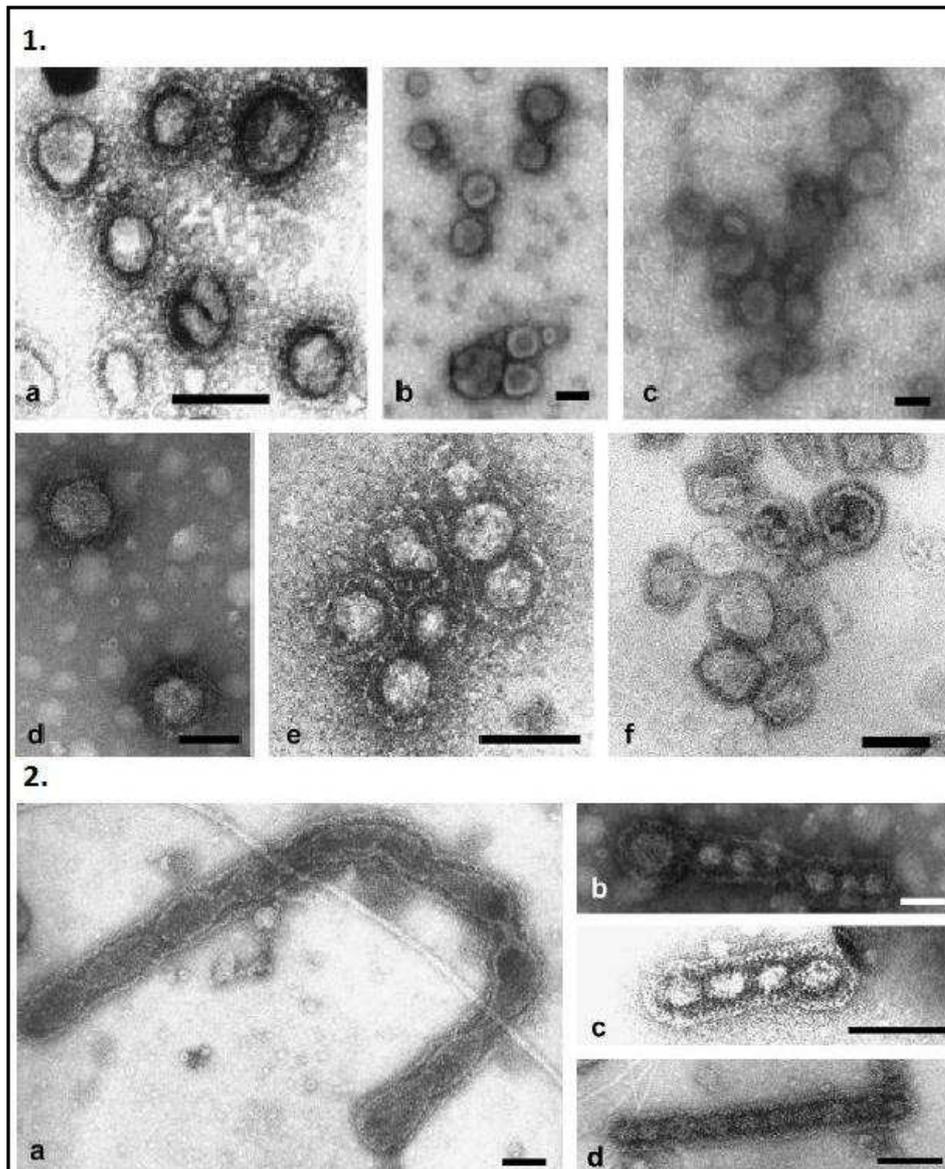


Figure 21. Photos de MET représentant les « virus-like vesicles » observées par Soler et collaborateurs. 1a-f vésicules observées chez les souches a) *Thermococcus* 9/3, b) *Thermococcus* 29/2, c) *Thermococcus* 28/4, d) *Pyrococcus horikoshii*, e) *Thermococcus* 29/3 et f) *Thermococcus* « nautilus » 30/1. 2 a-d présentent des « colliers de vésicules » observés chez les souches a) *Thermococcus* « nautilus » 30/1, b) *Pyrococcus horikoshii*, c) *Thermococcus* 29/3A, d) *Thermococcus* 31/3. La taille de la barre est 100 nm (d'après Soler *et al.*, 2008).

## 12.2. La niche écologique et la classification des *Geobacillus*

A l'heure actuelle, la famille des *Bacillaceae* est sous divisée en 41 genres, dont 4 ne sont pas encore officiellement reconnus. Parmi ces genres, figure *Geobacillus* (Tableau 3) (base de données NCBI). Pendant longtemps, la bactérie *Bacillus stearothermophilus*, décrite en 1920 (Donk, 1920), est demeurée la seule espèce du genre *Bacillus* obligatoirement thermophile. Dès les années 1980, d'autres espèces thermophiles ont été proposées sur la base de leurs caractéristiques phénotypiques. Des analyses de séquences codant pour l'ARNr 16S effectuées par Ash et collaborateurs (Ash *et al.*, 1991) ont divisé le genre *Bacillus* en plusieurs groupes distincts. Les études phylogénétiques regroupaient *B. stearothermophilus*, *B. kaustophilus* et *B. thermoglucosidasius* dans une lignée distincte de *Bacillus sensu lato*. La cohérence phénotypique et phylogénétique de ce groupe a été reconnue par Nazina et collaborateurs (Nazina *et al.*, 2001) qui ont proposé la création du genre « *Geobacillus* », avec *G. stearothermophilus* comme espèce-type. Ce genre comprend (au moment de la rédaction de ce document) 16 espèces décrites, ainsi que 8 espèces et deux sous-espèces non reconnues officiellement (base de données NCBI) (Tableau 3). Récemment, une révision taxonomique faite par Coorevits et collaborateurs (Coorevits *et al.*, 2012) propose une mise à jour de quelques espèces figurant au sein du genre *Geobacillus*. Elle inclut notamment le déplacement de *G. tepidamans* et de *G. caldoxyproteolyticus* dans le genre *Anoxybacillus*, la création du genre *Caldibacillus* au sein des *Bacillaceae* ayant comme seule représentante l'ancienne espèce *G. debilis* et l'inclusion de *B. thermantarcticus* dans le genre *Geobacillus*. Suite à ces modifications, les auteurs proposent une mise à jour de la description du genre *Geobacillus* faite par Nazina et collaborateurs. Les *Geobacilli* posséderaient des cellules en forme de bâtonnet, seraient obligatoirement thermophiles, endosporulantes, chimio-organotrophes, aérobies ou facultativement anaérobies avec une croissance faible et neutrophile (Tableau 4). Les sites d'isolement de souches de *Geobacillus* comprennent notamment des sources hydrothermales, des terres géothermiques, des réservoirs pétroliers, des composts et des produits alimentaires (Coorevits *et al.*, 2012).

Genres appartenant à la famille des <i>Bacillaceae</i>	Genres non reconnus des <i>Bacillaceae</i>	
<i>Aeribacillus</i>	<i>Natronobacillus</i>	<i>Amylobacillus</i>
<i>Alkalibacillus</i>	<i>Oceanobacillus</i>	<i>Anaerobacillus</i>
<i>Amphibacillus</i>	<i>Ornithinibacillus</i>	<i>Aquisalibacillus</i>
<i>Anoxybacillus</i>	<i>Paraliobacillus</i>	<i>Tenuibacillus</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Paucisalibacillus</i>	
<i>Caldalkalibacillus</i>	<i>Piscibacillus</i>	
<i>Calditerricola</i>	<i>Pontibacillus</i>	
<i>Cerasibacillus</i>	<i>Psychrobacillus</i>	
<i>Filobacillus</i>	<i>Saccharococcus</i>	
<b><i>Geobacillus</i></b>	<i>Salimicrobium</i>	
<i>Gracilibacillus</i>	<i>Salinibacillus</i>	
<i>Halalkalibacillus</i>	<i>Salirhabdus</i>	
<i>Halobacillus</i>	<i>Salsuginibacillus</i>	
<i>Halolactibacillus</i>	<i>Sediminibacillus</i>	
<i>Lentibacillus</i>	<i>Terribacillus</i>	
<i>Lysinibacillus</i>	<i>Thalassobacillus</i>	
<i>Marinococcus</i>	<i>Virgibacillus</i>	
<i>Microaerobacter</i>	<i>Vulcanibacillus</i>	
<i>Natribacillus</i>		

Espèces appartenant au genre <i>Geobacillus</i>	Espèces et sous-espèces non reconnues des <i>Geobacillus</i>
<i>G. caldoxylosilyticus</i>	<i>G. anatolicus</i>
<i>G. debilis</i>	<i>G. bogazici</i>
<i>G. gargensis</i>	<i>G. caldoproteolyticus</i>
<i>G. jurassicus</i>	<i>G. kaue</i>
<i>G. kaustophilus</i>	<i>G. kaustophilus</i> subsp. <i>Vulgivagus</i>
<i>G. lituanicus</i>	<i>G. thermoleovorans</i> subsp. <i>Stromboliensis</i>
<i>G. stearothermophilus</i>	<i>G. thermoparaffinivorans</i>
<i>G. subterraneus</i>	<i>G. tropicalis</i>
<i>G. tepidamans</i>	<i>G. uralicus</i>
<i>G. thermocatenulatus</i>	<i>G. zalihae</i>
<i>G. thermodenitrificans</i>	
<i>G. thermoglucosidasius</i>	
<i>G. thermoleovorans</i>	
<i>G. toebii</i>	
<i>G. uzenensis</i>	
<i>G. vulcani</i>	

Tableau 3. Liste de genres appartenant à la famille des *Bacillaceae*, dont le genre *Geobacillus*, qui est subdivisé en 24 espèces (base de données NCBI).

<b>Morphologie</b>		
Cellules	Bâtonnets, mobiles avec flagelles péritriches, cellules isolées ou pouvant former des chaînes	
Gram	Structure de la paroi cellulaire Gram positive, mais la coloration des cellules pouvant varier entre positive et négative	
Spores	Une spore ellipsoïdale par cellule, terminale ou sub-terminale	
Colonies	Formes, couleurs et tailles variables	
<b>Métabolisme</b>		
Energie	Chimio-organotrophes	
Température	Thermophiles obligatoires Croissance observée entre 30°-80°C avec des optimums de croissance entre 50°-60°C.	
Oxygène	Aérobies, facultativement anaérobies (mais avec une croissance faible)	
pH	Neutrophiles (variant entre 5.0 et 9.0 avec des optimums entre 6.2-7.5)	
Autre	Facteurs de croissance, vitamines, NaCl et KCl non nécessaires pour la croissance de la plupart des souches	
<b>Caractéristiques ADN</b>		
Pourcentage G+C	48.4 - 54.5 mol %	
<b>Distribution</b>	Référence	
Matière organique/sol Sols chauds	ex. compostes (ex. industriels), terres géothermales (ex. Mont Melbourne Antarctique)	(Poli <i>et al.</i> , 2006) (Nicolaus <i>et al.</i> , 1996)
Sources hydrothermales	ex. terrestres (Yellowstone Etats-Unis...), ex. océaniques profondes (ex. Fosses Mariannes...)	(Zeigler, 2001) (Takami <i>et al.</i> , 2004)
Réservoirs de pétroles chauffés géothermiquement	ex. gisements de pétrole (ex. Girkaliai en Lituanie...)	(Kuisiene <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 4. Description de quelques caractéristiques du genre *Geobacillus* (adapté et modifié d'après Zeigler, 2001).

### 12.2.1. Les virus des *Geobacillus*

Plusieurs virus infectant les *Geobacillus* ont été décrits dans la littérature. La distribution des *Geobacillus* étant très large, des souches porteuses de virus ont pu être isolées à partir des sols chauds ou des sources hydrothermales (Tableau 5). Dans les années 1960, quelques scientifiques se sont intéressés à des couples hôte-virus thermophiles et à l'effet que la température pouvait avoir sur ces derniers. Le modèle d'étude était souvent *Bacillus stearothermophilus*, qui a été ultérieurement reclassé dans les *Geobacillus* sous le nom de *Geobacillus stearothermophilus* (Nazina *et al.*, 2001). Le bactériophage  $\phi\mu_4$  (Thompson & Shafia, 1962; Shafia & Thompson, 1964b) a été décrit comme étant tempéré et possédant une morphologie sphérique. Les chercheurs ont mis en évidence l'importance de l'ion calcium dans l'adsorption du phage  $\phi\mu_4$  (Shafia & Thompson, 1964a), ainsi que l'inhibition de l'adsorption en condition d'anaérobiose (Thompson & Shafia, 1962). Onodera (Onodera, 1961) a également constaté des particules virales sphériques lors de ses observations, mais de nature virulente. Malgré un traitement des particules virales de 120 min à 100°C, ces particules ont été décrites comme gardant leur capacité infectieuse.

Les autres phages de *B. stearothermophilus* isolés à partir de sols chauds présentent la morphologie « tête-queue » rencontrée chez les *Caudovirales*. Parmi les virus décrits, TP1 est tempéré (Welker & Campbell, 1965). Welker et Campbell ont comparé la production virale de TP1 à différentes températures. Les auteurs ont constaté une production plus importante à 55°C, qu'à 45°C et à 65°C, en dépit du fait que le temps de génération des cellules-hôtes soit plus court à 65°C et que la lyse se fasse plus vite. L'explication proposée par les auteurs est la thermosensibilité des particules virales. Egbert et Michell (Egbert & Mitchell, 1967) ont observé une thermosensibilité du phage virulent T $\phi_3$ , dont la demi-vie bascula de 400 min à 60°C, à 120 min à 65°C, à 40 min à 70°C et à 12 min à 75°C. Une inactivation thermique du phage lytique TP84 a été constatée, mais semblait être milieu-dépendant. Dans le milieu de culture, peu d'inactivation a été constatée même après 12h à 65°C. Cependant, l'inactivation était importante à la même température dans un tampon sel-citrate (Saunders & Campbell, 1966). Sharp et collaborateurs ont isolé 13 phages de nature virulente. Malgré le fait qu'ils soient caudés, la morphologie de la « tête » était variable, certains ayant des têtes allongées (Sharp *et al.*, 1985), ressemblant à des phages rencontrés par exemple chez *B. subtilis* et *B. thuringiensis* (Ackermann *et al.*, 1995).

Nature de l'échantillon	Hôte	Nom du virus	Morphologie du virus	Type de virus	Taille du génome	Références
Lait	<i>Bacillus thermophile</i> (souche T60)	ND	ND	Virulent	ND	(Koser, 1926)
Lait	<i>Bacillus thermophile</i> (souche T60)	ND	ND	Virulent	ND	(Adant, 1928)
Sol (serre)	<i>B. stearothermophilus</i>	ND	Virus caudé	Virulent	ND	(White <i>et al.</i> , 1955)
Compost	Gram positive bacillus	ND	Sphérique	Virulent	ND	(Onodera, 1961)
ND	<i>B. stearothermophilus</i>	φμ4	Sphérique	Tempéré	ND	(Shafia & Thompson, 1964b)
ND	<i>B. stearothermophilus</i>	TP1 (TP1C)	Virus caudé	Tempéré	ND	(Welker & Campbell, 1965)
Sol (serre)	<i>B. stearothermophilus</i>	TP84	Virus caudé	Virulent	ND	(Saunders & Campbell, 1966)
Sol	<i>B. stearothermophilus</i>	Tφ3	Virus caudé	Virulent	ND	(Egbert & Mitchell, 1967)
Sol/composte	<i>B. stearothermophilus</i>	D5, D6, D7, D8	<i>Myoviridae</i>	Prob. virulents	ND	(Reanney & Marsh, 1972)
Sol/composte	<i>B. stearothermophilus</i>	D5	<i>Myoviridae</i>	Prob. virulent	ND	(Reanney & Wood, 1973)
Sol et Compost	<i>B. stearothermophilus</i> et <i>Bacillus thermophile</i>	13 phages	Virus caudés	Virulents	ND	(Sharp <i>et al.</i> , 1985)
Source marine profonde	<i>Geobacillus sp.</i>	E1 (=GVE1)	<i>Siphoviridae</i>	Virulent	ADNdb 4.1 kb	(Liu <i>et al.</i> , 2006)
Source marine profonde	<i>Bacillus sp.</i>	W1 (=BVW1)	Virus caudé	Virulent	ADNdb 18 kb	(Liu <i>et al.</i> , 2006)
Source marine profonde	<i>Geobacillus sp.</i>	E2 (=GVE2)	<i>Siphoviridae</i>	Virulent	ADNdb 40.9 kb	(Wang & Zhang, 2008)
Source marine profonde	<i>Geobacillus sp.</i>	D6E	<i>Myoviridae</i>	ND	ADNdb 49.3 kb	(Wang & Zhang, 2010)
Source marine côtière	<i>Geobacillus sp.</i>	GBSV1	<i>Myoviridae</i>	Tempéré	ADNdb 34.7 kb	(Liu <i>et al.</i> , 2009)
Source marine côtière	<i>Bacillus sp.</i>	BV1	<i>Myoviridae</i>	Virulent	ADNdb 35.1 kb	(Liu <i>et al.</i> , 2010)

Tableau 5. Tableau récapitulatif des phages infectant les espèces du genre *Geobacillus*. ND = non déterminé, db = double brin, kb = kilopaire de base

Plus récemment, d'autres phages de *Geobacillus* ont été isolés à partir de sources hydrothermales marines profondes (Liu *et al.*, 2006; Liu & Zhang, 2008; Wei & Zhang, 2008; Wang & Zhang, 2010) et côtières (Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010). Le virus E1 (ou GVE1) est un siphovirus virulent dont le génome de 41 kb est composé d'ADN double brin. Le phage W1 (ou BVW1) est un virus caudé dont le génome, à ADN double brin, ne fait que 18 kb. Deux autres phages ont également été isolés sur le même site, dans les sources hydrothermales marines profondes du Pacifique, E2 (ou GVE2) (Wang & Zhang, 2008) et D6E (Wang & Zhang, 2010). Le phage E2 est un siphovirus virulent, dont le génome est composé d'ADN double brin faisant 40.9 kb. Le phage D6E présente une morphologie de myovirus avec un génome d'ADN double brin de 49.3 kb.

En provenance d'une source marine côtière de Chine, le virus GBSV1, est en revanche un myovirus de type tempéré. Son génome, également composé d'ADN double brin, fait 34.7 kb (Liu *et al.*, 2009). Un autre myovirus provenant du même site d'échantillonnage, a également été identifié. Le virus BV1 est lytique et sa capside enferme 35.1 kb d'ADN double brin (Liu *et al.*, 2010). Les virus E2 (ou GVE), GBSV1, BV1 et D6E ont été séquencés et les séquences génomiques sont accessibles dans la base de données NCBI.

### **13. Introduction aux travaux de thèse**

En raison d'une exploration des écosystèmes thermophiles relativement récente, essentiellement depuis les travaux de Brock (Brock, 1967), notre connaissance sur la diversité, l'abondance et la distribution des communautés microbiennes thermophiles demeure encore faible à ce jour. Ces microorganismes occupant des niches écologiques très spéciales et considérées comme improbables il y a encore peu de temps témoignent de leur capacité d'adaptation à des milieux très divers. La découverte de virus qui sont associés à ces communautés témoigne à la fois d'une adaptation au niveau moléculaire à ces milieux hostiles, aux autres microorganismes, ainsi que d'un dynamisme génétique des communautés hôtes par transfert de gènes médiés par ces virus.

L'exploration de sources hydrothermales terrestres et marines permet à la fois d'alimenter nos connaissances en termes de diversité microbienne, d'abondance globale et relative de ces microorganismes par rapport à celle d'autres niches écologiques, ainsi que d'apporter des éléments de réponse quant à la distribution de ces microorganismes.

### 13.1. Les Terres Australes et Antarctiques Françaises (TAAF)

L'hémisphère nord abrite la majorité des sites géothermiques étudiés à ce jour. Les sites géothermiques peuvent se manifester sous plusieurs formes, terrestres ou marines. Les sites terrestres les plus connus sont sans doute les geysers de Yellowstone aux Etats-Unis et ceux d'Islande, les sources chaudes de Beppu au Japon et les sources volcaniques de Sicile en Italie. Les cheminées hydrothermales, généralement situées au niveau des rides océaniques et découvertes plus récemment, offrent des écosystèmes uniques, des « oasis de vie » dans les fonds marins. Il existe également de l'activité géothermique dans l'hémisphère sud, de manière peut être surprenante, dans les zones polaires et subpolaires.

Les Terres australes et antarctiques françaises (TAAF) (Figure 22) sont composées de cinq districts : Les îles Eparses, la terre Adélie, l'archipel de Crozet, l'archipel de Kerguelen, les îles Saint Paul et Amsterdam. Ces trois derniers constituent les îles dites « Subantarctiques ». Situées à la limite de l'océan Indien et Austral, les îles de Crozet, Kerguelen, Amsterdam et SaintPaul sont des îles volcaniques. On ne trouve aujourd'hui des sources hydrothermales que dans l'archipel des Kerguelen et sur l'île Saint Paul (site internet des TAAF).

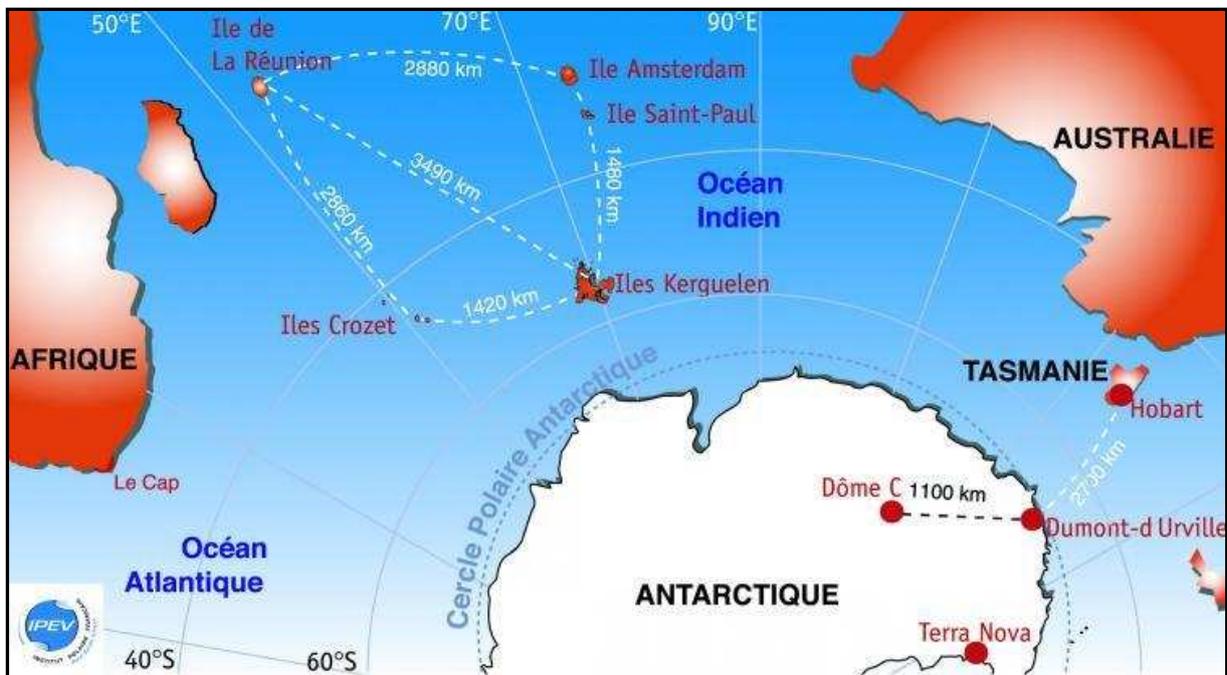


Figure 22. Représentation schématique de la géolocalisation des Terres australes et antarctiques françaises. Cette carte ne situe pas les îles Eparses (d'après l'institut polaire français Paul Emile Victor).

Les îles Kerguelen ont été découvertes en 1772 par Yves Joseph de Kerguelen de Trémarec. Après avoir été l'objet de plusieurs explorations scientifiques au courant du XVIII<sup>ème</sup> et XIX<sup>ème</sup> siècle, elles ont pris une importance scientifique considérable depuis 1958, année géophysique internationale, les programmes d'exploration des océans apportant de nombreuses données scientifiques. L'archipel de Kerguelen est situé à une latitude moyenne de 49°15' sud, sensiblement l'équivalent de celle de Paris dans l'hémisphère nord, et à une longitude moyenne de 69°30'est, à peu près celle de Bombay, et se trouve au milieu de la partie sud de l'océan Indien. Constitué d'une île principale (Grande Terre) et d'environ 300 îlots, l'archipel s'étend sur une superficie de 7 215 km<sup>2</sup> et est la troisième plus grande île océanique après l'Islande et Hawaï. Les Kerguelen n'hébergent pas de résidents permanents et sont cible de nombreuses études de tous les domaines. Elles présentent un intérêt particulier pour les géologues, puisqu'elles offrent une source d'informations unique sur les terres émergées de vaste surface liées au magmatisme intra-plaque (Gautier *et al.*, 1990; Giret *et al.*, 2003). Le climat de Kerguelen est océanique, froid et extrêmement venteux. La température moyenne annuelle y est de 4,5°C avec une amplitude faible d'environ 6°C (site internet des TAAF). L'activité géothermique de l'archipel Kerguelen est liée au point chaud de Kerguelen (Charvis *et al.*, 1995). Elle se manifeste sur la péninsule Rallier-du-Baty, ainsi qu'à Val Travers, respectivement au sud-ouest et à l'est de l'île Grande Terre (Nougier *et al.*, 1982) (Figure 23). Les sources chaudes de Rallier du Baty se présentent sous deux formes : fumerolles et mares de boue (Figure 24). Les sources ont une gamme de température qui varie entre 50° et 100°C et sont généralement acides et chargées en minéraux. Le débit des sources est faible, mais peut varier fortement avec les précipitations et les écoulements provenant des glaciers. Les sources chaudes des Kerguelen sont de l'eau profonde marine, dont la remontée est facilitée par la fracturation structurale de l'archipel ((Chavagnac *et al.*)*soumis*). Les sources terrestres de Val Travers, en revanche, ne partagent pas ce type de caractéristique. De débit beaucoup plus élevé, de l'ordre de 8 l/s (Nougier *et al.*, 1982), elles sont alcalines et globalement moins chaudes, aux alentours de 60°C (Figure 25).

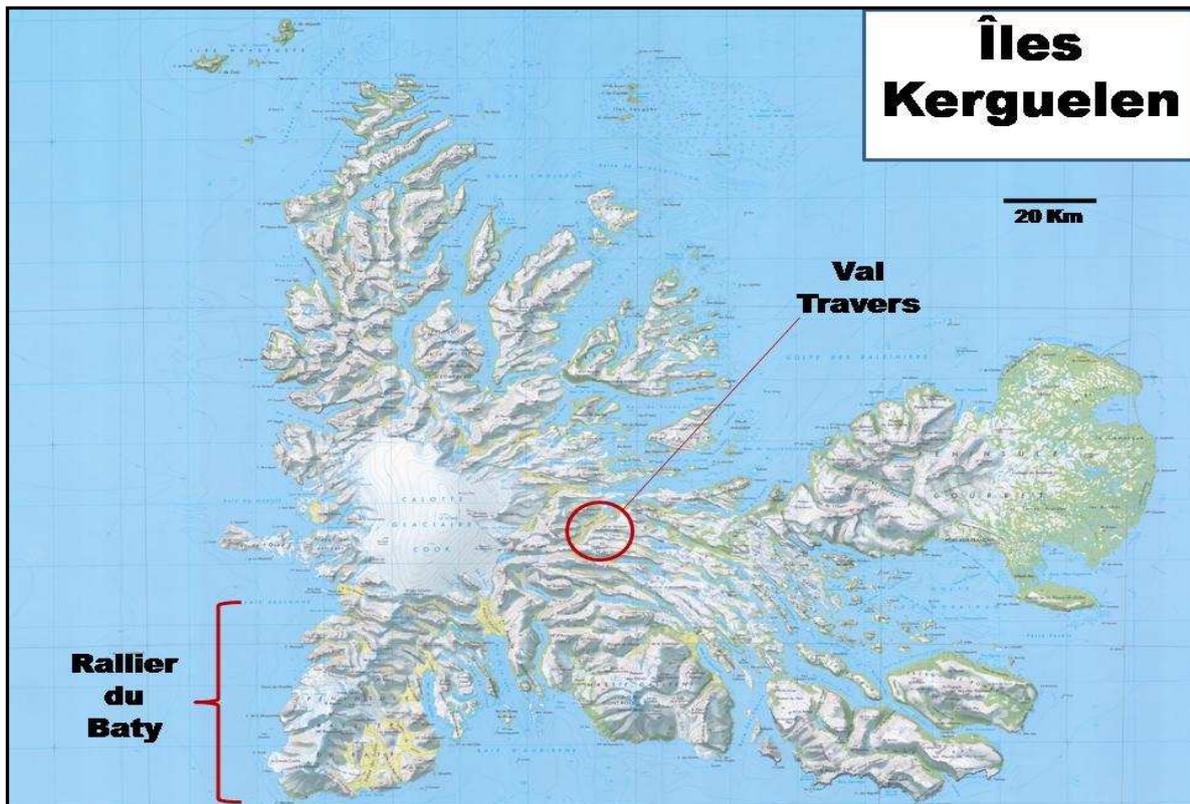


Figure 23. Carte topographique des Îles Kerguelen. Situées à 49°15' sud et 69°30'est, deux sites présentent encore actuellement de l'activité géothermique sous forme de sources hydrothermales : la péninsule Rallier du Baty et Val Travers (carte fournie par l'Institut National de l'Information Géographique et Forestière).



Figure 24. Des manifestations hydrothermales à Rallier du Baty. Sur la photo de gauche, une source chaude apparaît entre les rochers, couverts de végétation. Sur la photo de droite, des fumerolles peuvent être observées, surgissant entre des rochers nus.

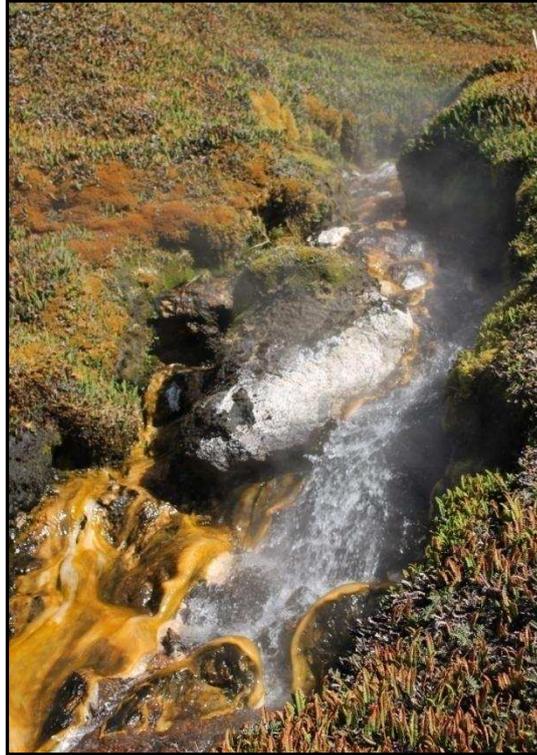


Figure 25. Source Val Traver n°1. La source chaude surgit entre les rochers couverts de végétation. La source, de 61 °C et de pH 9.8, a un haut débit constant. Quelques tapis microbiens jaunes et rouges sont visibles dans le coin gauche en bas de la photo.

L'île Saint Paul, située à une latitude de 38°42'sud et une longitude de 77°32'est et à environ 1200 km de l'archipel de Kerguelen, est un cratère récent partiellement submergé dans la mer (Figure 26 et 27). Avec Amsterdam, elle fait partie des îles les plus éloignées de tout continent (site internet l'Institut polaire français Paul Emile Victor). Son volcan initial s'étendait sur 12 km<sup>2</sup>, mais ne couvre plus aujourd'hui que 6,5 km<sup>2</sup>. Le lac de cratère, qui atteint 60 m de profondeur et 1 000 m de diamètre, n'est ouvert sur l'océan que par une étroite passe de quelques mètres de profondeur. La température moyenne annuelle se situe entre 12 et 14°C, avec une amplitude thermique oscillant entre 2 et 26°C. Sa géothermie est intimement liée à la dorsale indienne. Les manifestations volcaniques actuelles se présentent sous forme de sources chaudes surgissant à quelques mètres de profondeur que l'on peut observer sur les rives du lac de cratère. L'eau chaude se mélange avec l'eau du lac et l'on constate également la présence de remontée gazeuse. A plus grande altitude, sur le rebord ouest du cratère, on peut trouver occasionnellement des fumerolles et des terres chaudes (Doucet *et al.*, 2003). Les sources hydrothermales sont relativement chaudes, de l'ordre de 80°C et de pH neutre.

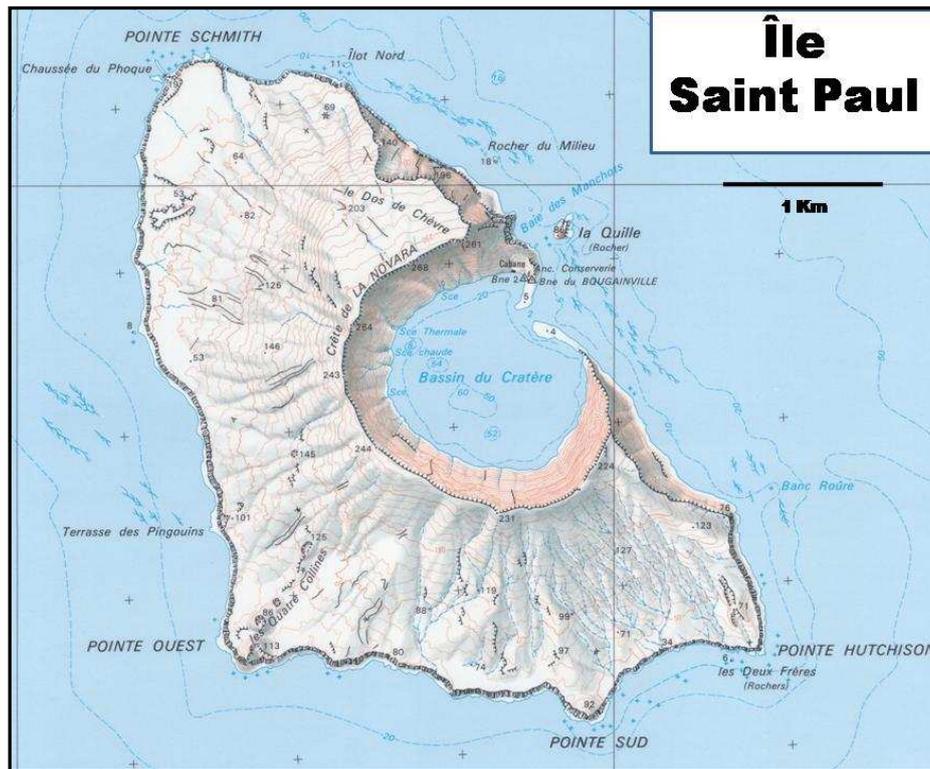


Figure 26. Carte topographique de l'île Saint Paul. Située à 38°42'sud et une longitude de 77°32'est, l'activité géothermique est majoritairement localisée dans le lac du cratère et sur ses plages (carte fournie par l'IGN).



Figure 27. Photo prise depuis la gorfoutière, au nord de l'île Saint Paul. La vue en hauteur donne sur le lac du cratère.

## 13.2. Le projet HOTVIR

La localisation géographique des zones polaires et subpolaires rend ces sites particulièrement intéressants du fait de leur isolement géographique extrême. Alors que l'étude des communautés microbiennes thermophiles des sites géothermiques de l'Antarctique (tels que Monts Erebus, Melbourne, Rittman et les îles Shetland par exemple) a été entamée vers la fin des années quatre-vingt (Hudson & Daniel, 1988; Hudson *et al.*, 1988), l'exploration de la diversité des microorganismes des sources hydrothermales des îles subantarctiques reste encore à un stade très préliminaire à ce jour.

Le programme IPEV (Institut Paul Emile Victor) n°408 « Hotvir » (IPEV-UBO-CNRS 2006-R50 HOTVIR) a débuté en 2006 dans le but de chercher des éléments de réponse à de nombreuses questions sur la structure des communautés microbiennes thermophiles des îles subantarctiques françaises sur les îles Kerguelen et Saint Paul. La diversité microbienne de ces sources hydrothermales est-elle similaire à celle rencontrée dans les sites de l'hémisphère nord ou bien est-elle unique? Existe-t-il des similitudes entre les microorganismes des îles subantarctiques et les écosystèmes analogues de la dorsale indienne ou les autres points chauds de l'Antarctique? A une autre échelle, trouve-t-on des communautés microbiennes similaires dans les différentes sources chaudes des deux îles australes étudiées? Si oui, comment s'effectue la dissémination de ces microorganismes, par voie aérienne/souterraine? Existe-t-il une dynamique des populations microbiennes liée à l'activité d'éléments génétiques mobiles?

Le programme Hotvir a comme objectifs de mieux comprendre la variabilité géographique des communautés de microorganismes thermophiles, de contribuer à la connaissance de la diversité microbienne et d'explorer la relation entre les éléments génétiques mobiles et leurs hôtes dans des conditions de milieu extrême.

### 13.2.1. Les travaux menés sous le programme Hotvir

#### *Les campagnes et l'échantillonnage*

Les campagnes d'échantillonnage sont organisées par l'IPEV en collaboration avec la collectivité des TAAF (Terres australes et antarctiques françaises) et sont rendues possible grâce au bateau de ravitaillement, le Marion Dufresne. Le Marion Dufresne effectue des rotations (ou des « OP ») qui durent généralement un mois, pendant lesquelles il approvisionne les districts. Les arrêts par district sont de courte durée, de quelques heures à quelques jours. Pendant ces arrêts, les scientifiques effectuant une OP ont l'occasion d'échantillonner. Le dépôt sur site dépend des conditions climatiques qui peuvent limiter leur accès par hélicoptère ou par zodiac. Le Marion Dufresne dispose de pièces laboratoire équipées pour des manipulations simples. A bord se trouve également un congélateur -80°C où des échantillons peuvent être stockés. En fonction du type de programme, quelques caisses en aluminium par opération servent de transport pour le matériel d'échantillonnage.

Suite à la campagne exploratoire de 2004/2005, cinq campagnes d'échantillonnage ont été menées pendant les étés australs en 2006/2007, 2007/2008, 2008/2009, 2009/2010 et 2011/2012. Durant ces campagnes, plusieurs types d'échantillon ont pu être récoltés. En raison des contraintes logistiques, des échantillonnages de grand volume n'ont pas pu être effectués, mais des échantillons de quelques millilitres (en cryotubes) quelques décilitres (en bouteilles) ont pu être prélevés. Grâce à une bonbonne d'azote liquide, des cryotubes ont pu être mis en cryo-congélation *in situ* et ensuite transférés à -80°C au retour sur le bateau. La nature des échantillons prélevés est détaillée dans le Tableau 6.

Localisation	Source	Température (°C)	pH	Salinité (%)
<b>Rallier du Baty (Kerguelen)</b>	RB 1	82.0	3.4	0
	RB 2	99.7	7.3	0
	RB 3	97.0	7.5	0
	RB 4	87.2	4.0	0
	RB 5	82.5	7.3	0
	RB 05	79.9 - 95.5	5.8 - 7.3	0
	RB 07	94 - 97.8	5.1	0
	RB 10	83 - 90.0	6.3 - 8.0	0
	RB 13	84 - 93.6	6.1	0
	RB 15	92.5 - 96.2	7.7	0
	RB 18	65.4 - 87.5	6.3	0
	RB 21	92 - 96.4	7.3	0
	RB 32	87.8 - 93.0	6.6	0
	RB 35	55 - 60.0	4.1	0
	RB 39	68 - 76.1	3.5	0
	RB 46 (vapeur)	ND	ND	ND
	<b>Val Travers (Kerguelen)</b>	Rivière	100.0	9.7
Plage du feu de joie 1		73.2	7.2	0
Plage du feu de joie 2		99.4	9.6	0
<b>Saint Paul</b>	VT 1	60.8	8.1 - 9.8	0
	VT 2	61.5	9.8	0
	VT 3	60.1	8.1	0
<b>Saint Paul</b>	SP1 I	70.0	6.8	3.4
	SP1 II	31.0	ND	3.4
	SP1 III	16.0	ND	3.4
	SP2 I	80.0	6.8	3.4
	SP2 II	35.0	ND	3.4
	SP2 III	15.0	ND	3.4
	SP2 bis	45.0	6.8	3.4
	SP3	98.0	6.8	3.4
	SP4 (sol)	62.0	5.5	ND
	SP 09	52 - 98	6.4	3.4
	SP 10	57.2	6.3	3.4
	SP 11	54 - 57	6.25	3.4
	SP 11 bis	64 .0	6.45	3.4
	SP 12	78 .5	6.70	3.4
SP 13	64 .3	5.70	3.4	
SP 39	73 .2	5.60	3.4	

Tableau 6. Tableau récapitulatif de la nature des sources hydrothermales échantillonnées dans les Terres australes et antarctiques françaises. Les données sont des moyennes sur plusieurs campagnes. Les variations importantes sont détaillées par un minima et maxima séparés par un tiret. ND= non déterminé

## *Les travaux effectués sur les échantillons depuis le programme Hotvir*

Les études concernant l'exploration de la diversité microbienne des sources hydrothermales des TAAF a pu débuter dans notre laboratoire avant les travaux effectués dans le cadre de cette thèse. Les travaux ont été conduits en parallèle à l'aide de méthodes culturales et moléculaires. Ceci a permis l'obtention d'un certain nombre d'isolats et d'informations sur la diversité potentielle des sources hydrothermales des Kerguelen.

Les études par approche moléculaire comprennent des analyses par méthodologie de banque de clones et par DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Anne Postec, en 2007-2008, a pu détecter par DGGE, en analysant des amplifications de séquence codant pour l'ARN 16S, les populations *a priori* dominantes dans les sources étudiées (Tableau 7). Ses résultats suggèrent une plus grande diversité bactérienne qu'archéenne. La composition des communautés des sources côtières de Saint Paul semble très différente de celle des sources terrestres de Kerguelen, surtout les populations bactériennes. Les *Thermales*, typiques des sources chaudes terrestres, n'ont pas été détectées avec cette méthode dans les sources de Saint Paul. Les groupes bactériens mis en évidence contiennent principalement des hétérotrophes impliqués dans la dégradation de matière organique, à l'exception des séquences proches de *Hydrogenivirga sp.* (*Aquificae*) dont les deux espèces décrites sont autotrophes (et soufre-oxydantes). Les clones, dont les séquences sont les plus proches des séquences d'ARNr 16S bactériens analysées, sont issus de sources chaudes terrestres (Russie, Islande, Japon, Nouvelle-Zélande, Etats-Unis et Antarctique), mais également de sources hydrothermales océaniques profondes (Okinawa, Japon), comme dans le cas des CFB (Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides) détectées dans les échantillons de Saint Paul. Les archées mises en évidence dans cette étude appartiennent à des groupes thermophiles et hyperthermophiles. Les séquences obtenues à partir des échantillons des sources terrestres de Kerguelen sont plus proches de clones isolés dans des sources chaudes terrestres (comme Yellowstone aux Etats-Unis), alors que celles issues des échantillons de Saint Paul sont au contraire plus proches de clones isolés à partir de sources hydrothermales marines profondes (Fosse de Marianne). Anne Postec a également obtenu un grand nombre de séquences qui n'avaient aucun représentant proche cultivé. Ceci suggère la présence de microorganismes représentant de nouveaux taxons, encore non décrits à ce jour.

Localisation	Bacteria	Archaea
Rallier du Baty – Kerguelen (points chauds ou petites sources à faible débit, couleurs rouge à ocre)	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Betaproteobacteria</i> <i>Thermus</i> sp. <i>Chloroflexi</i> Firmicutes ( <i>Sulfobacillus</i> related) <i>Actinobacteria</i> <i>Aquificae</i> ( <i>Hydrogenivirga</i> sp.)	Desulfurococcales ( <i>Ignisphaera</i> , <i>Thermosphaera</i> )
Val Travers – Kerguelen (sources très chaudes aux pH basiques, débit important)	<i>Gammaproteobacteria</i> <i>Thermus</i> sp.	incultivé
Saint-Paul (petites sources, points d'émission entre des cailloux à proximité de la mer)	<i>Alphaproteobacteria</i> Cyanobacteria CFB	Desulfurococcales ( <i>Pyrolobus</i> ) Archaeoglobales ( <i>Archaeoglobus</i> , <i>Geoglobus</i> ) Methanococcales

Tableau 7. Taxons détectés par approches moléculaires dans les d'échantillons bruts et analysées par méthodologie de la DGGE. Les microorganismes les plus proches ont été déterminés par comparaison des données avec BLAST (d'après Anne Postec)

Une autre approche moléculaire a été réalisée pour explorer la diversité microbienne : la construction de banque de clones. Les travaux, réalisés par Audrey Gramain et François Brillet en 2010 et 2011, se sont focalisés sur la détection d'archées hyperthermophiles dans les sources chaudes terrestres de Rallier du Baty ainsi que sur les vapeurs issues de ces sources, pour étudier les éventuels possibilités de dissémination des microorganismes par voie aérienne. La majorité des séquences obtenues, après amplification par PCR nichée des séquences codant pour l'ARNr 16S, serait affiliée à des archées hyperthermophiles phylogénétiquement distantes de tout taxon jusqu'alors isolé et décrit (Figure 28). La grande majorité des séquences serait proche de représentants du phylum des *Crenarchaeota* (dont beaucoup de clones ont été isolés dans les sources chaudes terrestres acides), à l'exception de quelques rares séquences, appartenant à des représentants du phylum *Euryarchaeota* de l'ordre des *Thermoplasmatales* (microorganismes spécifiquement acidophiles). Un petit groupe de séquences affilié à *Ignisphaera aggregans* (Niederberger *et al.*, 2006) (crenarchée hyperthermophile neutrophile), ainsi que des séquences présentant des similarités avec des représentants du phylum récemment découvert des *Thaumarchaea* (Spang *et al.*, 2010) ont également été découvertes.

Les microorganismes détectés dans les vapeurs et les sources d'eau présentaient de grandes similitudes, mais de manière surprenante, certains n'ont cependant été détectés que dans les vapeurs et pas dans les sources d'où émanaient ces vapeurs. Ces données suggèrent que la dispersion des microorganismes par voie aérienne est probable et donc des échanges entre communautés microbiennes de différentes sources chaudes est envisageable.

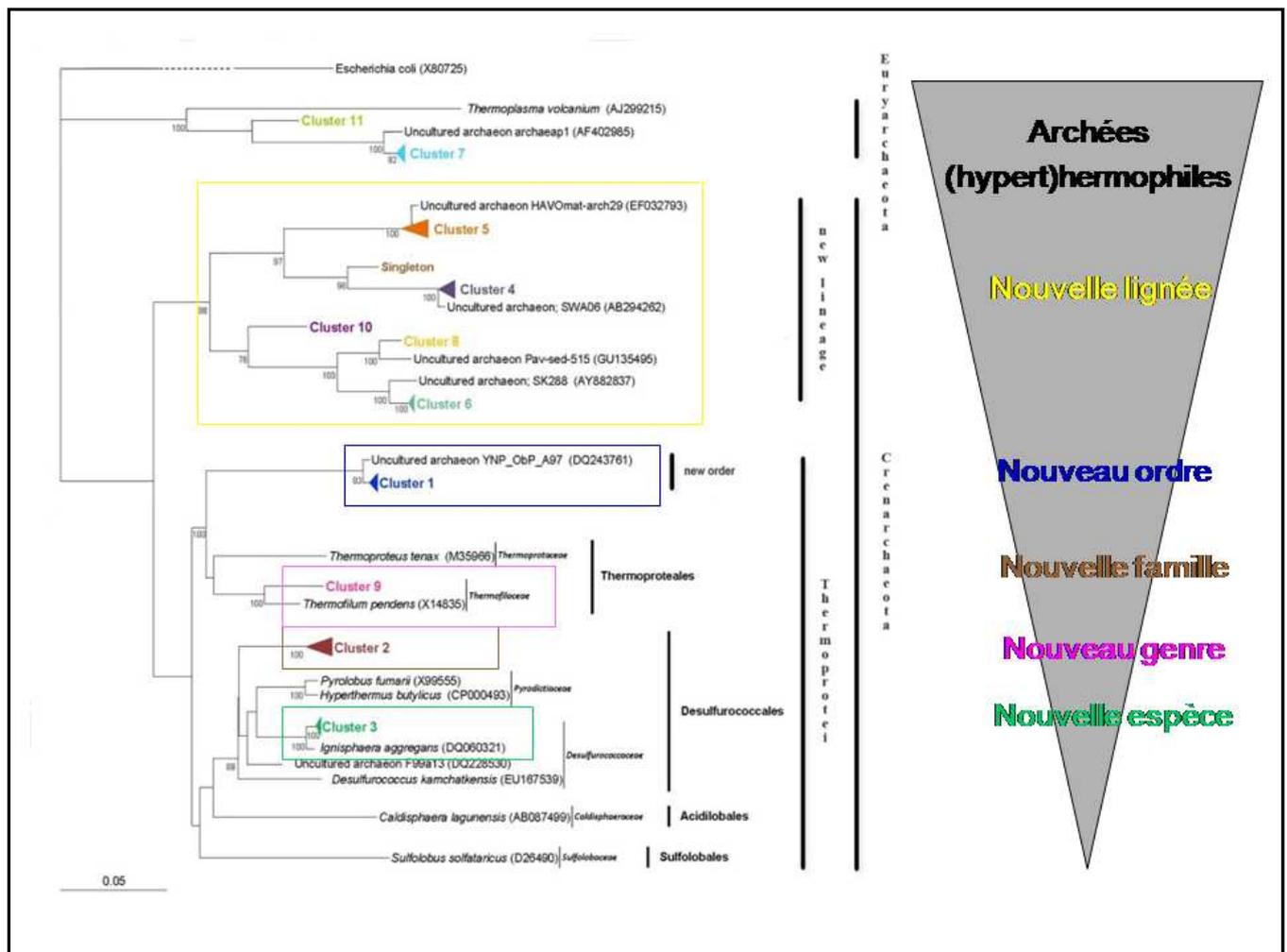


Figure 28. Arbre phylogénétique représentant les groupes (clusters) de séquences d'archées (hyper)thermophiles présentes dans les sources hydrothermales terrestres (eaux, vapeurs et fumerolles) de Rallier du Baty (RB 21, RB rivière et RB 46). Les séquences partageant au moins 97,5 % de similarité ont été groupées par cluster. La barre représente un taux de substitution de 5 nucléotides pour 100 nucléotides. Longueur des séquences = 830 bp (d'après (Gramain *et al.*, 2010)).

Les analyses réalisées à partir des banques de clones suggèrent donc une diversité archéenne impressionnante, si l'on considère la présence potentielle de nouvelles lignées, ordres, familles, genres et espèces d'archées ((Chavagnac *et al.*)*soumise*).

Des souches archéennes et bactériennes, aérobies et anaérobies, ont pu être isolées en culture. Parmi les archées hyperthermophiles d'intérêt pour le laboratoire se trouvent les *Thermococcales*, qui sont largement répandues au niveau des différentes sources hydrothermales marines de la planète et qui constituent une part importante de la population hétérotrophe microbienne de ce type d'écosystème (Harmsen *et al.*, 1997; Takai *et al.*, 2001). Anne Postec et Maria Ciobanu ont mis en culture sous anaérobiose des échantillons marins côtiers de Saint Paul afin d'étudier la présence des *Thermococcales* dans ces sources. Parmi les souches isolées, figuraient des *Thermococcales* mais également des

bactéries thermophiles de l'ordre des *Thermotogales*, qui partagent la même niche écologique. Ceci a permis la description d'une nouvelle espèce, *Marinitoga litoralis* (Postec *et al.*, 2010), qui est la première d'origine côtière et non profonde. D'autre part, des représentants du genre *Thermoanaerobacter* ont également pu être isolés à partir des sources de Rallier du Baty (Tableau 8).

Source	T°C	Nom de l'isolat	Nombre de paires de bases	Affiliation phylogénétique	Séquence la plus proche en banque	Identité (%)	Origine
<u>Rallier du Baty</u>							
2	60	MC10, MC11	768, 805	Bacteria Firmicutes	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i> ATCC 33223	98	source chaude Yellowstone, USA
<u>Ile Saint Paul</u>							
9	60	MC1, MC2	896, 685	Bacteria	<i>Thermosipho</i>	99	champ de pétrole, Mer du Nord
11bis	60	MC6	772	<i>Thermotogales</i>	<i>africanus</i> strain Ob7		
11bis	60	MC3	1359	Bacteria <i>Thermotogales</i>	<i>Marinitoga hydrogentolerans</i>	96	source hydrothermale profonde, dorsale Medio-Atlantique
11bis	80	MC8, MC9	762, 762	Archaea <i>Euryarchaeota</i>	<i>Thermococcus</i> sp. Ax01-65	99	source hydrothermale profonde, Juan de Fuca, Pacifique
11	80	MC4, MC5	768, 777	Archaea <i>Euryarchaeota</i>	<i>Thermococcus</i> sp. Ax01-65	93, 89	source hydrothermale profonde, Juan de Fuca, Pacifique

Tableau 8. Souches bactériennes et archéennes isolées en anaérobiose sur le milieu Ravot modifiée (Postec *et al.* 2010). L'identité des souches est établie à partir des séquences codant pour l'ARN 16S et comparées dans les bases de données avec l'outil BLAST. La souche MC 3 a été décrite comme une nouvelle espèce, *Marinitoga litoralis* (Postec *et al.* 2010) (d'après Maria Ciobanu).

Des souches ont également pu être isolées en aérobiose. A. Postec et M. Ciobanu ont utilisé pour cela le milieu 88 à pH 3 (Brock *et al.*, 1972) pour sélectionner des microorganismes thermo-acidophiles. Ainsi, neuf isolats d'*Alicyclobacillus* sp. ont pu être obtenus.

Des souches bactériennes neutrophiles ont également été isolées à 60-70°C. Samuel Dupont et Olivier Le Goff ont utilisé pour cela le milieu 162 (Degryse *et al.*, 1978), qui est un milieu riche couramment utilisé pour isoler des bactéries du genre *Thermus*. Les séquences codant pour l'ARN 16S de vingt-cinq souches aérobies ont ainsi été comparées à des séquences dans les bases de données en utilisant l'outil BLAST. Quinze souches appartenaient au genre *Geobacillus* de la famille des *Bacillaceae*, deux au genre *Anoxybacillus* et cinq au genre *Aneurinibacillus*, appartenant avec les *Anoxybacillus* à la famille des *Listeriaceae*. Une souche enfin était apparentée à l'espèce *Thermoactinomyces vulgaris* de la famille des *Thermoactinomycetaceae*.

Une souche ne présentait en revanche que très peu de similarité avec les souches ci-dessus. La comparaison de sa séquence ADNr 16S a permis de l'affilier au nouveau genre récemment décrit *Calditerricola* de la famille des *Bacillaceae* (Moriya *et al.*, 2011). Poussant à une température de 70°C, des spores terminales déformantes étaient visibles dans ces cellules en forme de raquettes. Dans la mesure où les deux seules espèces de ce genre *Calditerricola* ont été décrites comme non-sporulantes, une caractérisation plus poussée a été initiée par Olivier Le Goff et Samuel Dupont.

Enfin, une souche de *Geobacillus sp.*, isolée dans une source côtière de Saint Paul, a également servi pour des travaux expérimentaux de fossilisation de microorganismes. Orange et collaborateurs (Orange & co-workers) *soumis*) ont utilisé cette souche pour réaliser des expériences de silicification à long terme (sur cinq ans) dans la perspective de renseigner sur les empreintes géologiques que peuvent prendre les bactéries après fossilisation. Ces travaux ont permis de confirmer que les bactéries à Gram positif fossilisent plus facilement que les bactéries à Gram négatif. De plus, par l'utilisation de la technique de LIVE/DEAD couplée à la MET, ils ont suivi au cours du temps le processus de dénaturation cellulaire afin d'apporter des informations sur le potentiel de survie des cellules silicifiées. Les expériences montrent que la silicification débute par un dépôt de silicium sur la paroi bactérienne avant d'envahir le cytoplasme. Les cellules préservées présentent des structures similaires à celles rencontrées dans les roches dans la nature. La silicification se présente également comme un processus capable de conserver des cellules sinon vivantes du moins intègres pendant potentiellement de longues durées.

### 13.3. L'organisation de la thèse

Le « Laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes (LM2E) » s'intéresse à l'étude des microorganismes extrémophiles et plus particulièrement aux thermophiles. Son approche est organisée en trois volets complémentaires :

- **l'Exploration de la diversité microbienne des environnements extrêmes** (Diversité microbienne et la diversité des éléments génétiques mobiles)
- **Fonctionnement des communautés microbiennes** (Cycles biochimiques Interactions procaryotes/eucaryotes, et milieu abiotique)
- **Maintenance du génome chez les Archées hyperthermophiles** (Caractérisation structurale et fonctionnelle des ADN polymérase de *Pyrococcus abyssi* et de nouveaux interactants du complexe de réplication)

Cette thèse s'inscrit dans la première thématique, l'exploration de la diversité microbienne des environnements extrêmes. Le site d'étude choisi, les Terres australes et antarctiques françaises, présente des caractéristiques attrayantes pour ce type d'étude du fait de sa géolocalisation particulièrement isolée dans le grand Sud et de ses sources hydrothermales de caractéristiques physico-chimiques diversifiées du fait de leur nature marines et/ou terrestres.

Le travail de recherche mené dans le cadre de cette thèse a été centré sur l'étude des communautés microbiennes thermophiles et hyperthermophiles des sources hydrothermales terrestres et côtières des Terres australes françaises dans la continuité des travaux précédents (décrits ci-dessus). Le projet d'étude a été organisé autour de trois axes principaux :

- a) **La description de l'abondance des microorganismes** dans les sources hydrothermales des Kerguelen et Saint Paul
- b) **La recherche et l'étude d'éléments génétiques mobiles** associés à des microorganismes par approche culturale
- c) **L'étude d'un système hôte-virus** isolé à partir des sources hydrothermales étudiées

Pour l'étude de l'abondance des microorganismes, trois méthodes directes de dénombrement ont été explorées : La microscopie électronique à transmission (MET), la microscopie à épifluorescence (ME) et la cytométrie en flux (FCM). Les observations en MET ont également servi à identifier des VLP dans les échantillons bruts.

L'approche culturale a été choisie pour la recherche et l'étude d'éléments génétiques mobiles. Les souches aérobies et anaérobies, déjà disponibles suite aux travaux effectués en amont de ma thèse, ont été criblées en utilisant les techniques de la microscopie à épifluorescence. Les souches donnant un signal négatif ont été induites à la mitomycine C pour vérifier la présence de virus tempérés. Lors de l'isolement d'autres souches, la présence de VLP a également été recherchée dans les cultures d'enrichissement. Plusieurs structures intéressantes ont alors pu être observées, dont une qui pourrait être un virus présentant une nouvelle morphologie encore non observée à ce jour. La présence de vésicules semblables à celles décrites par Soler et collaborateurs (Soler *et al.*, 2008), a pu être détectée dans les isolats de *Thermococcales* et dans les enrichissements culturels, où ces dernières étaient probablement présentes. Par ailleurs, des structures associées aux flagelles ont été découvertes lors de la recherche de VLP sur les souches de *Thermotogales*. Ce type de « gaine flagellaire » a déjà été décrit chez des bactéries comme *Bacillus Brevis* (De Robertis & Franchi, 1951), mais ne ressemble pas à celui observé au niveau des isolats de *Thermotogales*.

Enfin, l'étude d'un système hôte-virus a été entreprise suite à la découverte d'un nouveau myovirus infectant une souche apparentée à *Geobacillus thermoleovorans*, isolée à partir d'un échantillon provenant de Saint Paul. Ce myovirus est tempéré. Afin de comprendre quel pouvait être l'impact des variations du milieu sur l'expression de ce virus, l'impacte du NaCl et l'alternance aérobie-anaérobie sur la production virale ont été étudiées. L'incidence d'une salinité élevée comme le passage à l'anaérobie paraissent déclencher la décision lytique du phage dans des proportions quelque peu différentes. La gamme d'hôte n'a pour le moment pas pu être établie, en raison des problèmes techniques, les souches de références s'avérant elles-mêmes potentiellement porteuses de virus. Le génome du phage, constitué d'ADN double brin d'environ 38 kpb, a pu être extrait, séquencé et son analyse a débuté.

La description de la souche appartenant au genre *Calditerricola* a pu être terminée et soumise à publication.





# Matériel et méthodes :

## 1. L'échantillonnage lors des campagnes

Cinq campagnes ont eu lieu lors du programme HOTVIR. Lors de ces campagnes, des échantillons ont été prélevés sur trois sites présentant des sources chaudes de nature différente:

Sources chaudes terrestres :

- Kerguelen - Rallier du Baty
- Kerguelen - Val Travers

Sources côtières marines :

- Saint Paul

Les sources du site Rallier du Baty sont les plus nombreuses, ainsi que les sources les plus chaudes et les plus acides. La température des sources oscillent entre 50° et 100°C et les pH varient entre 3 et 5. Cependant, elles sont de faible débit, formant des mares boueuses, et leur volume fluctue en fonction des précipitations. De ce fait, leur température et leur pH peuvent varier légèrement d'un échantillonnage à l'autre. Les sources « Plage du Feu de Joie » et « Rivière » constituent des exceptions par rapport aux autres sources de par leur débit plus élevé et leur nature alcaline. Les sources chaudes couvrent une surface de plusieurs centaines de mètres carrés et sont séparées les unes des autres par quelques mètres pour les plus proches, et quelques centaines de mètres pour les plus éloignées.

A Val Travers se trouvent trois sources. Elles présentent toutes les trois un haut débit constant et forment de petits ruisseaux qui se jettent dans un lac qui est alimenté par des glaciers. Ces sources alcalines présentent des valeurs peu fluctuantes de température (de l'ordre de 60°C) et de pH (de l'ordre de 9). Deux d'entre-elles, VT1 et VT2, sont séparées d'une dizaine de mètres et la troisième, VT3, se situe un peu plus à l'écart des deux autres.

Les manifestations géothermiques de Saint Paul sont essentiellement de trois types : hydrothermale sous-marine, hydrothermale de plage et terrestre. Les sources sous-marines (SP1, SP2), sont peu profondes, séparées de la surface par une colonne d'eau d'environ 6 mètres. Elles ont un pH neutre et sont relativement chaudes (70°C - 80°C). Quelques sources hydrothermales sont situées sur la plage (SP3, SP09-SP13, SP39) où elles surgissent à proximité de l'eau de mer et ne sont recouvertes qu'à marée haute. Leur température varie entre 50°C et 98°C et leur pH est neutre. L'existence de vapeurs chaudes sur l'île a été

décrite (Doucet *et al.*, 2003), mais jamais observée lors des missions. En revanche, nous avons pu prélever de la terre géothermique à 60°C (SP<sub>4</sub>).

La nature des différentes sources est détaillée dans le Tableau 6 de l'Introduction, p.81.

## **1.1. Les campagnes précédentes**

Pendant les campagnes de 2007, 2008 et 2009 des échantillonnages ont été réalisés au niveau des sources hydrothermales terrestres sur Rallier du Baty et à Val Travers (Kerguelen) et des sources hydrothermales marines de Saint Paul. Plusieurs prélèvements ont été effectués, afin que les échantillons et leur conditionnement soient adaptés aux différentes analyses effectuées en laboratoire.

### **1.1.1. La préparation des cryotubes pour l'étude de l'abondance microbienne et virale**

Pour l'étude de l'abondance des communautés microbiennes et virales, des échantillons d'eau de source ont été prélevés et conservés dans des cryotubes de 2 ml. Les échantillons ont été fixés au glutaraldéhyde 2 % (160 µl de glutaraldéhyde à 25 % pour 2 ml) et au formaldéhyde à 2 % (108 µl de formaldéhyde à 37 % dans 2 ml).

Deux types d'échantillon ont été mis en cryotubes : des échantillons filtrés à 0.8/0.2 µm pour l'étude de l'abondance virale et des échantillons bruts pour l'étude de l'abondance globale.

Pour chaque source, les prélèvements d'eau ont été effectués directement à la sortie de la source. Les cryotubes ont été remplis, puis plongés dans une bonbonne d'azote liquide (technique du « flash-freeze » (Marie *et al.*, 1999; Brussaard *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Brussaard, 2004; Wen *et al.*, 2004)). De retour sur le bateau, ceux-ci ont été ensuite transférés et conservés au congélateur à -80°C. Pour les échantillons de Saint Paul, la source étant située sous l'eau, des plongeurs ont prélevé les échantillons à la sortie de chaque source à l'aide d'une seringue.

### 1.1.2. La préparation des échantillons pour la réalisation de cultures d'enrichissements

Pour la mise en culture des échantillons bruts, des prélèvements de plus grand volume ont été effectués. Dans le cas des sources terrestres de Kerguelen, de l'eau et des sédiments ont été collectés dans des pots stériles de 100 ml en aérobiose et conservés ensuite à 4°C. Les sources marines de Saint Paul ont été échantillonnées en aérobiose comme précédemment et en anaérobiose dans des bouteilles Schott stériles de 200 ml, celles-ci contenaient un petit volume de Na<sub>2</sub>S (2 ml de Na<sub>2</sub>S 10 % dans 200 ml d'échantillon, soit une concentration finale de 0.1 % de Na<sub>2</sub>S) pour éviter l'oxydation des échantillons, ainsi qu'une goutte de résazurine (4 %) comme indicateur visuel de l'oxydation (l'échantillon prend une couleur rose lorsqu'il entre en contact avec de l'oxygène). Les bouteilles ont été scellées avec des bouchons en caoutchouc et conservées à 4°C.

## 1.2. La campagne 2011 :

Pendant la campagne 2011, à laquelle j'ai participé, des échantillons des trois sources terrestres thermo-alcalines de Val Travers, ainsi que des deux sources marines côtières principales de Saint Paul ont été prélevés.

### 1.2.1. La préparation des cryotubes pour l'étude de l'abondance microbienne et virale

La préparation des cryotube pour l'étude que l'abondance microbienne et virale a été effectuée comme décrit précédemment à la différence que la concentration finale en glutaraldéhyde est passée de 2 % à 1 %. A Saint Paul, des plongeurs ont prélevé les échantillons à la sortie de chaque source à l'aide de seringues. Pour un échantillonnage le long de transects, des échantillons ont été prélevés au cœur de chaque source principale, ensuite à proximité du cœur de chaque source (T° ≈ 30°C) et enfin à un point plus éloigné de chaque source, où l'eau avait la même température que l'eau environnante (T° ≈ 16°C).

L'annotation suivante a été utilisée pour les sites de prélèvement correspondant aux transects :

- **SP1** correspondant au cœur de la source principale
- **SP1 II** pour un point plus éloigné du cœur de la source **SP1**
- **SP1 III** pour point encore plus éloigné du cœur de la source **SP1**
- **SP2** correspondant au cœur de la source principale
- **SP2 II** pour un point plus éloigné du cœur de la source **SP2**
- **SP1 III** pour point encore plus éloigné du cœur de la source **SP2**
- **SP2 bis** correspondant à une source annexe découverte à proximité de la source **SP2**

### 1.2.2. Les précipitations virales *in situ*

Le protocole est inspiré de celui décrit par Zillig et ses collaborateurs (Zillig *et al.*, 1994). Lors des prélèvements d'eau de source en plus grand volume, 50 ml d'eau ont été filtrés à 0.8/0.2  $\mu\text{m}$  et ensuite transférés dans des tubes Falcon™ de 50 mL contenant des concentrations de PEG 6000 de 10 % et de NaCl de 1M (soit 5g PEG 6000 + 2.9 g de NaCl pour 50 ml d'échantillon), facilitant la précipitation des particules virales. Les échantillons ont ensuite été conservés à 4°C.

## 2. Les méthodes culturelles

### 2.1. L'anaérobiose

#### 2.1.1. Les milieux

Le milieu utilisé pour la culture des *Thermococcales* et *Thermotogales* est le milieu de Ravot modifié (Ravot *et al.*, 1995; Postec *et al.*, 2010), contenant pour 1 litre d'eau : 0.3 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ; 0.5 g de  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  ; 0.1 g de  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ; 0.5 g de  $\text{KCl}$  ; 0.83 g d'acétate de sodium trihydraté ; 2 g d'extrait de levure ; 2 g de Bio-trypcase ; 30 g de seasalts ; 3.3 g de PIPES ; 2 g de maltose et 4 gouttes de résazurine (4 %). Le pH du milieu est ajusté à 6 et le milieu est ensuite autoclavé. Après autoclavage, 1 ml de solution de polyvitamines (Balch *et al.*, 1979), ainsi que 5 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (7 %) et 5 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (7 %) stériles sont ajoutés au milieu. Ce milieu est également utilisé pour les enrichissements et l'isolement de *Thermococcales* et *Thermotogales*.

Le milieu pour les essais de mise en culture d'*Ignisphaera aggregans* est celui décrit par Niederberger et ses collaborateurs (Niederberger *et al.*, 2006). Il contient par litre d'eau : 1.3 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ; 0.074 g de  $\text{CaCl}_2$  ; 0.28 g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0.28 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0.1 g d'extrait de levure ; 2.0 g de trypticase peptone ; 2.0 g d'amidon ; 0.6 g de cystine et 0.28 g de  $\text{FeCl}_3$ . Il contient également 1 ml de solution d'éléments traces qui contient pour un litre d'eau: 2.2 mg de  $\text{MnSO}_4$ , 0.5 mg de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0.5 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_4$  ; 0.016 mg de  $\text{CuSO}_4$  ; 0.025 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  et 0.046 mg  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ . De la résazurine est ajoutée à raison de 0.1 % (p:v) au milieu de culture. Le pH est réglé à 7.0.

### 2.1.2. La culture liquide et solide en anaérobiose

#### *La culture en milieu liquide en anaérobiose*

Pour la culture en anaérobiose des *Thermotogales* et des *Thermococcales*, le volume choisi (généralement 20 ml) est réparti dans des fioles pénicilline stériles contenant environ 0.5 g de soufre élémentaire. Les fioles sont ensuite bouchées hermétiquement avec des bouchons en caoutchouc et scellées. Pour obtenir l'anaérobiose, sept cycles de vide et de gaz (azote) sont réalisés à l'aide d'aiguilles reliées à une rampe à gaz. Le milieu est ensuite réduit avec un volume  $\text{Na}_2\text{S}$  (10 %) correspondant à  $1/100^{\text{ème}}$  du volume du milieu (ex. 200  $\mu\text{l}$  pour 20 ml de milieu). Le milieu est ensuiteensemencé avec la souche désirée. Pour les souches pures, l'inoculation se fait par ajout de  $1/100^{\text{ème}}$  du volume de la pré-culture par rapport au volume du milieu (ex. 200  $\mu\text{l}$  pour 20 ml de milieu).

Les *Thermotogales* sont cultivées généralement à une température avoisinant les 70°C et les *Thermococcales* à une température plus élevée, de l'ordre de 80°- 85°C.

#### *La culture en milieu solide en anaérobiose*

La culture en milieu solide en anaérobiose est rendue possible grâce à une enceinte anaérobie, où l'oxygène est remplacé par un gaz inerte, l'azote. L'anaérobiose est assurée avec un faible taux d'hydrogène (entre 3 % et 8 %) ainsi que du palladium, qui sert de catalyseur pour permettre à l'oxygène de réagir avec l'hydrogène pour former de l'eau.

La méthode de culture en anaérobiose est basée sur le protocole de Erauso et ses collaborateurs (Erauso *et al.*, 1995). La culture en milieu solide permet notamment de réaliser des isollements de microorganisme à partir de cultures d'enrichissement. L'ajout de Gelrite® (Merck & Co.) permet au milieu de solidifier et de rester solide même à haute température (pour l'isolement des *Thermococcales*, la température utilisée était de 80°C).

Les boîtes de Pétri sont réalisées en deux parties : une « sous-couche » est d'abord coulée dans les boîtes. Une fois celle-ci solidifiée, une « sur-couche », contenant les microorganismes, est ajoutée.

La préparation de la « sous-couche » se fait de la manière suivante. Du milieu liquide (Ravot modifié) est préparé sous forme concentrée (deux fois). Parallèlement, du Gelrite à 1.6 % (p:v) est ajouté à de l'eau stérile et la solution obtenue est portée à ébullition. Le milieu et la solution eau/Gelrite sont ensuite placés dans l'enceinte anaérobie sur des agitateurs chauffants. Une fois chauffé, le milieu est réduit avec un volume  $\text{Na}_2\text{S}$  10 % correspondant à  $1/50^{\text{ème}}$  du volume du milieu et la solution eau/Gelrite (d'un volume équivalent à celui du milieu) y est ajoutée. Ceci permet l'obtention de milieu Ravot modifié concentré une fois au lieu de deux fois. La solution obtenue est coulée dans des boîtes en verre stériles et les boîtes sont laissées à température ambiante afin que la « sous-couche » se gélifie.

Une fois celle-ci solidifiée, la « sur-couche » peut être préparée. Le processus est similaire à celui de la préparation de la « sous-couche ». Du milieu concentré deux fois est utilisé, mais à la différence de la « sous-couche », la solution eau/Gelrite contient 0.4 % de Gelrite. Cette solution est portée à ébullition et déposée dans l'enceinte anaérobie sur un agitateur chauffant de la même manière que précédemment. Le milieu concentré deux fois est réduit avec un volume  $\text{Na}_2\text{S}$  10 % correspondant à  $1/50^{\text{ème}}$  du volume du milieu et distribué dans des tubes Hungate à raison de 800  $\mu\text{l}$  par tube. Dans chaque tube est ensuite ajouté 100  $\mu\text{l}$  d'inoculum (dilué généralement entre  $10^5$  et  $10^7$  fois) et 100-150  $\mu\text{l}$  d'une solution de soufre colloïdal. L'eau chaude contenant 0.4 % de Gelrite, est finalement ajouté à raison de 1 ml dans les tubes Hungate et le contenu du tube est mélangé et coulé sur la « sous-couche ». Une fois les deux couches solidifiées, les boîtes sont placées dans des jarres en verre (7 boîtes par jarre) avec une bandelette en papier imbibée de 1 ml de  $\text{Na}_2\text{S}$  10 % (pour maintenir l'anaérobiose dans les jarres). Les jarres sont fermées hermétiquement et sont ensuite placées dans une étuve à température permettant la croissance du microorganisme étudié (ex.  $80^\circ\text{C}$  -  $85^\circ\text{C}$  pour les *Thermococcales*).

La formation des colonies se produit à l'interface entre les deux couches, où les conditions sont favorables à leur croissance (anaérobiose et accès aux nutriments ainsi qu'au soufre) (Erauso *et al.*, 1995). Cette formation s'accompagne de l'apparition d'un « halo » apparaissant sur la « sur-couche » qui témoigne de la consommation du soufre colloïdal. Lors de l'isolement, une colonie individuelle est piquée avec un cône de micropipette qui est déposé dans un tube Hungate contenant du soufre élémentaire et 5 ml de milieu. Les tubes sont fermés hermétiquement et mis à incuber dans des étuves avec des températures appropriées. Après croissance des microorganismes, les cultures sont utilisées comme inoculum lors de l'étalement sur boîte de Pétri. Après trois étapes d'isolement sur boîte, la manipulation est terminée et la vérification par amplification du gène codant pour

l'ARNr 16S est effectuée pour déterminer la pureté de la culture. L'appartenance de la souche isolée à une espèce peut être déterminée par comparaison de la séquence de ce gène aux bases de données, telles que NCBI, à l'aide du logiciel BLAST (ou « Basic Local Alignment Search Tool » (Altschul *et al.*, 1990)).

### La réalisation des cultures d'enrichissement

Dans le cas d'un enrichissement, l'inoculation se fait par ajout de 1/100<sup>ème</sup>, 1/50<sup>ème</sup> et 1/30<sup>ème</sup> du volume du milieu avec l'échantillon brut (mélangé aux sédiments). Les fioles sont ensuite placées dans des étuves aux températures de croissance des souches cultivées. La culture d'enrichissement favorisant la culture des *Thermotogales* est placée à 70°C tandis que celle favorisant la culture des *Thermococcales* est placée à 80°C.

Les enrichissements qui ont été effectués sont indiqués dans le Tableau 9.

Site	Source	Milieu	Température (°C)
Rallier du Baty	Plage du Feu de Joie 2 (PFJ2)	Niederberger	70 ; 80 ; 90
	RB 10	Niederberger	70 ; 80 ; 90
Saint Paul	SP 1	Ravot mod.	70 ; 80 ; 90
	SP 2	Ravot mod.	70 ; 80 ; 90
	SP 3	Ravot mod.	70 ; 80 ; 90
	SP 09	Ravot mod.	70 ; 80 ; 90
	SP 11	Ravot mod.	70 ; 80 ; 90
	SP 11 bis	Ravot mod.	70 ; 80 ; 90

Tableau 9. Tableau récapitulatif des cultures d'enrichissement effectuées en anaérobiose.

## 2.2. L'aérobiose

### 2.2.1. Milieux

Le milieu utilisé pour les enrichissements et l'isolement des *Geobacillus* et *Thermus* sont les milieux 162 et 160 (Degryse *et al.*, 1978; Pétursdóttir & Kristjánsson, 1995). Pour 1 l de milieu 162 il faut : 898 ml d'H<sub>2</sub>O ; 2.5 g d'extrait de levure ; 2.5 g de tryptone et 10 g de NaCl. Après autoclave, y est ajouté 100 ml de « Base A » contenant pour 1 l : 1.32 g d'acide nitrilotriacétique, 2.0 g de MgCl<sub>2</sub> . 6 H<sub>2</sub>O ; 0.40 g de CaSO<sub>4</sub> . 2 H<sub>2</sub>O ; 14.7 mg de Na<sub>3</sub>citrate . 2 H<sub>2</sub>O ; 13.5 mg de FeCl<sub>3</sub> . 6 H<sub>2</sub>O. Au milieu sont également ajoutés 20 ml de « tampon B » contenant pour 1 l : 5.44 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 21.40 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O. Le milieu nécessite aussi 0.5 ml « d'éléments traces » contenant pour 1 l d'H<sub>2</sub>O : 12.8 g d'acide nitrilotriacétique ; 1.0 g de FeCl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O ; 0.5 g de MnCl<sub>2</sub> . 4H<sub>2</sub>O ; 0.3 g de CoCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O ; 0.2 g de ZnCl<sub>2</sub> ; 0.05 g de CuCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O ; 0.05 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O ; 0.02 g de H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> ; 0.02 g de NiCl<sub>2</sub> . 6H<sub>2</sub>O. Le pH est ajusté à 7.2. Pour obtenir des boîtes de Pétri avec du milieu solide, 2.8 % (p:v) d'agar sont ajoutés au milieu avant l'autoclave.

Le milieu 160 est identique à 162, si ce n'est pour la quantité de « tampon B » que l'on ajoute qui n'est que de 2 ml dans un litre de milieu (au lieu de 20 ml pour le milieu 162).

Le milieu utilisé pour la culture de *Geobacillus thermoleovorans* est le milieu TM (Liu *et al.*, 2006). Il contient pour 1 l d'H<sub>2</sub>O : 4 g d'extrait de levure ; 8 g de tryptone ; 30 g de NaCl ; 2 g de MgCl<sub>2</sub> . 6 H<sub>2</sub>O ; 0.73 g de CaCl<sub>2</sub> . 2H<sub>2</sub>O. Le pH est de 7.0.

### 2.2.2. La culture liquide et solide en aérobiose

#### *La culture en milieu liquide en aérobiose*

Pour la culture en aérobiose des *Geobacillus* et des *Thermus*, le volume choisi (généralement 20 ml) est réparti dans des fioles pénicilline stériles. Les fioles sont ensuite bouchées hermétiquement avec des bouchons en caoutchouc et scellées. Le milieu est inoculé avec la souche désirée de la même manière que pour les cultures en anaérobiose, c'est-à-dire par ajout de 1/100<sup>ème</sup> de volume de la pré-culture de la souche désirée par rapport au volume du milieu (ex. 200 µl pour 20 ml de milieu).

### *La culture en milieu solide en aérobiose*

Afin d'obtenir des boîtes de Pétri avec du milieu solide, à un litre de milieu sont ajoutés 28g d'agar avant autoclavage. L'agar peut être utilisé comme agent gélifiant pour des cultures qui n'excèdent pas les 70-75°C. A partir de 75°C, l'agar ne permet plus d'assurer la solidité du milieu et le Gelrite peut être utilisé comme agent gélifiant. Ceci est le cas également pour des milieux acides dont le pH est inférieur à 5. Une fois que les cultures d'enrichissement sont réalisées, des cultures peuvent êtreensemencées sur boîte. Avec une dilution adéquate (généralement entre  $10^5$  et  $10^7$  fois), des colonies de morphologie différente apparaîtront sur les boîtes. Des colonies isolées peuvent ensuite être repiquées et striées sur des boîtes de Pétri. L'isolement de colonies est répété quatre fois. Chaque isolat est ensuite identifié par des méthodes bioinformatiques, comme décrites précédemment.

### *La culture et description de la souche OLG<sub>2</sub>*

Parmi plusieurs isolats issus de cultures d'enrichissement effectuées à partir d'échantillons de terre chaude (SP<sub>4</sub>) de Saint Paul, un isolat présentait des caractéristiques différentes de celles habituellement rencontrées chez le genre *Geobacillus*. Après analyse bio-informatique, il s'est avéré que cette souche, la souche OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> (accession : FN398054), appartenait au genre récemment décrit *Calditerricola*. Présentant des caractéristiques distinctes des deux espèces décrites au sein de ce genre, quelques manipulations ont été nécessaires pour achever la description de cette souche.

Pour l'hybridation ADN-ADN, la souche OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> est cultivée sur le milieu 160, qui est celui qui permet son isolement. Pour ceci, une pré-culture est inoculée (à 1 %) sur 20 ml de milieu 160 et a été mise à incuber sur la nuit à 80°C. Le lendemain, les 20 ml de pré-culture ont été utilisés pour inoculer 2 l de milieu 160 pré-chauffés à 80°C. La culture a été répartie dans des flacons Erlen® de 5 l et mis à agiter à 70°C dans une étude à agitation. Après 12h à 18h de culture, les cellules ont été culottées par centrifugation à 10 000 g, pendant 30 min à 4°C. Afin d'obtenir 5 g de biomasse humide, 4 l à 5 l ont été nécessaires. La biomasse a été conservée à -20°C. L'autre souche, avec laquelle la souche OLG<sub>2</sub> a été hybridée est *Calditerricola yamamurae*. Le procédé d'obtention de biomasse a été identique à celui décrit pour la souche OLG<sub>2</sub><sup>T</sup>. L'hybridation ADN-ADN a été effectuée par la société DSMZ (ou « Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen »), après envoi de la biomasse dans un volume de 40 ml de solution eau/isopropanol (v:v) à température ambiante.

Afin de déterminer la gamme de température de croissance et la température optimale de croissance de la souche, une pré-culture de la souche OLG2 a été inoculée (à 1 %) sur 20 ml de milieu 160 et mis à 80°C pour la nuit. Le lendemain, 20 ml de milieu de culture 160 ont été répartis dans des fioles et pré-chauffés aux températures désirées. Une fois chauffés, les milieux ont été inoculés à 1 % avec la pré-culture. Les fioles avec les milieux fraîchement inoculés ont été ensuite remises à incuber à leur température respective. Après 6 h et 24h de culture, leur densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm. Les valeurs de densité les plus élevées ont été considérées comme indicatrice de la croissance optimale de la souche. Des fioles non-inoculées ont servi de témoins et ont été mises à la température de croissance optimale présumée de la souche. La manipulation a été effectuée en deux parties : une première fois avec une gamme de température large, tous les 10°C, pour établir la gamme de température de croissance. La manipulation a ensuite été répétée avec une gamme de température plus restreinte, tous les 2°C, pour déterminer avec plus de précision la température optimale. La culture de base, à partir de laquelle les pré-cultures ont été effectuées, est la même pour toutes les manipulations. Toutes les manipulations ont été effectuées en duplicat.

Des photos des cellules de OLG2 en microscopie à contraste de phase et en MET ont été obtenues en réalisant une culture inoculée à 1 % sur 20 ml de milieu 160 et incubée une nuit à 80°C et à 70°C, afin d'étudier les différences morphologiques liées à la sporulation à ces deux températures. Une goutte de chaque culture a été déposée entre lame et lamelle et observée à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Olympus BX60). Pour la MET, les cellules ont été centrifugées à 10 000 g pendant 20 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été resuspendues dans 200 µl de milieu de culture stérile, concentrant ainsi les cellules 100 fois. Un volume de 10 µl des différentes cultures choisies a été déposé sur des grilles MET (en cuivre) pendant 2 min et l'excès de liquide a été ensuite absorbé à l'aide de papier Whatman™. Un volume de 5 µl d'acétate d'uranyle à 2 % de concentration a ensuite été déposé sur les grilles MET pour effectuer la coloration permettant le contraste. Après 45 s, l'excès d'acétate d'uranyle a été absorbé grâce à du papier Whatman™. La grille a été laissée sécher à l'air libre.

Pour construire un arbre phylogénétique basé sur les séquences codant pour l'ARNr 16S, des séquences de gènes codant pour l'ARNr 16S des bactéries qui font l'objet de comparaison peuvent être récupérées dans la base de données NCBI. Les séquences sont ensuite alignées grâce au logiciel SEAVIEW (Gouy *et al.*, 2010). Les séquences alignées sont ensuite analysées avec le logiciel BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) qui permet de tronquer les séquences. Une fois tronquées, les séquences sont re-analysées avec SEAVIEW à l'aide duquel un arbre phylogénétique peut être construit en utilisant la méthode du neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987) avec un bootstrap d'une valeur de 1000.

### **3. L'étude de l'abondance microbienne et virale dans les échantillons bruts**

#### **3.1. Le dénombrement microbien et viral par microscopie à épifluorescence**

Le dénombrement microbien et viral se fait par la méthode de microscopie à épifluorescence. La méthodologie utilisée est basée sur le protocole de dénombrement procaryotique et viral décrit par Patel et ses collaborateurs (Patel *et al.*, 2007).

Pour les dénombrements dans les échantillons bruts, des dilutions différentes sont testées pour estimer la meilleure dilution à utiliser pour le dénombrement. Les échantillons des sources hydrothermales des Kerguelen sont dilués 10 fois dans du diluent  $\lambda$  (constitué de 10 mM de Tris-HCl, pH 7.5 ; de 8 mM de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  et 50 mM de NaCl dans de l'eau MilliQ.) (Sambrook *et al.*, 1989), filtré à 0,02  $\mu m$ .

Une fois dilués, les échantillons sont conservés dans de la glace et filtrés sur un filtre Anodisc 25 de Whatman (porosité de 0,02  $\mu m$ ) à l'aide d'un appareil à filtration Whatman<sup>TM</sup> connecté à une pompe à vide (Vacuum type glass holder). Les filtres sont déposés sur une lame de microscope et laissés à sécher dans une boîte de pétri à température ambiante ou dans une étuve à 40°C. La coloration des filtres est effectuée avec 60  $\mu l$  de SYBR Gold cinq fois concentré (SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain, Invitrogen<sup>TM</sup>) et après coloration, les filtres sont incubés à l'abri de la lumière pendant au minimum 15min. De l'agent « Anti-fading » est ensuite ajouté à raison de 50  $\mu l$  par filtre. Cet agent (composé de tampon phosphate salin (PBS) et Glycérol (v:v) et de 0,1 % de N'N'Diméthyle 1,4 Phenylène Diamine Sulfate) permet d'augmenter le temps de la fluorescence des particules après excitation lors des comptages. Les filtres sont observés au microscope à épifluorescence (Olympus BX60) en utilisant la lumière bleue comme source d'excitation et l'objectif x 100 pour les observations (grossissement final de 1000 x).

Les comptages d'abondance sont effectués à l'aide d'un quadrillage qui se situe dans l'objectif du microscope. Sa surface peut être calculée grâce une lame micrométrique. Lors des comptages, un minimum de 200 particules est compté sur un minimum de 10 champs de comptage de manière à ce que si le nombre de particules est inférieur à 200, le nombre de champs de comptage puisse être augmenté. Si arrivé à 200 particules ne pose pas de problème dans les échantillons issus des cinétiques d'induction virale faites en laboratoire, cela n'est pas toujours le cas dans les échantillons bruts des sources hydrothermales des Kerguelen et de Saint Paul. Pour ces échantillons bruts, un minimum de 200 particules est

compté lorsque cela est possible. Dans le cas contraire, les particules sont comptées sur 40 champs. La moyenne des particules est ensuite prise comme valeur pour l'échantillon.

L'abondance bactérienne et virale peut être ensuite calculée en utilisant la formule suivante :

$$Abondance \left( \frac{particules}{ml} \right) = (nombre \ de \ particules \ moyen \ dans \ un \ champ) \times \frac{Surface \ du \ filtre}{Surface \ du \ champ} \times dilution \times \frac{1}{volume \ filtré \ (ml)}$$

Le dénombrement se fait en triplicat de manipulation, lorsque cela est possible. Pour une première estimation, deux aliquots de chaque source étaient disponibles et les manipulations ont été faites en duplicat.

Les échantillons analysés sont détaillés dans le Tableau 10.

Année d'échantillonnage	Site	Echantillon	Température (°C)
2009	Rallier du Baty (Kerguelen)	RB 07	98.8
2009		RB 10	93.6
2009		RB 18	87.5
2009		RB 32	ND
2009		RB 35	99.6
2009		RB 36	ND
2009		RB 39	82.1
2009		PFJ1	ND
2009		PFJ2	99
2009		Saint Paul	SP 09
2009	SP 12		78.5
2009	SP 13		64.5
2011	SP1 I		70
2011	SP1 II		31
2011	SP1 III		16
2011	SP2 I		80
2011	SP2 II		35
2011	SP2 III		15
2011	SP2 bis		45
2011	Val Travers (Kerguelen)	VT1	60.8
2011		VT2	61.5
2011		VT3	60.1

Tableau 10. Tableau récapitulatif des échantillons analysés en épifluorescence pour déterminer l'abondance virale et microbienne.

### 3.2. Le dénombrement microbien et viral par cytométrie en flux

Le dénombrement microbien et viral par cytométrie en flux demande une certaine expertise, notamment pour la manipulation du cytomètre, mais aussi pour l'interprétation et l'analyse des résultats. Pour ceci, trois collaborations ont été sollicitées :

La première collaboration a eu lieu à Clermont-Ferrand, à l'Université Blaise Pascal, dans le « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement » (UMR CNRS 6023) avec le Pr. Sime-Ngando et le Dr. Colombet pour des analyses préliminaires sur des échantillons bruts des sources hydrothermales.

Une deuxième collaboration, visant à comparer trois méthodes directes de dénombrement procaryotique et viral, a été réalisée en Norvège, dans le « Laboratoire de Microbiologie Marine », à l'Université de Bergen. La collaboration s'est faite avec le Dr. Bratbak, le Dr. Heldal et le Dr. Ray.

La dernière collaboration était avec le Dr. Jacquet de l'Equipe BioFEEL de la « Station d'Hydrobiologie Lacustre » (INRA/UMR CARTELE) à Thonon. La collaboration a eu lieu dans l'optique de dénombrer les procaryotes et les VLP des échantillons obtenus lors de la campagne d'échantillonnage de 2011, par cytométrie en flux.

Avant de commencer l'analyse des échantillons bruts au cytomètre, une préparation des échantillons et du cytomètre est nécessaire. Le débit d'aspiration du cytomètre est mesuré à chaque mise en marche de la machine. Pour ceci, de l'eau ultrapure est pesée précisément puis placée dans le cytomètre. Le débit d'aspiration du cytomètre est ensuite fixé (par exemple en vitesse moyenne ou faible). Après un laps de temps déterminé précisément, l'aspiration est terminée et l'eau résiduelle est pesée. Avec la différence des poids avant et après aspiration, ainsi que la durée de l'aspiration, il est possible de définir le débit d'aspiration précis suivant la formule suivante :

$$\text{Débit d'aspiration } (\mu\text{l}/\text{min}) = \frac{\text{Poids initial} - \text{Poids après aspiration}}{\text{Temps (min)}}$$

Les poids doivent être convertis en volume d'eau (par exemple, la valeur de la masse volumique de l'eau à 4 °C est de 0,999973 kg/l). L'aspiration se fait au minimum pendant 15 min.

Une préparation des échantillons est nécessaire avant analyse par cytométrie. Ceux-ci sont sortis du congélateur à -80°C et laissés à fondre sur glace. Ensuite, les échantillons sont dilués dans du tampon TE (Tris-EDTA). Les gammes de dilution habituelles sont 1:10, 1:100, 1:500 et 1:1000. En général on ajoute du glutaraldéhyde à une concentration finale de 0.5 %, ce qui permet de fixer les échantillons et de conserver les structures biologiques. Cependant, les échantillons ayant été fixés lors des campagnes, cette étape n'est pas nécessaire lors de l'analyse des échantillons bruts des sources hydrothermales des Kerguelen et Saint Paul.

Des billes commerciales (Invitrogen™) sont ajoutées chaque tube à une concentration connue. Elles servent au contrôle du bon fonctionnement de la machine. En effet, comme elles apparaissent sur l'écran des résultats, elles permettent le contrôle des flux du cytomètre. Leur complexité morphologique et leur fluorescence étant connues, elles peuvent également servir de point de comparaison lors que des particules dispersées sont observées sur les cytogrammes.

Le fluorochrome utilisé est le SYBR® Green I (Invitrogen™) qui est ajouté ensuite dans chaque échantillon à une concentration finale de 1 x. Les échantillons sont placés à 70°C - 80°C à l'abri de la lumière pendant 10 min, afin d'augmenter l'efficacité de pénétration du fluorochrome. Après incubation, les échantillons sont laissés à refroidir à température ambiante pendant 5 min à l'abri de la lumière.

Après ces préparations, les échantillons sont vortexés et peuvent être analysés au cytomètre. Les débits d'aspiration utilisés sont généralement la vitesse moyenne ou faible pour l'analyse des VLP. L'analyse d'un échantillon prend 1 à 2 min. Entre 200 et 800 événements/s sont souhaitables (Jonathan Colombet, communication personnelle).

Les analyses informatiques sont fait à l'aide du programme « CytoWin » (disponible sur le site <http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/cyto.html#cytowin>) ou WinMDI (Trotter, 1995).

L'abondance bactérienne et virale peut ensuite être calculée avec la formule suivante :

$$Abondance \left( \frac{particules}{ml} \right) = \frac{Nombre \ d'évenements}{Temps \ d'acquisition} \times \frac{1000 \ \mu l}{Débit \ d'aspiration \left( \frac{\mu l}{min} \right)} \times dilution$$

Le chiffre « 1000 µl » permet d'exprimer l'abondance en particules/ml.

Pour les analyses des échantillons bruts au « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement », le side scatter (qui est un détecteur de granulométrie) était réglé à 700 et le FL1 (qui est un détecteur de fluorescence) à 467. Dans le « Laboratoire de Microbiologie Marine » à Bergen, le side scatter et le FL1 étaient réglés à 600 tous les deux. Pour le dénombrement du bactérioplancton hétérotrophe, S. Jacquet utilise les paramètres de fluorescence E02-500-500-500-500 et seuil FLH1 à minimum 100. Pour le virioplancton, les paramètres suivant ont été utilisés : 600-500-550-550 et un seuil de 90 pour le FLH1.

Les cytomètres utilisés pendant les trois collaborations étaient des FASCalibur (Becton Dickinson) muni d'un laser argon de 488 nm.

Les échantillons analysés sont les mêmes que ceux analysés en épifluorescence.

### **3.3. La comparaison des méthodes de dénombrement**

Pour les tests de corrélation entre les méthodes de dénombrement microbien et viral, par microscopie à épifluorescence et par cytométrie en flux, un test non paramétrique de rang de Spearman a été effectué avec le logiciel R (R-Development-Core-Team, 2005).

### **3.4. Le dénombrement et les observations virales par microscopie électronique à transmission**

Lors des collaborations effectuées au « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement » à Clermont Ferrand et au « Laboratoire de Microbiologie Marine » à Bergen, la méthodologie de dénombrement et l'exploration de la diversité virale par microscopie électronique à transmission ont été entreprises.

La méthodologie utilisée dans ces laboratoires est celle de la sédimentation des particules virales à partir d'échantillons naturels d'eau de source directement sur des grilles de MET, en cuivre recouverte d'un film de Formvar. Les tubes à ultracentrifugation contiennent un support, sur lequel sont attachées les grilles de MET à l'aide d'un scotch double-face. L'échantillon est ensuite ajouté dans ces tubes et les tubes sont placés dans un rotor du type « Swing-bucket » et ultracentrifugés.

Au « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement », les tubes sont ultracentrifugés pendant 2 h. Une fois la centrifugation terminée, les grilles sont récupérées

et contrastées avec 10 µl d'acétate d'uranyle à 2 % pendant 30 s. Un rinçage par une goutte de H<sub>2</sub>O stérile pendant 5 s est ensuite effectué avant de laisser les grilles sécher à l'air libre. La matière du support des grilles est un mélange commercial fait d'une résine polyester préaccélérée de type GTS et d'un durcisseur, le peroxyde d'éthylméthylcétone (Soloplast-Vosschemie, France) (Sime-Ngando *et al.*, 1996). L'ultracentrifugation se fait à 120 000 g pendant 120 min à 4°C dans un rotor de type « Swing-bucket TST<sub>4114</sub> ». L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope JEOL 1200 EX.

A la différence à la méthodologie utilisée au « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement », la résine utilisée comme support de grilles MET au « Laboratoire de Microbiologie Marine » à Bergen est une résine Epoxy commerciale (une colle à deux composants) de Casco® (Borsheim *et al.*, 1990; Ackermann & Heldal, 2010). L'ultracentrifugation se fait à 80 000 g, pendant 30 min à 10°C dans un « Swing-bucket SW<sub>41</sub> ». Les grilles sont ensuite récupérées et colorées à l'aide de 10 µl d'acétate d'uranyle 2 % pendant 1 min. Une étape de rinçage en utilisant 10 µl de H<sub>2</sub>O stérile est également réalisée avant de laisser sécher les grilles à l'air libre. L'observation est effectuée à l'aide d'un microscope JEOL 100CX.

Les observations se font à l'aide d'un microscope électronique à transmission et le dénombrement peut se faire à l'aide d'une formule similaire à celle utilisée pour la microscopie à épifluorescence :

$$Abondance \left( \frac{\text{particules}}{\text{ml}} \right) = (N) \times \frac{\text{Surface de la grille}}{\text{Surface du champ}} \times \frac{\text{Surface du support de la grille}}{\text{Surface de la grille}} \times \text{dilution} \times \frac{1}{\text{volume échantillon (ml)}}$$

Où « N » est le nombre de particules moyen observé dans un champ.

L'observation des échantillons bruts par MET permet également d'explorer la diversité morphologique des VLP. Le « Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes » ne disposant pas de rotor du type « Swing-bucket » pour tubes à grands volumes, des échantillons bruts ont été explorés pour la diversité morphologique des VLP en utilisant un rotor fixe Beckman « 70.1 Ti ». Pour ceci, une étape de pré-centrifugation des échantillons bruts a été effectuée à 6000 g, pendant 15 min à 4°C. Les échantillons ont ensuite été placés dans des tubes à ultracentrifugation et ont été ultracentrifugés à 100 000g, pendant 60 min à 4°C. Chaque culot est ensuite resuspendu dans 50 µl du diluent λ. Une grille MET est préparée en y déposant 10 µl de suspension virale et en laissant les particules virales s'adsorber pendant 2 min. L'excès de la suspension virale est ensuite enlevé à l'aide de papier Whatman™ et 10 µl d'uranyle acétate 2 % sont déposés, ce qui

permet la coloration des particules virales sur la grille. Après 45 s, l'excès d'acétate d'uranyle est enlevé à l'aide de papier Whatman<sup>TM</sup> et la grille est laissée à sécher à l'air libre.

Les observations en MET se font à la « Plateforme d'Imagerie et de Mesure en Microscopie (PIMM) » de « l'Université de Bretagne Occidentale » à l'aide d'un microscope de type JEOL JEM 1400. Les grossissements généralement utilisés sont de 60 000 à 120 000 x.

Les échantillons bruts explorés pour l'abondance et la diversité morphologique des VLP sont détaillés dans le Tableau 11.

Année d'échantillonnage	Site	Echantillon	Filtré à 0.02 µm
2009	<b>Rallier du Baty (Kerguelen)</b>	PFJ1	non
2009		RB 07 (cc)	non
2009		RB 18	oui
2009		RB 35	oui
2009		RB 13	oui
2009		RB 15	oui
2009		RB 15	oui
2009		RB 18	oui
2011		<b>Val Travers (Kerguelen)</b>	VT1
2011	VT2		non
2011	VT3		non
2009	<b>Saint Paul</b>	SP1	oui
2009		SP2	oui
2011		SP1 I	non
2011		SP1 II	non
2011		SP1 III	non
2011		SP2 I	non
2011		SP2 II	non
2011		SP3 III	non

Tableau 11. Tableau récapitulatif des échantillons analysés en microscopie électronique à transmission pour déterminer l'abondance ainsi que la diversité morphotypique virale.

## 4. La diversité des VLP dans les isolats procaryotiques

### 4.1. Le criblage des souches procaryotiques pour la présence de virus

Lors du criblage de souches microbiennes, on peut s'attendre à quatre cas de figure : a) l'absence de virus dans la souche criblée, b) la présence de virus de type lytique, c) la présence de virus de type lysogène ou pseudolysogène et d) la présence de virus infectant son hôte de manière chronique.

L'absence de virus se traduit généralement en l'absence de signal en épifluorescence. Ceci se traduit par une faible concentration de points observables en épifluorescence et par l'absence d'observation de particules virales en MET.

La présence de virus de type lytique peut être observée par le simple aspect de la culture de la souche hôte qui devient limpide suite à la lyse cellulaire. Ceci se vérifie par un signal positif en épifluorescence et l'observation des virus en MET.

La détection de virus de type lysogène peut appeler à des manipulations supplémentaires. Malgré une production potentielle par auto-induction, l'obtention de virus en quantité suffisante pour la détection peut nécessiter une induction. L'agent inducteur utilisé, la mitomycine C, agit au niveau de l'ADN en le sectionnant enzymatiquement de manière à ce qu'il ne puisse plus servir comme modèle pour la réplication et bloque la croissance des bactéries (Shiba *et al.*, 1959; Reich *et al.*, 1961). Suite à l'induction, les prophages logant dans les souches porteuses de phage tempéré entament le cycle lytique ce qui se traduit par le fait que la culture trouble devienne limpide, comme dans le cas des « cultures » de virus virulents. Les observations au microscope à épifluorescence et/ou électronique permettent ensuite de confirmer la présence de virus.

Les virus infectant leur hôte de manière chronique ou pseudolysogène sont plus délicats à détecter. Un stress subi par l'hôte, comme par exemple l'induction, peut augmenter le taux de virus produit, mais la concentration virale dans la culture reste souvent basse. Des VLP peuvent quand même être détectées au microscope à épifluorescence. L'observation en MET peut cependant nécessiter une étape supplémentaire qui consiste à concentrer les particules virales par précipitation à partir de grands volumes de culture. Cette étape peut également s'avérer nécessaire pour des virus lysogènes ou lytiques, si leur production est faible. Etant donné la nature inconnue du mode de reproduction des virus lors de leur criblage, toutes les cultures de souche pure atteignant la phase stationnaire de croissance sans lyse apparente sont induites.

La méthodologie de criblage pour la présence de virus est basée sur la détection des particules de type viral à l'aide de la microscopie à épifluorescence. Les cultures positives en épifluorescence sont ensuite analysées avec un microscope électronique à transmission (MET), ce qui permet l'observation de la morphologie des particules virales.

Les cultures virosées sont centrifugées à 10 000 g pendant 20 min à 4°C afin de se débarrasser des cellules et des débris cellulaires. Le surnageant obtenu est ultracentrifugé à 100 000 g, pendant 60 min à 4°C. Les culots viraux sont resuspendus dans 50 µl de diluant λ. Une grille de MET est ensuite préparée de la même manière que celle décrite précédemment.

La méthodologie de criblage s'applique aussi aux enrichissements de culture. Dans ce cas, seuls des inoculats secondaires d'enrichissement sont criblés pour éviter toute contamination de VLP provenant directement des échantillons bruts utilisés pour inoculer plutôt que produits par les souches présentes dans les enrichissements.

Les souches criblées pour la présence de VLP sont détaillées dans le Tableau 12.

Source d'isolement	Souche	Séquence d'ADNr 16S la plus proche en banque NCBI	Identité (%)
Saint Paul (SP 09)	MC 1	<i>Thermosipho africanus</i>	99
Saint Paul (SP 09)	MC 2	<i>Thermosipho africanus</i>	99
Saint Paul (SP 11 bis)	MC 3	<i>Marinitoga litoralis</i>	100
Saint Paul (SP 11)	MC 4	<i>Thermococcus sp.</i>	93
Saint Paul (SP 11)	MC 5	<i>Thermococcus sp.</i>	89
Saint Paul (SP 11 bis)	MC 6	<i>Thermosipho africanus</i>	99
Saint Paul (SP 11 bis)	MC 8	<i>Thermococcus sp.</i>	99
Saint Paul (SP 11 bis)	MC 9	<i>Thermococcus sp.</i>	99
Rallier du Baty (RB 2)	MC 10	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	98
Rallier du Baty (RB 2)	MC 11	<i>Thermoanaerobacter pseudethanolicus</i>	98
Saint Paul (SP1)	JP1	<i>Thermococcus fumarii</i>	99
Saint Paul (SP1)	JP2	<i>Thermococcus fumarii</i>	99
Saint Paul (SP1)	JP3	<i>Thermococcus fumarii</i>	99
Saint Paul (SP1)	JP4	<i>Thermococcus fumarii</i>	99
Saint Paul (SP1)	JP5	<i>Thermococcus fumarii</i>	99
Saint Paul (SP1)	JP5 bis	<i>Thermococcus fumarii</i>	99

Tableau 12. Tableau récapitulatif des souches criblées pour la présence de VLP.

## 5. La description d'un système hôte-virus

### 5.1. Les cultures virales et les tests d'induction

#### 5.1.1. La culture de la souche SP<sub>4</sub> SD de *Geobacillus thermoleovorans* et de son phage GTV<sub>1</sub>

La culture de la souche SP<sub>4</sub> SD de *Geobacillus thermoleovorans* a une croissance classique en terme de culture bactérienne. Un criblage par épifluorescence a suggéré la présence de virus.

Après 12-15h de pré-culture de la souche SP<sub>4</sub> SD, effectué en milieu TM, 100 ml du même milieu stérile sont placés dans une fiole Erlenmeyer de 500 ml au bain-marie à 65°C. Une fois chauffé à 65 °C, le milieu est inoculé à 0.5 % (v:v) avec la pré-culture et est placé sous agitation au bain-marie. La croissance de la souche est ensuite suivie en mesurant la densité optique (D.O.) de la culture à l'aide d'un spectromètre à 600 nm de longueur d'onde. Le suivi de croissance des cultures par mesure de D.O. permet de connaître en temps réel la phase de croissance (latence-exponentielle-stationnaire) où se situe la culture étudiée. Les valeurs de D.O. de la croissance de la souche SP<sub>4</sub> SD varient entre 0.000 et environ 1.100, les valeurs minimales correspondant au début de la phase de latence et les valeurs maximales à la phase stationnaire. La phase exponentielle se situe entre 0.1 et 0.8. L'induction de la souche se fait au début de la phase exponentielle, lorsque la D.O. atteint des valeurs entre 0.1-0.2 (0.150 par exemple) en ajoutant de la mitomycine C à [1 µg/ml]<sub>finale</sub>.

Suite à l'induction, la densité optique de la culture chute, traduisant la lyse virale, et lorsque la valeur minimale est atteinte, l'incubation est terminée. Pour récupérer les particules virales induites, une centrifugation à 10 000 g, pendant 20 min à 4°C, est effectuée pour se débarrasser des cellules restantes et des débris cellulaires. Le surnageant est ultracentrifugé à 100 000 g, pendant 60 min à 4°C, pour concentrer les virus. Les culots viraux sont ensuite resuspendus dans 150-200 µl de diluent λ.

## La gamme d'hôte du virus de *G. thermoleovorans*

Afin de déterminer la gamme d'hôte du phage de *G. thermoleovorans* SP<sub>4</sub> SD, des souches diverses sont cultivées en présence d'une solution virale provenant de *G. thermoleovorans* SP<sub>4</sub> SD.

En premier lieu, un lysat de 50 ml de culture de *G. thermoleovorans* est réalisé et les VLP sont resuspendues dans 200 µl de diluent λ. Les souches pour la gamme d'hôte sont mises en culture sur le milieu TM. En phase exponentielle, 100 µl de concentration virale de *G. thermoleovorans* sont ajoutés aux cultures et les cultures sont ensuite laissées à incuber 180 min. Parallèlement, des plages de lyse sont réalisées, selon la méthodologie décrite par Saunders et Campbell (Saunders & Campbell, 1966). Des boîtes de Pétri de 20 ml de milieu TM gélifié à l'aide de 2 % d'agar sont réalisées. Pour la sur-couche, 300 µl d'une souche à tester sont mis en présence de 100 µl de lysat viral provenant de *G. thermoleovorans* et au mélange sont ajoutés 2.5 ml de TM contenant 0.65 % d'agar. Le tout est coulé sur la boîte de Pétri, qui est ensuite mise à incuber à 60°C. Une boîte avec une dilution de 10 x de la solution virale et une boîte contrôle sans solution virale sont réalisées.

Les souches testées comme hôtes potentiels ont également été criblées en microscopie à épifluorescence pour la présence de VLP. Les souches testées sont détaillées sur le Tableau 13.

Espèce	Souche
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	DSM 5366
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	DSM 730
<i>Geobacillus vulcani</i>	DSM 13174
<i>Geobacillus lituanicus</i>	DSM 15325
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	DSM 7263
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	SP <sub>4</sub> S <sub>13</sub> (isolée au laboratoire)
<i>Thermus thermophiles</i>	DSM579

Tableau 13. Tableau récapitulatif des souches testées pour les expériences de plages de lyse.

### 5.1.2. La culture de la souche MC6 de *Thermosipho africanus* et de sa VLP

Un criblage par épifluorescence a suggéré la présence de phages dans la souche MC 6 de *Thermosipho africanus*, qui appartient à l'ordre des *Thermotogales*.

Du milieu Ravot modifié est réparti dans des fioles pénicilline en présence de soufre ou de thiosulfate. Le milieu est réduit comme décrit précédemment. Ensuite, les fioles sont

inoculées à 1 % (v:v) et mises à incuber à 70°C. La souche est induite avec de la mitomycine C [1 µg/ml]<sub>finale</sub> après environ 12 h de culture, la culture est laissée à incuber à 70°C pendant 180 min. Les cellules sont ensuite éliminées par centrifugation à 10 000 g, pendant 20 min à 4°C. Les VLP sont concentrés suivant différents protocoles. Les volumes de culture varient selon les tests de concentration utilisés, mais généralement un volume de 500 ml est utilisé.

### *Tests d'induction*

Afin d'investiguer des méthodes d'induction alternatives à la mitomycine C, d'autres agents inducteurs ont été testés.

La souche MC 6 a été mise en culture à partir d'un même inoculum. En phase exponentielle, une culture a été induite à la mitomycine C [1 µg/ml]<sub>finale</sub>, à une deuxième culture a été ajouté du NaCl à 10 % en concentration finale. Une culture servant de témoin n'a pas été induit. Le temps d'incubation après induction était de 180 min et l'effet de l'induction a été observé en microscopie à épifluorescence.

Des tentatives d'induction par différentes concentrations de NaCl ont été réalisées sur la souche de *G. thermoleovorans* SP<sub>4</sub> SD, cultivée sur du milieu TM sans NaCl. Les différentes concentrations finales en NaCl étaient de 3 %, 10 %, 20 %, 30 % et 36 %. L'effet d'anaérobiose a également été expérimenté. La stabilité de la mitomycine C a également été investiguée. Un aliquot de 1 ml de concentration [100 µg/ml] a été placé pendant 180 min à 80°C et ensuite a été utilisé pour induire une culture de *G. thermoleovorans* en phase exponentielle de la manière décrite précédemment.

## **5.2. Purification et concentration du virus de *Geobacillus thermoleovorans* et des VLP de *Thermosipho africanus***

Si le virus de la souche SP<sub>4</sub> SD de *G. thermoleovorans* est produit en quantité suffisante pour ne pas devoir passer par une étape de concentration, ceci n'est pas le cas pour les VLP d'un nouveau type de morphologie découverte dans la souche MC 6. Pour l'étude de ces VLP, plusieurs tentatives de concentration et de purification ont été effectuées.

### 5.2.1. La concentration par ajout de PEG 6000

Ce protocole est basé sur celui décrit initialement par Lewis et Metcalf (Lewis & Metcalf, 1988). Du milieu Ravot modifié, d'un volume total de 500 ml, est réparti, en présence de soufre, dans des fioles pénicilline à raison de 50 ml par fiole. Les cultures sont inoculées à 1 % (v:v) avec la souche MC6 et mises à incuber à 70°C. Après 12h de culture, ces dernières sont induites en phase exponentielle à la mitomycine C [ $1 \mu\text{g/ml}$ ]<sub>finale</sub>. Les cultures sont remises à incuber à 70°C pendant 180 min. Les cellules et les débris sont ensuite éliminés par centrifugation à 6000 g, pendant 20 min à 4°C. Du PEG 6000 et du NaCl sont ajoutés au surnageant à raison de 50 g (10 %) et 29 g (1 M) respectivement, et le tout est placé sous agitation et à 4°C pendant au moins 90 min. La solution est ensuite centrifugée à 10 000g, à 4°C pendant 30 min dans des tubes de centrifugation en polycarbonate Nalgene® (Thermo Scientific). Le précipité obtenu sur les parois des tubes est resuspendu à l'aide d'une oese stérile dans 4 ml de diluent  $\lambda$  (filtré à 0.0  $\mu\text{m}$ ). Les culots sont ensuite rassemblés dans un tube.

Le surnageant peut être retraité avec du PEG 6000 et du NaCl de la même manière que décrite précédemment, afin de précipiter les VLP qui seraient restées en solution. Les culots sont alors également rassemblés et mis en commun avec les culots obtenus précédemment.

Les 4 ml de resuspension sont centrifugés à 10 000g, à 4°C pendant 30 min. Le culot résultant est suspendu dans 15 ml de diluent  $\lambda$  et laissé à 4°C pendant une nuit, de façon à ce que les virus se détachent du PEG 6000. Le lendemain, une centrifugation à 6000 g pendant 20 min à 4°C est effectuée pour se débarrasser du PEG 6000 résiduel et le surnageant est réparti dans des tubes. Le surnageant est ensuite concentré par ultracentrifugation à 100 000g, pendant 60 min à 4°C. Les culots viraux sont resuspendus dans du diluent  $\lambda$  et rassemblés de manière à ce que le volume total final n'excède pas 250  $\mu\text{l}$ . Ces 250  $\mu\text{l}$  de solution virale peuvent être ensuite déposés sur un gradient de purification.

Alternativement à la concentration par ultracentrifugation, le surnageant viral peut être concentré par tubes Amicon® (de Millipore™) disposant d'un filtre de 30 KDa. La centrifugation dans ces tubes se fait à 5000 g, pendant 15min à 4°C. Une solution concentrée d'environ 200  $\mu\text{l}$  à 300  $\mu\text{l}$  est alors récupérée.

### 5.2.2. La concentration par ajout de FeCl<sub>3</sub>

Ce procédé, dit de « floculation chimique », est basé sur le protocole décrit par John et ses collaborateurs (John *et al.*, 2011). La préparation de 500 ml de culture se fait comme décrite précédemment pour la concentration par ajout de PEG 6000. Les 500 ml de surnageant contenant les VLP sont obtenus et une solution de FeCl<sub>3</sub> stérile y est ajoutée de manière à ce que la concentration finale des ions de fer soient de [1 mg/l] (la solution de FeCl<sub>3</sub> doit être préparée à une concentration 10 g de fer par litre, soit 4.83 g de FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O dans 100 ml d'eau MilliQ. L'ajout de la solution est alors de 50 µl dans 500 ml de solution virale). La solution est placée sous agitation à température ambiante pendant 60 min. Cette solution virale est ensuite centrifugée à 10 000 g, pendant 20 min à 4°C. Les culots obtenus sont repris dans un volume de 10 ml de tampon de resuspension contenant 0.25 M d'acide ascorbique, et 0.2 M de Mg<sub>2</sub>EDTA à pH 6 et filtré à 0.0 2µm. La solution de Mg<sub>2</sub>EDTA n'étant pas disponible, une solution de tampon de resuspension a pu être construite à partir de MgCl<sub>2</sub>, EDTA et acide ascorbique en respectant les proportions moléculaires des ions magnésium. L'acide ascorbique peut être remplacé par l'acide oxalique, si nécessaire. Le tampon de resuspension doit être préparé le jour de la manipulation. Une fois le tampon de resuspension ajouté, le tout est homogénéisé et une centrifugation de 5 000 g, pendant 20 min à 4°C est réalisée pour se débarrasser des agents flocculants. Le surnageant est ensuite ultracentrifugé à 100 000 g, pendant 60 min à 4°C. Les culots viraux sont resuspendus dans du diluent λ et rassemblés de manière à ce que le volume total final n'excède pas 250 µl. Ces 250 µl de suspension peuvent être ensuite déposés sur un gradient de purification.

Alternativement, après floculation la solution peut être filtré à sur un filtre membranaire de Whatman en polycarbonate de porosité 0.8 µm. Les virus précipités forment une matrice capturée sur le filtre qui est ensuite placé dans 10 ml de tampon de resuspension. Une fois le précipité dissout, les virus peuvent être concentrés par ultracentrifugation à 100 000 g, pendant 60 min à 4°C. Les culots viraux sont resuspendus dans du diluent λ et rassemblés de manière à ce que le volume total final n'excède pas 250 µl. Les culots viraux peuvent être obtenus également par concentration de la solution virale en utilisant des tubes Amicon® comme décrite précédemment. Ces 250 µl de suspension peuvent être ensuite déposés sur un gradient de purification.

Les protocoles décrits ci-dessus ont été également appliqués à des volumes de culture de 1 l et de 2 l et pour *T. africanus* MC 6. Les quantités de solutions ont été adaptées aux différents volumes de cultures à chaque fois.

Une fois qu'une solution d'environ 200 µl de VLP est obtenue, celle-ci peut être déposée sur un gradient de densité afin de purifier les VLP par ultracentrifugation. Pour ceci, plusieurs solutions peuvent être utilisées, dont les plus communes sont le chlorure de césium (CsCl), l'Iodixanol (ou OptiPrep™) ou encore une solution de sucrose. Le principe

repose sur la séparation des particules de tailles et de poids différents le long d'un gradient de densité en utilisant comme force de séparation l'ultracentrifugation. Une revue reprenant les différentes solutions, matériels et méthodologies utilisés à cet effet a été publiée par Lawrence et Steward: «Purification of viruses by centrifugation» (Lawrence & Steward, 2010).

### 5.2.3. La purification par utilisation de chlorure de césium

Les virus ayant potentiellement des densités différentes, le taux de chlorure de césium à utiliser pour la formation du gradient peut varier. Une liste de virus appartenant à des familles différentes et des densités de chlorure de césium respectives à utiliser peuvent être trouvée dans une publication de Thurber et collaborateur: «Laboratory procedures to generate viral metagenomes» (Thurber *et al.*, 2009). Le gradient se formant au cours de l'ultracentrifugation dans le cas de chlorure de césium, une solution de celle-ci est préparée en ayant déterminé d'abord une densité voulue. Le chlorure de césium se présente sous forme de poudre à mélanger à une solution liquide. La solution à utiliser est de préférence le tampon utilisé pour la resuspension virale, comme le diluent  $\lambda$ . Pour faire correspondre la densité choisie du gradient et le poids de chlorure de césium à mélanger dans un volume donné de tampon, la formule suivant peut être utilisée :

$$\text{CsCl}_{\text{masse}} = V_{\text{solution}} \times (\rho_{\text{solution}} - \rho_{\text{solvent}}) \times 1.35$$

où  $\text{CsCl}_{\text{masse}}$  est la masse de Chlorure de césium à utiliser (en g),  $V_{\text{solution}}$  est le volume de la solution de chlorure de césium,  $\rho_{\text{solution}}$  est la densité voulue pour la solution de chlorure de césium (g/ml) et  $\rho_{\text{solvent}}$  est la densité du diluent utilisé (g/ml) (Lawrence & Steward, 2010).

Une fois que la solution de chlorure de césium est préparée, la solution virale est déposée sur le gradient. Le tout est ultracentrifugé à 124 000 g, pendant 300 min à 12°C. Normalement une bande est visible, correspondant à la fraction virale ayant migré selon la densité des particules virales.

Les densités testées pour les fractions de VLP de la souche MC6 sont : 1.24 ; 1.298 ; 1.32 ; 1.36

La densité testée pour le myovirus de *G. thermoleovorans* est de 1.55 et 1.5

Une bande, correspondant à la fraction virale, générée par un gradient de chlorure de césium n'est pas toujours visible si la fraction est peu concentrée en VLP. Pour détecter une bande, un détecteur d'absorbance « Teledyne Isco UA-6 Absorbance Detector » a été utilisé. Cette machine est munie d'une source de rayonnement ultra-violet et d'un détecteur de ces rayonnements. Le gradient, où se trouve la fraction virale potentielle, est passé au détecteur. Une solution très dense de chlorure de césium est ensuite introduite au fond du

tube de manière à ce que la solution déjà présente dans le tube entre dans la machine. Le gradient passe ensuite devant le rayonnement UV émit par la machine. Lorsque la fraction virale passe devant le détecteur de rayonnement UV, un pic d'absorbance des acides nucléiques est détecté et la fraction peut être récupérée au niveau d'un collecteur de la machine.

#### 5.2.4. La purification par l'utilisation d'iodixanol

Deux manières de former un gradient d'iodixanol ont été testées.

La première consiste à préparer plusieurs solutions de densités différentes et à les déposer les unes sur les autres par ordre décroissant de densité. A partir de la solution mère à 60 %, quatre solutions sont réalisées dans du diluent  $\lambda$ : à 45 %, à 40 %, à 35 % et à 30 %. Elles sont disposées comme indiqué plus haut et laissées incuber pendant la nuit à 4°C. Le lendemain, la fraction virale est déposée sur le gradient et le tout est ultracentrifugé à 150 000 g, pendant 360 min à 10°C. Cette méthode a été testée pour les fractions de VLP de la souche MC 6.

La deuxième méthode a été construite à partir des données d'Axis-Shield détaillées dans l'Application Sheat n°Vo3 (<http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Vo3.pdf>). Cette méthode consiste à préparer une solution d'iodixanol à 20 %. La fraction virale est ensuite déposée sur ce gradient. L'ultracentrifugation se fait avec le rotor 70.1 Ti de Beckman, à 70 000 rpm (environ 335 000 g) à 15°C pendant 300 min. Le gradient est ainsi autoformé au cours de la centrifugation. Les paramètres changent selon le rotor, il est donc important de respecter ces paramètres pour le rotor 70.1 Ti. Ce protocole a été testé pour les fractions virales de *G. thermoleovorans*. Une variation de ce protocole a également été expérimentée, où les 20 % d'iodixanol ont été remplacés par une solution à 30 % ou à 35 %.

#### 5.2.5. La purification par l'utilisation d'une solution de sucrose

Pour une purification en utilisant un gradient de sucrose, une solution de 25 % de sucrose est préparée dans du diluent  $\lambda$ . La solution est laissée incuber à 4°C pendant une nuit. Le lendemain, la fraction virale est déposée sur la solution. Le tout est ultracentrifugé à 54 000 g pendant 120 min, à 4°C. Une ultracentrifugation à 150 000 g, pendant 300 min à 4°C a également été testée.

Le gradient de sucrose a été testé pour les fractions de VLP de la souche MC 6.

### 5.3. Les cinétiques de croissance de la souche SP4 SD avec et sans induction

Quatre cinétiques de croissance de la souche SP4 SD, décrites ci-dessous, ont été réalisées. La première cinétique de croissance a été effectuée sans induction et a servi de culture témoin. La deuxième cinétique a compris une étape d'induction de la souche SP4 SD par la mitomycine C. La troisième cinétique décrit la réponse de la souche SP4 SD à l'induction suite aux conditions d'anoxie. La quatrième cinétique a été réalisée en utilisant un choc osmotique comme moyen d'induction, par ajout de NaCl [3 %].

#### 5.3.1. L'induction par ajout de la mitomycine C

Une pré-culture de 10 ml de la souche SP4 SD de *Geobacillus thermoleovorans* est inoculée dans le milieu TM. Le lendemain, pour chaque culture, 100 ml de milieu TM sont placés dans une fiole Erlenmeyer de 500 ml et sont chauffés jusqu'à 65°C. Une fois chaud, le milieu de chaque fiole Erlenmeyer est inoculé avec 0.5 ml (inoculation 0.5 % v:v) de pré-culture et les cultures sont placées en agitation dans un bain-marie. La croissance des cultures est ensuite suivie en effectuant des points de mesure de densité optique (D.O.) ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ) sur des échantillons de 1 ml. Une fois la D.O. mesurée, 900  $\mu\text{l}$  de l'échantillon sont mis en cryotube contenant 18  $\mu\text{l}$  de glutaraldéhyde 25 % (concentration finale de 0.5 %) lesquels sont ensuite plongés dans de l'azote liquide (technique du « flash-freeze ») et conservés à -80°C. L'induction de la souche SP4 SD par l'utilisation de la mitomycine C [1  $\mu\text{g/ml}$ ] a lieu au début de la phase exponentielle (à une valeur de D.O. avoisinant 0.150 $_{\lambda=600\text{nm}}$ ). Des échantillons sont prélevés tout les 30 min tout au long de l'expérience jusqu'à ce que la croissance de la souche SP4 SD atteigne la phase de croissance stationnaire. Pour la culture contrôle non-induite, ceci est effectué jusqu'à la phase stationnaire de la souche, qui atteindra une valeur maximale en D.O. (environ 1.100 $_{\lambda=600\text{nm}}$ ). Pour la culture induite par la mitomycine C, la cinétique est réalisée jusqu'à ce que la D.O. chute à une valeur avoisinant 0.050, correspondant à la lyse des cellules provoquées par des virus.

### 5.3.2. L'induction par anoxie

L'induction par mise en conditions d'anaérobiose est effectuée au début de la phase exponentielle de la croissance de souche, comme pour l'ajout de la mitomycine C. La culture est alors transférée de la fiole Erlenmeyer pour être mise en bouteille Schott de 500 ml à l'aide de seringues de 50 ml. La bouteille Schott a été préalablement bouchée à l'aide d'un bouchon en caoutchouc et scellée avec un bouchon à vis. Une fois fermée, l'anaérobiose a été réalisée dans la bouteille en y plantant une aiguille, connectée à une rampe à gaz, à travers le bouchon et en faisant le vide. Une deuxième aiguille a ensuite été plantée à travers le bouchon et de l'azote a été injecté pendant 20 s (à 1 bar de pression) et la surpression est évacuée grâce à la deuxième aiguille, technique dite de « flush ».

### 5.3.3. L'induction par choc osmotique - NaCl

La cinétique est similaire à celle décrite ci-dessus. A la différence des deux autres, cette cinétique impose que la souche SP<sub>4</sub> SD soit cultivée sur du milieu TM sans NaCl. La pré-culture, ainsi que les cultures de la cinétique même, sont cultivées sur du milieu TM à 0 % de NaCl.

Comme décrit précédemment, lorsque la culture atteint le début de la phase exponentielle, elle est induite. Ceci se fait par ajout de 3 g de NaCl dans la culture (atteignant ainsi 3 % de NaCl en concentration finale). Les prélèvements d'échantillon se font ensuite comme décrit, jusqu'à ce que la culture atteigne la phase stationnaire de croissance.

Toutes les cinétiques ont été réalisées avec un contrôle non-induit et en duplicat de culture.

### 5.3.4. Le dénombrement bactérien et viral des cultures induites

Les échantillons conservés à -80°C sont laissés à décongeler sur de la glace pour les dénombrements bactériens et viraux des cinétiques d'induction de la souche SP<sub>4</sub> SD. Une fois décongelés, des dilutions adéquates pour le dénombrement bactérien (variant entre 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-4</sup>) et viral (variant entre 10<sup>-1</sup> et 10<sup>-5</sup>) peuvent être effectuées. Une centrifugation à 6000 g pendant 20 min à 4°C est réalisée au préalable pour se débarrasser des cellules. Les dilutions sont faites dans 5 ml de diluant λ (filtrée à 0,02 µm).

Le procédé utilisé pour le dénombrement est celui décrit précédemment pour le dénombrement procaryotique et viral dans les échantillons bruts par microscopie à épifluorescence. A la différence des échantillons bruts, le dénombrement peut se faire sans l'interférence de sédiments et de débris divers et donc un minimum de 200 particules peut être compté sur un minimum de 10 champs de manière à ce que si le nombre de particules est inférieur à un total de 200, le nombre de champs de comptage puisse être augmenté. La moyenne des valeurs est ensuite prise comme valeur pour l'échantillon et les abondances bactérien et viral peuvent être comptées en utilisant la formule employée précédemment.

## **6. L'analyses des acides nucléiques**

### **6.1. Les solutions utilisées :**

- EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique
- Tampon TE : Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8
- Tampon TNE : Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M, Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM, pH 8
- Tampon TAE : Tris/Acétate/EDTA (solution commerciale Eurobio)
- PCI : Mélange Phénol/Chloroforme/Alcool Isoamylique (25 :25 :1)
- SDS : Sodium Dodecyle Sulfate,
- Sarkosyl : Sodium Lauroyl Sarcosinate
- Acide acétique glacial : acide acétique 100 %
- Isopropanol : alcool isopropylique, propan-2-ol ou IsoPropyl-Alcohol (en anglais)
- Protéinase K : la concentration utilisée est de [20 mg/ml], dissoute dans une solution de Tris-HCl 10 mM, pH 8 et 0.5 mM de CaCl<sub>2</sub>
- Lysozyme : la concentration utilisée est de [50 mg/ml]
- RNase A : la concentration utilisée [10 mg/ml] (Sigma R6513)

## 6.2. L'extraction de l'ADN total des bactéries

Après une culture d'environ 12 h, les cellules de la souche étudiée sont culottées à l'aide d'une centrifugation à 10 000 g pendant 20 min à 4°C. Le culot est ensuite resuspendu dans un volume de 700 µl de TNE et la suspension est transférée dans un tube Eppendorf. A ceci sont ajoutés 20 µl de lysozyme et la solution est laissée incuber à température ambiante pendant 15 min. Un volume de 100 µl de SDS (à 10 %) et 100 µl de Sarkosyl (à 10 %) sont ajoutés à cette solution. Le tube est immédiatement inversé pour homogénéiser la solution. Ensuite, 50 µl de protéinase K sont ajoutés et la réaction de digestion protéique se fait à 55°C pendant 60 min. Après digestion, 1 volume de PCI (970 µl) est ajouté à la solution et le tout est homogénéisé par agitation. Le tube est alors centrifugé à 14 000 rpm, pendant 15 min à 4°C. Deux phases sont alors visibles : la phase inférieure, organique (composée de la solution de phénol) et la phase supérieure, aqueuse (comportant l'ADN). Entre les deux phases peut être observé un agrégat protéique. Ainsi, 850 µl de la phase aqueuse du tube sont récupérés et transférés dans un nouveau tube et à celle-ci est ajouté un volume égal de chloroforme. Le tube est centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 min à 4°C. Deux fractions sont de nouveau visibles et 750 µl de la fraction supérieure sont récoltés dans un nouveau tube. Un volume de 525 µl d'isopropanol (l'équivalent de 0.7 de volume de la fraction récupérée) est ensuite ajoutée au tube et celui-ci est placé à -20°C pendant 60 min afin que l'ADN précipite. Après incubation, le tube est centrifugé à 14 000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le culot, comprenant de l'ADN, est resuspendu et lavé dans 500 µl d'éthanol à 70 % froid. Le tube est ensuite recentrifugé à 14 000 rpm pendant 5 min à 4°C et le culot d'ADN est séché au SpeedVac® (Thermo scientific) pour éliminer les traces d'éthanol.

Le culot est repris dans 100 µl d'une solution TE à 4°C et laissé se resuspendre pendant 12h. La solution resuspendue est traitée à la RNase A à raison de 1 µl à 37°C pendant 1h. L'ADN peut être conservé à 4°C ou à -20°C pour une plus longue durée.

## 6.3. Extraction ADN circulaire fermé de manière covalente (ou ADNccc)

Ce protocole est basé sur la technique de lyse alcaline (Birnboim & Doly, 1979).

Un volume de 100 ml de culture incubé pendant 12h est nécessaire pour cette extraction. La culture est centrifugée à 10 000 g pendant 20 min à 4°C. Le culot bactérien est ensuite resuspendu dans 600 µl d'une solution de TNE froide. Les cellules sont ensuite lysées avec 600 µl de solution de lyse (composée d'une solution à base d'eau MilliQ avec une concentration de 0.2 N de NaOH et 1 % de SDS) et préparée le jour même. Après homogénéisation de la solution, la lyse est arrêtée en y ajoutant 700 µl d'une solution de neutralisation (eau MilliQ avec une concentration de 3 M d'acétate de potassium à pH 4.8 ajusté avec de l'acide acétique glacial). Après homogénéisation, le mélange est centrifugé à

20817 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est ensuite réparti dans deux tubes Eppendorf de 2 ml à raison de 850 µl par tube.

De manière similaire à celle du protocole d'extraction d'ADN total, au 850 µl de surnageant, comportant l'ADNccc, est ajouté un volume égal de PCI. Après agitation, les tubes sont centrifugés à 20817 g, pendant 15 min à 4°C. Ensuite, 750 µl de la phase supérieure de chaque tube sont récupérés et à ces 750 µl est ajouté un volume égal de chloroforme dans deux nouveaux tubes. Les tubes sont centrifugés à 20817 g pendant 5 min à 4°C. Un volume de 650 µl de la fraction supérieure de chaque tube est récolté dans deux nouveaux tubes. Ensuite, un volume de 455 µl d'isopropanol est ajoutée aux tubes et ceux-ci sont mis à -20°C pendant 1 h afin que l'ADNccc précipite. Après incubation, les tubes sont centrifugés à 20817 g pendant 20 min à 4°C. Les culots, de l'ADNccc, sont resuspendus et lavés dans 500 µl d'éthanol à 70 % froid. Les tubes sont recentrifugés à 20817 g pendant 5 min à 4°C et les culots sont séchés au SpeedVac® (Thermo scientific).

Les culots séchés sont repris dans 30 µl de solution de TE et laissés à 4°C pendant 12 h, afin que ceux-ci se resuspendent. Les solutions sont ensuite traitées à la RNase A à raison de 1 µl à 37°C pendant 1 h afin d'éliminer les traces d'ARN abondante dans ces préparations. Les solutions d'ADNccc sont finalement réunies et conservées à 4°C.

#### **6.4.L'extraction de l'ADN viral**

Le protocole d'extraction d'ADN viral est inspiré du protocole de Smeesters et collaborateurs (Smeesters *et al.*, 2011).

La fraction virale récupérée du gradient à l'aide d'une micropipette est tout d'abord dialysée pendant trois heures sur un filtre de porosité 0.02 µm (Millipore) contre 100 ml de diluent λ. La fraction dialysée généralement d'un volume de 200 µl est ensuite traitée à la TurboDNase (Invitrogen™) en l'incubant à 37°C en présence de 1 µl de DNase [2U/µl] afin d'éliminer toutes traces d'ADN chromosomique libre dans la fraction virale. Après incubation, sont ajoutés 50 µl d'EDTA (à 1 M) et 50 µl de SDS (à 5 %). Ensuite, 15 µl de protéinase K sont ajoutés et le tout est incubé à 55°C pendant 60 min. Le volume de la solution est ensuite ajusté à 500 µl avec du diluent λ. Un volume équivalent de PCI y est ajouté, le tout est homogénéisé par agitation. Les tubes sont ensuite centrifugés à 20817 g, pendant 15 min à 4°C. Ensuite, 450 µl de la phase aqueuse supérieuresont récupérés et à ceux-ci est ajouté un volume égal de chloroforme dans un nouveau tube. Le tube est centrifugé à 20817 g pendant 5 min à 4°C. Un volume de 400 µl de la fraction supérieure obtenue est transféré dans un nouveau tube. Ensuite, un volume de 93 µl d'acétate d'ammonium (à 3 M), ainsi que 350 µl d'isopropanol, sont ajoutés au tube. Celui-ci est placé à -20°C pendant 60 min pour permettre à l'ADN viral de mieux précipiter. Après incubation, le tube est centrifugé à 20817 g pendant 20 min à 4°C. Le culot d'ADN obtenu est lavé avec

500 µl d'éthanol à 70 % froid. Le tube est recentrifugé à 20817 g pendant 5 min à 4°C et le culot d'ADN est séché au SpeedVac® (Thermo scientific).

Le culot séché est repris dans 30 µl de solution TE et laissé se resuspendre à 4°C pendant 12 h. L'ADN viral est traité à la RNase A à raison de 1 µl à 37°C pendant 60 min. L'ADN est conservé à 4°C.

### **6.5. Les digestions enzymatiques de l'ADNccc et de l'ADN viral**

Afin de déterminer la taille approximative de l'ADNccc ou de l'ADN viral, des analyses de profils de restriction sont réalisées. Généralement, le volume de la réaction est de 20 µl. Ce mélange réactionnel comprend :

- 15.0 µl d'ADNccc ou viral d'une concentration minimale de [20 ng/µl]
- 2.0 µl de tampon de réaction (concentré 10 fois)
- 1.5 µl d'enzyme de restriction (à concentration de 10U/µl)
- 1.5 µl d'eau MilliQ stérile

Les enzymes de restriction utilisées pour les digestions sont HindIII, EcoRI, et MboI (fournies par Promega). Toutes les réactions de digestions sont effectuées à 37° pendant 240 min.

### **6.6. L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S par PCR**

La réaction de PCR du gène codant pour l'ARNr 16S est effectuée sur un volume de 25 µl et comprend :

- 17.38 µl de H<sub>2</sub>O (MilliQ)
- 2.5 µl de tampon [10x]
- 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub> [25 mM]
- 0.5 µl de dNTP [40 mM]
- 1.0 µl d'Amorce forward [10 mM]
- 1.0 µl d'Amorce reverse [10 mM]
- 0.12 µl de Taq « Go » [5U/µl]
- 1 µl d'ADN génomique (concentration minimale de 20 ng/µl)

Pour l'amplification de la séquence codant pour les ARNr 16S des bactéries et des archées, deux couples d'amorces différents sont utilisés avec deux programmes différents, respectivement.

Les amorces employées pour l'amplification de la séquence d'ADNr 16S bactérien sont l'amorce 8F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') et l'amorce 1492RU (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'). Pour l'amplification, le programme PCR suivant a été réalisé :

95°C	300 s	
95°C	30 s	}
57°C	30 s	
72°C	90 s	
72°C	480 s	
4°C	∞	

L'accolade indique les températures et les temps qui définissent un cycle. Pour l'amplification, 25 cycles sont effectués.

Les amorces employées pour l'amplification de la séquence d'ADNr 16S archéen sont l'amorce 4F (5'-TCC GGT TGAT CCT GCC RG-3') et l'amorce 1492RU (5'-CGG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3'). Pour l'amplification, le programme PCR suivant a été réalisé :

95°C	300 s	
95°C	30 s	}
57°C	30 s	
72°C	90 s	
72°C	480 s	
4°C	∞	

L'accolade indique les températures et les temps qui définissent un cycle. Pour l'amplification, 30 cycles sont effectués.

## 6.7. Préparation de gel d'agarose et électrophorèse

La visualisation d'ADN par électrophorèse est effectuée sur gel d'agarose à 1 %, contenant du bromure d'éthidium à 0.5 µg/ ml, dans un bain de TAE [1x]. La migration est réalisée à 80 kv, 400 mA pendant 1 h. Le gel est ensuite révélé sous UV. Les marqueurs de taille utilisés sont le « Smart Ladder » d'Eurogentec (à raison de 5 µl) allant jusqu'à 10 kb et le « λ Hind III DNA Ladder » de Sigma-Aldrich® (à raison de 0.5 µl), allant jusqu'à 23 kb.

## 7. L'analyse du génome du virus GTV1

Le génome de la souche *G. thermoleovorans* SP4 SD a été séquencé *de novo* selon la technologie GS-FLX (Roche) complétée par un séquençage sur HiSeq 2000 (Illumina). Le séquençage a abouti à l'obtention d'une banque de 354 contigs couvrant à priori l'intégralité du génome bactérien. Ces séquences ont été annotées dans un premier temps à l'aide du serveur RAST « Rapid Annotation using Subsystem Technology » et du logiciel d'analyse SEED (Aziz *et al.*, 2008; Aziz *et al.*, 2012), afin de repérer la présence de gènes d'origine virale. Dans une seconde étape, une réannotation plus fine a été effectuée sur certains contigs à l'aide de Phage SEED (Overbeek *et al.*, 2004; Overbeek *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2008; Disz *et al.*, 2010). L'identification des cadres ouverts de lecture (ORF) a été faite par une approche heuristique (GeneMark Heuristic). Chaque séquence codante (CDS) prédite a ensuite été comparée dans les bases de données NCBI à l'aide du logiciel BLAST (Blastx) (Altschul *et al.*, 1990). Des fonctions putatives ont été retenues pour chaque séquence en utilisant une valeur seuil d'E-value de  $10^{-5}$ . En parallèle, ces séquences ont également été comparées à celles référencées dans la base de données Pfam (Finn *et al.*, 2010).





# Résultats et Discussion :

## 1. L'abondance des Microorganismes

Jusqu'à présent, aucune étude n'a encore été faite sur l'abondance microbienne et virale des sources hydrothermales des TAAF. Ainsi, nous avons été confrontés au choix de la méthode à utiliser pour le dénombrement viral. Les techniques indirectes de dénombrement, peu adaptées à la microbiologie environnementale, n'ont pas été explorées. Les techniques directes, la microscopie électronique à transmission (MET), la microscopie à épifluorescence (ME) et la cytométrie en flux (CMF) ont donc été privilégiées.

Afin d'avoir une estimation d'abondance se rapprochant le plus de la réalité, nous avons décidé d'explorer chacune des trois méthodes de dénombrement, permettant à la fois de trouver celle qui fournirait les résultats les plus fiables. Pour ceci, trois collaborations ont été mise en place, afin de compléter les pratiques utilisées au laboratoire : une au « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement » (UMR CNRS 6023) avec le Dr. Sime-Ngando et le Dr. Colombet ; une au « Laboratoire de Microbiologie Marine » à Bergen, Norvège, avec le Dr. Bratbak, le Dr. Haldal et le Dr. Ray et enfin avec la « Station d'Hydrobiologie Lacustre, Equipe BioFEEL » (INRA/UMR CARTELL) avec le Dr. Jacquet.

### 1.1. Les analyses préliminaires d'abondance microbienne et virale

#### 1.1.1. Les analyses préliminaires par microscopie à épifluorescence

Les analyses de différents échantillons par ME ont été faites en deux temps : en premier lieu, des échantillons des différentes sources ont été observés en ME afin d'établir une liste de sources potentiellement dénombrables. Ce travail a permis de ne retenir que quelques sources sur lesquelles des analyses détaillées ont été effectuées.

Pour les analyses préliminaires, des gammes de dilution ont été faites. De manière peut être surprenante, la dilution 10x semblait être adaptée à pratiquement la totalité des échantillons de tout type. Les échantillons non dilués contenaient souvent des agrégats importants ou des « matrices », de nature inconnue, noyant la fluorescence de manière à ne pas pouvoir distinguer de particules séparées et empêchant ainsi tout dénombrement (Figure 29). Surtout, les tentatives de dénombrement ne concordaient pas avec les données

obtenues à une dilution de 10 x. Toutes les dilutions au-delà de 10 x se sont avérées non adaptées au dénombrement en raison de concentrations trop faibles.

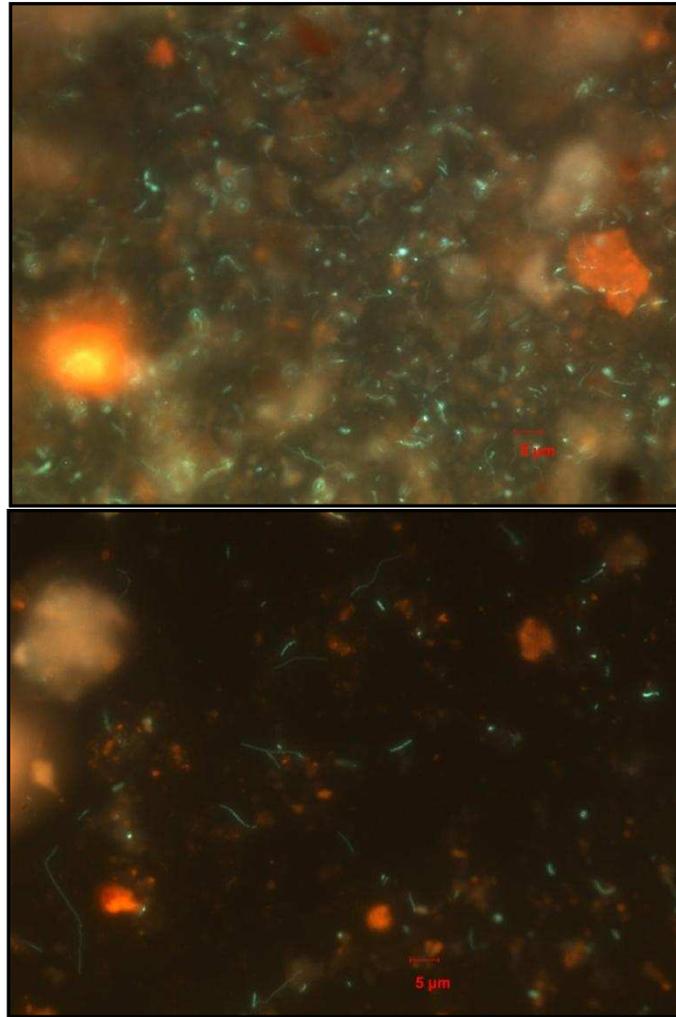


Figure 29. Deux photos prises en ME sur des échantillons de la source VT<sub>3</sub> de Val Travers. La photographie du haut représente un échantillon non dilué de VT<sub>3</sub> et la photographie du bas représente le même échantillon dilué 10x. Dans les deux photos, des microorganismes fluorescents peuvent être observés, ces derniers étant plus facilement quantifiables dans la photographie du bas.

Toutefois, si la dilution de 10x nous a permis de dénombrer des procaryotes et des VLP dans les échantillons bruts, elle n'était pas idéale pour suivre les standards imposés par le protocole de Patel et collaborateur (Patel *et al.*, 2007). Selon ces derniers, un nombre minimum de 200 particules (virales ou de cellules procaryotiques) doit être compté sur un minimum de 10 champs. Le cas échéant, le nombre de champs doit être augmenté de manière à atteindre au moins 200 particules. Pour nos échantillons, ce standard a été respecté pour les particules virales, mais n'a pas toujours pu être appliqué aux cellules procaryotiques. Cependant, une observation d'une quarantaine de champs a été respectée. Au-delà, la perte progressive du signal, augmentant graduellement avec le temps, rendait tout comptage aléatoire.

Quelles que soient la nature ou la provenance des échantillons, les analyses préliminaires ont permis d'établir que l'abondance virale et microbienne est faible quand celle-ci est détectable. Cette abondance avoisine les  $10^4$  à  $10^5$  particules/ml dans les sources de Rallier du Baty. La valeur du VPR présente des différences selon les sources, avec des valeurs inférieures à 1 pour certaines et pouvant atteindre jusqu'à 150 pour d'autres. Pour les sources de Val Travers et de Saint Paul, les valeurs d'abondance oscillent entre  $10^4$  et  $10^6$  particules/ml. Les valeurs de VPR associées sont quant à elles comprises entre 0 et 7, avec une majorité de valeurs proches de 0.

Si l'on se réfère aux résultats préliminaires, aucun lien de causalité ne peut être entrevu entre les paramètres physico-chimiques (pH, température, salinité) des sources hydrothermales et l'abondance microbienne et virale qui y est mesurée. En effet, une abondance microbienne et virale faible et peu variable peut être constatée dans toutes les sources étudiées, malgré la variabilité des paramètres physico-chimiques de ces dernières (les sources du Rallier de Baty étant très chaudes et acides, celles de Val Travers chaudes et alcalines et celles de Saint Paul chaudes et de pH neutre).

Ces données préliminaires suggèrent globalement deux tendances : une abondance microbienne et virale généralement faible dans les sources hydrothermales des TAAF, ce qui est cohérent avec les données de la littérature sur les sources hydrothermales, et une variabilité relative dans les abondances des microorganismes et des particules virales au sein des sources chaudes d'un même site, qui ne semble pas directement dépendante des facteurs température, salinité et pH.

### 1.1.2. Les analyses préliminaires par cytométrie en flux

Une série d'échantillons a pu être analysée au cytomètre en flux au « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement » de Clermont-Ferrand. La majorité des échantillons contenait peu de microorganismes et de particules virales identifiables. Une partie des échantillons ne présentait que du bruit de fond, identifiable par son positionnement et sa densité sur les diagrammes à deux dimensions (FL1 vs SSC). Dans beaucoup d'échantillons, la présence de particules virales était probable, mais noyée dans un bruit fond et donc constituait des populations difficilement discernables. Les tentatives de dénombrement étaient, de ce fait, très subjectives.

Au « Laboratoire de Microbiologie Marine » à Bergen, Norvège, une série d'échantillons a pu être analysée dans un contexte de comparaison de méthodes de dénombrement. Les résultats des échantillons examinés au cytomètre de flux ont conduit à des conclusions générales similaires à celles faites au « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement ». Une manipulation supplémentaire a cependant été effectuée. Une culture pure du virus PAV<sub>1</sub> de *Pyrococcus abyssi*, préparée au laboratoire, fixée au

glutaraldéhyde et ensuite conservée à  $-80^{\circ}\text{C}$ , a été également examinée. Le virus PAV<sub>1</sub> est un virus fusiforme constitué d'une capsid de 120 nm x 80 nm, enfermant un génome composé d'ADN double brin circulaire de 18 kb (Geslin *et al.*, 2003a). Il n'existe pas, à ma connaissance, d'études faites sur la détection des virus fusiformes (ni, à ce titre, sur des virus extrémophiles) à l'aide d'un cytomètre en flux. De ce fait, nous ne disposons pas de repères pour la détection de ce virus. Nous n'avons pas réussi à identifier de zones peuplées clairement par le virus recherché sur les cytogrammes. Des cellules hôtes du virus *P. abyssi*, en revanche, ont pu être devinées.

En général, la position des virus sur les cytogrammes est située près de l'origine des deux axes, en raison de leur petite taille et de leur faible fluorescence. Toutefois, bien que différentes populations virales puissent être identifiées et discriminées l'une de l'autre, leur positionnement relatif sur le cytogramme n'est pas dépendant de la taille de leur génome ni de leur morphologie (Brussaard *et al.*, 2000). De ce fait, dans notre expérience la position de PAV<sub>1</sub> n'a pu ni être formellement prédite ni identifiée. L'hôte de PAV<sub>1</sub> étant cultivé en présence de soufre, il n'est pas impossible que ce dernier ait interféré avec les analyses. Un autre point peut être également avancé : lors de la préparation des échantillons pour analyse par cytométrie, les virus subissent un traitement à la chaleur ( $80^{\circ}\text{C}$ ) pendant 10 min, ce qui permet d'augmenter la perméabilisation des capsides, facilitant ainsi la fixation du fluorochrome au génome viral. PAV<sub>1</sub> étant un virus hyperthermophile, il n'est pas impossible que ce traitement soit moins efficace pour ce type de virus que pour les virus mésophiles. Par extension, cette remarque est également valable pour les VLP des sources hydrothermales, qui sont plus résistantes au stress thermique que leurs équivalents mésophiles.

Ainsi, les analyses préliminaires ont pu confirmer la faible abondance virale et microbienne globale déjà constatée en épifluorescence. Elles ont néanmoins révélé une abondance globalement plus élevée dans les sources côtières que dans les autres sources hydrothermales des TAAF.

## **1.2. Les analyses sur les échantillons de la campagne 2011**

Lors de la campagne de terrain 2011, deux types de source hydrothermale ont pu être échantillonnés : trois sources terrestres alcalines, celles de Val Travers à Kerguelen, et deux sources côtières de pH neutre à Saint Paul. Eu égard aux analyses préliminaires, nous avons pu effectuer des analyses d'abondance plus approfondies sur celles-ci. Concernant les sources marines de Saint Paul, trois points ont été échantillonnés en fonction du gradient de température ( $70^{\circ}\text{C}$ ;  $31^{\circ}\text{C}$ ;  $16^{\circ}\text{C}$  pour SP1 et  $80^{\circ}\text{C}$ ;  $35^{\circ}\text{C}$ ;  $15^{\circ}\text{C}$  pour SP2), le long d'un transect partant du cœur des sources dans le but d'étudier l'abondance microbienne et virale en fonction notamment de la température.

La stratégie adoptée pour le dénombrement microbien et viral des échantillons a été de coupler les deux méthodes directes, la microscopie à épifluorescence et la cytométrie en flux.

### 1.2.1. Cas des sources côtières de Saint Paul

#### *Les transects des sources SP1 et SP2*

Les sources SP1 et SP2 sont situées à environ 6 m de profondeur dans le cratère de Saint Paul. Les eaux des sources se mélangent donc avec la colonne d'eau de mer tempérée à leur sortie. Les transects sont donc composés d'eau hydrothermale pour les échantillons dénommés « SP1 I » et « SP2 I » d'eau de mer pour les échantillons « SP1 III » et « SP2 III », et enfin les échantillons « SP1 II » et « SP2 II » résultent d'un mélange d'eau de source et d'eau de mer.

Les résultats du dénombrement microbien et viral des transects des sources SP1 et SP2 sont présentés dans le Tableau 14 et sous forme de graphiques (Figure 30 et 31).

Méthode		ME	CMF	ME	CMF
Année	Site	Taux de procaryotes (x 10 <sup>5</sup> cellules/ml)	Taux de procaryotes (x 10 <sup>5</sup> cellules/ml)	Taux de VLP (x 10 <sup>5</sup> particules/ml)	Taux de VLP (x 10 <sup>5</sup> particules/ml)
2011	SP1 I	8.50 (± 1.75)	3.62 (± 0.19)	9.76 (± 1.62)	2.95 (± 0.32)
2011	SP1 II	4.04 (± 0.66)	8.37 (± 0.53)	8.79 (± 2.6)	11.21 (± 1.7)
2011	SP1 III	11.56 (± 0.93)	16.89 (± 0.65)	75.21 (± 4.03)	46.93 (± 3.34)
2011	SP2 I	17.59 (± 0.85)	15.58 (± 0.74)	70.7 (± 0.85)	61.76 (± 4.92)
2011	SP2 II	6.93 (± 0.46)	8.38 (± 0.43)	31.55 (± 0.46)	24.4 (± 1.41)
2011	SP2 III	12.92 (± 0.97)	18.61 (± 3.03)	56.09 (± 0.97)	34.32 (± 8.4)

Méthode		ME	CMF
Année	Site	VLP-to-Prokaryote Ratio	VLP-to-Prokaryote Ratio
2011	SP1 I	1.15 (± 0.22)	0.82 (± 0.09)
2011	SP1 II	2.18 (± 0.84)	1.34 (± 0.2)
2011	SP1 III	6.51 (± 0.9)	2.78 (± 0.09)
2011	SP2 I	4.02 (± 0.21)	3.97 (± 0.25)
2011	SP2 II	4.55 (± 0.1)	2.91 (± 0.06)
2011	SP2 III	4.34 (± 0.13)	1.84 (± 0.18)

Tableau 14. Tableau récapitulatif des données d'abondance microbienne et virale des transects SP1 et SP2. SP1 I = 70°C ; SP1 II = 31°C ; SP1 III = 16°C SP2 I = 80°C ; SP2 II = 35°C ; SP2 III = 15°C. ME= microscopie à épifluorescence ; CMF =cytométrie en flux.

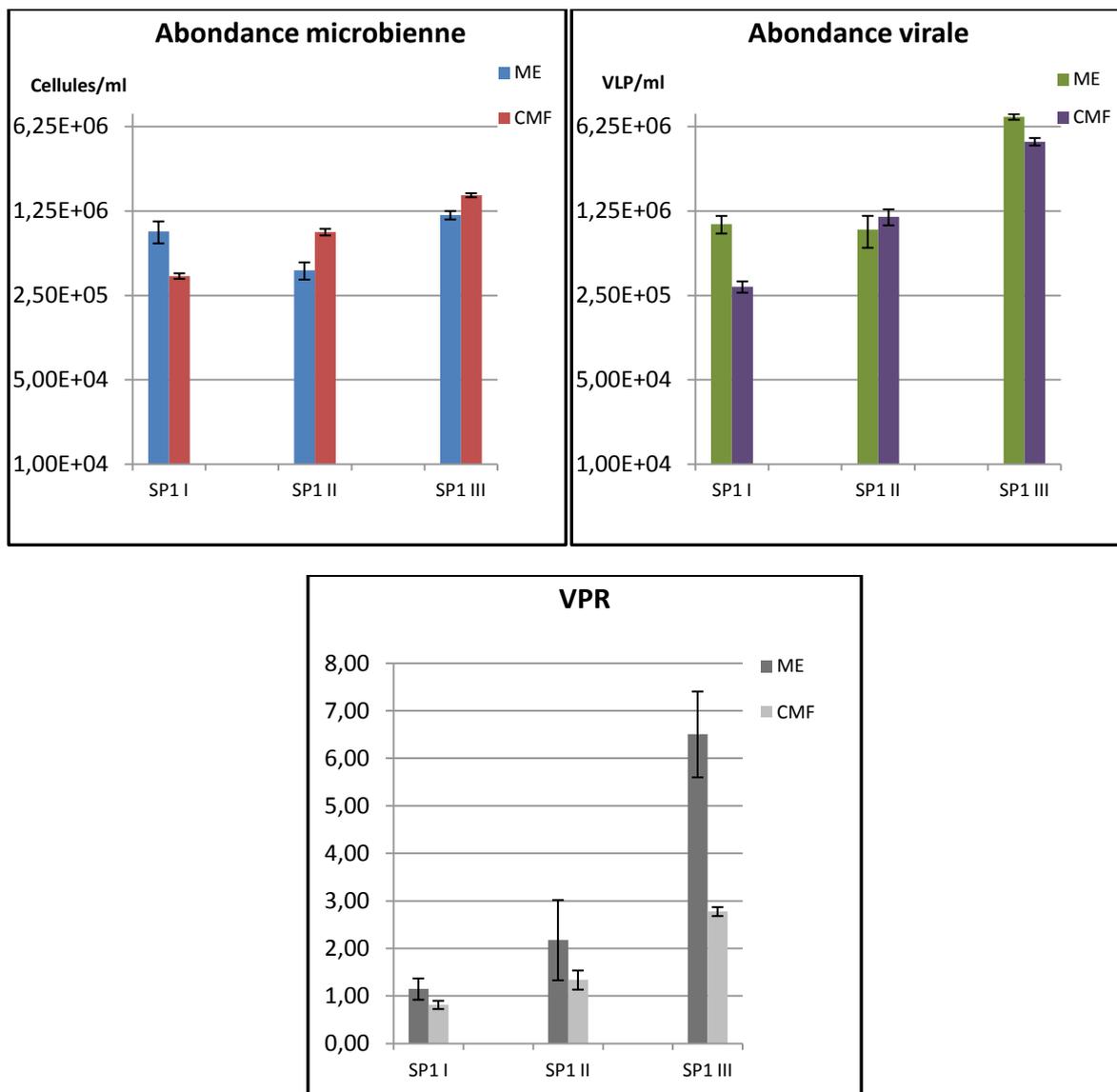


Figure 30. Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviation standard, dans les échantillons du transect fait à la source SP1. La température des échantillons varie le long du transect : SP1 I = 70°C ; SP1 II = 31°C ; SP1 III = 16°C. ME= microscopie à épifluorescence ; CMF=cytométrie en flux ; VLP= Virus-like particle ; VPR= rapport VLP/procaryotes.

L'abondance microbienne est comprise entre  $3.6 (\pm 0.2)$  et  $8.5 (\pm 1.7) \times 10^5$  cellules/ml au cœur de la source SP1 I, entre  $4.0 (\pm 0.7)$  et  $8.4 (\pm 0.5) \times 10^5$  cellules/ml au point SP1 II et entre  $1.2 (\pm 0.1)$  et  $1.7 (\pm 0.1) \times 10^6$  cellules/ml au point SP1 III. La concentration de cellules est donc de l'ordre de  $10^5$  cellules/ml dans le cœur de la source et une concentration de moins d'un ordre de grandeur plus élevé peut être constatée dans les eaux tempérées environnantes. Ainsi, une augmentation de la concentration microbienne, en s'éloignant du cœur de la source et suivant un gradient décroissant de température, peut être notée.

Le taux de VLP se situe entre  $2.9 (\pm 0.3)$  et  $9.8 (\pm 1.6) \times 10^5$  VLP/ml au cœur de la source SP1 I, entre  $0.9 (\pm 0.3)$  et  $1.1 (\pm 1.7) \times 10^6$  VLP/ml au point SP1 II et entre  $4.7 (\pm 0.0)$  et  $7.5 (\pm 0.0) \times 10^6$  VLP/ml au point SP1 III. Le taux de VLP augmente de manière plus importante que la concentration en cellules de procaryote en s'éloignant du cœur de la source. Si une tendance de l'augmentation de la concentration microbienne et virale peut être notée, elle demeure cependant peu importante.

De manière intéressante, le rapport VLP/procaryotes augmente également le long du transect en s'éloignant de la source hydrothermale. Le rapport est de  $0.8 (\pm 0.1) - 1.1 (\pm 0.2)$  pour la source hydrothermale même SP1 I, augmente à  $1.3 (\pm 0.2) - 2.2 (\pm 0.8)$  au point SP1 II et est de l'ordre de  $2.8 (\pm 0.0) - 6.5 (\pm 1.0)$  dans les eaux environnantes, à SP1 III.

Pour la source SP2 I, l'abondance microbienne est comprise entre  $1.6 (\pm 0.1)$  et  $1.8 (\pm 0.1) \times 10^6$  cellules/ml. Elle est comprise entre  $6.9 (\pm 0.5)$  et  $8.4 (\pm 0.4) \times 10^5$  cellules/ml au point SP1 II et entre  $1.3 (\pm 0.1)$  et  $1.9 (\pm 0.3) \times 10^6$  cellules/ml à SP1 III. La concentration en cellules procaryotiques est de l'ordre de  $10^6$  cellules/ml au cœur de la source chaude, partageant approximativement la même valeur que celle des eaux environnantes. Elle atteint une valeur légèrement plus faible au point intermédiaire SP2 II. Les données suggèrent que la concentration globale en procaryotes demeure similaire dans les trois points du transect, sans détecter d'augmentation ou de diminution de la concentration en fonction du déplacement dans celui-ci. La concentration de VLP se situe entre  $6.2 (\pm 0.5)$  et  $7.1 (\pm 0.1) \times 10^6$  VLP/ml pour la source SP2 I, entre  $2.4 (\pm 0.1)$  et  $3.1 (\pm 0.0) \times 10^6$  VLP/ml au site SP2 II et entre  $3.4 (\pm 0.1)$  et  $5.6 (\pm 0.1) \times 10^6$  VLP/ml pour le point éloigné SP2 III. Le taux de VLP demeure de l'ordre de  $10^6$  particules/ml, diminuant sensiblement en s'éloignant du cœur de la source. De manière similaire à la concentration microbienne, l'abondance de VLP semble le plus faible à la source intermédiaire SP2 II. Globalement, la concentration semble peu varier, diminuant cependant légèrement en se déplaçant sur le transect du cœur vers les eaux tempérées environnantes.

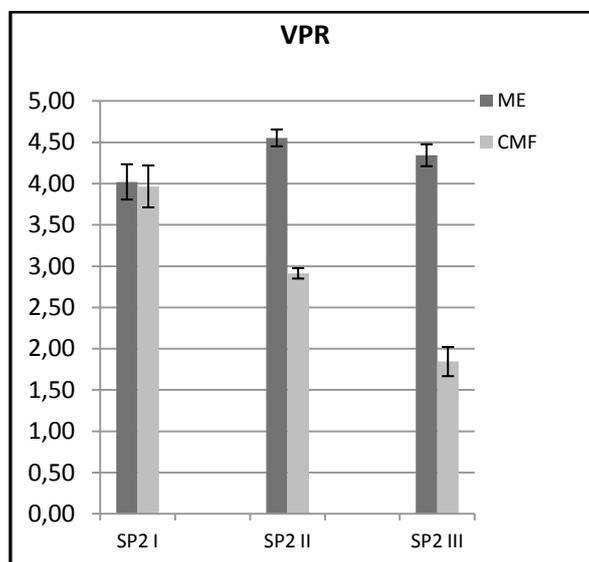
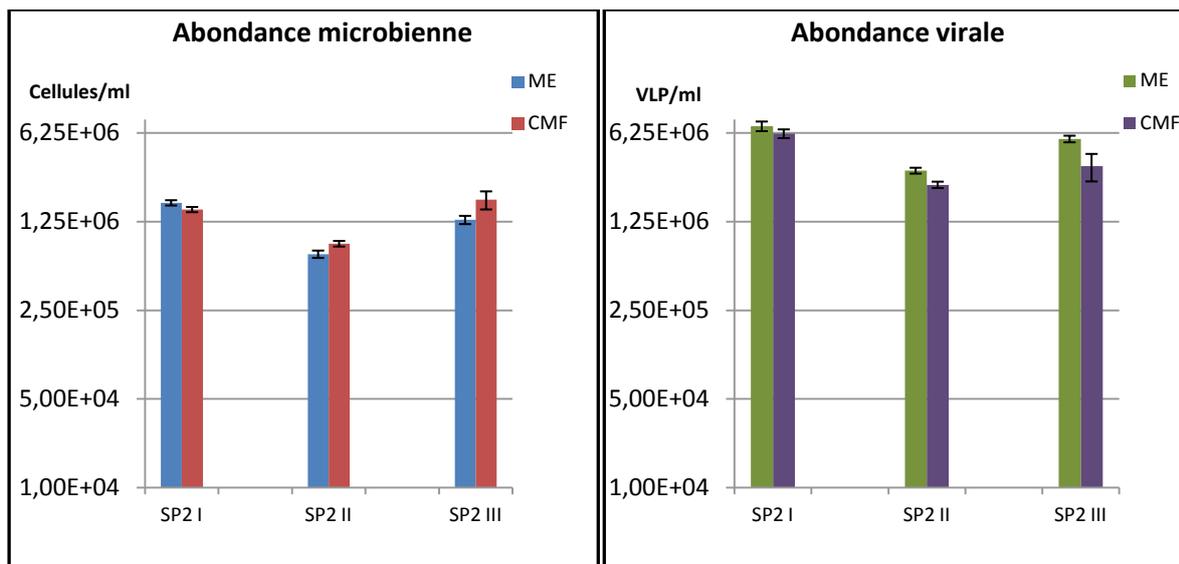


Figure 31. Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviation standard, dans les échantillons du transect fait à la source SP2. La température des échantillons varie le long du transect : SP2 I = 80°C ; SP2 II = 35°C ; SP2 III = 15°C. ME= microscopie à épifluorescence ; CMF =cytométrie en flux ; VLP= Virus-like particle ; VPR= rapport VLP/procaryotes.

Le rapport VLP/procaryotes est de 4.0 (± 0.2) pour la source hydrothermale même SP2 I, augmente à 2.9 (± 0.1) - 4.5 (± 0.1) au site SP2 II et est de l'ordre de 1.8 (± 0.2) - 4.3 (± 0.1) dans l'eau de mer, à SP2 III. La valeur reste relativement stable sur le transect.

Ainsi, les deux sources hydrothermales côtières de Saint Paul sont caractérisées par des abondances microbienne et virale qui oscillent entre  $10^5$  et  $10^6$  particules/ml. L'abondance des populations microbiennes et virales semble être plus élevée dans la source SP2 I que dans SP1 I. Le rapport VLP/procaryotes est en moyenne de 2.5 pour les deux

sources, mais il est à noter que le ratio VPR est quatre fois plus élevé dans la source SP2 I que dans la source SP1 I, 4.0 contre 1.0 respectivement. Peu de différences peuvent être constatées entre l'abondance microbienne et virale des points intermédiaires des transects, SP1 II et SP2 II. Le VPR est, cependant, deux fois plus élevé dans SP2 II que dans SP1 II, atteignant des valeurs moyennes de 3.7 contre 1.8, respectivement. Les données d'abondance de cellules procaryotes et de VLP fluctuent peu entre SP1 III et SP2 III, avec un VPR qui oscille en moyenne entre 3.1 et 4.6. Ceci semble peu surprenant, et caractérise le milieu marin dans lequel se trouvent les sources chaudes bien que celles-ci soient éloignées l'une de l'autre d'environ un kilomètre.

Globalement, aucune tendance claire ne peut être tirée des variations d'abondance microbienne et virale le long des transects, qui ne présentent pourtant pas de variations similaires. Cependant, il est surprenant d'observer une variation aussi faible entre les abondances microbienne et virale des sources hydrothermales et celles des eaux côtières.

De manière générale, les sources hydrothermales sont caractérisées par une abondance microbienne de l'ordre de  $10^5$  cellules/ml avec une variation d'un ordre de grandeur. Le taux de VLP/ml est quant à lui globalement similaire à celui de l'abondance microbienne, les VPR étant souvent inférieurs à 5.0 donc relativement faibles (se référer au Tableau 2 p. 57 de l'Introduction). Ainsi, l'abondance microbienne et virale des sources hydrothermales SP1 I et SP2 I se situent bien dans la gamme d'abondance microbienne et virale des sources hydrothermales, avec toutefois des valeurs légèrement plus élevées que la moyenne (étant plutôt de l'ordre de  $10^6$  cellules et particules/ml). Les VPR sont situés entre 1 et 4, ce qui se rapproche également des autres systèmes hydrothermaux marins étudiés.

Les systèmes côtiers tempérés abritent la plus forte concentration de particules virales des systèmes marins avec des taux compris habituellement entre  $10^6 - 10^7$  particules/ml, ce taux diminuant à  $10^5 - 10^6$  particules/ml dans les eaux de surface de l'océan (Paul & Kellogg, 2000). Dans les systèmes pélagiques, le VPR est oscille globalement entre 3 et 10 (Weinbauer, 2004). L'eau de mer du cratère de Saint Paul contient des concentrations microbienne et virale légèrement plus importantes que les sources hydrothermales, qui correspondent aux valeurs basses observées dans les écosystèmes côtiers. Le ratio VPR demeure cependant faible, puisque compris entre 1 et 6.

Dans l'étude menée par Manini et collaborateurs (Manini *et al.*, 2008) sur la diversité des procaryotes et l'abondance virale dans les sources hydrothermales côtières de l'île Panarea et de Sulawesi, les auteurs ont dénombré entre  $1.1$  et  $2.0 \times 10^5$  cellules procaryotiques/ml, le nombre maximal correspondant à un échantillon contrôle d'eau environnante. Le taux de particules virales était compris entre  $1.9$  et  $8.8 \times 10^5$  particules/ml, le nombre maximal correspondant à nouveau à celui du contrôle. Les VPR oscillaient entre

1.0 et 5.4, le chiffre le plus important ayant été noté dans l'échantillon contrôle. Les résultats que nous obtenons sur Saint Paul s'apparentent assez bien à ceux de cette étude, malgré le taux d'un ordre de grandeur plus faible comparativement à l'étude de Manini et collaborateurs. Comme dans le transect de la source SP1 de Saint Paul, les sources de Panarea semblent contenir des concentrations virales qui croissent en fonction de la distance par rapport au cœur de la source. Les auteurs ont également noté que ceci ne se vérifiait pas pour les sources de Sulawesi, ce qui est tout à fait le cas de la source SP2. Le rapport entre les VLP et les cellules procaryotiques est relativement faible dans ces sources et ne semble pas être plus élevé dans le contrôle. En se basant sur des concentrations virales plus faibles que celles typiquement observées dans les systèmes côtiers, ainsi que sur les faibles nombres de VPR, Manini et collaborateurs proposent une hypothèse selon laquelle les virus seraient moins tolérants à la chaleur que les procaryotes (Manini *et al.*, 2008).

Un des avantages du cytomètre en flux réside dans la possibilité de discerner des populations cellulaires et virales différentes. Parmi les populations microbiennes qui ont pu être détectées sur les transects des sources SP1 et SP2, nous trouvons trois populations phytoplanctoniques, dont une population picoplanctonique riche en phycoérythrine du type *Synechococcus spp.*. Les *Synechococcus* sont des cyanobactéries ubiquitaires présentes dans tous les écosystèmes marins à des concentrations comprises entre  $5.0 \times 10^2$  et  $1.5 \times 10^6$  cellules/ml (Partensky *et al.*, 1999). En revanche, les *Synechococcus* thermophiles peuplent les sources hydrothermales terrestres généralement alcalines, allant jusqu'à des températures de 75°C (Klatt *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2012). Cependant, quelques études suggèrent la présence de cyanobactéries thermophiles marines, trouvées à proximité de sources hydrothermales côtières (Tarasov *et al.*, 1999; Tarasov *et al.*, 2005; Tarasov, 2006), dont celles de Panarea (Maugeri *et al.*, 2013). Des populations de picocyanobactéries sont observées à raison de  $1.2 \times 10^4$  cellules/ml dans la source SP1 I, cette concentration augmentant le long du transect à  $7.1 \times 10^4$  cellules/ml dans l'échantillon SP1 III. Parallèlement, la concentration en picocyanobactéries est de  $6.5 \times 10^4$  cellules/ml dans la source SP2 I et de  $7.8 \times 10^4$  cellules/ml dans l'échantillon SP2 II, mais présente une chute de concentration au point SP2 II comparable à celle de la composante cellulaire procaryotiques (hétérotrophes) et virale. L'abondance phytoplanctonique globale, comprenant les trois populations phytoplanctoniques, varie entre  $1.3 \times 10^4$  et  $1.0 \times 10^5$  cellules/ml dans le transect SP1 en s'éloignant du cœur de la source. La concentration du phytoplancton est comprise entre  $1.3 \times 10^4$  et  $1.1 \times 10^5$  cellules/ml en s'éloignant de SP2 I vers SP2 III, avec une concentration plus faible à ces deux dernières dans l'échantillon SP2 II.

Il est inhabituel de trouver des populations phytoplanctoniques dans des sources hydrothermales côtières, les cyanobactéries thermophiles peuplant essentiellement les sources hydrothermales terrestres. Phototrophes, il est peu probable que ces populations proviennent des profondeurs d'où émergent les sources de Saint Paul qui surgissent sur les pentes immergées de cratère à une température comprise entre 70°C et 80°C. Il est très

probable que les eaux environnantes abritent des populations phytoplanctoniques à une concentration moyenne de  $1.1 \times 10^5$  cellules/ml et que ces eaux se mélangent avec les eaux des sources hydrothermales avant ou dès leur sortie, à l'orifice où l'échantillonnage a été effectué. Ceci pourrait expliquer, en partie, la faible différence entre les concentrations microbiennes et virales des sources hydrothermales et celles régnant dans les eaux environnantes qui se rapproche plus d'un système marin océanique que d'un système côtier.

### 1.2.2. Autres sources de Saint Paul

Parmi des autres sources de Saint Paul, qui ont pu être étudiées pour l'abondance microbienne et virale, nous trouvons les sources SP2 bis (de la campagne 2011 et qui se trouve à quelques mètres de la source SP2, sous 6 m de profondeur et dont la température est mesurée à 45°C), SP09, SP12 et SP13 (de la campagne 2009 et qui sont des sources côtières situées dans la zone de balancement des marées et peu distantes de SP2. Ces sources ont une température respective de 98°C, 78°C et 64°C). Seule la source SP2 bis a été étudiée en utilisant la ME et la CMF, les autres sources n'ayant pu être analysées que par la CMF. Les résultats du dénombrement microbien et viral de ces sources sont présentés dans le Tableau 15 et sous forme de graphiques (Figure 32).

Méthode		CMF	CMF	ME	ME
Année	Site	Taux de procaryotes	Taux de VLP	Taux de	Taux de VLP
		( $\times 10^5$ Cellules/ml)	( $\times 10^5$ particules/ml)	procaryotes	( $\times 10^5$ particules/ml)
				( $\times 10^5$ Cellules/ml)	
2009	SP09	1,48 ( $\pm 1,01$ )	4,27 ( $\pm 7,03$ )	ND	ND
2009	SP12	1,22 ( $\pm 0,16$ )	1,09 ( $\pm 0,13$ )	ND	ND
2009	SP13	28,2 ( $\pm 0,4$ )	3,43 ( $\pm 0,06$ )	ND	ND
2011	SP2 bis	5,48 ( $\pm 1,72$ )	32,96 ( $\pm 0,17$ )	5,56 ( $\pm 0,78$ )	33,11 ( $\pm 6,76$ )

Méthode		CMF	ME
Année	Site	VLP-to-Prokaryote	VLP-to-Prokaryote Ratio
		Ratio	
2009	SP09	2,89 ( $\pm 0,24$ )	ND
2009	SP12	0,89 ( $\pm 0,23$ )	ND
2009	SP13	0,12 ( $\pm 0$ )	ND
2011	SP2 bis	6,01 ( $\pm 2,43$ )	4,41 ( $\pm 0,63$ )

Tableau 15. Tableau récapitulatif des données d'abondance microbienne et virale des autres sources de Saint Paul. SP2 bis = 45°C; SP09 = 98°C; SP12 = 78°C ; SP13 = 64°C. ND = Non Déterminé. ME= microscopie à épifluorescence; CMF =cytométrie en flux.

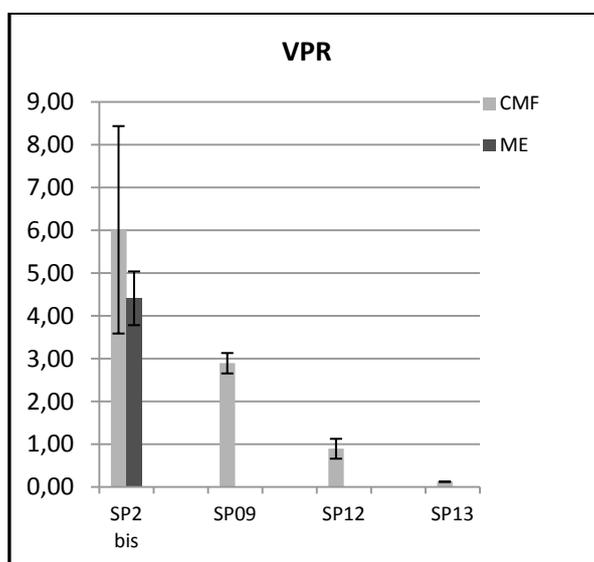
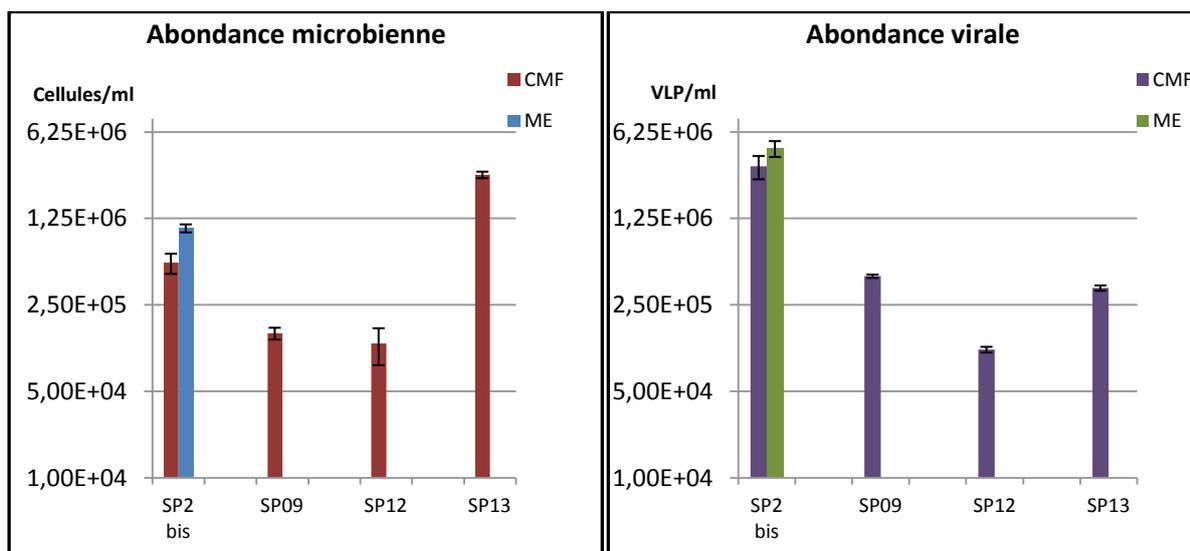


Figure 32. Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviation standard, dans les sources SP2 bis, SP09, SP12 et SP13. La température des échantillons varie selon les sources : SP2 bis = 45°C ; SP09 = 98°C ; SP12 = 78°C ; SP13 = 64°C. ME= microscopie à épifluorescence ; CMF=cytométrie en flux ; VLP= Virus-like particle ; VPR= rapport VLP/procaryotes.

La source sous-marine SP2 bis a un taux de cellules procaryotiques et de VLP similaire à celui de l'eau de mer environnante, de l'ordre de  $10^6$  cellules et particules virales/ml. Le VPR est compris entre 4.4 ( $\pm 0,6$ ) et 6.0 ( $\pm 2.4$ ). Les sources côtières exondées SP09 et SP12 ont une abondance microbienne et virale de l'ordre de  $10^5$  cellules et particules virales/ml, plus faible que les taux mesurés dans SP1 I et SP2 I. Les VPR sont faibles, inférieur à 2 pour SP09 et inférieur à 1 pour SP12. La source SP13 semble avoir la concentration la plus élevée en cellules procaryotiques, soit 2.8 ( $\pm 0.0$ )  $10^6$  cellules /ml, mais une concentration de VLP plus faible d'un ordre. Le VPR de la source SP13 mesuré à 0.12 ( $\pm 0.0$ ) est le plus faible de toutes les sources de Saint Paul.

Les concentrations microbienne et virale des sources SP09, SP12 et SP13 sont donc globalement plus faibles que celles mesurées dans les sources SP1 I et SP2 I, à l'exception toutefois de l'abondance cellulaire de la source SP13. Ces sources ne sont immergées que pendant la marée haute. Il est intéressant de noter qu'aucune signature de populations phytoplanctoniques n'a été identifiée dans ces sources à marée basse. A l'opposé, des populations phytoplanctoniques ont été détectées dans la source SP2 bis à raison de  $2.14 \times 10^5$  cellules/ml.

Ces données suggèrent un mélange d'eaux environnantes avec celles des sources hydrothermales expliquant ainsi la présence de populations phytoplanctoniques dans les échantillons des sources SP1, SP2 et SP2 bis. Les sources côtières (SP09, SP12 et SP13) sont sans doute polluées par les microorganismes de la colonne d'eau à marée haute, mais ils sont probablement dégradés par la chaleur de ces sources, les rendant de ce fait indétectables.

### 1.2.3. Cas des sources chaudes terrestres de Val Travers - Kerguelen

Parmi les sources chaudes terrestres des Kerguelen, seules celles de Val Travers ont pu être étudiées pour l'abondance microbienne et virale. Les trois sources VT1, VT2 et VT3 sont des sources alcalines, dont la température est de 60.8°C; 61.5°C et 60.1°C, respectivement. Elles surgissent du sol à flanc de vallée, formant des ruisseaux à fort débit qui se jettent en contre bas dans la rivière qui serpente en fond de vallée. Les dénombrements ont été effectués en par ME et la CMF et les résultats sont présentés dans le Tableau 16 et la Figure 33 sous forme de graphiques.

Méthode		ME	CMF	ME	CMF
Année	Site	Taux de procaryotes (x 10 <sup>5</sup> Cellules/ml)	Taux de procaryotes (x 10 <sup>5</sup> Cellules/ml)	Taux de VLP (x 10 <sup>5</sup> particules/ml)	Taux de VLP (x 10 <sup>5</sup> particules/ml)
2011	VT1	6,52 (± 1,35)	0,7	53,96 (± 8,62)	1,33 (± 0,07)
2011	VT2	5,48 (± 0,58)	0,97 (± 0,2)	12,77 (± 1,59)	1,52 (± 0,07)
2011	VT3	21,78 (± 3,73)	10,41 (± 1,25)	19,11 (± 1,63)	27,8 (± 0,99)

Méthode		ME	CMF
Année	Site	VLP-to-Prokaryote Ratio	VLP-to-Prokaryote Ratio
2011	VT1	8,28 (± 3,04)	1,89
2011	VT2	2,33 (± 0,38)	1,56 (± 0,34)
2011	VT3	0,88 (± 0,07)	2,67 (± 0,36)

Tableau 16. Tableau récapitulatif des données d'abondance microbienne et virale des autres sources de Val Travers VT<sub>1</sub> = 61°C ; VT<sub>2</sub> = 61°C ; VT<sub>3</sub> = 60°C. Pas de déviation standard disponible pour l'abondance microbienne de VT<sub>1</sub>, ni pour son VPR, en CMF. ME= microscopie à épifluorescence ; CMF =cytométrie en flux.

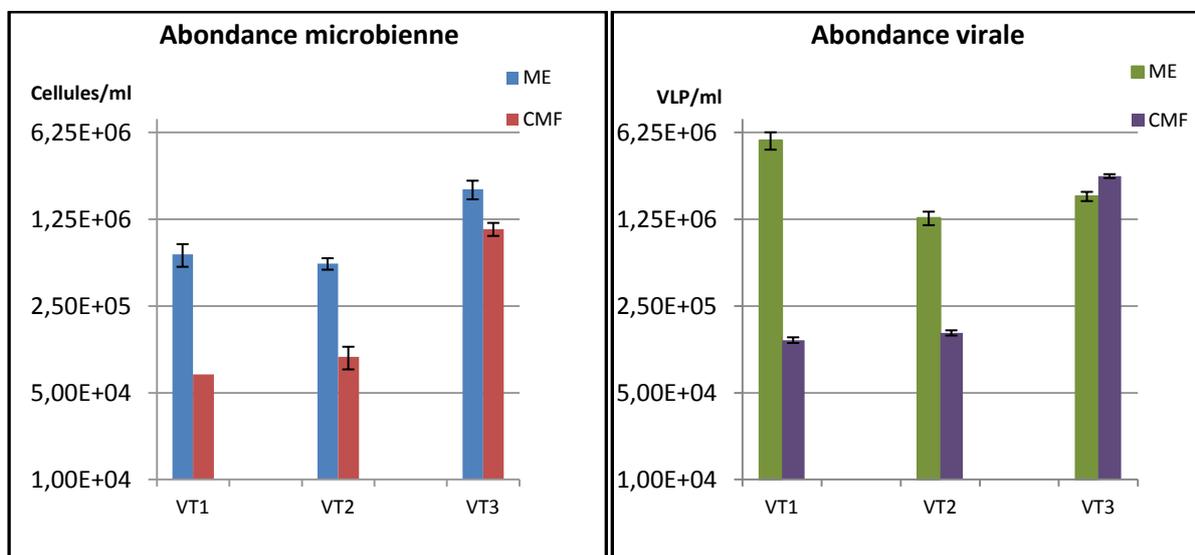


Figure 33. Représentation graphique de l'abondance microbienne et virale, avec déviation standard, dans les sources VT<sub>1</sub> (61°C), VT<sub>2</sub> (61°C) et VT<sub>3</sub> (60°C). ME= microscopie à épifluorescence ; CMF =cytométrie en flux ; VLP= Virus-like particle ; VPR= rapport VLP/procaryotes. Pas de déviation standard disponible pour l'abondance microbienne de VT<sub>1</sub>, ni pour son VPR, en CMF.

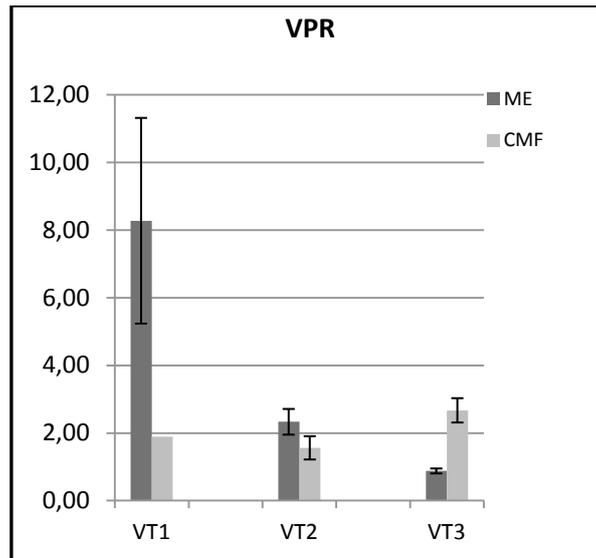


Figure 33 (suite)

Dans les sources VT<sub>1</sub> et VT<sub>2</sub>, l'abondance microbienne et virale est de l'ordre 10<sup>5</sup> cellules/ml. Les populations microbiennes et virales sont plus élevées d'un ordre de grandeur dans la source VT<sub>3</sub> (10<sup>6</sup> cellules/ml). Pour cette source, comme pour la source VT<sub>2</sub>, le ratio VPR est faible, de l'ordre de 2. Le ratio VPR de VT<sub>1</sub> est en moyenne deux fois plus élevé comparé aux deux autres sources. Il existe globalement peu de différences entre les concentrations microbienne et virale des sources VT<sub>1</sub> et VT<sub>2</sub>. Ceci est peu surprenant car les sources ne sont séparées que d'une dizaine de mètres, il est donc probable qu'elles aient la même origine.

Dans l'étude menée par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2004b) sur les sources hydrothermales terrestres de Casa Diablo et The Little Hot Creek, en Californie, les auteurs dénombrent des cellules procaryotiques à raison de 1-2 x 10<sup>5</sup> cellules/ml et entre 0.7 et 70 x 10<sup>5</sup> particules virales/ml. Ces sources font entre 73°C - 84°C et ont un pH variant entre 7 et 8. Schoenfeld et collaborateurs (Schoenfeld *et al.*, 2008) ont également trouvé une abondance microbienne et virale similaire, variant entre 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> cellules et particules virales/ml sur les sources Bear Paw, dont le pH mesurée est de 7 et la température de 74°C et Octopus qui est plus chaude et alcaline, 93°C et de pH 8 (Yellowstone). Les ratios VPR calculés étaient toutefois très faibles, puisqu'inférieurs à 1. Comparativement, les sources de Val Travers ont des abondances équivalentes, légèrement plus élevées dans le cas de VT<sub>3</sub>. Les sources de Val Travers sont, cependant, moins chaudes et plus alcalines que les sources Californiennes et de Yellowstone. Selon une estimation faite par Fulton et collaborateurs (Fulton *et al.*, 2009), les sources hydrothermales acides (pH < 4) et à température élevée (T° > 80 °C) hébergeraient généralement des abondances comprises entre 10<sup>5</sup> et 10<sup>7</sup> cellules hôtes/ml et entre 10<sup>4</sup> et 10<sup>6</sup> particules virales/ml.

### **1.3. Comparaison des deux méthodes de dénombrement : Microscopie à épifluorescence et cytométrie en flux**

Si la méthode de dénombrement microbienne et virale par microscopie électronique à transmission s'est avérée inadaptée à la mesure des abondances microbienne ou virale des sources, la microscopie à épifluorescence et la cytométrie en flux ont au contraire permis d'en donner une estimation correcte. Les deux méthodes ne donnent pourtant pas les mêmes valeurs. Des corrélations peuvent cependant être observées. Une corrélation de Spearman significative,  $r = 0.66$  ( $p = 0.044$ ), entre les deux méthodes peut être constatée pour le dénombrement des cellules de procaryote (Figure 34 A). En revanche, pour le dénombrement des VLP la corrélation n'est que marginalement significative entre ces deux méthodes,  $r = 0.59$  ( $p = 0.080$ ) (Figure 34 B). Cette faible valeur corrélatrice est influencée par les données obtenues sur la source VT<sub>1</sub>, pour laquelle le taux de VLP/ml est 40 fois plus élevée avec la méthode de ME par rapport à la méthode par CMF (Tableau 17). Une corrélation très significative,  $r = 0.90$  ( $p = 0.002$ ) pourrait être observée entre les deux méthodes pour le dénombrement des VLP, si les données de VT<sub>1</sub> ne sont pas prises en compte (Figure 34 C).

En comparant les données d'abondance microbienne et virale, dénombrée avec les deux méthodes utilisées, une tendance peut être observée. Les données obtenues par microscopie à épifluorescence sont globalement plus élevées que celles mesurées par la méthode de cytométrie en flux (Tableau 17).

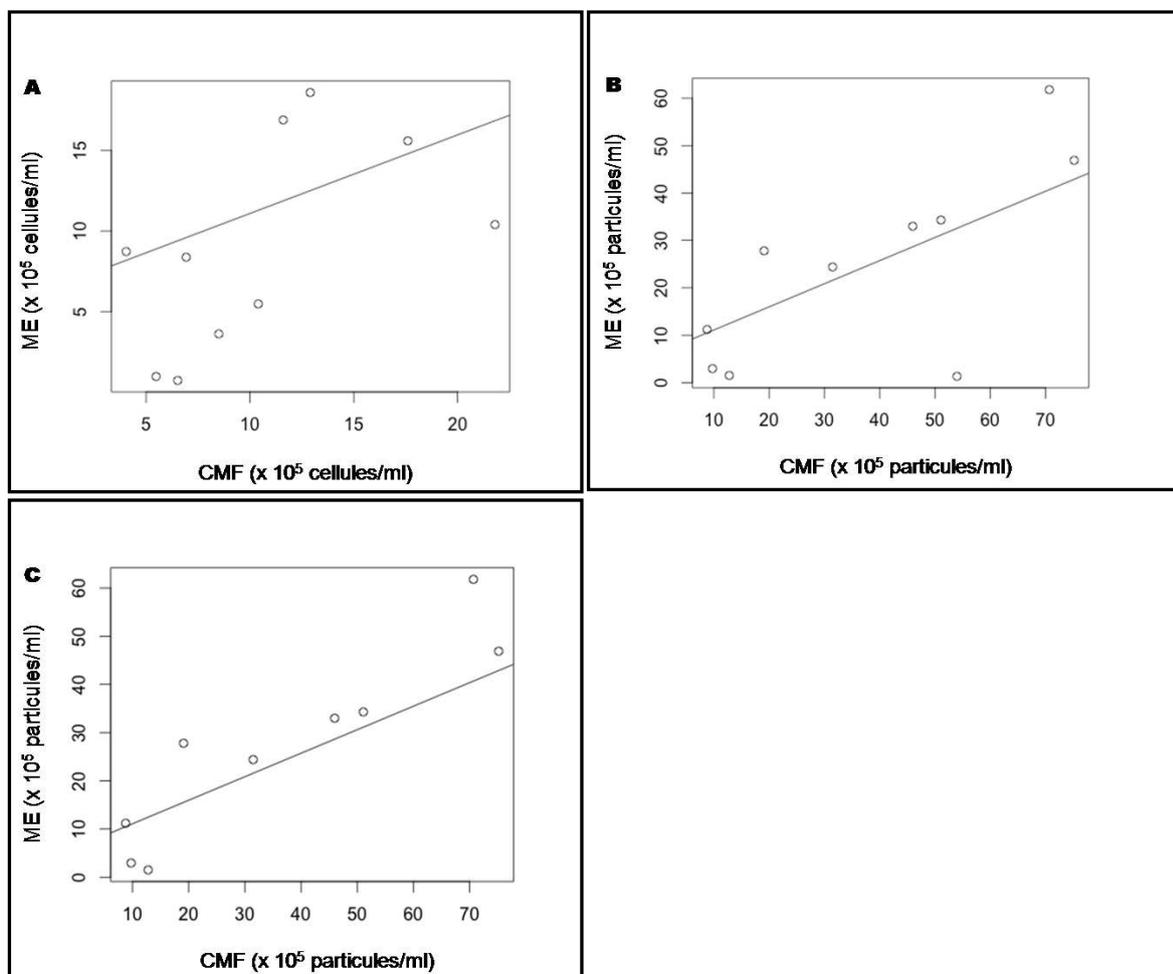


Figure 34. Comparaison de l'abondance microbienne (A) et virale (B) dénombrée en utilisant la méthodologie de microscopie à épifluorescence et de cytométrie en flux. Dans le graphique (C) est présentée une comparaison des deux méthodes de dénombrement de particules virales sans les données de VT1.

Année	Site	Rapport ME/CMF abondance procaryotique	Rapport ME/CMF abondance VLP	Rapport ME/CMF de VPR
2011	SP1 I	2,35	3,31	1,41
2011	SP1 II	0,48	0,78	1,63
2011	SP1 III	0,68	1,60	2,34
2011	SP2 I	1,13	1,14	1,01
2011	SP2 II	0,83	1,29	1,56
2011	SP2 III	0,69	1,63	2,36
2011	SP2 bis	1,90	1,40	0,73
2011	VT1	9,27	40,64	4,38
2011	VT2	5,63	8,41	1,49
2011	VT3	2,09	0,69	0,33

Tableau 17. Comparaison des abondances microbienne et virale, mesurées en utilisant la microscopie à épifluorescence (ME) et la cytométrie en flux (CMF). VPR= rapport VLP/procaryotes.

Dans le cas de la mesure des abondances procaryotiques, on constate une tendance à mesurer des abondances plus élevées de procaryote par ME que par CMF. Ceci est également le cas pour l'estimation de l'abondance virale, dont les chiffres sont généralement plus élevés en ME qu'en CMF. Ceci se vérifie également dans les rapports ME/CMF des VPR, qui ne varient que peu, indiquant qu'une estimation plus élevée de l'abondance en ME est générale, plutôt que spécifique pour les cellules ou les particules virales. Les rapports de VPR étant néanmoins supérieurs à 1, on constate une légère surestimation du dénombrement des VLP.

Toutes les études de mesure des abondances microbienne et virale faites à l'aide de la cytométrie en flux et rapportées dans la littérature ont été, à ce jour, effectuées sur des systèmes aquatiques tempérés. De fortes corrélations sont rapportées entre les deux méthodes de dénombrement. Ainsi, Marie et collaborateurs (Marie *et al.*, 1999) ont noté une corrélation ( $r=0.97$ ,  $n=14$ ) entre ces deux méthodes, avec des valeurs obtenues par CMF qui excédaient de 30 % en moyenne celles de la ME, lors d'analyses d'échantillons marins. De leur côté, Chen et collaborateur (Chen *et al.*, 2001) ont constaté une abondance virale 1.1 fois plus élevée par la technique CMF dans des échantillons du lac Erie. Lors de l'étude de mise en point portant sur le dénombrement des populations bactériennes et virales des sédiments du lac Léman et du lac du Bourget, Duhamel et Jacquet (Duhamel & Jacquet, 2006) ont également rapporté une corrélation entre CMF et ME pour les bactéries ( $r=0.84$ ) et les virus ( $r=0.74$ ), la CMF donnant des valeurs une à deux fois plus élevées. Ces auteurs suggèrent que cette différence pourrait être en partie expliquée par un artéfact technique lié au temps d'exposition des fluorochromes, dont la fluorescence diminue progressivement, diminuant le signal. Les analyses étant plus rapides en CMF, il n'y aurait pas de perte de fluorescence et plus de particules pourraient être comptées. Brussaard et collaborateurs (Brussaard *et al.*, 2010) ont également signalé une forte corrélation ( $r=0.89$ ,  $p<0.0001$ ) entre des comptages de particules virales marines effectués en CMF et en ME. En conclusion, tous les auteurs sont actuellement unanimes à considérer que les deux approches méthodologiques aboutissent en général à des résultats qui peuvent varier, mais qui restent concordants. Par rapport à la ME, la CMF surestimerait les valeurs d'abondance. Ceci est à relativiser si l'on considère que Marie et collaborateurs (Marie *et al.*, 1999) ont observé une sous-estimation de la concentration virale dans une culture de *Phaeocystis*, lorsque les abondances étaient faibles.

Pour se forger une opinion plus tranchée, focalisons-nous sur les données acquises au niveau des eaux marines (tempérées) de Saint Paul. Des abondances microbiennes plus faibles (entre 17 % et 52 %) sont mesurées en ME par rapport à la CMF. Les valeurs les plus proches ont été obtenues pour les sites SP1 II et SP1 III, ainsi que pour SP2 II et SP2 III, alors qu'une valeur supérieure caractérise le cœur de la source SP1. Cette différence est également plus marquée lorsque l'on considère les résultats de dénombrement des sources chaudes de Val Travers. Il faut donc admettre que, dans le cas des sources chaudes,

l'hypothèse d'un artéfact lié à la perte de signal, suite à une exposition prolongée des fluorochromes en ME, ne peut être retenue. Cependant, ceci n'écarte pas l'hypothèse d'une surestimation dans le contexte des sources chaudes qui pourraient être due à la présence d'ADN libre en suspension. A ma connaissance, il n'existe pas d'étude rapportant la mesure en teneur d'ADN libre dans les sources hydrothermales. Il est donc difficile d'estimer la contribution des acides nucléiques libres dans ces milieux extrêmes. Toutefois, il pourrait être avancé que cette contribution est probablement minime, en raison des conditions dénaturantes qui règnent dans ces environnements.

Une autre raison explicative peut être énoncée. Elle tient à la nature des échantillons. L'observation par microscopie à épifluorescence a permis de visualiser les échantillons. En microscopie épifluorescence, le bruit de fond d'autofluorescence s'est révélé relativement fort, perturbant sans doute la discrimination entre les cellules, les particules virales et les particules colloïdales. Cet effet était particulièrement marqué dans l'échantillon VT<sub>1</sub>, ce qui pourrait expliquer les fortes différences d'abondance constatées *in fine*. L'analyse des variances (Tableau 18) effectuées sur les résultats de comptage apporte un éclairage et montre en effet que la CMF est une méthode plus robuste et plus précise.

Méthode	ME	CMF	ME	CMF
Site	Taux de procaryotes (Cellules/ml)	Taux de procaryotes (Cellules/ml)	Taux de VLP (particules/ml)	Taux de VLP (particules/ml)
SP <sub>1</sub> I	3,07E+10	3,60E+08	2,64E+10	1,00E+09
SP <sub>1</sub> II	4,32E+09	2,79E+09	6,74E+10	2,90E+10
SP <sub>1</sub> III	8,66E+09	4,29E+09	1,63E+11	1,12E+11
SP <sub>2</sub> I	7,15E+09	5,52E+09	3,79E+11	2,42E+11
SP <sub>2</sub> II	2,13E+09	1,83E+09	2,80E+10	2,00E+10
SP <sub>2</sub> III	9,34E+09	9,17E+10	1,13E+11	7,05E+11
SP <sub>2</sub> bis	6,06E+09	1,03E+10	4,58E+11	4,95E+11
VT <sub>1</sub>	1,83E+10	ND	7,44E+11	4,83E+07
VT <sub>2</sub>	3,37E+09	4,05E+08	2,54E+10	5,36E+07
VT <sub>3</sub>	1,39E+11	1,57E+10	2,64E+10	9,80E+09

Tableau 18. Tableau représentant la variance des concentrations des cellules de procaryotes et de particules virales dans les sources hydrothermales des TAAF. La variance est calculée à partir des données de dénombrement faites en triplicat pour chaque site. Pas de variance disponible pour les cellules de procaryotes énumérées en CMF. ND= non déterminé.

Finalement, il est difficile d'arriver à une conclusion claire et tranchée et ceci ne fait que confirmer les conclusions des différentes études comparatives antérieures réalisées dans ce but. Il n'en demeure pas moins qu'il est important de poursuivre ces investigations méthodologiques afin d'améliorer les protocoles de dénombrement qui restent perfectibles,

surtout si l'on prend en considération les remarques (récentes) de Forterre et collaborateurs portant sur les difficultés de dénombrement (Forterre *et al.*, 2013).

## **2. La diversité des Microorganismes**

### **2.1. La diversité des VLP dans les échantillons bruts**

Lors des collaborations avec le « Laboratoire Microorganismes : Génome et Environnement » à Clermont-Ferrand et avec le « Laboratoire de Microbiologie Marine » à Bergen, très peu de VLP ont pu être observées en MET sur nos échantillons bruts, rendant utopique une quelconque estimation quantitative. Cependant, la visualisation des échantillons bruts par MET est indispensable pour observer la morphologie des VLP. L'observation par MET permet à la fois d'identifier des morphologies connues, mais également de décrire de nouvelles formes et d'en donner les dimensions.

Cependant, le traitement infligé aux virus, lors de la phase de concentration (par ultracentrifugation, congélation/décongélation, notamment) ou pendant la coloration à l'acétate d'uranyle peut altérer la forme ou les dimensions apparentes des particules (Ackermann & Haldal, 2010). L'ultracentrifugation peut par exemple fractionner les particules et suite à ceci, les composants des virions peuvent devenir inidentifiables ou être confondus comme des particules virales à part entière. Par exemple, les virus appartenant à l'ordre des *Caudovirales* ont tendance à se fractionner au niveau du col reliant la queue à la capsid, résultant en des capsides et des queues détachées, qui peuvent être interprétées comme étant des VLP filamenteuses (Ackermann & Tiekotter, 2012). La coloration positive à l'acétate d'uranyle a, quant à elle, une tendance à réduire la taille des capsides de 10 % à 15 %. Ceci se ferait suite à la condensation de l'ADN double brin, pour lequel l'acétate d'uranyle a une forte affinité (Huxley & Zubay, 1961).

Lors des observations faites à Clermont-Ferrand, seuls quelques-uns des échantillons présentent des particules qui pourraient être assimilés à des VLP. Dans l'échantillon nommé Plage du Feu de Joie 1 (PFJ1), quatre particules de morphologie différente peuvent être observées (Figure 35 a-d).

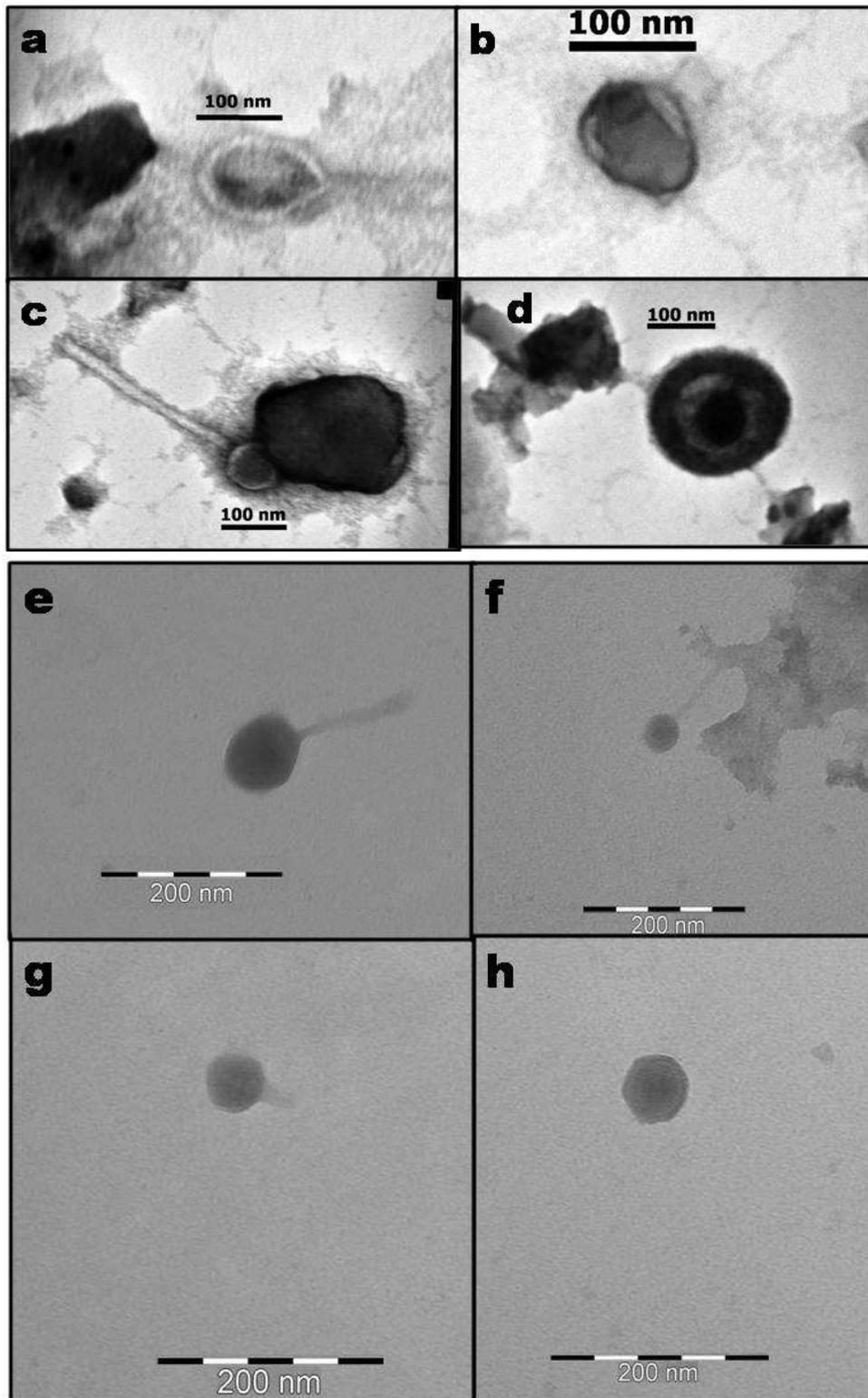


Figure 35. Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après une coloration négative) dans les échantillons Plage du Feu Joie (a - d) et SP1 (e-h). Les dimensions des particules sont détaillées dans le Tableau 19.

Site	Source	Morphologie de VLP	Dimensions de VLP	Référence de la photo
<b>Rallier du Baty</b> (Kerguelen)	Plage du Feu de Joie 1 (PFJ1)	Fusiforme	150 nm x 100 nm	Figure 35 a
		Vésicule	100 nm x 90 nm	Figure 35 b
		Caudé	Ø (capside) = 70 nm queue = 15 nm x 325 nm	Figure 35 c
		Sphérique	Ø (capside) = 200 nm Ø (noyau) = 85 nm	Figure 35 d
<b>Saint Paul</b>	SP 1	Caudé	Ø (capside) = 75 nm queue = 130 nm	Figure 35 e
		Caudé	Ø (capside) = 50 nm queue = 95 nm	Figure 35 f
		Caudé	Ø (capside) = 55 nm queue = 30 nm	Figure 35 g
		Icosaèdre	Ø (capside) = 65 nm	Figure 35 h

Tableau 19. Différents morphotypes et dimensions de VLP observés dans différents échantillons bruts.

La première forme (Figure 35 a) représente une particule fusiforme d'approximativement 150 nm de longueur et 100 nm de largeur. Ces dimensions sont plus importantes que celles de la plupart des représentants des virus fusiformes décrits essentiellement chez les microorganismes extrêmophiles, qui font généralement environ 100 nm de longueur et 60 nm de largeur (Pina *et al.*, 2011). L'aspect de cette VLP diffère également par ses bords plus clairs en contrastes par rapport au centre de la particule, rendant sa coloration apparente moins uniforme. Ceci pourrait être dû à la coloration des acides nucléiques, qui se présentent généralement sous un aspect foncé dans les préparations de MET. L'acétate d'uranyle peut également engendrer la formation d'un « halo » autour de la capsid, le centre apparaissant alors plus foncé et les contours plus clairs et flous (Ackermann & Tiekotter, 2012). Cette VLP n'est pas sans rappeler cette découverte par Borrel et collaborateurs (Borrel *et al.*, 2012) dans les sédiments du fond du Lac Pavin, où des conditions anoxiques règnent. Parmi ces VLP, une ressemble particulièrement (Figure 36 b), mais avec des dimensions plus grandes (environ 370 nm x 250 nm).

Une deuxième VLP putative observée dans l'échantillon PFJ 1 (Figure 35 b) a une forme vésiculaire légèrement ovale. Elle a une dimension d'environ 100 nm de longueur et 90 nm

de largeur. Elle présente une morphologie surprenante par ses deux zones plus claires de part et d'autre de la particule. Ceci n'est pas sans rappeler la structure apparente de particules virales enveloppées infectant des animaux et similaires en raison de la présence de l'enveloppe, ce qui modifie la pénétration du contrastant (Roingear, 2008; Goldsmith & Miller, 2009).

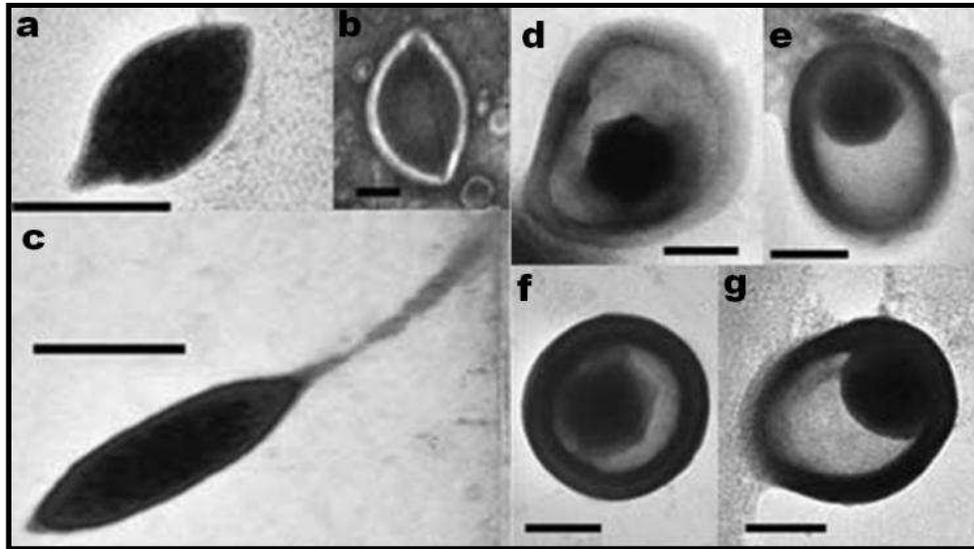


Figure 36. Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) dans les échantillons de sédiments du Lac Pavin (d'après Borrel *et al.* 2012).

Une forme de VLP, de type caudée, a également été identifiée dans l'échantillon PFJ1 (Figure 35 c). Cette particule présente une morphologie typique des représentants de l'ordre des *Caudovirales*. La tête a un diamètre d'environ 70 nm. La partie caudale fait environ 325 nm de longueur et 15 nm de largeur. L'aspect général de cette particule permet d'assigner cette VLP à la famille des *Siphoviridae*. Cette VLP paraît attachée à un débris.

Il est à noter que la présence de débris a été observée en cytométrie en flux. Certains échantillons étaient caractérisés par un bruit de fond important masquant parfois les zones du cytogramme où les VLP sont trouvées. Suite à la présence de fortes concentrations de débris, les VLP pourraient être adsorbées à ces derniers, qui une des causes de la perte des particules virales dans la mer (Suttle & Chen, 1992; Juniper *et al.*, 1998).

La quatrième VLP observée à une forme sphérique d'un diamètre d'environ 200 nm (Figure 35 d). Elle présente une morphologie apparemment constituée « core » plus dense et plus opaque aux électrons. Le core, d'environ 85 nm de diamètre, apparaît entouré d'une membrane. Cette VLP ressemble également à certaines VLP décrites par Borrel et collaborateurs (Borrel *et al.*, 2012) dans le Lac Pavin (Figure 36 d-g). Les VLP décrites par ces auteurs ont un diamètre total d'environ 220 nm, le core se réduisant à environ 110 nm. Ces particules rappellent, par leur morphologie, les virus appartenant à l'ordre des *Herpesvirales*. Les auteurs notent également que ce type de VLP n'a pas encore été associé à des

procaryotes et pourrait, de ce fait, représenter une nouvelle famille de virus (Borrel *et al.*, 2012).

Pendant mon séjour à Bergen, quatre VLP ont pu être identifiées que dans un unique échantillon, provenant de la source côtière marine SP<sub>1</sub> de Saint Paul (Figure 35 e-h). Parmi de ces quatre VLP, trois apparaissent caudées, appartenant de ce fait aux *Caudovirales* (Figure 35 e-g). La première (Figure 35 e) est composée d'une tête de diamètre approximatif de 75 nm. La queue a une longueur d'environ 130 nm. La capsid de la deuxième VLP (Figure 35 f) a un diamètre légèrement plus petit, d'environ 50 nm. Sa queue, d'une longueur voisine de 95 nm, semble être attachée à un débris. Ces deux premières VLP ont une morphologie plutôt caractéristique des *Siphoviridae*. Au contraire, la troisième qui exhibe une queue plus courte (approximativement 30 nm) et une capsid d'environ 55 nm de diamètre (Figure 35 g) ressemble davantage aux virions de la famille des *Podoviridae*. Le diamètre de la capsid correspond à celle attendue pour les *Podoviridae* (entre 50 nm et 60 nm), mais la queue semble plus longue que celles rencontrées dans cette famille (10 nm) (Ackermann & Haldal, 2010). Il pourrait donc s'agir de la queue d'une VLP appartenant plus probablement aux *Myo-* ou *Siphoviridae*, mais ayant été cassée lors de la manipulation de l'échantillon (ultracentrifugation etc.). Une quatrième VLP (Figure 35 h) présente une capsid icosaédrique d'environ 65 nm de diamètre. Cette VLP pourrait être apparentée aux *Tectiviridae*, dont les virus possèdent une capsid icosaédrique enfermant de l'ADN double brin, ou bien alors celle des *Leviviridae*, qui regroupe des virus icosaédriques, mais dont le génome est de l'ADN simple brin. La présence putative de virus apparentés à la famille des *Tectiviridae* a déjà été rapportée associée à des bactéries thermophiles du genre *Thermus*. La présence de virus à ADN simple brin en condition hyperthermophile a tout récemment été mise en évidence chez des archées (Mochizuki *et al.*, 2012). La possibilité d'observer la présence de virus à ADN simple brin de la famille des *Leviviridae* n'est donc pas à exclure, au motif que les membres de cette famille n'ont jusqu'à ce jour toujours été décrits qu'en milieu tempéré. Cependant, il se peut que ce soit tout simplement un artefact d'observation, une simple capsid isolée détachée de la partie caudale d'un bactériophage.

Seuls les échantillons analysés avec la technique de centrifugation directe sur les grilles de MET décrite par Sime-Ngando et collaborateurs (Sime-Ngando *et al.*, 1996), ainsi que Børsheim et collaborateurs (Børsheim *et al.*, 1990), ont permis l'observation de VLP.

Aucune VLP n'a été détectée dans les échantillons filtrés à 0.2 µm *in situ* et ensuite précipités au PEG 6000. Il est possible que lors de la resuspension du culot viral, après centrifugation avec un rotor fixe, une perte importante ait lieu, empêchant la visualisation des virus, puisque la limite de détection théorique des particules virales, en utilisant la MET, est de l'ordre de 10<sup>4</sup> particules/ml (Ewert & Paynter, 1980b) dans le meilleur des cas. Il est cependant possible que cette limite soit plus élevée, de l'ordre de 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> particules/ml (Roingard, 2008). Si l'on considère à la fois le seuil de détection de la méthode d'observation et la faible abondance virale caractérisant les sources chaudes

(Prangishvili, 2006a), il n'est pas du tout surprenant que la détection de particules virales soit si infime dans nos échantillons.

## **2.2. La diversité des VLP dans les cultures d'enrichissement d'isolats bactériens et archéens thermophiles**

Des structures représentant potentiellement des VLP et des particules de type vésiculaire ont pu être observées dans trois enrichissements de culture, réalisés en anaérobiose, visant à cultiver des *Thermotogales*, des *Thermococcales* et l'archée hyperthermophile *Ignisphaera aggregans*: SP<sub>1</sub>, SP<sub>09</sub> et SP<sub>11</sub> sur milieu Ravot modifié (Postec *et al.*, 2010) à 70°C, SP<sub>3</sub> sur le même milieu, mais à deux températures différentes (70°C et 8°C) et PFJ<sub>2</sub> sur milieu Niederberger (Niederberger *et al.*, 2006) à 70°C.

Dans la culture d'enrichissement sur milieu Ravot modifié à 70°C, réalisé à partir de l'échantillon SP<sub>1</sub>, trois VLPs ont été photographiées (Figure 37 a-d). Ces trois VLP présentent une morphologie de type binaire composée d'une capsidie icosaédrique attachée à une queue (Figure 37 a-c). Deux de ces particules (Figure 37 a et b) exhibent les mêmes dimensions avec une capsidie dont le diamètre approximatif est de 55 nm de diamètre, et une queue d'environ 245 nm de longueur. Les queues sont d'une apparence flexible, ce qui suggère que ces deux particules appartiendraient à la famille des *Siphoviridae*. La deuxième particule semble être attachée à une vésicule d'un diamètre de 275 nm. La troisième particule virale (Figure 37 c) a une capsidie de diamètre légèrement plus large, de l'ordre de 65 nm et une queue plus courte comparée aux deux autres particules caudées. La capsidie a un aspect sphérique ce qui est probablement dû à la coloration, l'acétate d'uranyle pouvant gonfler les structures protéiques. La queue, d'environ 165 nm, n'est pas courbée et la flexibilité de cette dernière n'est donc pas vérifiée. Cette particule pourrait donc être un siphovirus ou un myovirus. La queue contractile d'un myovirus peut perdre sa gaine lors de la préparation ne laissant apparent que le tube central de la queue, ce qui peut aboutir à une interprétation erronée (Ackermann & Tiekotter, 2012). L'observation de nombreuses autres particules à morphologie identique dans l'échantillon suggérerait que ces particules sont plutôt des représentants de la famille des *Siphoviridae*. Enfin, la quatrième particule a une morphologie sphérique de type vésiculaire, avec un diamètre d'environ 225 nm (Figure 37 d). Elle présente un core de coloration plus claire de 200 nm, entouré d'une membrane plus foncée. Cette particule ressemble vraiment aux « virus-like vesicles » décrites par Soler et collaborateurs (Soler *et al.*, 2008) dans les cultures de *Thermococcales*, qui sont des archées hyperthermophiles marines (Figure 38 a). En revanche, cette particule vésiculaire présente un diamètre deux fois plus grand que celui des vésicules décrites par Soler et collaborateurs, qui ont généralement un diamètre variant entre 50 nm et 100 nm.

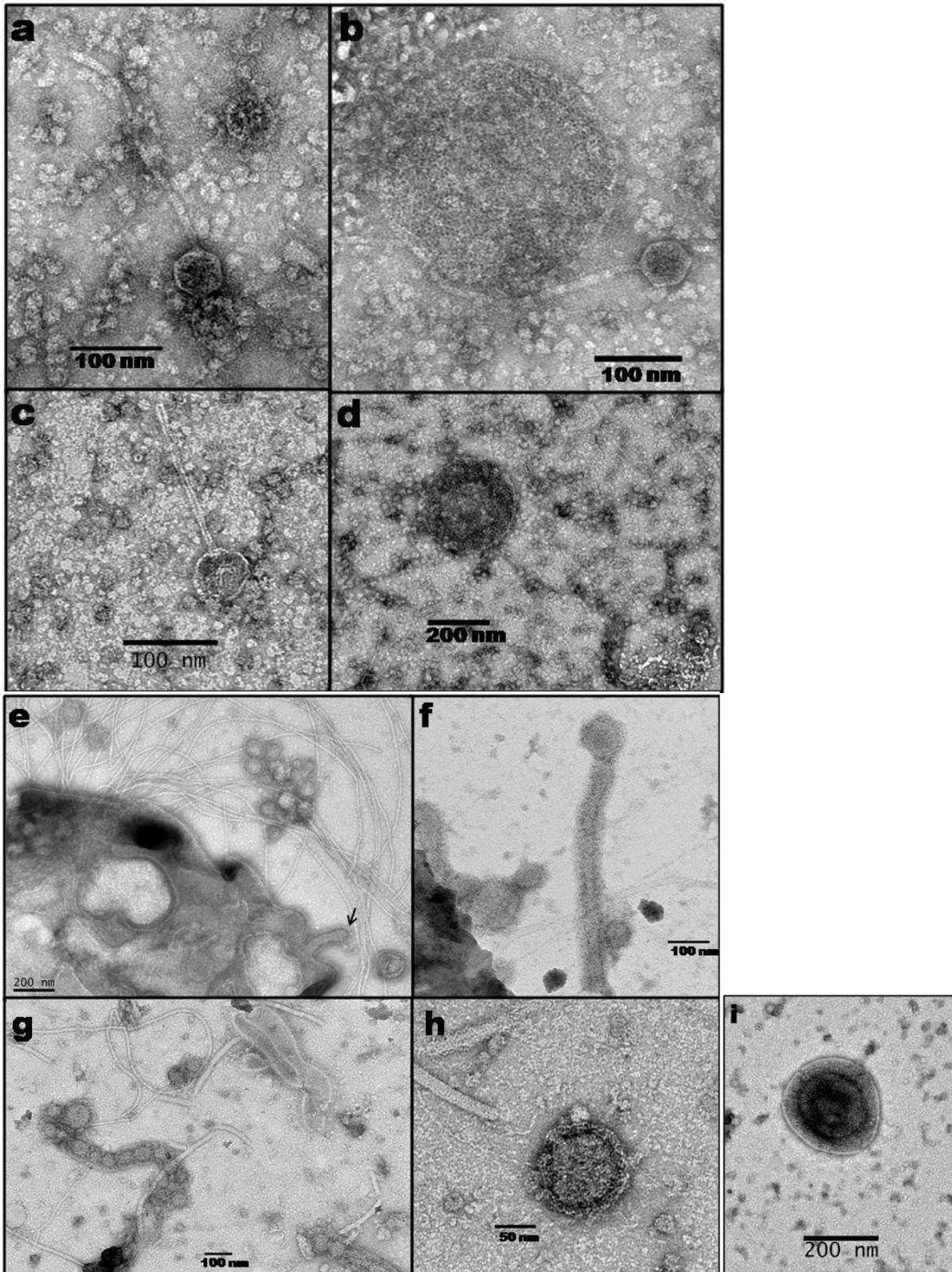


Figure 37. Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) sur le surnageant des cultures d'enrichissement effectuées avec SP1 sur milieu Ravot à 70°C (a - d), avec SP3 sur milieu Ravot à 70°C (e) et 80°C (f - h) et avec SP09 sur milieu Ravot à 70°C (i). Les dimensions et les morphotypes des particules sont détaillés dans le Tableau 20.

Source	Milieu/ Température	Morphologie des cellules	Morphologie de VLP	Dimensions de VLP	Référence de la photo
SP 1	Ravot modifié/70°C	Bâtonnets	Caudé	Ø (capside) = 55 nm queue = 245 nm	Figure 37 a et b
			Caudé	Ø (capside) = 65 nm queue = 165 nm	Figure 37 c
			Sphérique	Ø = 225 nm	Figure 37 d
SP 3	Ravot modifié/70°C	Coques/ Bâtonnets	Sphérique	Ø = 200 nm	Figure 37 e
	Ravot modifié/80°C	Coques	Tubulaire	675 nm x 60 nm	Figure 37 f
			Sphérique	Ø = 100 nm	Figure 37 g
			Sphérique	Ø = 120 nm	Figure 37 h
SP 09	Ravot modifié/70°C	Bâtonnets	Sphérique	Ø = 375 nm	Figure 37 i

Tableau 20. Différents morphotypes et dimensions de VLP observés dans différentes cultures d'enrichissement.

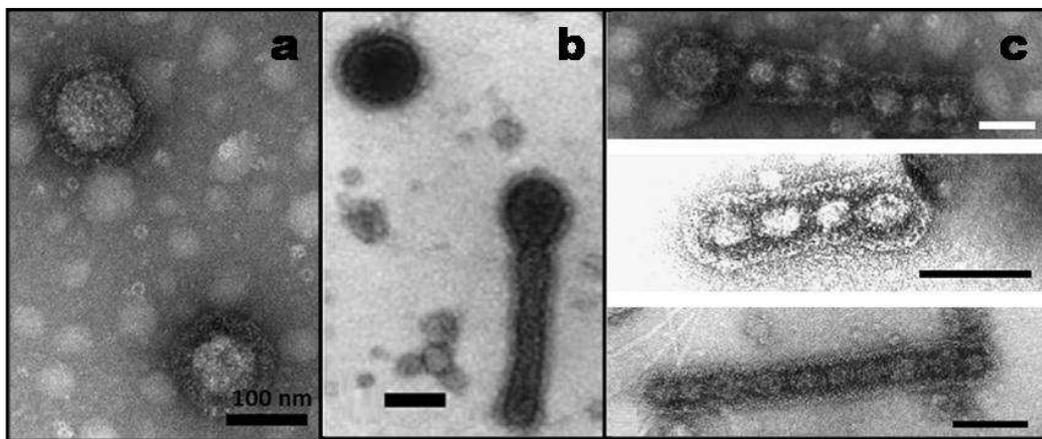


Figure 38. Photos de « virus-like vesicles », colorées négativement, observées à l'aide d'un microscope électronique à transmission dans les surnageants des souches de *Thermococcales*. Plusieurs types de morphotype peuvent être observés : a) vésiculaire, b) allongé, c) en « collier de perles ». La barre, dans b et c, représente 100 nm (d'après Soler *et al.* 2008).

Les observations faites sur le surnageant des cultures d'enrichissement sur milieu Ravot modifié, à 70°C et à 80°C, avec SP<sub>3</sub> et à 80°C avec SP<sub>1</sub>, ont révélé la présence de particules de type « virus-like vesicles » (Soler *et al.*, 2008) (Figure 37 e - h, avec la photo e) prise du surnageant d'un enrichissement à 70°C et les photos f-h) d'un enrichissement à 80°C). Dans la Figure 37 e), un amas de plusieurs vésicules, de diamètre de l'ordre de 200 nm, est visible. Cet amas est à proximité d'une structure membranaire, à laquelle sont attachés plusieurs flagelles. L'amas est vraisemblablement une cellule de *Thermococcale* endommagée. Une excroissance en formation est visible (mise en évidence par une flèche dans la Figure 37 e). Dans la Figure 37 f), une structure tubulaire, d'environ 675 nm de longueur et 60 nm de largeur, avec une extrémité sphérique, vésiculaire, peut être constatée. La Figure 37 g) présente un autre type de structure composée d'un chapelet de plusieurs vésicules, d'environ 100 nm de diamètre. Soler et collaborateurs (Soler *et al.*, 2008) ont décrit plusieurs variations autour des « virus-like vesicles », dont des entités tubulaires avec des bourgeons vésiculaires à leurs extrémités ainsi que d'autres structures qu'ils nomment des « colliers de perles ». Afin de permettre la comparaison, j'ai intégré une copie d'une figure de Soler (Figure 38 b) qui présente une structure tubulaire similaire à celle observée dans l'enrichissement SP<sub>3</sub> à 70°C, cette structure ayant une longueur plus petite (440 nm), mais une largeur plus importante (75 nm). Le chapelet de type « collier de perles » peut également être observé sur la Figure 38 c).

Un autre type de particule vésiculaire a été visualisé dans le surnageant de culture de SP<sub>09</sub>, faite sur du milieu Ravot modifié à 70°C (Figure 37 i). Cette particule a un diamètre approximatif de 375 nm, et présente un core plus foncé d'environ 200 nm de diamètre. Cette vésicule présente des similarités avec une VLP photographiée dans les sources chaudes terrestres de Little Hot Creek en Californie (Figure 39 a) par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2004b). Les dimensions de la particule sont cependant plus petites (82 nm de diamètre extérieur avec le core faisant environ 70 nm). Chiura et collaborateurs (Chiura *et al.*, 2002) ont également constaté la présence de particules vésiculaires (Figure 39 b) dans des sources hydrothermales terrestres de Nakanoyu en Japon. Ces vésicules, ou « Budding-like » particles, seraient produites par des bactéries logeant sur des mats de soufre. Ces vésicules semblent également avoir des dimensions plus petites que celle observée dans les cultures d'enrichissement de SP<sub>09</sub>, puisque le diamètre est de l'ordre de 210 nm avec un core de 125 nm. Breitbart et collaborateurs ayant également travaillé sur des sources hydrothermales terrestres, il n'est pas exclu que la VLP qu'ils ont photographié soit une vésicule produite par type de bactérie proche de celles décrites par Chiura et collaborateurs. La vésicule observée dans le surnageant de culture de SP<sub>09</sub> présente également des similitudes morphologiques avec des rétrovirus de rongeurs (Figure 39 c), dont l'aspect vésiculaire peut avoir une coloration plus dense au niveau du core entouré d'une membrane plus claire. La taille de ces rétrovirus est toutefois de diamètre plus petit (Roingard, 2008). Qu'il s'agisse des rétrovirus, des particules décrites par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2004b) ou par Chiura et collaborateurs (Chiura *et al.*, 2002), le morphotype de ces

éléments présente un core plus dense enfermant théoriquement un génome entouré d'une couche externe moins dense d'origine probablement cellulaire .

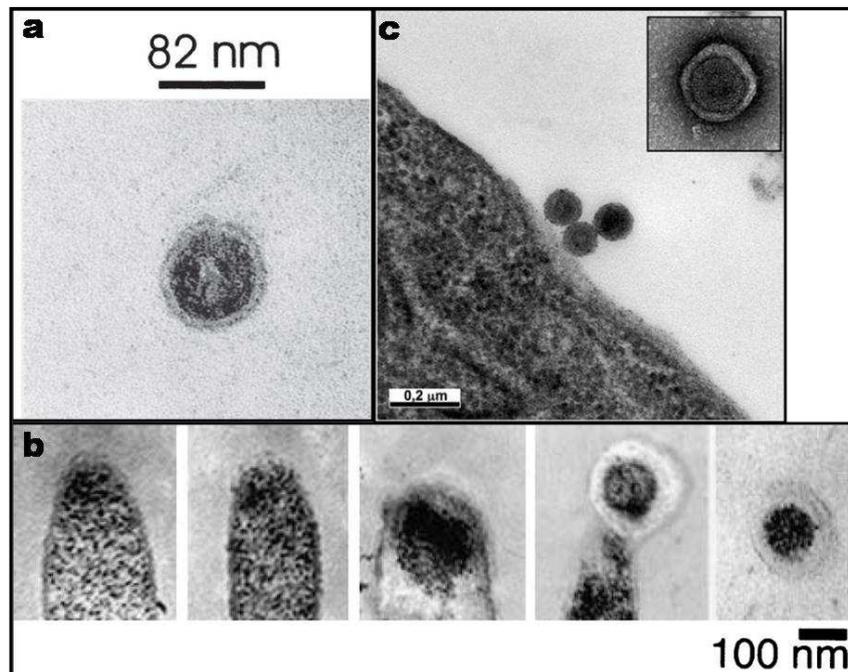


Figure 39. Des virus de morphotype vésiculaire et la production de vésicules de bactéries thermophiles visualisées en microscopie électronique à transmission (coloration négative): a) photo de VLP à morphotype vésiculaire dans un échantillon brut de source hydrothermale (Little Hot Creek en Californie) par Breitbart et collaborateurs (d'après Breitbart *et al.* 2004); b) production de vésicules dans des sources hydrothermales terrestres de Nakanoyu en Japon par des bactéries logeant dans des mats de soufre (d'après Chiura *et al.* 2002); c) rétrovirus de rongeur par Roingard et collaborateurs (d'après Roingard 2008).

Dans le surnageant de l'enrichissement de l'échantillon PFJ2, sur milieu Niederberger cultivé à 70°C, des particules filamenteuses ont pu être observées (Figure 40 a-d). Ces particules varient en longueur entre 100 nm et environ 175 nm, et ont une largeur approximative de 35 nm avec un aspect flexible. Elles paraissent être composées de constituants simples (mis en évidence par la flèche dans la Figure 40 c) tassés en répétition et formant ainsi des corps filamenteux. Ces structures ne ressemblent à aucun type de virions connus. Les virus filamenteux des procaryotes (hyper)thermophiles sont en général formés de sous unités protéiques capsidiques plus petites et entassées de manière plus dense, donnant un aspect général plus « lisse » lorsqu'ils sont observés en microscopie. Les rudivirus font généralement une vingtaine de nanomètre de largeur (Prangishvili *et al.*, 1999; Vestergaard *et al.*, 2005), à part TTV4 qui fait 35 nm de largeur (Zillig *et al.*, 1996), et sont rigides. L'Aeropyrum coil-shaped virus (ACV) est également rigide fait environ 30 nm de largeur (Mochizuki *et al.*, 2012). Les lipothrixvirus sont des virus flexueux dont la largeur varie entre 20 nm et 40 nm (Janekovic *et al.*, 1983), et sont enveloppés (Prangishvili & Garrett, 2005). Les inovirus, qui infectent généralement des procaryotes non extrêmophiles, sont souvent très long (800 nm - 2000 nm) et peu larges (environ 6 nm), ainsi que flexueux

(Marvin, 1998). Aucune morphologie correspondant à ces morphotypes viraux ne semble donc correspondre aux caractéristiques observées sur la particule de l'enrichissement PFJ2. Ce type de morphologie ne paraît pas être non plus rencontrée chez des virus d'eucaryotes (Ruigrok *et al.*, 2011; Stubbs & Kendall, 2012). Parmi les virus infectant les animaux, le morbillivirus des *Paramyxoviridae* (virus de la rougeole) présente des virions flexibles et d'aspect « en dents de scie » (Ruigrok *et al.*, 2011) (Figure 41) se rapprochant éventuellement le plus de la structure observée dans l'enrichissement PJJ2. La taille et l'aspect des structures issues de l'échantillon PJJ2 suggèrent qu'il pourrait s'agir d'un nouveau type de morphologie virale, même si la possibilité d'agrégation de protéines d'organites cellulaires, comme des constituants de flagelle, ne peut pas être écartée.

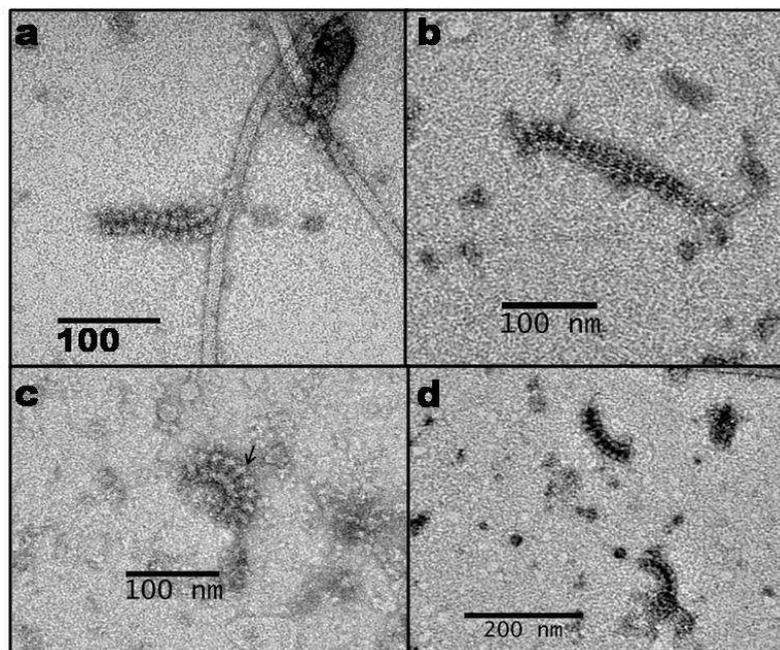
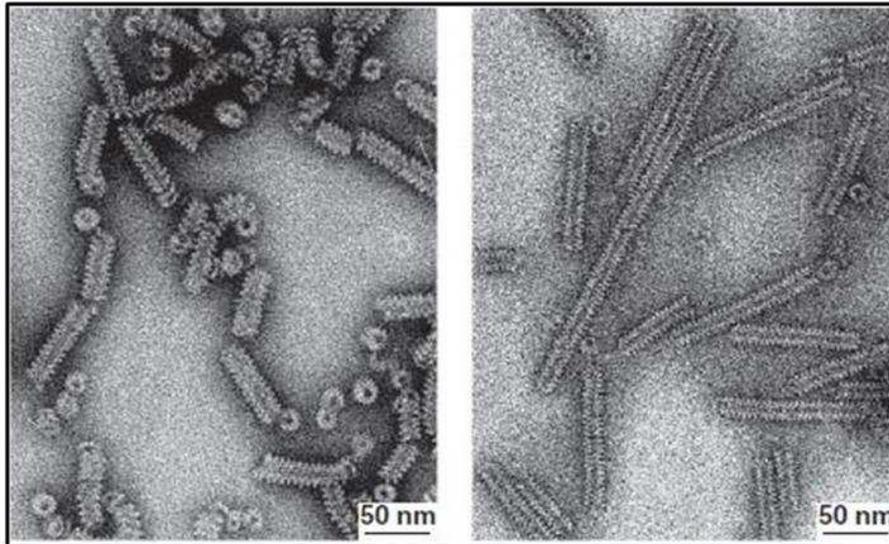


Figure 40. Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) dans la culture d'enrichissement PFJ2, sur milieu Niederberger à 70°C (a - d).



**Virus de la rougeole**

Figure 41. Photos de morbillivirus prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative). Sur la photo de gauche, des capsides intactes sont présentes et sur la photo de droite, des capsides digérées avec de la trypsine peuvent être observées (d'après Ruigrok *et al.* 2011).

Quatre particules partageant des traits communs ont été identifiées dans l'enrichissement SP11, sur milieu Ravot modifié à 70°C (Figure 42 a-c). La Figure 42 a), présente une particule globuleuse, anguleuse, de 50 nm de diamètre, à laquelle est associée une série de cinq anneaux, eux-mêmes rattachés à un filament d'approximativement 520 nm longueur et 7 nm de largeur. Les anneaux succèdent à une structure cylindrique d'environ 25 nm de large et 40 nm de longueur (indiquée une flèche bleue) reliant les anneaux à la tête angulaire. Les anneaux font environ 15 nm de largeur et, tassés l'un après l'autre, 30 nm de longueur (indiqués par une flèche noir).

Une particule de morphologie assez similaire peut être observée dans La Figure 42 b). Elle diffère notamment par la disparition de partie anguleuse. Cette VLP putative paraît divisée en trois parties : une structure en forme corps tubulaire, lui-même attaché à une pièce cylindrique intermédiaire, suivi d'un long filament de 665 nm de longueur sur lequel sont positionnés des anneaux identiques à ceux précédemment décrits à proximité de la pièce intermédiaire. Le corps cylindrique (indiqué par une flèche bleue), dont les dimensions sont de l'ordre de 40 nm de largeur et 55 nm de longueur, est prolongé par une structure tubulaire dont le diamètre oscille entre 35 nm et 25 nm de largeur (à la partie apicale) et de 115 nm de longueur environ. La structure tubulaire semble être attachée à une structure globuleuse qui pourrait s'apparenter à une vésicule d'environ 60 nm de diamètre avec un centre clair.

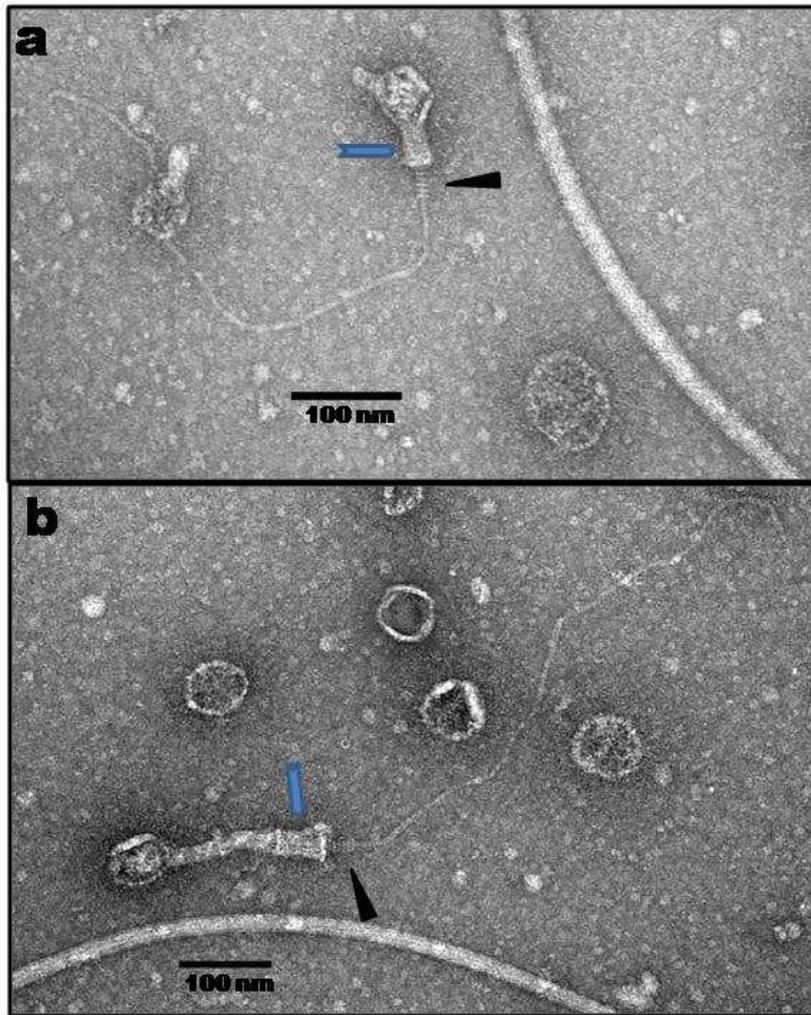


Figure 42. Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) dans le surnageant de la culture d'enrichissement SP11, sur milieu Ravot à 70°C (a - b). Les flèches noires indiquent les structures en anneaux, les flèches bleues indiquent le corps cylindrique. Les dimensions et les morphotypes des différentes particules sont résumés dans le Tableau 21.

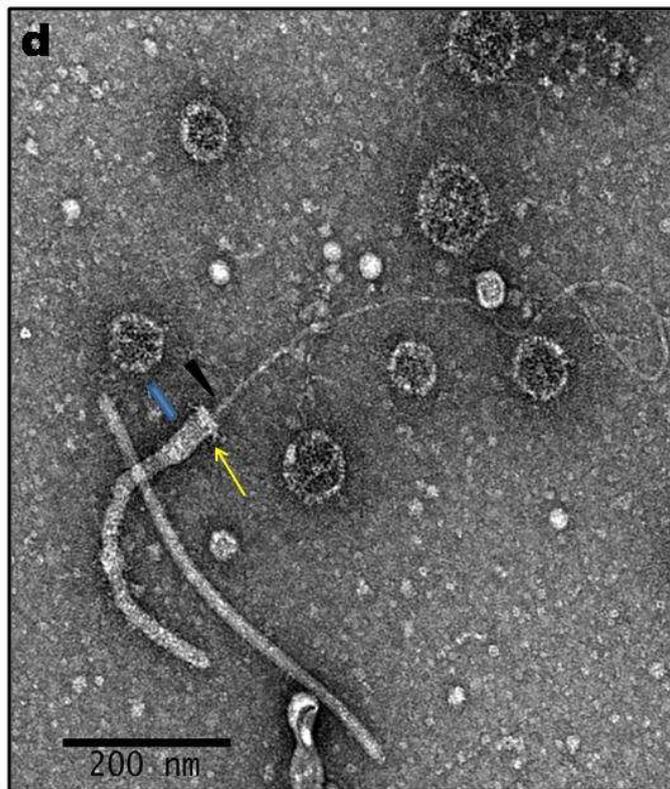
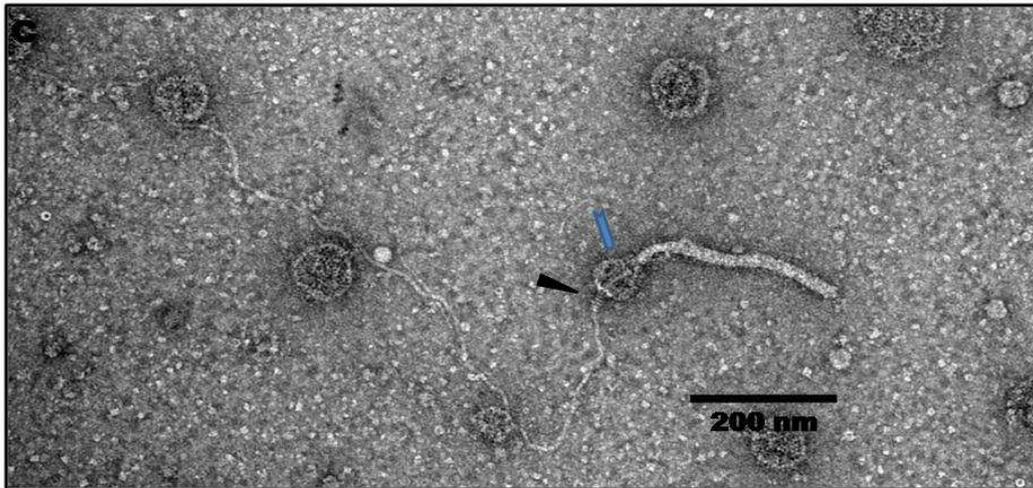


Figure 42 (suite). Photos de VLP prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative) dans le surnageant de culture de l'enrichissement SP11, sur milieu Ravot à 70°C (c - d). Les flèches noires indiquent les structures en anneaux, les flèches bleues indiquent le corps cylindrique et la flèche jaune désigne des spicules sur la « couronne ». Les dimensions et les morphotypes des particules sont détaillés dans le Tableau 21.

Source	Milieu/Température	Morphologie des cellules	Morphologie de VLP	Dimensions de VLP	Référence de la photo
SP 11	Ravot modifié/70°C	Bâtonnets	Inconnue	Ø (capside) = 50 nm  corps cylindrique = 40 nm x 25 nm anneaux = 30 nm x 15 nm filament = 7 nm x 520 nm	Figure 42 a
			Inconnue	structure tubulaire = 115 nm x 25 nm  corps cylindrique = 40 nm x 55 nm anneaux = 30 nm x 15 nm filament = 7 nm x 665 nm	Figure 42 b
			Inconnue	Ø (bulbe) = 70 nm  tige = 290 nm x 15 nm anneaux = 30 nm x 15 nm filament = 7 nm x 2400 nm	Figure 42 c
			Inconnue	corps cylindrique = 65 nm x 30 nm structure tubulaire = 375 nm x 25 nm  anneaux = 30 nm x 15 nm filament = 7 nm x 805 nm épis = 20 nm x 4 nm	Figure 42 d

Tableau 21. Différents morphotypes et dimensions de VLP observés dans la culture d'enrichissement SP11.

La troisième particule, quoique différente, présente des similitudes morphologiques avec les deux premières (Figure 42 c). Elle se compose d'une partie apicale allongée comme la deuxième particule, possède un très long filament (environ 2400 nm) qui supporte une fois de plus une série d'au moins 5 anneaux de 15 nm de largeur. Le filament et les anneaux sont reliés à la structure tubulaire (15 nm de largeur et 290 nm de longueur) par l'intermédiaire d'une sorte de bulbe (de 70 nm de diamètre qui remplacerait la pièce cylindrique observée sur les VLP 1 et 2 (Figure 42 a et b). Il subsiste pourtant un doute sur cette structure car on ne peut pas écarter la possibilité que ce dernier puisse être un fragment de flagelle qui serait venu se coller sur la VLP. Néanmoins, son aspect flexueux serait atypique pour un fragment de flagelle. La rareté de ce type de VLP fait qu'il est quasiment impossible de conclure à ce stade des observations.

Une quatrième particule présente également cinq anneaux à l'identique des VLP précédentes (Figure 42 d). Elle est aussi prolongée par un filament de la même largeur, mais dont la longueur diffère puisque mesurée à environ 805 nm. Les anneaux semblent être une fois de plus associés à un corps cylindrique d'environ 30 nm de largeur et 65 nm de longueur. Ce corps cylindrique est prolongé, comme la particule observée dans la Figure 42 b), par une structure tubulaire d'environ 25 nm de largeur et 375 nm de longueur. A la différence des

trois VLP précédentes, cette particule présente une particularité unique : elle semble porter une couronne de spicules (indiquée par une flèche jaune) à l'extrémité du corps cylindrique à proximité des anneaux. Ces spicules font environ 4 nm de largeur et 20 nm de longueur.

Quoique d'allure distincte, ces quatre VLP partagent des traits communs. A ma connaissance, elles présentent également la particularité de ne ressembler à aucun virus déjà décrits dans la littérature. Les caractéristiques communes portent sur la présence d'un système d'anneaux attachés à un filament de même épaisseur, mais variant en longueur. Si ces VLP sont de nature virale, on pourrait penser que l'ensemble filament et anneaux constitue la partie virion qui entre en contact avec la cellule hôte. L'autre extrémité pourrait correspondre à l'équivalent de la capsid. En suivant cette hypothèse, les différences architecturales observées chez ces quatre particules pourraient alors s'expliquer essentiellement de deux manières : soit une déformation de cette capsid, qui pourrait apparaître parfois sphérique ou au contraire allongée sous la contrainte du traitement ou alors parce que celle-ci réagit comme le font les myovirus, soit il s'agit en fait d'un artefact d'observation correspondant à l'association stochastique du virion à des débris cellulaires.

La littérature rapporte de nombreux exemples de déformation de virion suite aux traitements chimiques ou mécaniques de purification. Les virions peuvent également changer d'apparence suite à des changements d'osmolarité. Par exemple, une osmolarité plus élevée que celle requise pour la croissance de la souche-hôte (GE23) du virus hyperthermophile PAV<sub>1</sub>, engendre la formation de particules virales tubulaires, allongées, comparativement aux particules virales fusiformes habituellement observées (Figure 43) (Geslin *et al.*, 2003a). Parmi les modifications morphologiques de la capsid s'effectuant à l'extérieur de la cellule-hôte, l'exemple le plus étudié est sans doute celui des myovirus. Les myovirus connaissent une modification structurale de la partie caudale du virion lorsqu'ils entrent en contact avec la cellule hôte. La gaine extérieure se contracte la rendant plus épaisse et simultanément le tube central se projette vers la cellule de manière à provoquer l'injection du génome viral (King *et al.*, 2011).

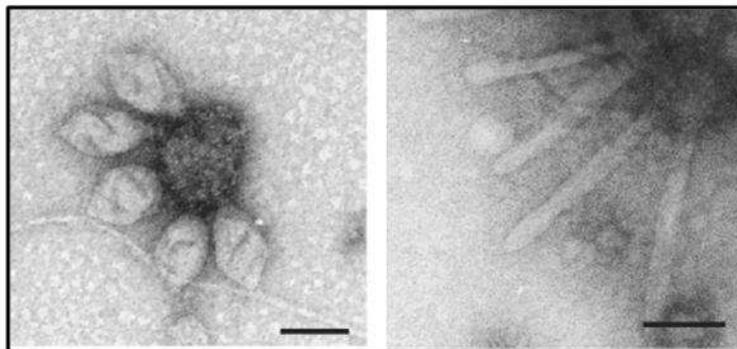


Figure 43. Photos de capsides de PAV<sub>1</sub> prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative). Sur la photo de gauche figurent des capsides intactes. Sur la photo de droite peuvent être observés des virions allongés suite à des conditions osmotiques défavorables. La barre représente 100 nm (d'après Geslin *et al.* 2003a)

Un autre exemple exceptionnel concerne l'archéovirus hyperthermophile *Acidianus* two-tailed virus (ATV). Ce virus est fusiforme, mais développe deux protrusions distales lorsque celui-ci se trouve à l'extérieur de la cellule-hôte et à des températures plus basses que la température optimale de croissance de l'hôte (Figure 44) (Haring *et al.*, 2005).

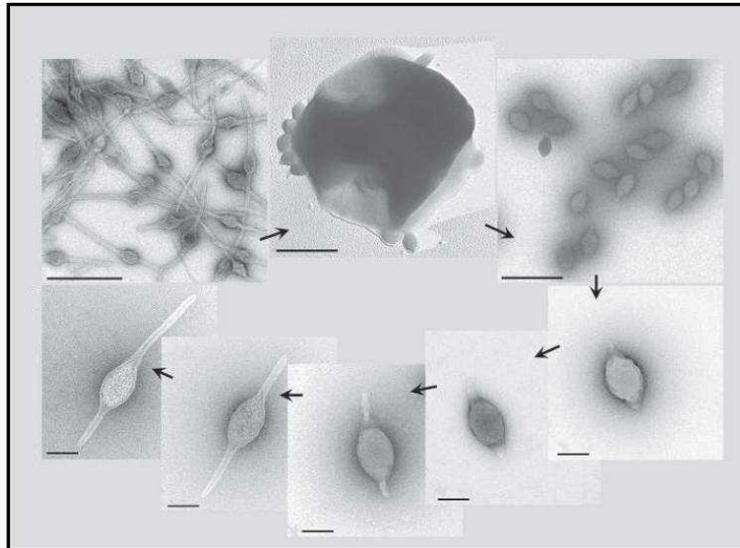


Figure 44. Photos de microscopie électronique à transmission (coloration négative) de capsides du virus ATV. Le virus fusiforme développe des protrusions à l'extérieur de la cellule et présente ainsi une plasticité morphologique remarquable. La barre représente dans les trois photos supérieures 500 nm et la barre des cinq photos en partie basse représente 100 nm (d'après Häring *et al.* 2005)

Les virus peuvent être également associés à des débris divers. Une culture peut contenir des protéines, des sucres, des sels, des débris cellulaires *etc.* qui peuvent interférer avec les observations en MET (Ackermann & Tiekotter, 2012). Ainsi, dans notre cas, il est possible que le pseudo virion soit en réalité composé d'au moins la partie filamenteuse associée aux anneaux et de la partie cylindrique d'où semble sortir les anneaux. Cette structure peut être alors associée à des débris divers, comme des fragments de flagelle (comme cela pourrait être le cas de la particule observée en Figure 42 c), ou des vésicules déformées (Figure 42 b), ou de petite taille (Figure 42 a).

Le filament, prolongeant les anneaux, est observé dans les quatre VLP photographiées dans l'enrichissement SP11. Si sa largeur, de l'ordre de 7 nm, ne varie pas entre les différentes VLP, sa longueur, en revanche varie. Sa faible largeur et sa longueur changeante suggèrent que cette structure pourrait être dénaturée ou correspondre à un élément viral expulsé lors de sa préparation. Ceci n'est pas sans rappeler les phénomènes d'expulsion de l'ADN génomique viral sous certaines conditions osmotiques (Jeembaeva *et al.*, 2008; Evilevitch *et al.*, 2011). En microscopie à épifluorescence, ceci peut se traduire par la présence de petits points lumineux, correspondants aux capsides, prolongés par des filaments fluorescents, correspondant aux génomes partiellement éjectés de chaque

capside (Gunnar Bratbak, communication personnelle). Toutefois, l'ADN n'aurait pas l'apparence, après coloration à l'acétate d'uranyle, que présente les filaments observés au niveau des quatre particules décrites ci-dessus (Gunnar Bratbak ; Paolo Tavares ; Rudi Lurz, communications personnelles). L'ADN viral aurait une apparence sombre, comme dans les photos de l'ADN du phage  $\phi 29$  de *B. subtilis*, visualisé par MET par Grimes et Anderson (Figure 45) (Grimes & Anderson, 1997).

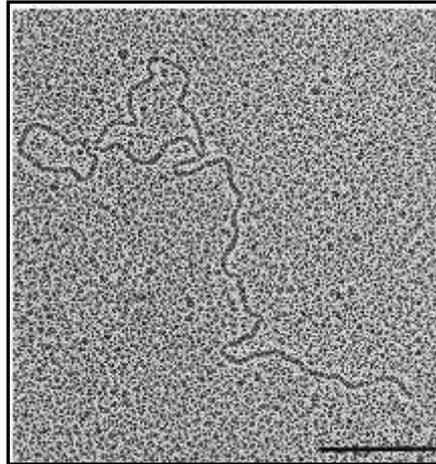


Figure 45. Photo de l'ADN du phage  $\phi 29$  de *Bacillus subtilis* prise à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative à l'acétate d'uranyle). La barre représente 250 nm (d'après Grimes et Anderson 1997)

Le filament serait alors plutôt de nature protéique, ou nucléoprotéique (Gunnar Bratbak ; Paolo Tavares ; Rudi Lurz, communications personnelles). Il existe de nombreuses observations de virions associés à des structures filamenteuses. Prestel et collaborateurs (Prestel *et al.*, 2012) ont découvert et caractérisé, dans des échantillons provenant du désert du Sahara, un phage proche du type siphovirus, dont l'extrémité de la queue est très flexible, formant une morphologie en « ruban » (Figure 46). Les auteurs suggèrent qu'il pourrait s'agir d'une modification de la queue permettant la reconnaissance de l'hôte, substituant les fibres caudales qui pourraient représenter des structures trop fragiles dans l'environnement extrême où ces phages ont été trouvés.

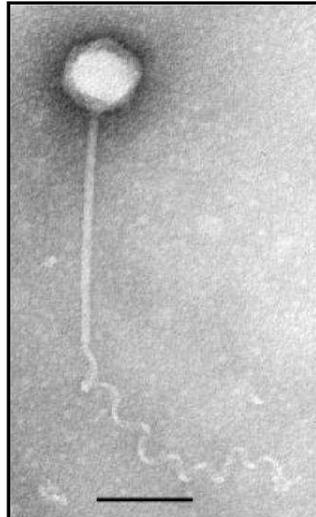


Figure 46. Photo du phage Sol P11 prise à l'aide d'un microscope électronique à transmission (après coloration négative). La queue de ce siphovirus a une morphologie surprenante en « ruban ». La barre représente 100 nm (d'après Prestel *et al.* 2012)

Les nucléoprotéines virales peuvent également former des structures qui peuvent apparaître filamenteuses lors des observations en MET. Chez les virus infectant les animaux, notamment les *Rhabdoviridae*, les *Filoviridae*, les *Bunyaviridae*, les *Arenaviridae* et les *Orthomyxoviridae*, les nucléoprotéines peuvent s'associer pour former des structures hélicoïdales avant la maturation des capsides (Figure 47) (Ruigrok *et al.*, 2011).

Si la coloration de ces ensembles nucléoprotéiques paraît assez semblable à celle des filaments des VLP observées l'enrichissement SP11, ils ont cependant un aspect compact qui ne correspond pas à ce qui peut être observé sur les photos de l'enrichissement SP11. Parmi les virus de crenarchées hyperthermophiles, le virus ACV d'*Aeropyrum pernix* présente une capside de morphologie cylindrique, formée d'un filament nucléoprotéique doublement enroulé sur elle-même (Mochizuki *et al.*, 2012). Lorsque la capside est rompue, le filament se débobine et forme des filaments qui ressemblent à ceux qui sont observés dans l'enrichissement SP11 (Figure 48).

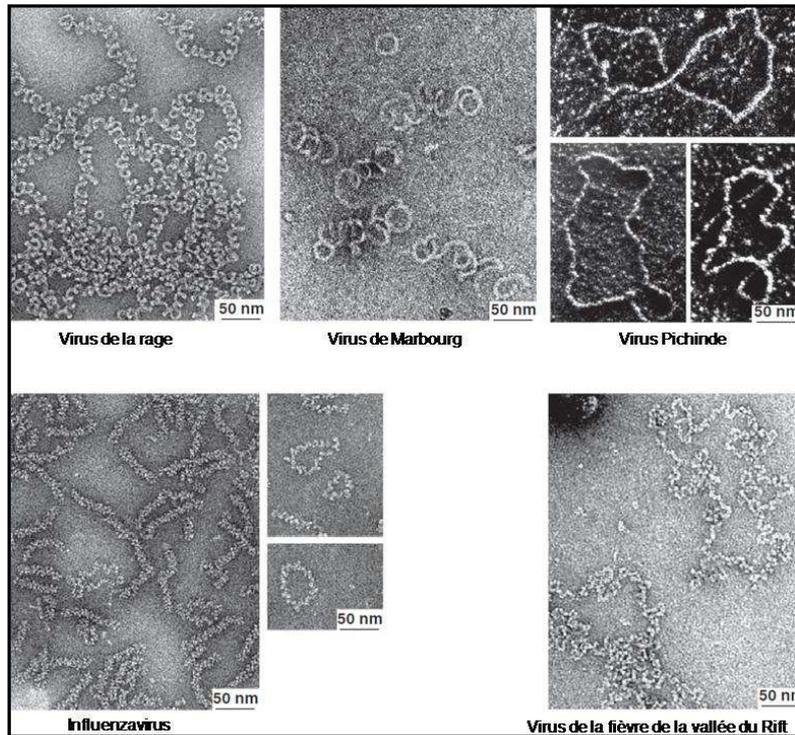


Figure 47. Photos de nucléocapsides de virus d'animaux prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission de différents virus animaux. Les nucléocapsides immatures s'assemblent pour former des structures apparaissant filamenteuses en MET. Les virus sont colorés négativement, à l'exception du virus de Pichinde qui est ombré (d'après Ruigrok *et al.* 2011).

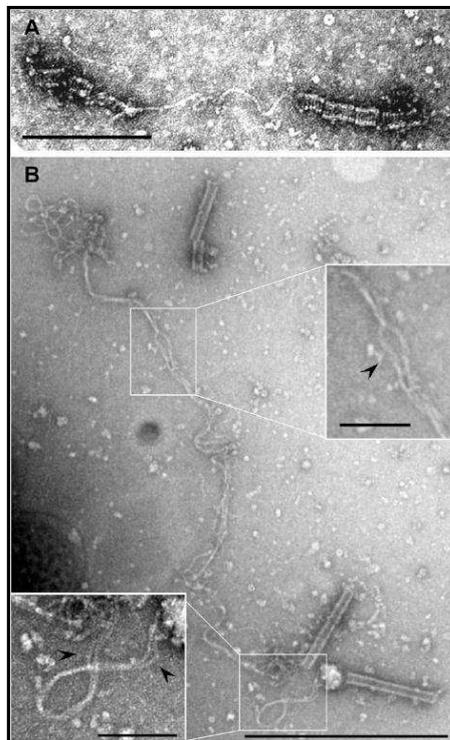


Figure 48. Photos du virion du virus ACV prises à l'aide d'un microscope électronique à transmission. Les filaments nucléoprotéiques constituant le virion sont visibles dans des particules rompues (a), se dissociant occasionnellement l'un de l'autre (b). Les flèches indiquent les points de dissociation des filaments nucléoprotéiques. La barre représente 200 nm (a) et 500 nm (b) (d'après Mochizuki *et al.* 2012).

Des fibres probablement de nature nucléoprotéique ont également été constatées chez le virus hyperthermophile PSV (*Pyrobaculum* spherical virus), par Häring et collaborateurs (Haring *et al.*, 2004) (Figure 49). Les auteurs ont noté la présence de filaments de 6 nm de largeur sortant des virions rompus. Ces filaments forment alors deux fibres formant des boucles. Une analyse de Fourier a révélé une périodicité d'environ  $(2.8 \text{ nm})^{-1}$  dans ces filaments (Haring *et al.*, 2004). La longueur des filaments n'est pas précisée, mais dépend probablement du degré de déroulement des fibres nucléoprotéiques. Ceci pourrait expliquer la longueur inhabituelle (2400 nm) du filament de la particule de la Figure 42 c).

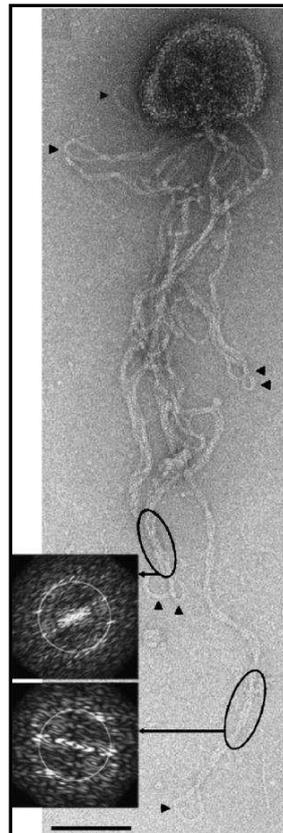


Figure 49. Photo de microscopie électronique du virus PSV en coloration négative. Le virus est rompu et des filaments nucléoprotéiques sortent du virion. Une périodicité d'environ  $(2.8 \text{ nm})^{-1}$  est mise en évidence. Les flèches indiquent les boucles que forment ces filaments. La barre représente 100 nm (d'après Häring *et al.* 2004).

Le milieu Ravot est couramment utilisé au laboratoire pour la croissance des *Thermotogales* et des *Thermococcales*. Ce milieu (Ravot *et al.*, 1995), et sa version modifiée (Postec *et al.*, 2010), ont été mis en œuvre pour la croissance des *Thermotogales*. Le milieu Ravot a également été utilisé par Geslin et collaborateurs dans notre laboratoire pour des enrichissements de *Thermococcales*, afin de cribler pour la présence de VLP associées à ces derniers (Geslin *et al.*, 2003b). Prenant en compte la diversité des VLPs observées dans les enrichissements de *Thermococcales*, mais le faible nombre de virus décrits chez les

*Thermococcales* (les deux seuls virus ayant été caractérisés également dans notre laboratoire), ainsi que l'absence de virus décrits chez les *Thermotogales* à ce jour, les enrichissements faits avec le milieu Ravot modifié ont été criblés pour la présence de VLP afin d'en découvrir davantage.

Les enrichissements SP<sub>1</sub>, SP<sub>3</sub>, SP<sub>09</sub> et SP<sub>11</sub> mis à 70°C, analysés au microscope à contraste de phase et électronique à transmission, semble être tous peuplés par des *Thermotogales*. Cette impression repose sur l'observation de cellules présentant une morphologie en forme de bâtonnet, mobiles et prolongées par des membranes appartenant vraisemblablement à la toge.

Les enrichissements SP<sub>3</sub> mis à 80°C, analysés au microscope à contraste de phase et électronique à transmission, semble être composés par des *Thermococcales*. Les cellules observées sont en forme de coques uniques et mobiles. La ciliature lophotriche, identifiée en MET, est une des caractéristiques des *Thermococcales* (Bertoldo & Antranikian, 2006). La présence de « virus-like vesicles », décrites uniquement chez les *Thermococcales* (Soler *et al.*, 2008; Soler *et al.*, 2011) suggère que les coques cultivés dans les enrichissements appartiennent à l'ordre des *Thermococcales*. La présence de ces vésicules dans le surnageant de l'enrichissement SP<sub>1</sub> à 70°C suggérerait également la croissance de *Thermococcales* au sein des *Thermotogales*.

Lors des tentatives de culture d'*Ignisphaera aggregans*, détecté dans les enrichissements réalisé sur le milieu décrit par Niederberger et collaborateurs (Niederberger *et al.*, 2006) avec l'échantillon PFJ 2, une croissance microbienne a été constatée uniquement à 70°C. Des cellules en bâtonnet peuvent être observées. Il faudrait, cependant, poursuivre par des études moléculaires la caractérisation des populations microbiennes pour identifier ces dernières, les caractéristiques morphologiques n'étant pas assez distinctives pour permettre leur identification.

## **2.3. La diversité des VLP dans les isolats anaérobies**

### **2.3.1. Le criblage des souches de *Thermococcales***

Six souches de *Thermococcales* ont pu être isolées à partir d'un des enrichissements de SP<sub>1</sub> à 80°C sur le milieu Ravot modifié. Les analyses phylogénétiques ont montré que tous ces isolats partageaient 99 % de similarité de séquence ADN<sub>r</sub> 16S avec *Thermococcus fumicolans*. Ces 6 isolats, auxquels il faut ajouter 6 autres préalablement isolés au

laboratoire par M. Ciobanu à partir de la source SP11 bis, ont émis un signal positif en ME sans avoir eu besoin de traiter les cultures à la mitomycine C, afin d'induire l'expression d'un hypothétique virus lysogène.

L'observation en MET a permis de conclure à une absence de virus dans tous les cas, et ce malgré un signal positif en épifluorescence. Toutefois, l'observation en MET a révélé la présence de vésicules dans toutes ces cultures.

Le diamètre de ces vésicules varie entre 100 nm et 160 nm (pour exemple, se référer à la Figure 50). Des morphologies allongées et tubulaires, comme précédemment observées dans l'enrichissement SP3 à 70°C, sont présentes. Ces structures tubulaires font 75nm de largeur et 550 nm de longueur (Figure 50 b).

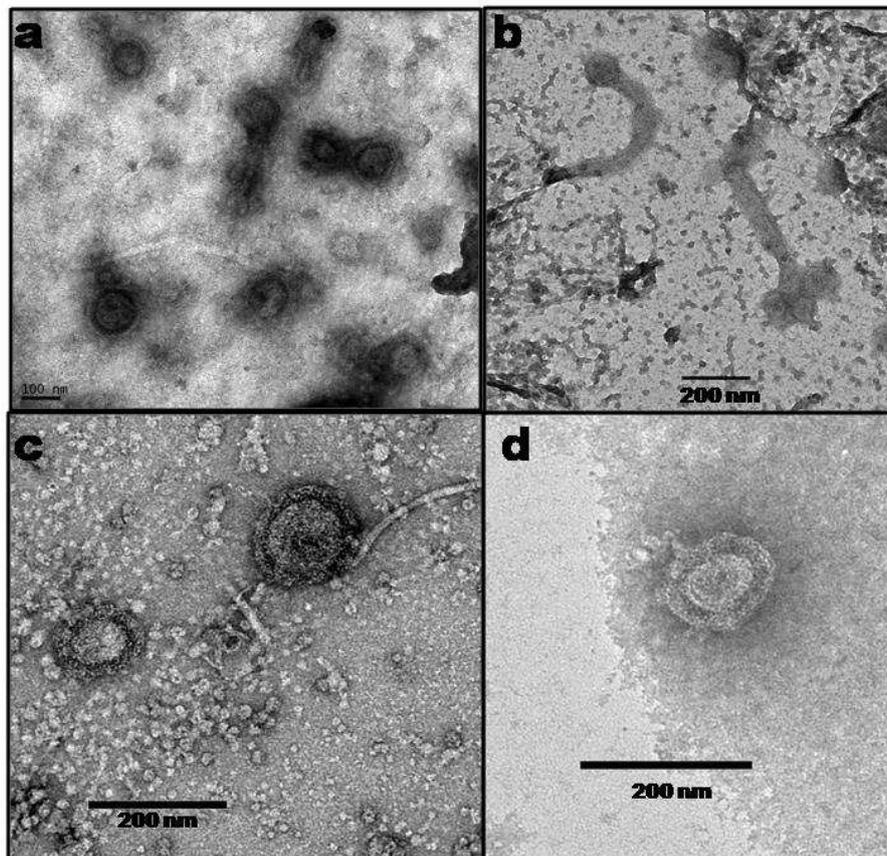


Figure 50. Photos de vésicules colorées négativement en microscopie électronique à transmission : a) Plusieurs vésicules sont visibles dans la souche MC9 ; b) des formes allongées/tubulaires ont été observées dans la souche MC9 ; c) des vésicules de taille différente sont présentes dans la souche MC8 ; d) une vésicule avec un noyau bien contrasté est observable dans la souche MC5.

L'ordre des *Thermococcales* comporte une famille, les *Thermococcales*, elle-même divisée en trois genres : *Thermococcus*, *Paleococcus* et *Pyrococcus* (base de données NCBI). Depuis la recherche de virus associés aux archées de cette famille au début des années 2000, des travaux récents ont rapportés l'existence commune de ce type de vésicules,

notamment chez différentes espèces des genres *Thermococcus* (*T. kodakaraensis*, *T. gammatolerans* et *T. nautilus*) et des espèces de *Pyrococcus* (*P. horikoschii*) (Soler et al., 2008; Gaudin et al., 2012). Soler et collaborateurs ont découvert des vésicules dans 26 souches sur 34 (Soler et al., 2008). Lors d'une autre étude faite dans notre laboratoire, des cellules d'une souche du genre *Palaeococcus sp.* isolée dans une source hydrothermale profonde a pu être observée en MET et parmi ces cellules, des vésicules ont pu être identifiées. Ces « virus-like vesicles » ont été renommées récemment « membrane vesicles » (Gaudin et al., 2012). Une étude a pu démontrer que ces vésicules membranaires sont produites par la membrane cellulaire contenant la protéine OppA. Cette protéine est impliquée dans le métabolisme peptidique et les vésicules pourraient ainsi jouer un rôle dans l'acquisition des peptides. Les vésicules sont également capables de véhiculer de l'ADN, dont des plasmides. L'ADN étant protégé de la thermodégradation, ces vésicules membranaires ne présenteraient un nouveau mécanisme d'échange génétique (Soler et al., 2008; Gaudin et al., 2012).

Au-delà du simple fait que nos analyses permettent d'ajouter l'espèce *fumicolans* à la longue liste des espèces de *Thermococcales* productrices de « membrane vesicles », confirmant ainsi le caractère très commun de ce type de production, ceci pointe toute la difficulté d'utiliser la ME comme méthode d'approche de l'abondance virale dans les échantillons issus des écosystèmes chauds.

### 2.3.2. L'étude des VLP de *Thermosipho africanus*

Parmi les souches de Thermotogales criblées pour la présence de VLP, un signal faible a été détecté en microscopie à épifluorescence dans la souche MC 6, appartenant à l'espèce bactérienne *Thermosipho africanus* et qui a été isolée au laboratoire par M. Ciobanu à partir de la source chaude côtière SP11 bis qui jouxte la source SP11 étudiée dans le paragraphe précédent. Afin de confirmer la présence de ce signal, cette souche a été soumise à un traitement à la mitomycine C [ $1 \mu\text{g/ml}$ ]<sub>finale</sub> afin d'induire un éventuel virus. L'induction a effectivement permis de confirmer la présence d'un signal de fluorescence plus importante laissant présager l'existence d'un virus. Après centrifugation différentielle pour culotter les cellules, le surnageant de culture a été analysé par MET pour rechercher la présence de VLP.

C'est ainsi que différentes formes de VLP ont pu être observées (Figure 51 a-c).

Site d'isolement	Souche	Espèce	Morphologie de VLP	Dimensions de VLP	Référence de la photo
Saint Paul (SP11 bis)	MC 6	<i>Thermosipho africanus</i>	Inconnue	bulbe = 65 nm x 75 nm anneaux = 30 nm x 15 nm filament = 7 nm x 850 nm	Figure 51 a
			inconnue	bulbe = 65 nm x 55 nm corps cylindrique = 20 nm x 35 nm anneaux = 30 nm x 15 nm filament = 7 nm x 3500 nm	Figure 51 b
			inconnue	Ø (bulbe) = 50 nm corps cylindrique = 40 nm x 25 nm anneaux = 30 nm x 15 nm filament = 7 nm x 520 nm tige = 260 nm x 20 nm	Figure 51 c

Tableau 22. Différents morphotypes et dimensions de VLP observés en MET dans les surnageants de la culture de la souche MC 6, *Thermosipho africanus*.

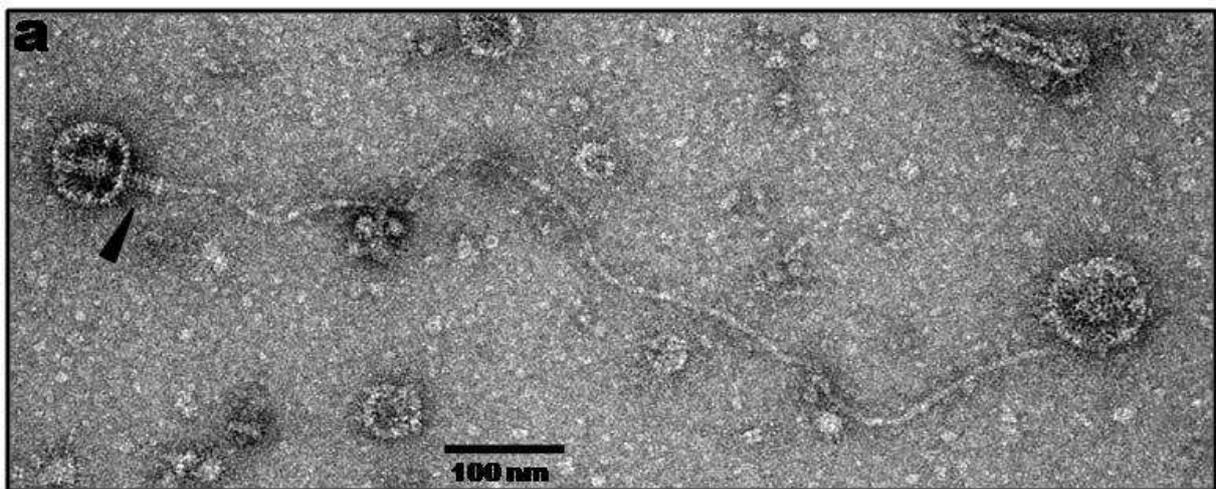


Figure 51. Photos de VLP (colorés négativement) visualisées au microscope électronique à transmission dans la souche MC 6, *Thermosipho africanus*. Les pointes de flèche noire indiquent les structures en anneaux, les pointes de flèche bleue indiquent le corps cylindrique. Les dimensions des particules sont résumées dans le Tableau 22.

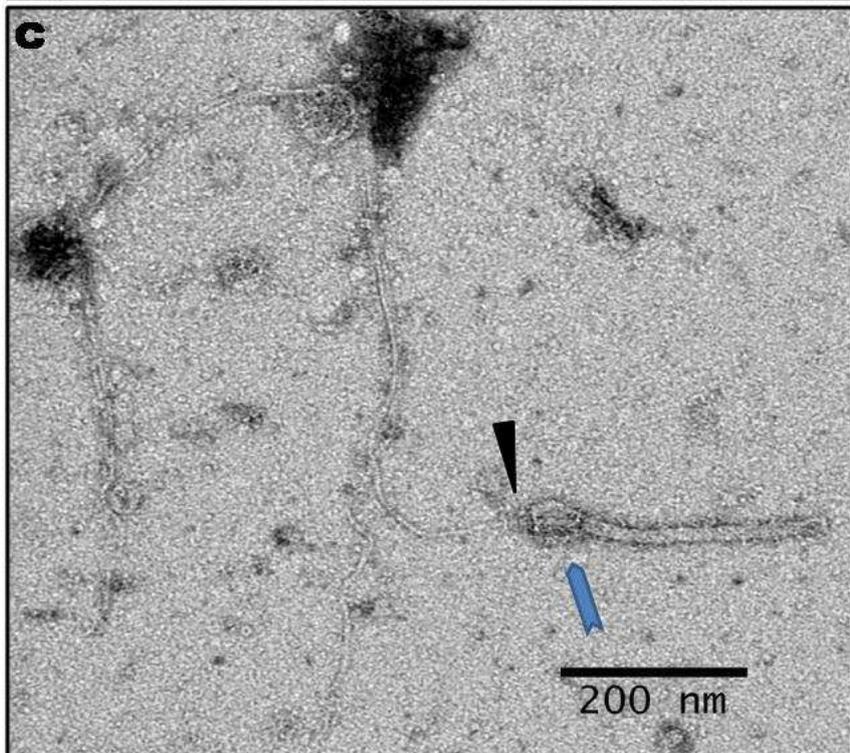
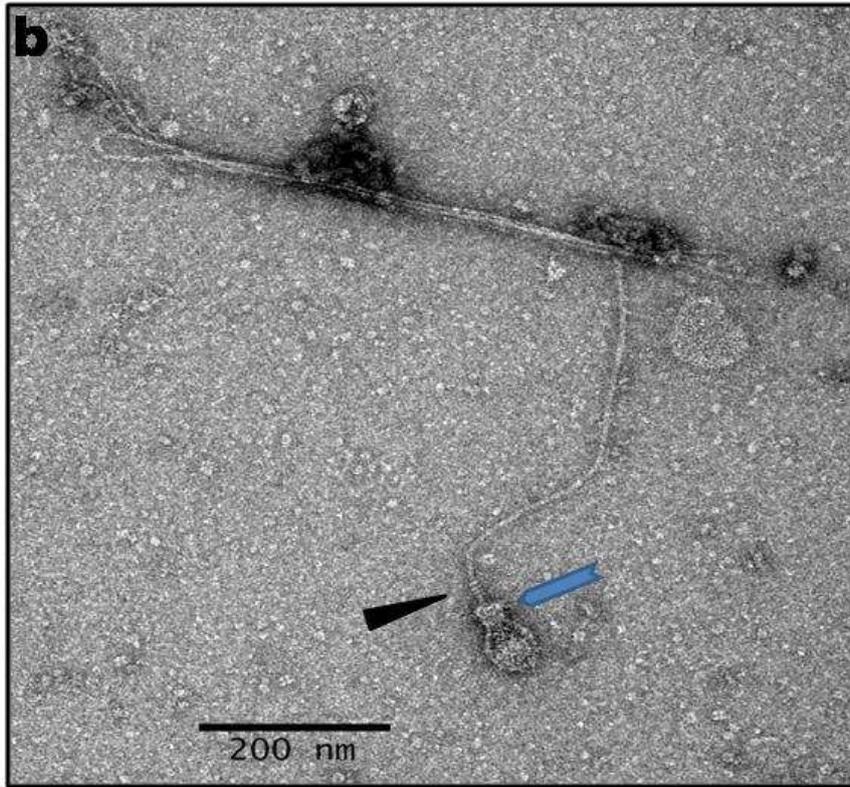


Figure 51 (suite).

Deux des particules photographiées (Figure 51 a et b) partagent une architecture générale similaire, globalement sphérique associée à une série de 5 anneaux, reliés à un filament de taille variable. La troisième particule (Figure 51 c) diffère des deux premiers par la présence d'un corpuscule allongé, ce qui rappelle tout à fait la VLP de la Figure 42 c) décrite dans le paragraphe précédent et observée dans la culture d'enrichissement de l'échantillon SP 11, faite sur le même milieu à 70°C.

La première VLP (Figure 51 a) présente une architecture globulaire avec une tête de l'ordre de 75 nm de largeur et 65 nm de longueur. Cette tête paraît constituée de différents éléments si l'on en juge par les différences de contraste entre la partie périphérique et le centre qui est occupé par une sorte de cylindre. A l'image d'un bilboquet, cette structure sphérique est surmontée par l'association d'une série de 5 anneaux. Ces 5 anneaux, de mêmes dimensions que ceux décrits précédemment au niveau des VLP observées dans l'enrichissement SP11, donnent l'impression d'être une prolongation extérieure de la structure tubulaire visible au centre de la sphère. Le filament attaché à ces anneaux a une largeur de 7 nm et une longueur de 850 nm.

La deuxième VLP (Figure 51 b) a une morphologie composée de trois parties : une tête en forme de bulbe ovoïde, d'approximativement 55 nm de largeur et 65 nm de longueur, prolongée d'une partie cylindrique d'environ 35 nm de largeur et 20 nm de longueur, elle-même attachée à 5 anneaux identiques à ceux décrits précédemment. Cette VLP fait tout à fait penser à une ampoule électrique à culot vissable. Là encore, il semble que les anneaux se prolongent par un filament de 7 nm de largeur de longueur très importante, environ 3 500 nm.

Enfin, la troisième particule (Figure 51 c), présente une architecture différente constituée à nouveau de trois parties dont seule la partie « tête » diffère vraiment des précédentes. Au lieu d'être globuleuse ou sphérique, cette tête est allongée. Ses dimensions sont d'environ 20 nm de large et 260 nm de long. La partie cylindrique attachée à la tête se prolonge sur 50 nm de longueur, faisant environ 55 nm de largeur. Le filament, attaché aux anneaux, fait 7 nm de large et 3200 nm de long.

L'observation de ces VLP dans la culture de *Thermosipho africanus* isolé de la source SP11 bis conforte les observations réalisées précédemment au niveau des cultures d'enrichissement des échantillons de la source SP11, en milieu Ravot, dédié à la croissance des *Thermotogales* et des *Thermococcales*. La similitude de morphologie qui caractérise ces différentes VLP indique bien que dans les enrichissements nous avons certainement réussi à cultiver des *Thermotogales*. Ceci concorde d'ailleurs bien avec l'observation concomitante de cellules à toga.

S'il peut être admis que ces particules sont associées à des *Thermotogales*, il n'est cependant pas possible d'affirmer avec certitude que ces particules soient des virus. La possibilité que ces structures ne soient que des organites cellulaires de *Thermotogales* ne

peut pas être écartée. Parmi les observations effectuées en MET lors du criblage pour la présence de VLP dans ces échantillons, des fragments de flagelle ont pu être photographiés. La mobilité, et les organelles le permettant, de *Thermosipho africanus* n'ayant pas encore été décrite dans la littérature, cette espèce serait, d'après mes observations, mobile avec des flagelles mono- ou lophotriches (Figure 52). Ces flagelles paraissent surmontés d'une gaine ayant un aspect en « filet de pêche » (mise en évidence par une flèche noire).

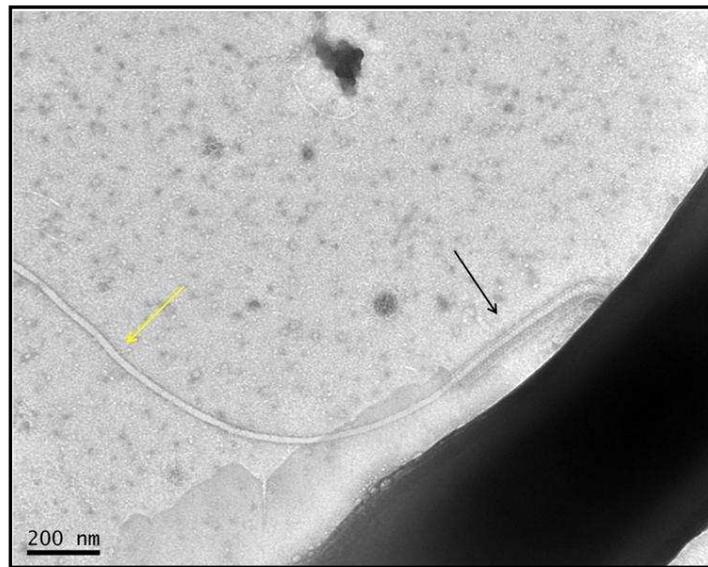


Figure 52. Photos d'un flagelle de *Thermosipho africanus* (souche MC6) visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative). Une partie médiane de la cellule est visible à laquelle est attaché un flagelle. Le flagelle est entouré par une gaine (mis en évidence par une flèche noire). Une partie du flagelle est visible où la gaine est absente (mise en évidence par une flèche jaune).

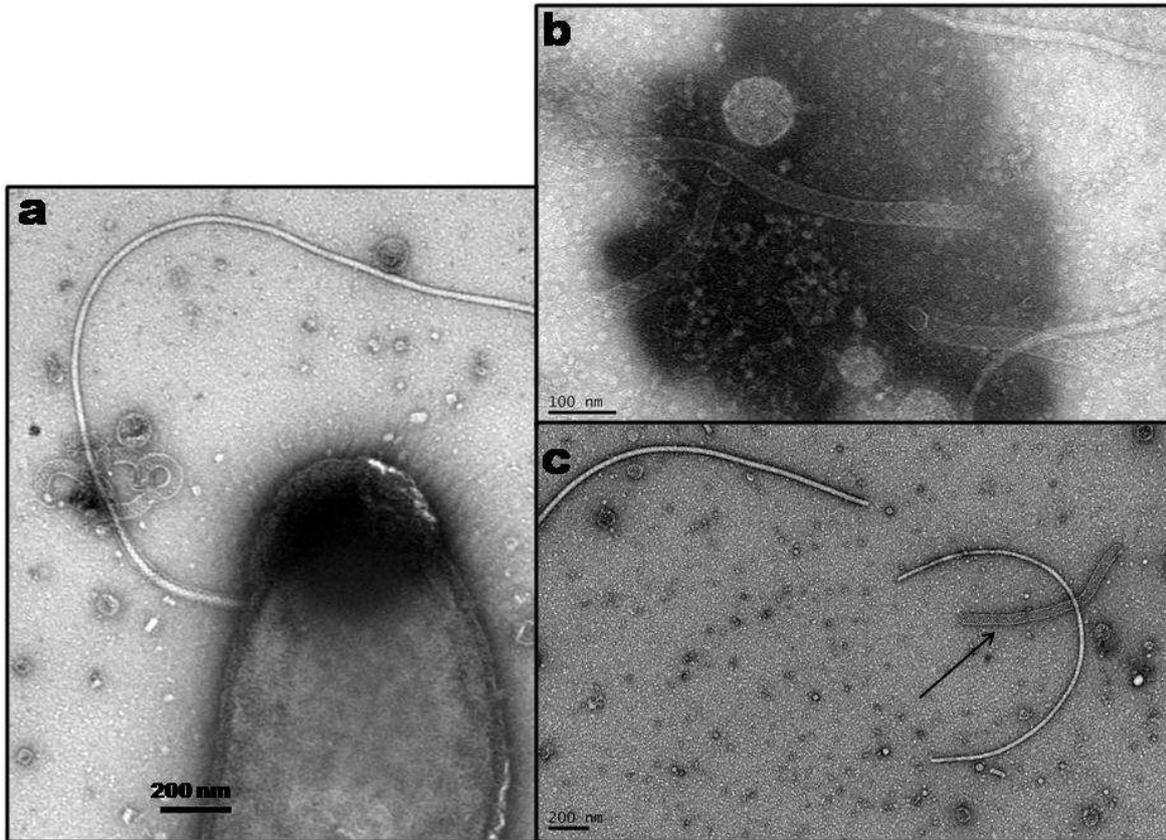


Figure 53. Photos de flagelles de *Thermosipho africanus* (souche MC 6) visualisés au microscope électronique à transmission (coloration négative) : a) une cellule est partiellement visible à laquelle est attachée un flagelle, couvert en partie par une gaine qui se débobine ; b) des fragments de gaine sont visibles, détachés de flagelles ; c) des fragments de flagelle nus peuvent être observés avec une gaine détachée, mise en évidence par une flèche noire.

Cette gaine mesure environ 30 nm ( $\pm 5$  nm) de large et commence au point d'ancrage du flagelle. Elle entoure le flagelle sur une certaine longueur difficilement quantifiable car elle a tendance à se dérouler lors de la préparation des grilles de MET (Figure 53 a), se retrouvant parfois même séparée du flagelle (Figure 53 b et c). Si la présence de gaines flagellaires chez les *Thermotogales* n'a pas encore été évoquée dans la littérature, elle a néanmoins déjà été décrite chez d'autres ordres bactériens. Initialement décrit chez *Bacillus brevis* (De Robertis & Franchi, 1951), les gaines flagellaires ont été ensuite découvertes chez *Vibrio metchnikovii* (van Iterson, 1953; Follett & Gordon, 1963; Glauert *et al.*, 1963) puis étudiées chez d'autres espèces du genre *Vibrio*, notamment lors des études sur la participation des flagelles dans la pathogénicité (Bari *et al.*, 2012). La gaine (Figure 54) serait une excroissance provenant de la membrane externe par extension.

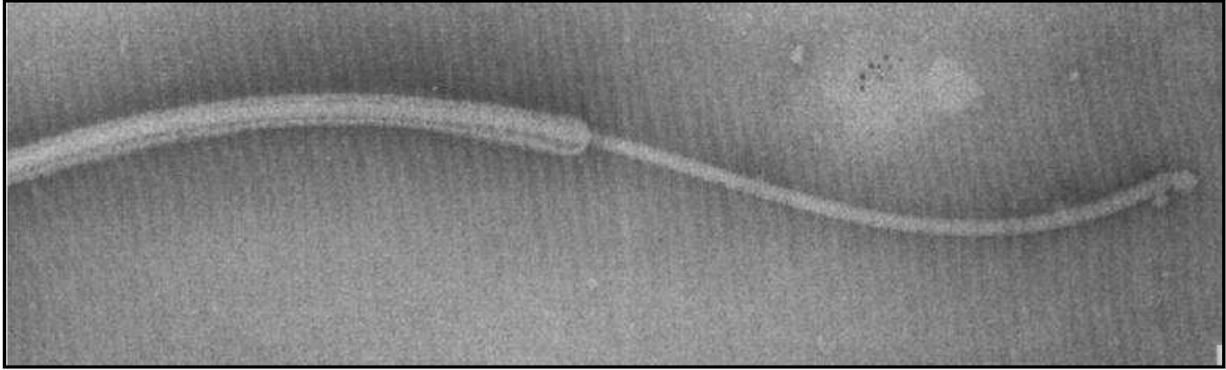


Figure 54. Photos d'un flagelle de *Vibrio metchnikovii* visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative) à un grossissement de 125 000 x (d'après Follett et Gordon 1963)

Chez *Vibrio cholerae*, elle comporte des protéines membranaires externes qui participent à l'intégrité du flagelle (Bari *et al.*, 2012). Le rôle de la gaine flagellaire demeure encore un mystère, mis à part sa participation à l'intégrité du flagelle (Bari *et al.*, 2012). Certains auteurs argumentent que le flagelle muni d'une gaine pourrait faciliter la colonisation de certains types d'environnements spécifiques, comme les muqueuses par *Helicobacter pylori* (Kostrzynska *et al.*, 1991).

Les flagelles de la souche MC 6 ont une gaine qui a un aspect de « filet de pêche » (Figure 53 b), différente de celles qui ont été décrites chez *Vibrio* et de *Helicobacter*; mais plus ressemblante de la gaine flagellaire de *Pseudomonas rhodos* qui est de constitution hélicoïdale (Figure 55) (Schmitt *et al.*, 1974). Le flagelle et la gaine associée de la souche MC6 est cependant plus large (environ 20 nm de largeur de flagelle prolongée de 10 nm de gaine) que l'ensemble décrit chez *P. rhodos* (13 nm de largeur de flagelle prolongée de 5 nm de gaine) chez qui la gaine est composée de trois bandes hélicoïdale étroitement liées, faisant chacune 4.7 nm de largeur, séparées l'une de l'autre par 4.7 nm et tournant autour du flagelle avec un angle de 27° (Lowy & Hanson, 1965; Schmitt *et al.*, 1974).



Figure 55. Photos de flagelles de *Pseudomonas rhodos* visualisés au microscope électronique à transmission (coloration négative). Des flagelles couverts d'une gaine sont visibles et présentent un aspect « strié ». Des flagelles démunis de gaine peuvent également être observés et ont un morphotype plus clair (d'après Schmitt *et al.* 1974).

La gaine du flagelle de MC 6 présente donc des caractéristiques différentes de celles qui ont été décrites. Sa présence pourrait être liée à la particularité des *Thermotogales*, la toge membranaire. La présence de gaines flagellaires de ce type a été notée dans l'enrichissement SP<sub>11</sub>, ce qui soutiendrait à nouveau la présence de *Thermotogales* dans cette culture.

Il est important de remarquer que, parfois, les flagelles détachés du corps cellulaire de MC 6 peuvent apparaître associés à une vésicule à l'extrémité du point d'ancrage (Figure 56). Dans la mesure où ce type de structure pourrait faire penser à une VLP, il est nécessaire de bien comprendre ce que peuvent être ces structures.



Figure 56. Photos de flagelle de *T. africanus* (MC 6), visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative). Un flagelle est partiellement couvert de sa gaine et est associé à une vésicule.

Dans une étude publiée par DePamphilis et Adler (DePamphilis & Adler, 1971) portant sur le crochet du flagelle d'*Escherichia coli*, les auteurs constatent la présence occasionnelle des vésicules associées ces derniers (Figure 57). Ils constatent qu'il s'agit d'artéfact de préparation résultant d'une « vésiculation » de fragments de la membrane cytoplasmique (DePamphilis & Adler, 1971). Il est possible que les vésicules attachées aux flagelles de MC 6 se forment suite à la séparation des flagelles des cellules lors de la préparation des grilles de MET. Le point d'ancrage arracherait alors une partie de la membrane (à laquelle il est attaché) qui se renfermerait ensuite sur elle-même formant une vésicule membranaire.

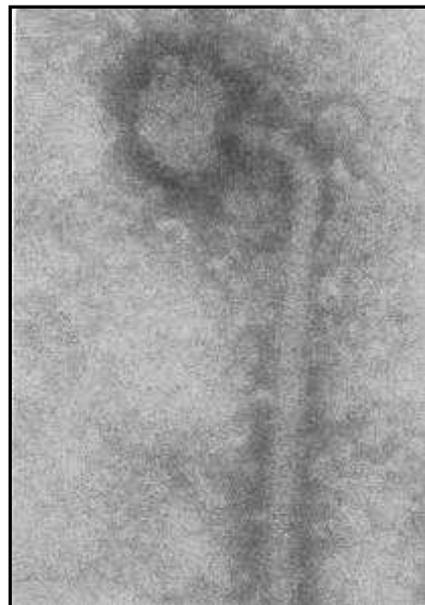


Figure 57. Photos de flagelle d'*Escherichia coli*, visualisé au microscope électronique à transmission (coloration au phosphotungstène). Un flagelle associé à une vésicule. Grossissement de 200 000 x (d'après DePamphilis et Adler 1971).

Toutes les particules de type viral, découvertes dans l'enrichissement SP11 et la souche MC 6, comporte une structure annelée. L'aspect en « anneaux » de ce composant n'est, une fois encore, pas sans rappeler l'apparence du point d'ancrage d'un flagelle de bactérie à Gram négatif (Figure 58). Y'aurait-il un lien entre ces VLP et les flagelles de *Thermosipho* décrits précédemment ?

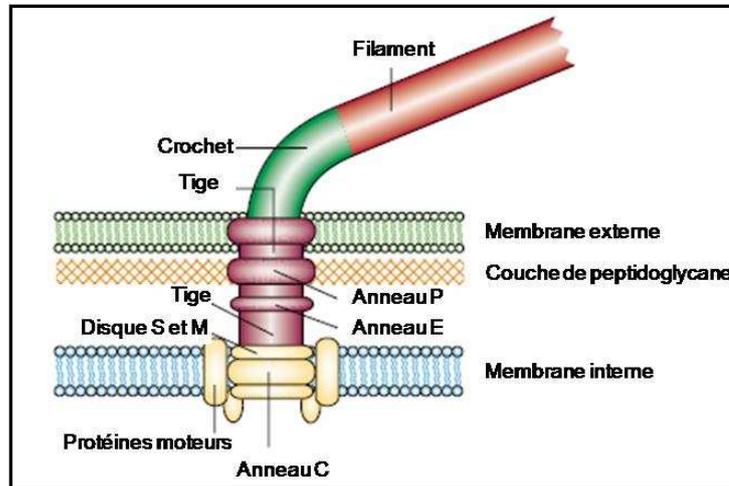


Figure 58. Représentation schématique du point d'ancrage d'un flagelle de bactérie Gram négatif (adapté d'après (Jensen et al., 2002)).

De nombreuses observations en MET ont finalement permis d'observer le point d'encrage d'un flagelle de *T. africanus* (Figure 59). Une observation minutieuse révèle que les dimensions de l'extrémité du flagelle (43 nm, 37 nm et 27 nm pour les trois anneaux visibles dans la Figure 59) ne correspondent pas aux différentes mesures faites sur les VLP de l'enrichissement SP11 ou de la souche MC 6.

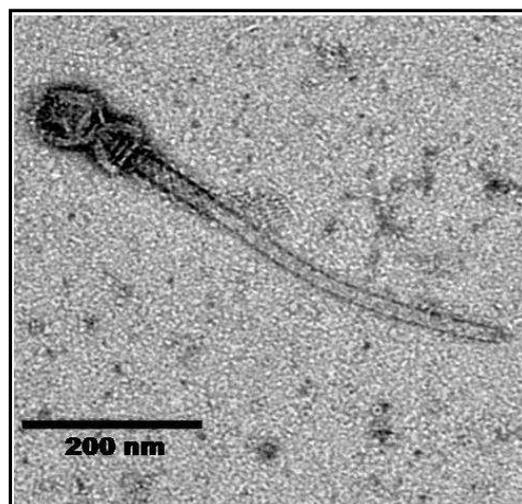


Figure 59. Visualisation par MET (coloration négative) du point d'ancrage d'un flagelle de *T. africanus* (MC 6).

Il est donc très peu probable que les VLP décrites précédemment soient des fragments de flagelle détachés et portant une vésicule membranaire.

Une dernière hypothèse existe. Ces VLP pourraient également correspondre à des composants du système de sécrétion cellulaire (Rudi Lurz, communication personnelle). Chez les bactéries à Gram négatif pathogènes, tels que *Salmonella*, *Shigella*, ou *Yersinia*, il existe un système de sécrétion de type III, qui est responsable de la translocation de divers facteurs, dont les facteurs de virulence, dans la cellule hôte lors de l'établissement d'une interaction entre les deux protagonistes. Le système de sécrétion en question est composé d'une base en anneaux multiples, traversant le système pariétale, prolongée d'une aiguille (Figure 60) (Kubori *et al.*, 1998; Poyraz *et al.*, 2010).

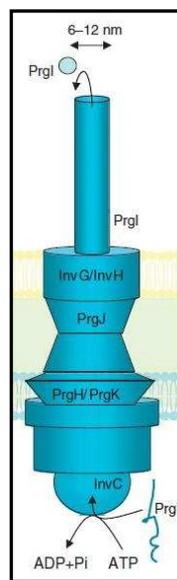


Figure 60. Représentation schématique du système de sécrétion de type III de *Salmonella typhimurium*, traversant la membrane interne (en bleue) et la membrane externe (en jaune) (d'après Fronzes *et al.* 2008).

Même si les dimensions de ce système sécrétoire sont relativement similaires à celles des VLP observées dans l'enrichissement SP11 et la souche MC 6, ce système de sécrétion, n'a pas une morphologie globalement semblable aux VLP photographiés (Figure 61).

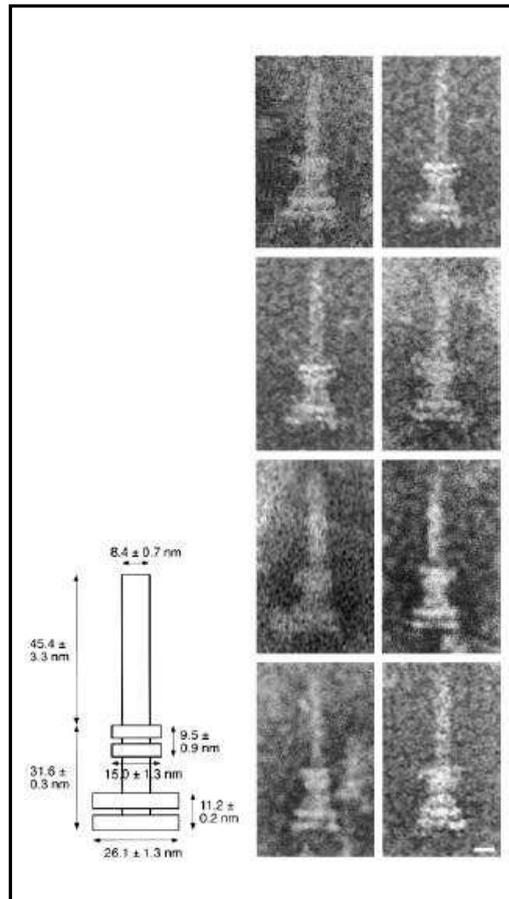


Figure 61. A gauche, représentation schématique du système de sécrétion de type III de *Shigella flexneri*. A droite, photos de MET (coloration négative) de système de sécrétion de type III de *S. flexneri*. La barre représente 10 nm (d'après (Tamano *et al.*, 2000)).

En effet, l'aiguille présente un aspect plus rigide, alors que les particules sont associées à des filaments flexibles. De la même manière, les anneaux observés chez les VLP sont tous identiques, ce qui n'est pas le cas des anneaux du système de sécrétion de type III. On peut donc raisonnablement écarter cette hypothèse et cette confusion.

Il existe d'autres types de système de sécrétion chez les microorganismes, en particulier les pili de type IV. Les pili de type IV (Figure 62) sont des organelles de la surface des cellules que l'on peut trouver chez plusieurs bactéries à Gram négatif. Ils peuvent avoir plusieurs fonctions, telles que la motilité cellulaire par mouvement en torsion ou par reptation, l'adhésion à un substrat, l'échange d'ADN par transformation et ils présentent des facteurs clé de virulence chez plusieurs bactéries, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* et *Escherichia coli*. Les pili sont assemblés à partir de milliers de sous-unités, les pilines, formant des fibres d'environ 5 nm à 8 nm de large et jusqu'à plusieurs micromètres de long (Skerker & Berg, 2001; Craig *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2005; Fronzes *et al.*, 2008). Se pourrait-il que nos VLP correspondent à ces structures cellulaires ?

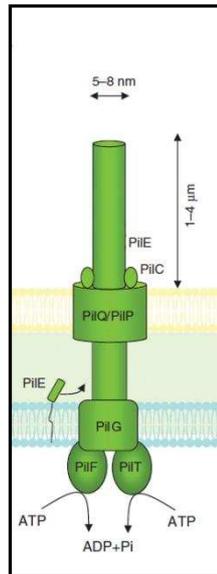


Figure 62. Représentation schématique d'un pili de type IV de *Neisseria gonorrhoeae*, traversant la membrane interne (en bleue) et la membrane externe (en jaune) (d'après Fronzes *et al.* 2008).

Si l'architecture du point d'ancrage de pili de type IV n'est pas ressemblant au système d'anneaux observés chez les VLP associées aux *Thermotogales* de l'enrichissement de SP11 ou encore observées chez MC 6, il est toutefois possible que ces anneaux soient tout simplement adsorbés à des débris cellulaires, dont des pili de type IV, ce qui donnerait alors l'apparence d'une VLP complexe. Dans la mesure où nous n'avons pas réussi à purifier ces VLP tant à partir des cultures d'enrichissement que la souche pure MC 6, il est impossible d'apporter une réponse définitive à cette question.

Un autre point d'interrogation demeure : celui de la nature du long filament fin et flexueux qui semble partie intégrante des VLP. L'observation de ce type de filament, qui est trop fin pour constituer la capsidie intègre d'un virus, a été rapportée dans la littérature lors de l'étude d'autres virus, en particulier un virus hyperthermophile. C'est ainsi que dans les années 80, le virus TTV1 infectant la crenarchée hyperthermophile, *Thermoproteus tenax*, a pu être visualisé en association à des filaments qui ont été assimilés à des pili par les auteurs (Figure 63) (Janekovic *et al.*, 1983).

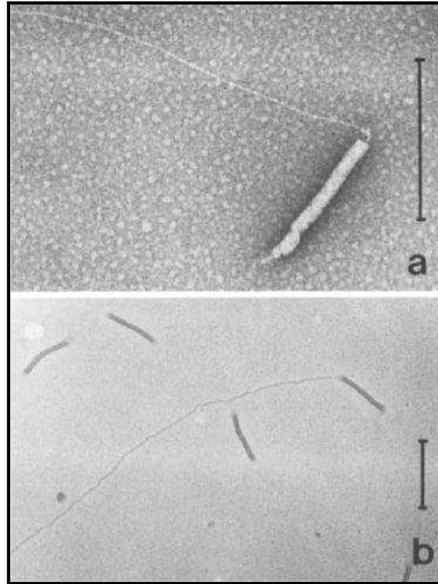


Figure 63. Le virus TTV<sub>1</sub> de la crenarchée hyperthermophile, *Thermoproteus tenax*, attaché vraisemblablement à un pili, photographié en MET et coloré négativement (photographie du haut) et ombré au phosphotungstène (photographie du bas). La barre représente 500 nm (d'après Janekovic *et al.* 1983).

Si nous étions dans cette configuration, nos particules virales pourraient alors n'être constituées que de la structure en anneaux associée à une capsid de morphologie cylindrique ou sphérique. Il est possible que la structure en anneaux soit internalisée dans la capsid et ne sorte qu'une fois que le virus entre en contact avec les récepteurs viraux de la cellule hôte, subissant en conséquence une alternation architecturale comme chez les myovirus. Il serait alors possible d'imaginer que des virus s'adsorbent par exemple à des structures comme les systèmes de sécrétion de type IV. Ceci est le cas de plusieurs phages, notamment les phages filamenteux Ff d'*E. coli* et CTX $\phi$  de *V. cholerae* (Rakonjac *et al.*, 2011).

Lors des observations en MET, j'ai remarqué que les gaines flagellaires de MC 6 avaient tendance à se débobiner pour donner naissance à un filament (Figure 64).

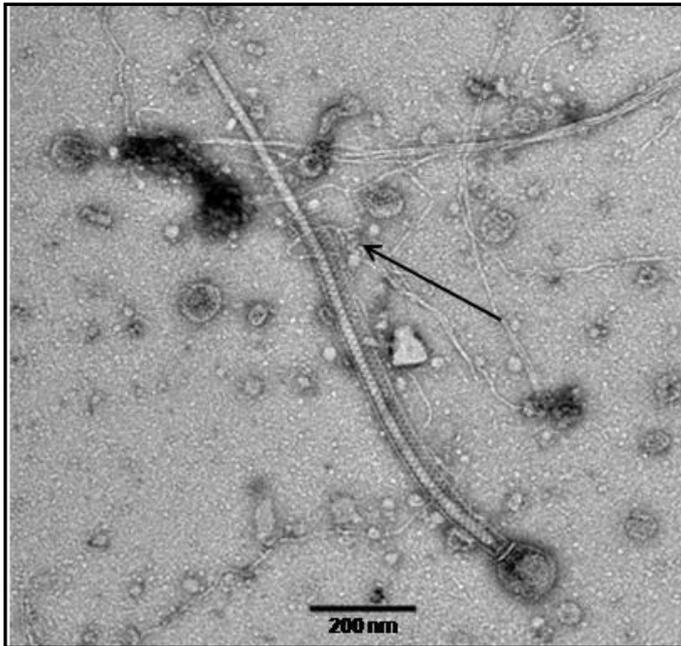


Figure 64. Photo de flagelle de *T. africanus* (MC 6), visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative). Un flagelle partiellement couvert de gaine est associé à une vésicule. La gaine paraît se décomposer en filaments (mise en évidence par la flèche noire).

Ce filament présente un aspect similaire aux filaments qui sont associés aux VLP. Il pourrait être ainsi imaginé que les particules virales reconnaissent des récepteurs viraux sur des gaines flagellaires ce qui expliquerait leur association fréquentes aux filaments. De ce fait, la gaine pourrait servir de récepteur viral (Sjoblad *et al.*, 1983). Si des phages utilisant le flagelle comme récepteur viral tels que le virus PBS de *B. subtilis* (Figure 65) existent, à ma connaissance, aucun phage utilisant la gaine flagellaire comme cible n'a encore été décrit. Il y a peu de doute que ce type d'interaction phage-hôte existe et il serait intéressant d'explorer ce genre d'adsorption viral.

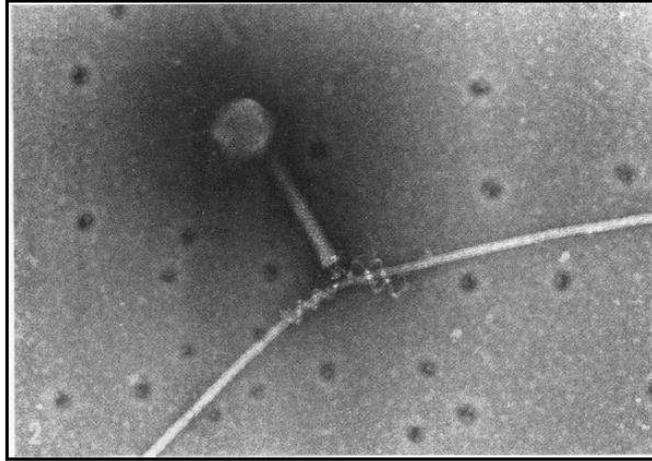


Figure 65. Photo du phage PBS de *Bacillus subtilis*, visualisé au microscope électronique à transmission (coloration négative). Le phage est adsorbé au flagelle d'une cellule de *B. subtilis* SB19. Grossissement 120 000x (d'après (Raimondo *et al.*, 1968))

Les différentes particules que nous avons vues associées aux cultures de *Thermotogales*, de la souche MC 6 et l'enrichissement SP11, sont des structures très organisées ; aussi il est peu probable qu'il ne s'agisse que de débris cellulaires (de nature protéique) aléatoirement adsorbés lors de la préparation des échantillons pour l'observation en MET. Un doute subsiste avec l'hypothèse que nous serions en présence d'organelles cellulaires de *Thermotogales*. En effet, les systèmes de sécrétion de différents types n'ayant pas été décrits chez cet ordre, il n'existe pour l'instant pas de possibilité de les comparer aux particules observées dans cette étude. Cependant, certains indices suggéreraient qu'il s'agit plutôt de particules virales que d'organelles cellulaires. Parmi ces indices figure la réponse des microorganismes cultivés en présence de mitomycine C ou de NaCl. Sans ajout de la mitomycine C [ $1 \mu\text{g/ml}$ ]<sub>finale</sub> ou de NaCl [10 %]<sub>finale</sub>, deux agents au potentiel d'induction virale avéré, le signal en ME est faible comparativement à ce qui est observé suite à l'ajout de l'une ou l'autre de ces molécules.

Hélas, à ce stade de l'étude, il m'est impossible de conclure sur la nature de cette VLP. Malgré de nombreuses tentatives de purification et/ou de concentration de ces VLP à partir de cultures MC 6, je n'ai pas réussi à purifier, même partiellement, ces éléments qui paraissent fragiles. De plus, se superpose un problème de production, ces VLP paraissent produites en relativement faible quantité si j'en juge par la difficulté de les observer en MET.

## 2.4. Criblage des souches aérobies pour la présence de VLP

Pendant les premiers mois de ma thèse, je me suis familiarisé avec les cultures de microorganismes thermophiles et hyperthermophiles en réalisant l'isolement de bactéries croissant en aérobiose. Ces travaux, ainsi que des précédents menés en amont de ma thèse, ont abouti à l'obtention d'une collection d'isolats aérobies thermophiles variés. J'ai poursuivi par le criblage de ces isolats pour la présence de VLP. C'est ainsi que le surnageant de culture de quatre souches nommées RB 39 a, RB 39 c1, SP4 SD et OLG 2 a été analysé en ME en premier lieu. Chacune de ces souches donnant un signal positif en ME, l'ADN codant pour l'ARNr 16S a été amplifié par PCR et comparé par BLAST (Altschul *et al.*, 1990) contre les banques de données NCBI pour savoir dans quel taxon nous nous positionnions. C'est ainsi que les souches RB 39 a, RB 39 C1 et SP4 SD ont été identifiées comme appartenant au genre *Geobacillus*. En revanche, le dernier isolat, OLG<sub>2</sub>, présentait une homologie avec un tout nouveau genre bactérien dénommé *Calditerricola* (Moriya *et al.*, 2011) et regroupant deux nouvelles espèces.

### 2.4.1. Description de la souche OLG<sub>2</sub><sup>T</sup>

En 2008, Oshima et Moriya ont isolé deux isolats bactériens hautement thermophiles à partir de compost agricole (Oshima & Moriya, 2008). Ces isolats ont ensuite été bien caractérisés et décrits comme appartenant à un nouveau genre, *Calditerricola* (Moriya *et al.*, 2011). Ce nouveau genre appartient à la famille des *Bacillaceae*, et présente des liens de parenté avec le genre *Planifilum*, de la famille des *Thermoactinomycetaceae* (voir Annexe).

L'analyse de la séquence ADN codant pour l'ARNr 16S a révélé que la souche OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> partage 99 % de similarité avec les espèces *Calditerricola satsumensis* et *Calditerricola yamamurae*. Mais la souche OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> présente cependant des propriétés physiologiques différentes. Une des caractéristiques la distinguant est sa propension à sporuler, ce qui, d'après Oshima et Moriya, n'est ni observée chez *C. satsumensis* ni chez *C. yamamurae*, et ce, à quelques conditions de culture que ce soit (Moriya *et al.*, 2011). A température optimale, 78°C, les cellules d'OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> se présentent sous la forme de bâtonnets de 3.2 µm (± 0.6 µm) x 0.5µm (±0.2 µm) de dimension. Dans des conditions de croissance suboptimale telle qu'à une température de 70°C, OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> produit des spores terminales déformantes dont la taille avoisine 1.1 nm de diamètre. La sporulation implique l'expression de gènes multiples pour la formation et la germination des spores (Paredes-Sabja *et al.*, 2011) dans l'ordre des *Bacillales*. Une hybridation ADN-ADN entre OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> avec *C. yamamurae* a révélé une identité de séquence de 55.1 %. En prenant en

compte le seuil d'identité de 70 % sous lequel on considère que deux souches sont représentatives de deux espèces distinctes (Wayne *et al.*, 1987), ceci démontre qu'OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> n'est pas un isolat appartenant à l'espèce *C. yamamurae*. Pour des raisons techniques, l'hybridation ADN-ADN entre OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> et *C. satsumensis* n'a pas pu être effectuée. Cette souche, en collection à la DSMZ (DSM-45223) et à la JCM (14719<sup>T</sup>) ne pousse en effet que difficilement. Plusieurs tentatives de culture ont également suggéré des contaminations importantes, les cultures présentant plusieurs types de morphologie cellulaire (coques et bâtonnets de différentes tailles et apparences). Néanmoins, le taux de G+C de la souche OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> étant établi à 63.7 %, contre 70 % chez *C. satsumensis*, OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> peut être considérée comme une espèce à part, si l'on prend en compte le seuil de différence de 5 % (Rossello-Mora & Amann, 2001).

Ainsi, bien que OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> soit très proche des espèces *C. yamamurae* et *satsumensis*, nous proposons que celle-ci soit la représentante d'une nouvelle espèce intitulée « *Calditerricola clavaformis* » (cla'va.for.mis. cla'va de L.n. *clava*, raquette; L. adj. *formis* morphologie; N. L. adj. *clavaformis* en forme de raquette). La publication rédigée suite à la description d'OLG<sub>2</sub><sup>T</sup> peut être consultée dans l'Annexe.

Malgré un premier signal positif en épifluorescence, il n'a pas possible de visualiser de VLP dans cette souche, ce qui n'a pas été le cas pour les trois autres isolats apparentés au genre *Geobacillus*.

#### 2.4.2. La découverte de bactériovirus dans les isolats de *Geobacillus*

A la suite de l'observation d'un signal fort en épifluorescence, les surnageants de culture des trois isolats *Geobacillus sp.*, (RB39 a, RB39 c1 et SP4 SD) ont été concentrés puis explorés en MET. Si l'analyse n'a pas permis de révéler la présence de particules dans le surnageant de culture de la souche RB39 a, en revanche, les deux autres souches, RB39 c1 et SP4 SD se sont bien révélées porteuses de virus (Figures 66 et 67)

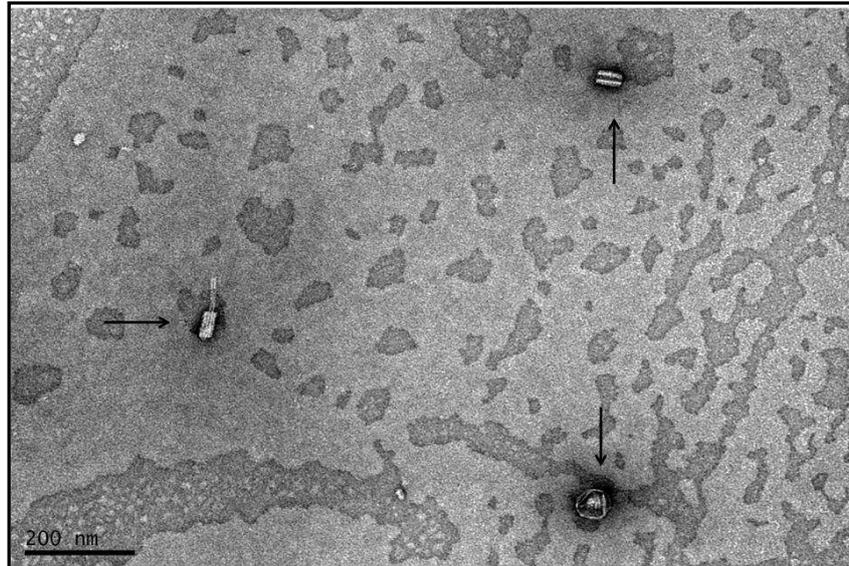


Figure 66. Photographie prise en MET (coloration négative) du surnageant de culture de RB39 C1. Trois fragments sont mis en évidence par des flèches. Dans ces fragments peuvent être devinées la gaine extérieure (fragment en haut de l'image), la queue (fragment à gauche de l'image) et la tête (à droite de l'image) d'un myovirus.

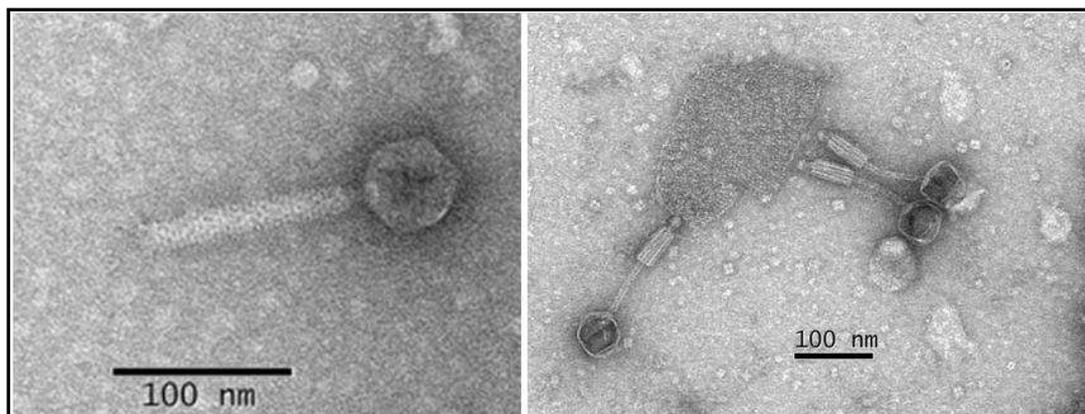


Figure 67. Photographies prises en MET (coloration négative) du phage de SP4 SD. Sur la photographie de gauche est visible le virus sous une forme non contractée. Dans la photographie de droite peuvent être observées trois particules virales attachées à un fragment de membrane cellulaire. Ces virus présentent le deuxième morphotype, après contraction, du phage SP4 SD.

Les particules virales observées chez RB39 C1 et de SP4 SD présentent des caractéristiques de myovirus, à savoir une capsidie icosaédrique, une queue rigide composée d'une gaine externe et d'un tube interne subissant une modification morphologique lors de l'entrée en contact avec la cellule hôte (King *et al.*, 2011). Dans la mesure où nous avons accumulé un certain nombre de données caractérisant les sources chaudes de Saint Paul, j'ai choisi de poursuivre l'étude en focalisant les analyses sur le couple hôte-virus SP4 SD, choisi comme modèle d'étude.

### 3. La description du système hôte-virus SP4 SD

L'analyse comparative de la séquence codant pour l'ARNr 16S de l'isolat SP4 SD a confirmé l'affiliation de celui-ci à l'espèce *Geobacillus thermoleovorans* (similitude 99 %) (Figure 68).

A partir de cet isolat cloné, j'ai pu obtenir un virus purifié, que j'ai nommé GTV1 pour « *Geobacillus thermoleovorans* virus 1 » dans la mesure où aucun virus associé à cette espèce thermophile n'a encore été décrit dans la littérature.

L'analyse bibliographique a en effet permis de recenser l'existence de plusieurs virus inféodés au genre *Geobacillus*. La description des virus de *Geobacillus* a vraisemblablement débuté avec l'isolement d'un premier phage à partir d'un Bacille thermophile par Koser en 1926 (Koser, 1926). Plusieurs descriptions de virus de *Geobacillus* ont été faites plus récemment (Tableau 5 - Introduction p. 72), dont celles de six nouveaux virus isolés à partir d'isolats non identifiés mais appartenant au genre *Geobacillus* à partir de sources hydrothermales marines chinoises (Liu *et al.*, 2006; Wang & Zhang, 2008; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Wang & Zhang, 2010). Le génome de quatre d'entre a été séquencé : les virus GBSV1, BV1, D6E et GVE2 (Wang & Zhang, 2008; Liu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Wang & Zhang, 2010). GBSV1, BV1 et D6E font partie de la famille des *Myoviridae*, et possèdent un génome à ADN double brin de taille 34.7 kb, 35.1 kb et 49.3 kb, respectivement. GVE2 est au contraire un siphovirus qui possède également un génome à ADN double brin de 40.9 kb.

Parallèlement à l'obtention d'information génomique sur les virus de *Geobacillus*, plusieurs génomes de l'hôte *Geobacillus* ont également été séquencés (ou sont en cours de séquençage) (base de données NCBI et Tableau 23). En analysant le contenu génétique de ces souches, j'ai découvert que des gènes d'origine virale peuvent être identifiés dans huit d'entre-elles. Les séquences identifiées ont des tailles qui varient entre 20 kb et 89 kb, avec une majorité comprise entre 30 kb et 40 kb, ce qui correspond bien à la dimension des génomes des quatre virus isolés et décrits dans ce genre. Ces données vont être utiles dans des analyses comparatives avec le nouveau virus GTV1.

Aucunes des souches des différents espèces de *Geobacillus* testées pour la gamme d'hôte n'a présenté des plages de lyse, lorsque ces dernières ont été cultivées sur boîte en présence du virus GTV1. Les surnageants de culture de ces souches ont été analysés en ME et chacune des souches de référence (provenant de la DSMZ), mise à part une, présentait un signal positif pour la présence de VLP. Il est donc possible que ces souches soient porteuses de virus tempérés. L'absence de plage de lyse lors de l'ajout de GTV1 serait alors explicable par la mise en place d'une immunité à la superinfection par des phages homologues dans les souches testées.

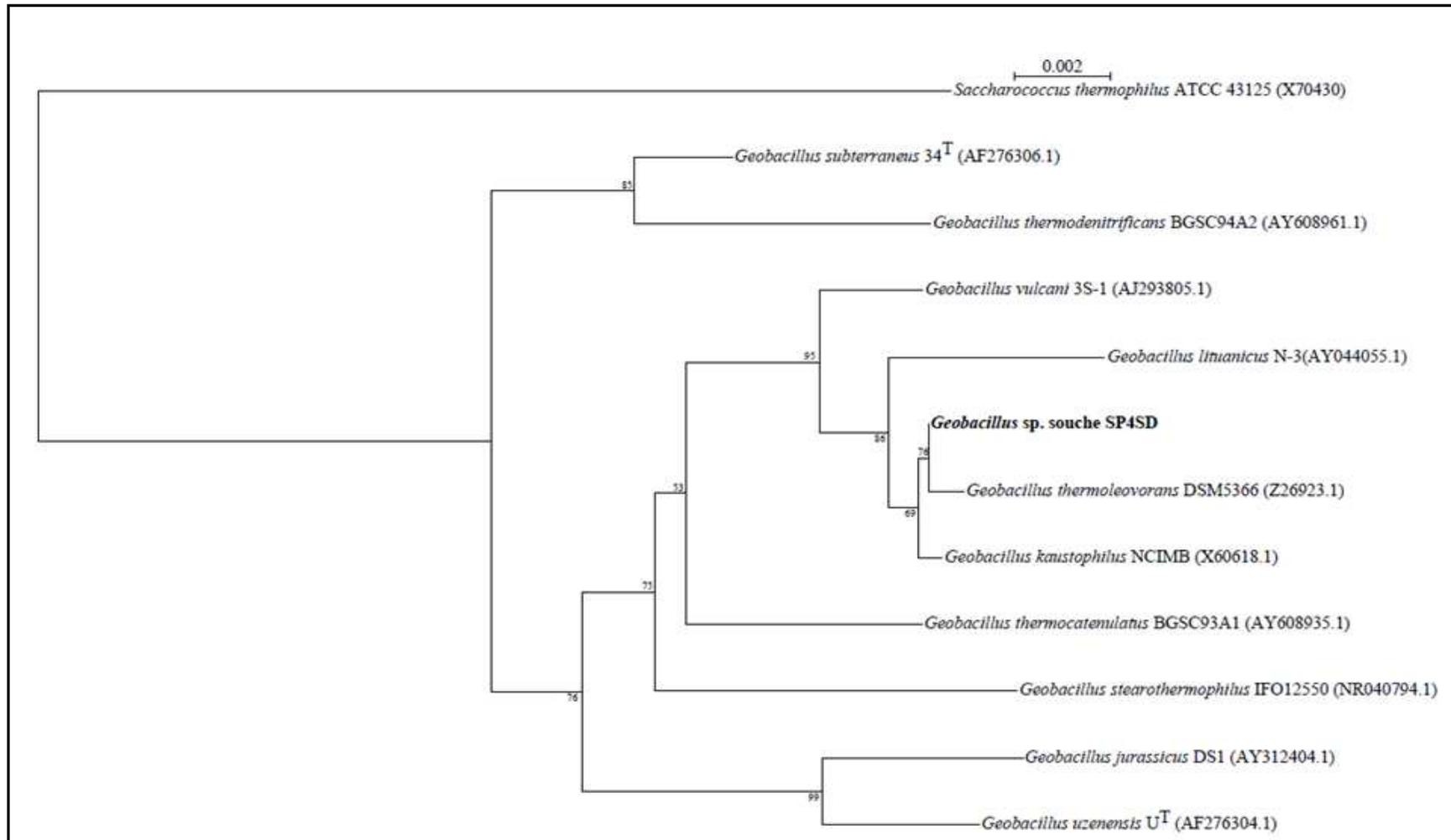


Figure 68. Figure représentant le positionnement de la souche *Geobacillus* SP<sub>4</sub> SD au sein de différents taxons du genre *Geobacillus* dans un arbre phylogénétique construit avec les séquences codant pour l'ARNr 16S par la méthode Neighbour-Joining (Saitou & Nei, 1987). Les valeurs positionnées au niveau de chaque nœud expriment les valeurs du bootstrap (1000 rééchantillonnages). La barre indique deux substitutions par mille nucléotides. Les numéros d'accèsion respectifs sont indiqués entre parenthèse après chaque souche.

Espèce <i>Geobacillus</i>	Projets de séquençage de souches	Souches séquencées	Nom de la souche séquencée	Accession	Taille	Plasmide	Taille Plasmide	Prophage	Taille approximative
<i>G. thermoleovorans</i>	-	1	CCB_US3_UF5	CP003125	3.60 Mb	-	-	oui	41 kb
<i>G. staerothermophilus</i>	5	0	-	-	-	1 (souche 18)	62.8 kb	-	-
<i>G. thermoglucoosidasius</i>	1	2	C56-YS93	NC_015660	3.99 Mb	2	80.8 et 19.6 kb	oui	42 kb
			TNO-09.020*	NZ_CM001483	3.74 Mb	-	-	-	-
<i>G. kaustophilus</i>	-	2	HTA 426	NC_006510	3.59 Mb	1	47.9 kb	oui	39 kb
			NBRC 102445*	-	-	-	-	-	-
<i>G. thermodenitrificans</i>	-	1	N680-2	NC_009328	3.61 Mb	1	57.7 kb	oui	89 kb
<i>G. caldxylosilyticus</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. debilis</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. zalihae</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. toebii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G. jurassicus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geobacillus sp.</i>	1	6	Y412MC52	NC_014915	3.67 Mb	1	45.1 kb	oui	40 kb
			C56-T3	NC_014206	3.65 Mb	0	-	oui	20 kb
			WCH70	NC_012793	3.51 Mb	2	33.9 et 10.3 kb	non	-
			YA.1MC1	NC_014650	3.91 Mb	1	71.6 kb	oui	39 kb
			Y412MC61	NC_013411	3.67 Mb	1	45.1 kb	oui	32 kb
			G11MC16*	NZ_ABVH00000000	3.55 Mb	-	-	-	-

Tableau 23. Tableau récapitulatif des souches de *Geobacillus* séquencées et accessibles dans la base de données NCBI. Les résultats d'une recherche du nombre de souches séquencées par espèce de *Geobacillus*, du nombre de projets de séquençage et de la recherche d'éléments extra-chromomiques au sein des souches séquencées sont détaillés.

- = annotation du génome n'a pas été effectuée.

Le virus GTV<sub>1</sub> présente une capsidie icosaédrique de 55 nm de diamètre, reliée à une queue de 130 nm de long et 17 nm de large (Figure 67). Une plaque basale, parfois détachée (Figure 69), peut être observée. Aucune fibre caudale liée à la plaque basale, ni de moustaches (« whiskers ») liées au collier, n'a été identifiée dans les préparations de MET. Mis à part pour les fibres caudales et les « whiskers », GTV<sub>1</sub> partage des caractéristiques morphologiques avec deux des cinq genres de la famille des *Myoviridae* : le genre « P2-like viruses » et « Mu-like viruses ». Les « P2-like viruses », dont l'espèce type est le virus *Enterobacteria* phage P2, sont caractérisés par une capsidie d'environ 60 nm de diamètre, une queue de 135 x 18 nm munie d'un collier à une extrémité et six fibres caudales de l'autre. Les « Mu-like viruses », dont l'espèce type est le virus *Enterobacteria* phage Mu, sont également caractérisés par une capsidie d'environ 60 nm de diamètre et une queue de 120 x 18 nm. Ils possèdent également une plaque basale à laquelle sont liées six courtes fibres caudales (King *et al.*, 2011).

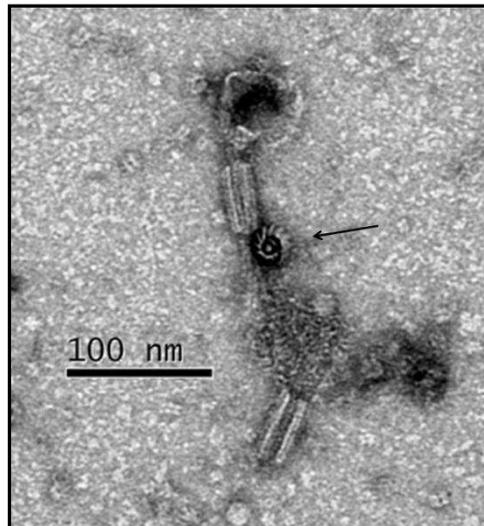


Figure 69. Photographie prise en microscopie électronique à transmission du virus GTV<sub>1</sub>. La flèche indique une plaque basale détachée du virion.

Dans une étude, Lavigne et collaborateurs (Lavigne *et al.*, 2009) ont réalisé une comparaison de similarité de séquences protéiques, combinée avec des données physico-chimiques, ayant utilisé les génomes de 102 myovirus. Ces auteurs constatent que le transfert horizontal des gènes ne masque que partiellement la parenté des phages et proposent trois sous-familles dans la famille des *Myoviridae* : les *Peduvirinae*, les *Teequatrovirinae* et les *Spounavirinae*. Le genre « P2-like viruses » est compris dans la sous-famille des *Peduvirinae*, en revanche le type « Mu-like viruses » ne serait affilié à aucune des trois sous-familles proposées. Ainsi, dans l'hypothèse où le virus GTV<sub>1</sub> appartiendrait au genre « P2-like viruses », il serait ainsi un myovirus de la sous-famille des *Peduvirinae*.

### 3.1. La relation de GTV1 et de son hôte SP4 SD

Lors de la culture de la souche SP<sub>4</sub> SD de *G. thermoleovorans*, aucun phénomène de lyse, laissant supposer la présence de bactériophage, n'a été constaté. En revanche, à l'ajout de mitomycine C, la turbidité de la culture SP<sub>4</sub> SD en phase de croissance disparaît pour laisser place à un milieu limpide. Ceci est caractéristique de la présence d'un virus de type lysogène, dont la réplication est induite sous l'effet inducteur de l'agent chimique. GTV<sub>1</sub> serait donc un virus lysogène et inductible.

La mitomycine C est couramment utilisée en tant qu'agent inducteur de virus tempérés. Si son effet sur l'ADN est connu (Shiba *et al.*, 1959; Reich *et al.*, 1961), la concentration nécessaire à l'induction de provirus est relativement peu documentée, surtout en conditions extrêmes. Il semble que la concentration nécessaire pour une efficacité maximale soit dépendante tout d'abord de la densité de population bactérienne et de la nature du milieu de culture. La concentration nécessaire pour une action maximale est de l'ordre de 20 µg mitomycine C/ml pour une population d'environ 1-2 x 10<sup>9</sup> cellules/ml chez les bactéries mésophiles (Reich *et al.*, 1961). Toutefois, cette valeur n'exprime que son action délétère sur l'ADN bactérien, conduisant à la mort cellulaire, mais pas l'efficacité de son pouvoir inducteur à l'égard des prophages, qui est une conséquence de l'inhibition de la synthèse d'ADN (Otsuji *et al.*, 1959).

Il est important de noter que la mitomycine C se dénature sous l'effet d'une augmentation de température et en fonction de l'augmentation ou la diminution des valeurs du pH à partir d'une valeur de pH neutre (Edwards *et al.*, 1979). Ceci a donc nécessairement une incidence sur le pouvoir inducteur en présence de microorganismes extrémophiles, qu'ils soient thermophiles, acidophiles ou toute autre combinaison de ces deux paramètres. C'est en particulier le cas de *G. thermoleovorans* SP<sub>4</sub> SD qui est thermophile. Les études réalisées sur différents systèmes hôte-virus hyperthermophiles au cours des dernières années montrent cependant que la mitomycine C reste active même à des températures supérieures à 70°C, comme par exemple dans le cas de l'archéovirus ATV et de son hôte *Acidianus*, cultivé à 75°C et à pH 3, pour lequel une concentration de [0.5 µg/ml]<sub>fin</sub> de mitomycine C est suffisante pour son induction (Prangishvili *et al.*, 2006c). Généralement, ces différentes études s'accordent pour utiliser une dose de mitomycine C d'une concentration de [1.0 µg/ml]<sub>finale</sub>, ce qui est probablement légèrement surconcentré. Pour l'étude de GTV<sub>1</sub>, un aliquot de mitomycine C d'une concentration de [100 µg/ml] a été placé à 80°C pendant 3 h et après incubation, cette solution a été utilisée pour induire le virus GTV<sub>1</sub> à raison de [1.0 µg/ml]<sub>finale</sub>. Une lyse complète de la culture bactérienne de la souche SP<sub>4</sub> SD a pu être observée. Ainsi, si une dégradation de la mitomycine C a bien lieu,

une quantité suffisante de composé actif persiste néanmoins pour permettre l'induction. La quantité nécessaire de mitomycine C pour induire est donc probablement moins importante que la concentration couramment utilisée dans les manipulations de laboratoire, à savoir [1.0 µg/ml]<sub>finale</sub>.

Si la mitomycine C est un puissant agent inducteur, l'effet inducteur d'autres agents physico-chimiques a déjà été décrit dans la littérature. Parmi ces agents, figurent notamment le stress oxydatif, plus précisément l'effet de l' $H_2O_2$  (Lwoff & Jacob, 1952; Selva *et al.*, 2009), ainsi que le sel (NaCl) (Husson-Kao *et al.*, 2000; Shkilnyj & Koudelka, 2007).

Afin de définir la relation hôte-virus du phage GTV<sub>1</sub>, des suivis de croissance bactérienne couplés à une induction virale par ajout de mitomycine C ont été effectués dans un premier temps. Puis, dans une seconde étape, et pour se rapprocher des conditions naturelles régnant dans les sources hydrothermales de Saint Paul, l'impact de différents stress environnementaux sur la relation hôte-virus a été testé. Ainsi, l'impact du NaCl, mimant la transition entre l'eau non salée de la source chaude dans la colonne d'eau de mer, et l'alternance aérobie-anaérobie sur l'expression du virus ont été étudiés.

### 3.1.1. La cinétique de croissance de l'hôte avec et sans induction par ajout de mitomycine C

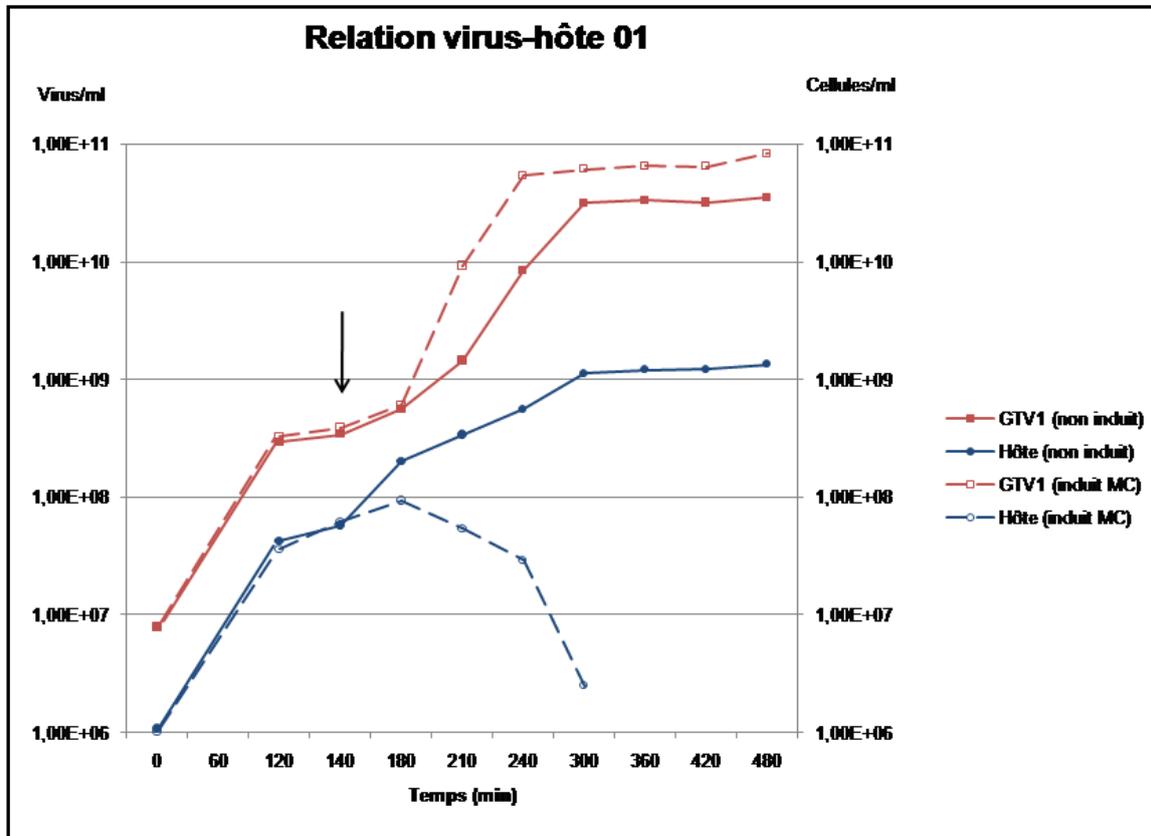


Figure 70. Graphique représentant un suivi de croissance de la souche SP4 SD (sphères bleues pleines) et la production du virus GTV1 (carrés rouges pleins) en fonction du temps. Suite à une induction à la mitomycine C, la production du virus GTV1 (carrés rouges vides) et la croissance de la souche SP4 SD (sphères bleues vides) sont représentés en fonction du temps. La flèche noire indique le moment d'ajout de la mitomycine C. MC= mitomycine C.

Lors de la culture de SP4 SD sans mitomycine C, une production croissante de GTV1, parallèle à la croissance cellulaire, peut être observée (Figure 70). Comparativement, l'ajout de la mitomycine C au début de la phase exponentielle de croissance de SP4 SD (à  $6.2 \times 10^7$  cellules/ml) permet *in fine* une augmentation significative de la production du virus GTV1. Après ajout de l'agent inducteur, la croissance bactérienne se poursuit pendant environ 40 min, mais à un taux plus faible que précédemment. Une faible production virale persiste pendant cette période. Ensuite, la croissance cellulaire se dégrade, la population bactérienne diminuant inéluctablement tandis que la teneur en virus ne fait que s'amplifier. A 210 min, un taux six fois plus élevé de virus peut être constaté dans la culture induite comparée à la culture contrôle non-induite. A 240 min, la production virale semble atteindre un plateau. Après 300 min de culture, soit 160 min après induction, l'abondance bactérienne n'est plus quantifiable car sous le seuil de détection de la microscopie à épifluorescence correspondant approximativement à  $10^4$  cellules/ml

(Lemarchand *et al.*, 2001). Il est probable que les concentrations cellulaires atteignent leurs valeurs minimales à 240 min en parallèle avec la phase plateau de la production virale. L'abondance maximale de virus est atteinte à la fin du suivi de production virale, à 480 min, où elle atteint  $8.3 \times 10^{10}$  particules/ml. Par comparaison, la concentration virale dans la culture contrôle atteint  $3.4 \times 10^{10}$  particules/ml pour un taux de bactéries de  $1.3 \times 10^9$  cellules/ml.

La concentration relativement élevée de particules virales dans la culture non-induite est probablement due à une induction spontanée d'une partie de la population bactérienne. Cette concentration demeure relativement constante tout au long de la croissance de la souche hôte. Un tel phénomène d'induction spontanée a déjà été rapporté dans les années 1950, ce phénomène étant lié à l'état physiologique de la cellule (Lwoff, 1953).

Si l'induction spontanée est un trait commun aux phages tempérés, quels que soient les types de phage ou de souche hôte, les causes déterminant ce phénomène demeurent encore mal connues (Carrolo *et al.*, 2010). Plusieurs facteurs sont probablement impliqués. En général, la production virale par induction spontanée est inférieure de plusieurs ordres de grandeurs par rapport à une production induite (Livny & Friedman, 2004). Par exemple, la souche LT-2 de *Salmonella typhimurium*, portant le phage P22, a une fréquence d'induction spontanée d'une cellule sur 10 000 par génération *in vitro* (Levine, 1961). Pour des souches lysogènes d'*E. coli* portant le virus H-19B qui code pour la toxine Stx-1, la fréquence est d'une cellule sur 20 000, mais est d'une cellule sur 7000 pour le virus 933W, codant pour la toxine Stx-2 (Livny & Friedman, 2004). La fréquence d'induction spontanée des phages paraît donc être relativement variable. Pour les cellules lysogènes de SP4 SD, il n'est pas possible d'estimer précisément la fréquence d'induction spontanée à ce stade d'analyse sans réaliser une expérience de « one step growth », décrite initialement par Ellis et Delbrück (Ellis & Delbrück, 1939), de manière à connaître le « burst size ». Toutefois, ce taux semble a priori relativement élevé si l'on en juge par les valeurs d'abondance observées. Une estimation peut être effectuée sur la base du suivi de production virale. Entre la fin de la phase de latence après induction à la mitomycine C à 180 min de culture et 300 min de culture, une diminution de  $9.1 \times 10^7$  cellules/ml peut être observée. Durant cette période, une augmentation de  $6.0 \times 10^{10}$  particules virales/ml peut être constatée. En supposant que la diminution de l'abondance cellulaire est uniquement due à la lyse virale suite à l'induction, il y aurait alors une production moyenne de 664 virions par cellule. Il s'agit d'une simple estimation, car cet ordre de grandeur peut varier notamment avant la phase stationnaire où la production virale atteint sa valeur maximale et la concentration cellulaire sa valeur minimale. Il doit également être tenu compte de l'action bactéricide de la mitomycine C, comme le rapporte Levine sur la souche LT-2 de *S. typhimurium* après 60 min d'incubation en présence de mitomycine C à  $1\mu\text{g/ml}$ , suite à laquelle une mortalité de 11 % des cellules est observée (Levine, 1961).

Ainsi le « burst size » de GTV1 est approximativement de 664 virions par cellule, valeur probablement sous-estimée.

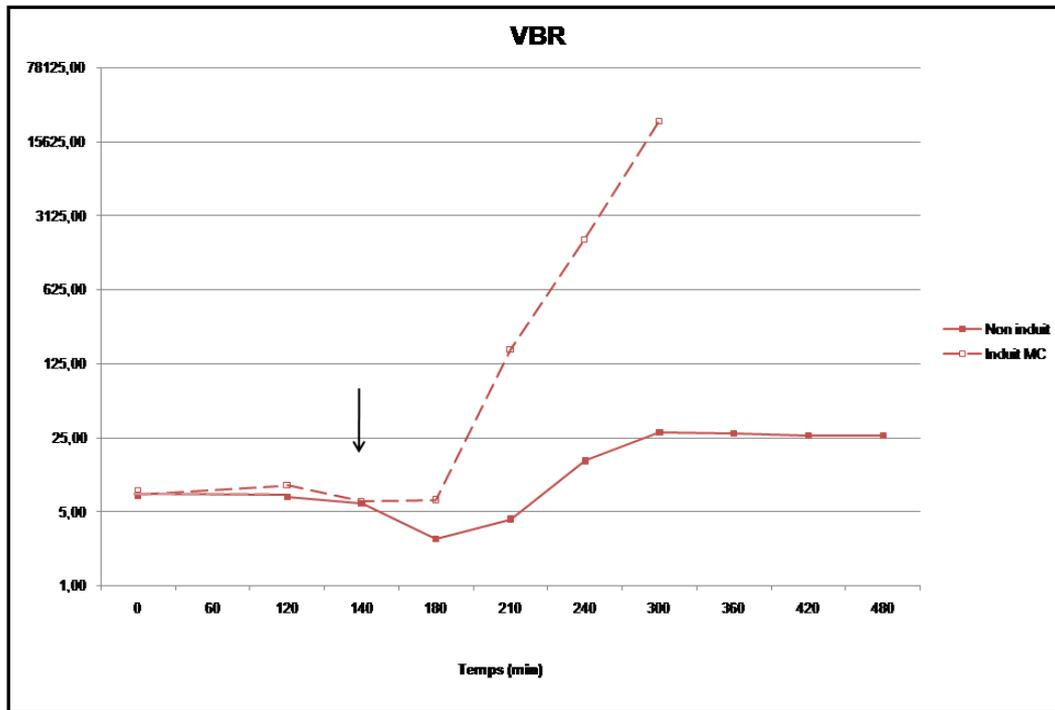


Figure 71. Graphique représentant les VBR de la culture non induite (carrés rouges pleins), de la culture induite à la mitomycine C (carrés rouges vides) en fonction du temps. La flèche noire représente le moment de l'induction. MC= mitomycine C.

L'analyse du VBR, qui définit le rapport entre le bactérioplancton et le virioplancton d'un système écologique donné (Wommack & Colwell, 2000), conforte ces hypothèses (Figure 71). Quoique rarement employé pour l'analyse d'une culture *in vitro*, il permet toutefois de comparer de manière relative l'évolution de la production virale en fonction du temps. Dans nos expériences, une diminution du VBR peut être constatée dans la culture contrôle entre 120 min et 180 min. Le VBR augmente globalement de 7 au début du suivi de croissance jusqu'à atteindre 27 à la phase stationnaire. Ainsi, en conditions optimales de croissance, la souche SP<sub>4</sub> SD aurait une production virale variant entre 7 et 27 fois plus élevée que sa propre abondance. Il est probable qu'*in vivo* ces chiffres soient plus faibles, les conditions de croissance étant moins optimales que celles d'une culture sur milieu riche.

Comparé au contrôle précédent, le VBR augmente fortement dans le temps à la suite de l'ajout de la mitomycine C, révélant très nettement l'augmentation extrêmement forte de la production virale vraisemblablement consécutive à la lyse des cellules-hôtes.

### 3.1.2. La cinétique de croissance de l'hôte avec et sans induction par la mise en condition d'anaérobiose

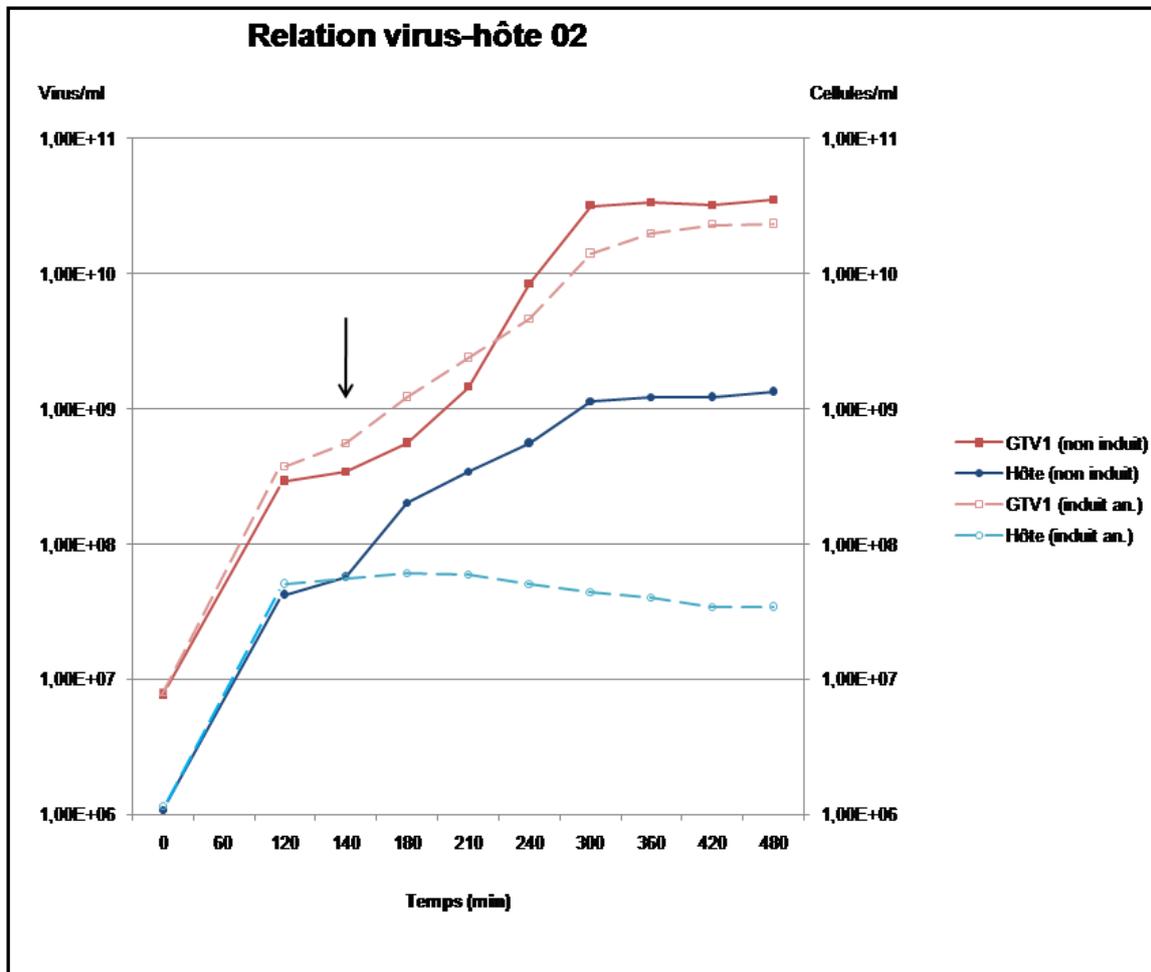


Figure 72. Graphique représentant un suivi de croissance de la souche SP4 SD (sphères bleues pleines) et la production du virus GTV1 (carrés rouges pleins) en fonction du temps. Suite à une induction par passage en conditions d'anaérobiose, la production du virus GTV1 (carrés roses vides) et la croissance de la souche SP4 SD (sphères turquoises vides) sont représentées en fonction du temps. La flèche noire indique le moment du transfert de la culture induite en anaérobiose. an= anaérobiose.

*Geobacillus thermoleovorans* est une espèce aéro-anaérobie facultative. Cependant, en conditions d'anaérobiose, la croissance est faible (Deflaun *et al.*, 2007; Dinsdale *et al.*, 2011). Dès que la culture de SP4 SD est placée en conditions d'anaérobiose, le taux de croissance chute pour atteindre une valeur proche de zéro. La concentration se maintient aux alentours  $5 \times 10^7$  cellules/ml et décline légèrement avec le temps (Figure 72). Parallèlement, la production virale de GTV1 reste soutenue et atteint même des concentrations quasiment similaires à celles décrites précédemment pour la culture témoin. A partir du passage en anaérobiose, l'abondance virale augmente de  $5,5 \times 10^8$  particules/ml à  $2,3 \times 10^{10}$  particules/ml. On peut émettre l'hypothèse que cette augmentation n'est pas

uniquement la conséquence d'une induction spontanée, mais le résultat d'un stress anoxique qui agirait comme un agent inducteur. La croissance bactérienne serait alors annihilée par la lyse virale. La production virale continuerait jusqu'à atteindre une valeur maximale stationnaire. Dans cette phase, la production cesserait probablement suite à une multiplicité d'infection (M.O.I. ou « multiplicity of infection ») élevée qui favoriserait le cycle lysogène (Herskowitz & Banuett, 1984).

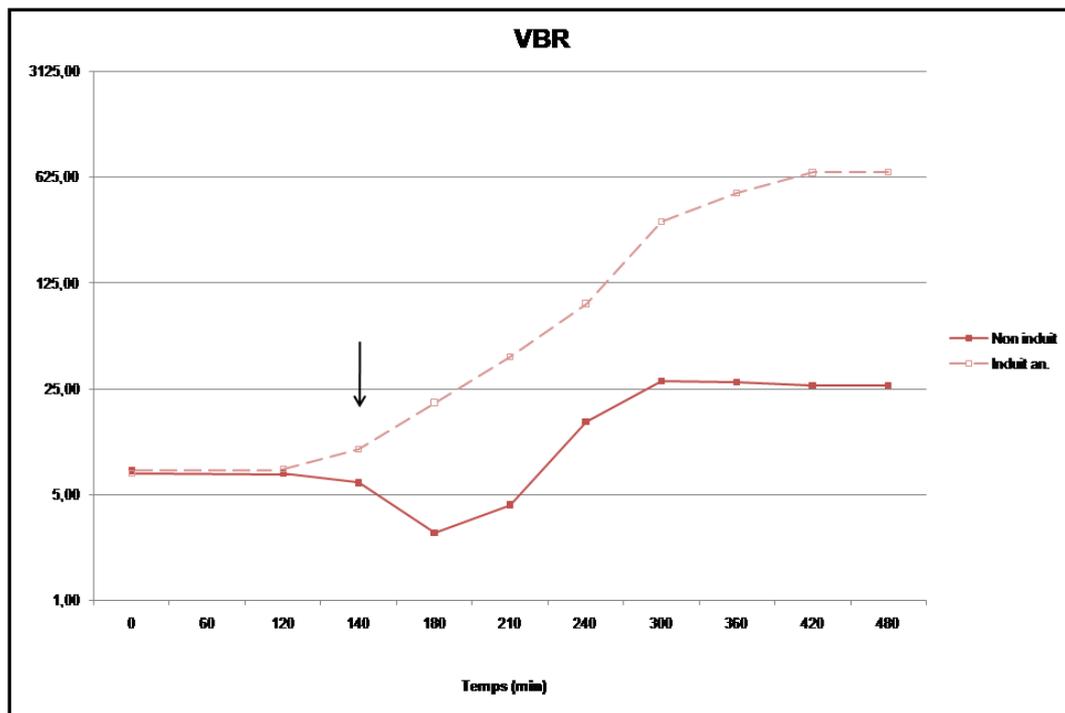


Figure 73. Graphique représentant les VBR de la culture non induite (carrés rouges pleins), de la culture induite par anaérobiose (carrés roses vides) en fonction du temps. La flèche noire représente le moment de l'induction.  
an. = anaérobiose

Lorsque la bactérie est soumise au stress anoxique, une augmentation du VBR est observée (Figure 73). Celle-ci est moins importante que dans le cas de figure de la culture induite par la mitomycine C, mais significativement plus forte que dans le cas de la culture témoin non induite, comme l'indique le VBR dont la valeur passe de 7 à un peu près de 625 (soit 25 fois plus élevé comparativement au témoin). Cette évolution du VBR traduit bien l'effet stressant de l'anaérobiose qui agirait en tant qu'inducteur pour la décision du passage de la lysogénie à la phase lytique.

La croissance en anaérobiose de *G. thermoleovorans* n'a pas été particulièrement étudiée. Cependant, on voit bien qu'une alternance aérobie-anaérobie peut influencer la relation de l'hôte et son virus modifiant par là même la dynamique des populations. En réponse aux conditions d'anaérobiose, les procaryotes vont activer des voies métaboliques alternatives à la respiration d'oxygène, tels que la respiration anaérobie, la fermentation ou

encore la photosynthèse anoxygénique (Patschkowski *et al.*, 2000). Dans une étude récente, Isabella et Clark ont constaté l'induction de l'expression de plusieurs gènes chez *N. gonorrhoeae* suite à la transition d'une culture aérobie en conditions d'anaérobiose (Isabella & Clark, 2011). Parmi l'expression des gènes induits figuraient en particulier des gènes impliqués dans la réparation d'ADN, mais surtout des gènes du phage lysogène Ngoφ1. Une autre étude rapporte un cas chez *P. aeruginosa* (Platt *et al.*, 2008). Dans cette étude, les auteurs ont constaté que parmi les 62 gènes les plus exprimés en culture anoxique, 33 gènes sont impliqués dans la production de phages, suggérant fortement le lien de causalité entre anaérobiose et induction virale.

Les résultats des expériences réalisées sur la souche thermophile SP4 SD indiquent que ce phénomène existe également en condition à haute température.

### 3.1.3. La cinétique de croissance de l'hôte avec et sans induction par ajout de NaCl

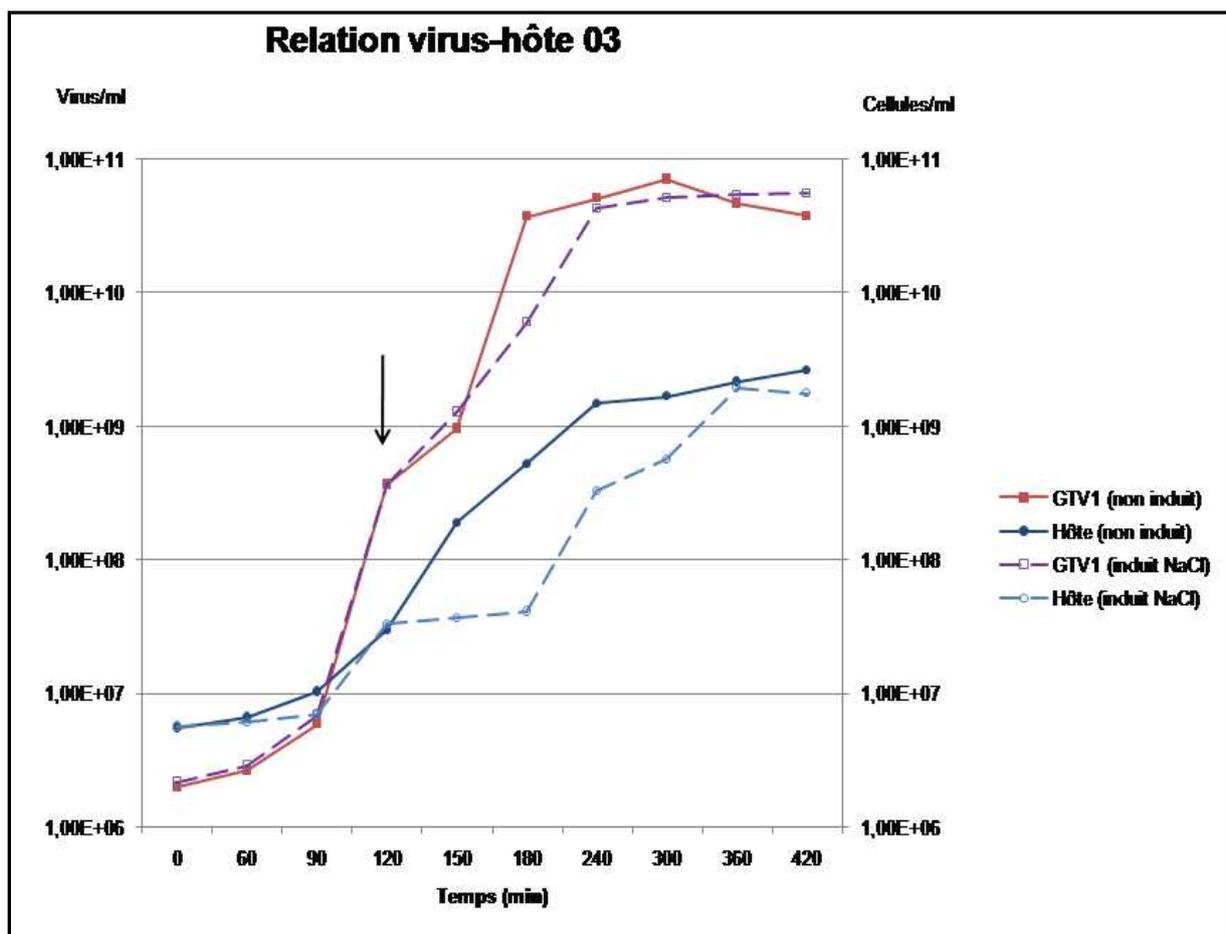


Figure 74. Graphique représentant un suivi de croissance de la souche SP4 SD (sphères bleues pleines) et la production du virus GTV1 (carrés rouges pleins) en fonction du temps. Suite à une induction par ajout de NaCl [30 g/l], la production du virus GTV1 (carrés mauves vides) et la croissance de la souche SP4 SD (sphères bleues claires vides) sont représentées en fonction du temps. La flèche noire indique le moment l'ajout du NaCl.

Dans le but de se rapprocher des conditions environnementales des sources hydrothermales de Saint Paul, une transition d'un milieu sans NaCl à un milieu de concentration de NaCl de 3 % a été envisagée pour étudier l'effet d'un choc osmotique sur le couple GTV<sub>1</sub>/SP<sub>4</sub> SD. En supposant que le taux de NaCl des sources hydrothermales de Saint Paul soit nul, l'émergence au fond du cratère submergé de ces dernières conduirait à un mélange de l'eau de source avec l'eau de mer. La transition serait alors d'approximativement 0 % à 3 % de NaCl.

Une fois le NaCl ajouté après 120 min de culture, la souche SP<sub>4</sub> SD sort de la phase de croissance exponentielle (Figure 74). La croissance entre ensuite dans une période stationnaire de croissance durant environ 60 min. A 180 min de culture, une croissance exponentielle reprend pour atteindre une nouvelle phase stationnaire 360 min de culture. Comparativement à la croissance d'une souche témoin, le NaCl semble induire un retard de croissance qui cependant est finalement comblé. La production virale, en revanche, ne semble pas connaître de période stationnaire après ajout du NaCl, sa concentration augmentant de manière exponentielle jusqu'à environ 240 min de culture, puis comme dans la culture témoin, atteint un plateau.

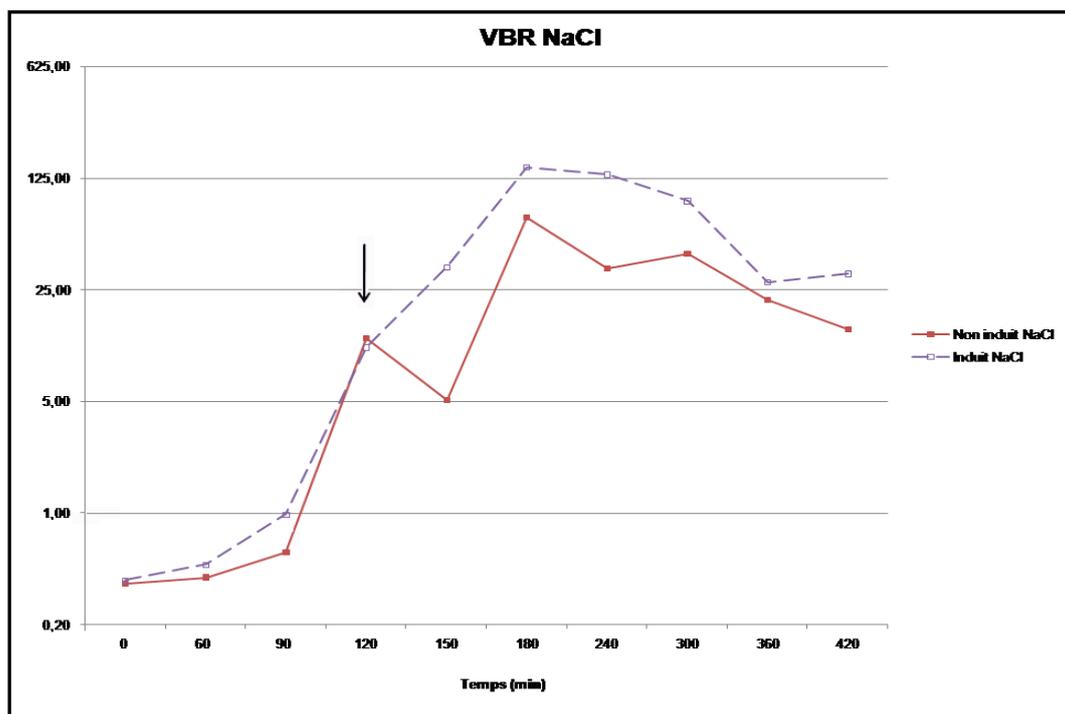


Figure 75. Graphique représentant les VBR de la culture non induite (carrés rouges pleins) et de la culture induite par ajout de NaCl [30 g/l] (carrés mauves vides) en fonction du temps. La flèche noire représente le moment de l'induction.

En comparant le VBR de la culture témoin et celle de la culture induite au NaCl 3 % en fonction du temps, une production virale globalement plus importante peut être constatée dans la culture induite par NaCl (Figure 75).

Une diminution du VBR de la culture témoin au temps 150 min est observable, similairement à celui de la culture témoin de l'expérience précédente, consécutivement à la forte croissance bactérienne exponentielle comparée la production virale. La culture induite au NaCl ne connaît pas de croissance exponentielle et cette diminution du VBR n'est, de ce fait, pas visible. En revanche, lors de la période stationnaire entre 120 min et 180 min de culture, le VBR continue à augmenter de manière importante. La période stationnaire correspond sans doute à une période d'adaptation au choc osmotique et aux nouvelles conditions de culture, car la croissance bactérienne reprend après cette période de 60 min. Une fois arrivée à 180 min, la production virale atteint son maximum et suit un plateau. La croissance bactérienne continuant, le VBR décroît corrélativement. Le taux d'induction spontanée semble ainsi diminuer, car la production virale cesse. Il pourrait s'agir de l'établissement d'un équilibre entre la production virale et la croissance bactérienne, suite à l'adaptation aux nouvelles conditions de culture qui suit le choc osmotique.

Suite à l'induction au NaCl, la production virale est deux à sept fois plus élevée que dans la culture témoin, la différence maximale étant atteinte juste après ajout de NaCl.

L'influence du sel sur la décision lytique des phages a fait l'objet d'études en culture, mais aussi en conditions naturelles dans les années passées. Chez les halophiles, le sel joue un rôle dans la décision du virus HS1 de l'archée *Halobacterium salinarium*, puisqu'en présence de concentrations très élevées en NaCl, HS1 n'est pas produit tandis que des concentrations de NaCl plus faibles semblent stimuler une production lytique de HS1 (Torsvik & Dundas, 1980). Chez la bactérie thermophile *Streptococcus thermophilus*, l'influence du NaCl sur l'induction de son prophage a également pu être démontrée (Husson-Kao *et al.*, 2000). Ainsi une teneur de 2 % en NaCl induit une lyse cellulaire consécutive à l'induction de son prophage et ceci à n'importe quel moment de sa croissance. Une troisième étude sur culture rapporte l'influence du sel sur la lysogénie du phage  $\lambda^{imm434}$  de la bactérie mésophile *E. coli* (Shkilnyj & Koudelka, 2007). En transférant des cultures dans des milieux à teneur en NaCl variable, les auteurs ont constaté une augmentation de l'induction spontanée corrélée à la concentration en NaCl. Le taux d'induction spontanée était 25 fois plus élevé dans un milieu contenant 100 mM de NaCl comparativement à un milieu sans NaCl. Ce taux augmentait pour être 75 fois plus élevé en présence de 300 mM de NaCl. Shkilnyj et Koudelka ont pu établir que le NaCl modifiait l'expression de la protéine répresseur 434 modulant la décision lysogénie/virulence du phage  $\lambda^{imm434}$  dont l'affinité à l'ADN diminuait consécutivement à l'augmentation de la concentration intracellulaire en cations monovalents. Ainsi, son action inhibitrice sur les gènes codant pour le cycle lytique était levé et le cycle lytique engagé par le phage  $\lambda^{imm434}$ .

Ces mêmes auteurs ont également constaté que l'effet du choc osmotique sur la fréquence d'induction spontanée était transitoire. Ils argumentent qu'après adaptation aux nouvelles conditions osmotiques, l'effet du sel sur les gènes est relevé. De manière intéressante, cela se situe à environ 60 min après l'ajout de NaCl, ce qui rappelle tout à fait nos observations sur la culture SP<sub>4</sub> SD en présence de sel. A la différence de la production virale  $\lambda^{imm434}$ , l'augmentation de la fréquence de l'induction spontanée de GTV1 n'est que de 2 à 7 fois plus élevée, d'un ordre de grandeur plus faible que celui du phage  $\lambda^{imm434}$ . Ne connaissant pas la fréquence d'induction spontanée de SP<sub>4</sub> SD, ces résultats sont difficilement explicables. Il est possible que l'effet du choc osmotique n'influence le répresseur de GTV1 en moindre mesure que le répresseur 434 du phage  $\lambda^{imm434}$ .

L'influence du NaCl en conditions environnementales a également été particulièrement étudiée dans un contexte de gradient de salinité, notamment dans les zones estuariennes. Cissoko et collaborateurs ont, par exemple, observé une diminution couplée de la concentration cellulaire et de l'abondance virale quand des bactéries issues d'eau douce se retrouvaient en eau de mer, suggérant une activation des virus tempérés (Cissoko *et al.*, 2008). Dans une autre étude analysant la distribution des populations virales et stratégies de vie dans l'estuaire de Bach Dang (Vietnam), Bettarel et collaborateurs ont postulé l'hypothèse selon laquelle une induction de phages lysogéniques marins se produirait au niveau de la zone de mélange d'eau de mer avec l'eau de la rivière consécutivement à la variation d'osmolarité (Bettarel *et al.*, 2011a). Dans une seconde étude sur les caractéristiques écologiques des virus planctoniques et procaryotiques le long d'un gradient de salinité, Bettarel et collaborateurs ont observé l'existence d'une corrélation négative entre la fraction de cellules infectées lytiquement (déterminée à partir de la fraction des cellules visiblement infectées ou « FVIC ») et le taux de salinité, suggérant une augmentation de la lysogénie en fonction de la concentration croissante du sel (Bettarel *et al.*, 2011b).

Ainsi, à l'image de ce qui a été décrit précédemment, il apparaît que le phage tempéré GTV1 de la souche thermophile *G. thermoleovorans* SP<sub>4</sub> SD est sensible aux fluctuations de la teneur en sel de son milieu de vie, ce qui selon les conditions environnementales influencerait la décision lysogénique ou lytique de son phage. C'est à ma connaissance la première fois que ceci est expérimentalement mis en évidence dans un contexte de source hydrothermale. Ainsi l'émergence de la source chaude d'eau douce dans l'eau de mer pourrait déclencher l'entrée en phase lytique du virus, ce qui pourrait se traduire par l'apparition de bouffées virales dans l'environnement immédiat de la source. Ceci pourrait également se produire au niveau des sources côtières dans la zone de balancement des marées au moment où celles-ci sont exondées et l'eau douce libérée sur un sol salé.

L'effet du choc osmotique et les mécanismes mis en place en réponse au choc par la souche SP<sub>4</sub> SD ne sont pas connus. Cependant, une adaptation à l'augmentation de la concentration de NaCl peut être constatée et la période d'adaptation est accompagnée par une augmentation de la production virale. Cette production virale est sans doute liée à une augmentation de la fréquence d'induction spontanée du virus GTV<sub>1</sub>. Ainsi, il est possible que le NaCl agisse sur un répresseur viral régulant les gènes codant pour le cycle lytique du virus GTV<sub>1</sub> d'une manière analogue à celle décrite pour le virus  $\lambda^{imm434}$  d'*E. coli* (Shkilnyj & Koudelka, 2007). L'effet de plusieurs autres concentrations de NaCl supérieures à 3 % et jusqu'à 10 % a été testé sur la souche SP<sub>4</sub> SD sans que l'on puisse toutefois déceler d'adaptation aux nouvelles conditions de cultures. Suite à l'augmentation de la concentration en NaCl à une valeur supérieure ou égale à 10 %, un blocage de la croissance de la souche SP<sub>4</sub> SD a pu être constaté.

En conclusion, si les effets du sel et de l'anoxie sur la décision lysogénique des virus procaryotiques ont été rapportés en conditions tempérées, ceci n'avait pas encore été documenté en contexte chaud. Ceci n'est pas sans intérêt pour bien comprendre les relations entre ces hôtes extrémophiles et leurs virus dans des conditions environnementales très fluctuantes, puisque les sources chaudes peuvent, comme dans les cas des sources chaudes marines de Saint Paul, subir d'importantes variations de température, d'anoxie, de salinité et même de pH sur des temps courts. On peut donc penser que même si le réseau trophique d'une telle niche écologique est très simple, en raison de l'effet de la température, les fluctuations de ces paramètres doivent moduler de façon relativement complexe (effet de synergie et/ou antagonisme) les dynamiques populationnelles dans les sources hydrothermales.

### 3.2. La génomique

Les analyses d'extraction et de digestion enzymatique indiquent que le virus GTV<sub>1</sub> possède un génome composé d'une molécule d'ADN double brin. Les profils de digestion de l'ADN viral extrait à partir de virus purifié suggèrent que la taille du génome virale serait de l'ordre de 36 kb (Figure 76 A). La digestion de l'ADNccc (ccc pour « covalently closed circular ») non encapsidé extrait directement à partir des cellules de *G. thermoleovorans* SP<sub>4</sub> SD par les mêmes enzymes de restriction donne des profils de restriction différents. L'ADNccc digéré par l'enzyme EcoRI donne naissance à bande d'environ 2.2 kb (Figure 76 B3). Ce profil diffère de celui de l'ADNccc natif (Figure 76 B2). Aucun site de restriction reconnu par l'enzyme HindIII ne semble être présent dans l'ADNccc, celui-ci présentant un profil identique à celui de l'ADNccc natif après digestion (Figure 76 B4).

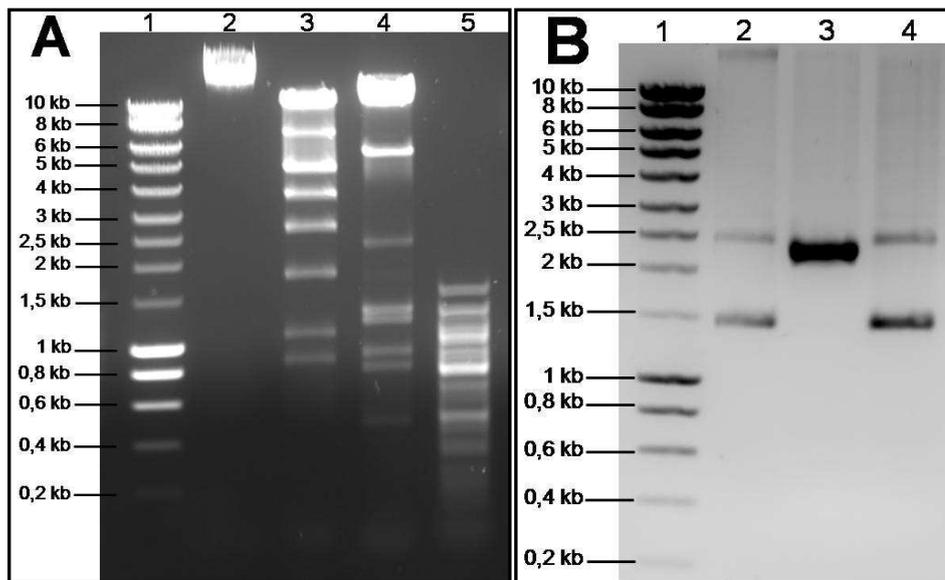


Figure 76. Profils de digestion de l'ADN de GTV1 purifié (A) et de l'ADNccc, présent dans la souche *G. thermoleovorans* SP4 SD (B) par enzymes de restriction, visualisés sur un gel d'agarose à 1 % après électrophorèse. 1) Echelle Eurogentec, 2) ADN natif, 3) ADN digéré avec l'enzyme EcoRI, 4) ADN digéré avec l'enzyme Hind III et 5) ADN digéré avec l'enzyme MboI (uniquement visible dans la figure A). kb= kilo paire de bases.

Ces résultats suggèrent que l'ADNccc ne correspondrait pas à l'ADN génomique viral. Il pourrait s'agir d'un petit plasmide. On peut en déduire qu'à priori l'ADN génomique viral n'est pas présent sous forme libre dans la cellule de l'hôte, ou bien en quantité non détectable. GTV1 est un phage tempéré, on peut émettre l'hypothèse que celui-ci se trouve sous forme de prophage intégré dans le génome de son hôte.

Dans l'optique de confirmer cette hypothèse et poursuivre la description de GTV1, le génome de la souche SP4 SD a été séquencé *de novo*. Cela nous a permis d'obtenir les séquences correspondant au génome de SP4 SD et une série d'analyses bioinformatiques préliminaires ont pu être entamées. Parmi les 384 contigs couvrant à priori l'intégralité du génome bactérien, au moins un contig de 61,35kb contient des signatures virales. L'analyse bioinformatique a permis de détecter la présence d'un élément viral intégré dont le génome aurait une taille estimée de 38,842 kb. Ce génome, qui est constitué 71 cadres ouverts de lecture putatifs (ORFs) et dont le contenu en G+C est de 45.28 %, pourrait correspondre au génome du virus GTV1. Pour 33 de ces ORFs, des fonctions ont pu être prédites dont un certain nombre sont en relation avec des fonctions ou des structures typiquement virales. 36 ORFs partagent des similarités avec des gènes de fonction inconnue à ce jour et trois ne présentent aucune similarité avec des séquences présentes dans les bases de données (Tableau 24).

ORF	Start	Stop	Brin	Longueur (a.a)	Longueur (a.a) (BLAST)	Séquence la plus similaire/ % de similarité organisme	Fonction prédite et/ou structure prédite
1	459	1	-	152	196	Hypothetical protein BV1_gp40/ 95 %/ <i>Bacillus virus 1</i> (YP_001425620.2)	
2	1843	527	-	438	438	FtsK_SpoIIIE family protein/ 88 %/ <i>Bacillus virus 1</i> (YP_001522914.1)	FtsK/SpoIIIE family protein
3	1950	2120	+	30			
4	2771	2424	-	115	115	Hypothetical protein GK0550/ 100 %/ <i>G. kaustophilus</i> HTA426 (YP_146403.1)	
5	3178	2897	-	93	226	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase/ 99 %/ <i>G. kaustophilus</i> HTA426 (YP_146402.1)	LysM superfamily (peptidoglycan-binding module)
6	3578	3180	-	110	222	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980754.1)	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
7	3994	3575	-	139	139	Hypothetical protein GK0548/ 96 %/ <i>G. kaustophilus</i> HTA426 (YP_146401.1)	Holin family
8	4214	4080	-	44	46	Hypothetical protein GY4MC1_o644/ 82 %/ <i>Geobacillus sp. Y4.1MC1</i> (YP_003988083.1)	
9	4590	4216	-	124	124	Hypothetical protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980752.1)	
10	5131	4601	-	176	476	Phage-related putative tail protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980751.1)	
11	6030	5176	-	254	476	Phage-related putative tail protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980751.1)	Phage tail fibre protein
12	6647	6036	-	190	194	Hypothetical protein/ 82 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980750.1)	DUF 2313 (Putative phage tail protein)
13	7256	6651	-	106	238	Hypothetical protein Desmer_3270/ 70 %/ <i>Desulfosporosinus merdicii</i> DSM 13257 (YP_006623018.1)	
14	8282	7269	-	338	341	Protein of unknown function (DUF2793)/ 70 %/ <i>Desulfosporosinus youngiae</i> DSM 17734 (ZP_09656704.1)	
15	8700	8287	-	135	134	Hypothetical protein BAZO_o8446/ 64 %/ <i>Bacillus azotiformans</i> LMG 9581 (ZP_11312950.1)	
16	9742	8705	-	345	346	Baseplate J/ 92 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980749)	Baseplate protein
17	10148	9735	-	137	137	Hypothetical protein/ 99 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980748)	DUF 2634 (Putative baseplate related protein)
18	10405	10148	-	85	85	Hypothetical protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980747)	
19	11366	10407	-	319	319	Hypothetical protein/ 99 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980746)	
20	12042	11368	-	222	223	Peptidoglycan-binding lysin domain-containing protein/ 88 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980745)	LysM family
21	13277	12039	-	412	752	Phage tape measure protein/ 92 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980744)	
22	14295	13342	-	315	752	Phage tape measure protein/ 98 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980743)	
23	14880	14479	-	133	133	Hypothetical protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980743)	
24	15356	14892	-	154	154	Core tail protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980742)	
25	16673	15375	-	432	432	Sheath tail protein/ 99 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980741)	Phage tail sheath protein
26	16855	16673	-	60	60	Hypothetical protein/ 82 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980740)	
27	17246	16839	-	135	135	Hypothetical protein/ 84 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980739)	
28	17634	17236	-	131	132	Hypothetical protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980738)	DUF646 (Putative tail-related protein)
29	17831	17634	-	65	121	Hypothetical protein/ 98 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980737)	
30	18000	17815	-	35	121	Hypothetical protein/ 97 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980737)	
31	18343	18002	-	112	113	Hypothetical protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980736)	Phage gp6-like head-tail connector protein
32	18489	18346	-	22	47	Hypothetical protein/ 100 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980735)	
33	19321	18503	-	272	272	Gp7 / 99 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980734)	
34	19617	19342	-	91	185	Methyl-accepting chemotaxis protein scaffolding protein/ 99 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980733)	Phage minor structural protein GP20
35	19900	19703	-	84	185	Methyl-accepting chemotaxis protein scaffolding protein/ 98 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980733)	Phage minor structural protein GP20
36	20307	20023	-	94	94	Hypothetical protein GC56T3_1371/ 79 %/ <i>Geobacillus sp. C56-T3</i> (YP_003670971)	
37	21655	20300	-	357	485	SPP1 family phage head morphogenesis protein/ 92 %/ <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980731)	Phage Mu F (Minor head related protein)

38	23072	21648	-	474	474	<b>Phage portal protein, SPP1/ 99 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980730)	Portal protein
39	24348	23086	-	349	349	<b>Terminase large subunit/ 99 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980729)	Terminase (Terminase 3 superfamily)
40	24775	24335	-	146	146	<b>Terminase small subunit/ 96 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980728)	Terminase (Terminase 2 superfamily)
41	24936	24796	-	46	49	<b>Hypothetical protein GBVE2_gp061/ 87 %/</b> <i>Geobacillus</i> virus E2 (YP_001285867)	
42	25288	25070	-	72	72	<b>Hypothetical protein GYMC61_o618/ 99 %/</b> <i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61 (YP_003251778)	
43	25747	25304	-	147	166	<b>Phage transcriptional regulator, ArpU family/ 97 %/</b> <i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61 (YP_003251777)	
44	26136	25888	-	69	69	<b>Hypothetical protein/ 97 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980723)	
45	26860	26270	-	194	183	<b>Hypothetical protein Geoth_o768/ 69 %/</b> <i>G. thermoglucosidasius</i> C56-YS93 (YP_004586847)	
46	27290	26871	-	138	138	<b>Hypothetical protein ICW_o3104/ 70 %/</b> <i>Bacillus cereus</i> BAG2X1-2 (ZP_17379879)	RusA (Endodeoxyribonuclease)
47	27799	27290	-	169	169	<b>DUTPase/ 93 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980717)	Hydrolases
48	28105	27938	-	54	55	<b>Hypothetical protein GYMC61_o609/ 87 %/</b> <i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61 (YP_003251769)	
49	28535	28110	-	140	141	<b>Hypothetical protein BAZO_11449/ 54 %/</b> <i>Bacillus azotoformans</i> LMG 9581 (ZP_11313545)	
50	29763	28510	-	415	420	<b>DnaB domain-containing protein helicase/ 59 %/</b> <i>Bacillus bataviensis</i> LMG 21833 (ZP_11308737)	DnaB_C
51	30023	29760	-	87	87	<b>Hypothetical protein GC56T3_o247/ 49 %/</b> <i>Geobacillus</i> sp. C56-T3 (YP_003669892)	
52	30248	30024	-	70	259	<b>Prophage LambdaBaoz, DNA replication protein/ 47 %/</b> <i>Bacillus cereus</i> G9241 (ZP_00240336)	Dna_D (DnaB_2)
53	30804	30310	-	149	283	<b>Putative replication protein/ 78 %/</b> <i>Geobacillus</i> virus E2 (YP_001285845)	
54	30980	30810	-	55	55	<b>Hypothetical protein/ 87 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980713.1)	
55	31851	30970	-	275	289	<b>DNA-binding phage-related protein/ 98 %/</b> <i>Geobacillus</i> phage GBSV1 (YP_764458)	RecT (recombination and repair)
56	32813	31848	-	321	321	<b>YqaJ/ 99 %/</b> <i>Geobacillus</i> phage GBSV1 (YP_764457)	YqaJ
57	33004	32810	-	63	66	<b>Hypothetical protein BH3545/ 60 %/</b> <i>Bacillus halodurans</i> C-125 (NP_244412)	
58	33233	33084	-	39			
59	33406	33212	-	63	63	<b>Hypothetical protein GPGV1_gp55/ 98 %/</b> <i>Geobacillus</i> phage GBSV1 (YP_764510)	
60	33698	33417	-	91	91	<b>Hypothetical protein GPGV1_gp54/ 98 %/</b> <i>Geobacillus</i> phage GBSV1 (YP_764510)	
61	34009	33695	-	104	162	<b>Hypothetical protein GPGV1_gp52/ 100 %/</b> <i>Geobacillus</i> phage GBSV1 (YP_764508)	
62	34087	34404	+	105	105	<b>Hypothetical protein/ 100 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980705)	
63	34542	34393	-	49	49	<b>Hypothetical protein/ 100 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980704)	
64	34768	34556	-	70	187	<b>Prophage antirepressor/ 96 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980703)	Phage antirepressor protein
65	35346	34765	-	189	255	<b>Phage associated-antirepressor protein/ 71 %/</b> <i>Bacillus methanolicus</i> PB1 (ZP_10132706)	Bro-N (Phage associated antirepressor)
66	35597	35361	-	78	78	<b>Predicted transcription regulator/ 99 %/</b> <i>Bacillus</i> virus 1 (YP_001522916)	Helix-turn-helix domain
67	35942	36211	+	89	156	<b>Immunity repressor protein/ 100 %/</b> <i>Bacillus</i> virus 1 (YP_001425626)	
68	36232	36675	+	143	146	<b>Hypothetical protein/ 92 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980700)	
69	37322	36702	-	117			
70	37473	37655	+	57	57	<b>Hypothetical protein/ 95 %/</b> <i>G. thermoleovorans</i> CCB_US3_UF5 (YP_004980697)	
71	37658	38842	+	394	394	<b>DNA integration_recombination protein/ 99 %/</b> <i>Geobacillus</i> phage GBSV1 (YP_764501)	Phage integrase

Tableau 24. Tableau représentant les cadres ouverts de lecture (ORF) putatifs du virus GTV1. Les ORF prédit, ainsi que leur position dans le génome, leur sens de lecture et leur longueur en acides aminés (a.a.) sont représentés. La séquence représentant le plus de similarité, ainsi que sa longueur en acides aminées, est présentée pour chaque ORF. Le pourcentage de similarité, l'organisme auquel appartient chaque séquence et sa fonction prédite par Pfam et BLAST sont associées. Le numéro d'accèsion de chaque souche est mis entre parenthèses. *G. thermoleovorans* = *Geobacillus thermoleovorans*.

Un mosaïcisme typique des génomes de bactériophages caudés peut être deviné au sein du génome de GTV1. En effet, l'analyse des fonctions prédites montre l'existence d'une organisation fonctionnelle et synténique. Ainsi, de l'ORF 2 à l'ORF 7, des fonctions liées à la reconnaissance et aux interactions entre le virus et la paroi bactérienne sont identifiées. Celles-ci comprennent notamment des gènes codant pour des amidases (ORFs 5 et 6) et une holine (ORF 7), impliquées dans l'hydrolyse de la paroi bactérienne. Un opéron fonctionnel peut être également identifié entre l'ORF 10 et l'ORF 37, où de nombreux gènes codant pour des protéines structurales du virion sont prédits. Ainsi, des gènes nécessaires pour la formation de la structure caudale du virion (ORFs 10-12, ORFs 24-25 et ORF 28), pour la plaque basale (ORFs 16 et 17), pour la tête (ORFs 34-35 et 37) ainsi que pour l'interaction entre la tête et la queue (ORF 31) peuvent être clairement identifiés. Cette région est ensuite suivie par une série d'ORFs codant pour des protéines participant au remplissage du virion par le génome viral, dont la « portal protein » (ORF 38) et des terminases (ORFs 39 et 40). Une quatrième région virale rassemblerait des gènes impliqués dans les mécanismes de transcription (ORF 43) et de réplication de l'ADN viral (ORFs 50, 52 et 53) ainsi que sa restriction (ORFs 46 et 47). Ces ORFs sont suivis de gènes codant pour des fonctions liées à la recombinaison génétique (ORFs 55 et 56). Trois ORF impliqués dans la régulation de la transcription (ORFs 64-66) sont également observés. Finalement, une intégrase est identifiable dans le dernier ORF (ORF71). La majorité des gènes viraux prédits est présente sur le brin - .

Parmi les 71 ORFs prédits sur le génome de GTV1, 44 présentent également des similarités avec des séquences de nature procaryotique affiliées au genre *Geobacillus* ou *Bacillus* et 12 avec des séquences de virus infectant des isolats environnementaux thermophiles de ces 2 genres. Parmi ces virus figurent GBSV1 (*Geobacillus* sp.), BV1 (*Bacillus* sp.) et GVE2 (*Geobacillus* sp.), 3 virus infectant des souches isolées de sources chaudes marines côtières (GBSV1 et BV1) ou profonde (GVE2).

Ainsi, six ORFs (ORFs 55, 56, 59, 60, 61 et 71) de GTV1, se situant dans la région terminale allant des gènes impliqués de la recombinaison à l'intégration (ORF 71) partagent des similarités de séquence avec des gènes de GBSV1. Ce dernier est un virus tempéré dont le génome, plus petit, a une taille approximative de 34.7 kb et code pour 54 ORFs. GBSV1 infecte une souche de *Geobacillus* isolée dans une source côtière chinoise extrêmement distante du lieu d'isolement de notre virus GTV1. Le fait qu'il partage certains gènes communs pose la question de la dissémination de ces éléments génétiques au sein des océans ou par une voie souterraine par un réseau d'aquifères pouvant relier les sources chaudes entre-elles.

4 ORFs (ORFs 1-2 et ORFs 66-67) présentent une similitude avec quatre gènes retrouvés chez BV1, tandis que 2 ORFs (ORF 41 et ORF 53) sont communs avec des gènes du virus GVE2. La présence de ces gènes suggère fortement l'existence de phénomènes d'échange génétique entre ces différents types de virus. En effet, contrairement à GTV1, ces

deux virus sont de nature lytique, et de surcroît, si BV1 est également un myovirus, GVE2 est en revanche un siphovirus.

Il est également intéressant de constater que parmi les 44 ORFs de GTV1 présentant des similarités de séquence avec des souches du genre *Geobacillus*, 37 sont partagés avec la souche *Geobacillus thermoleovorans* CCB\_US3\_UF5, dont le génome est intégralement séquencé et accessible en banque génomique. L'intérêt réside en particulier dans le fait qu'une majorité de ces ORFs possède des fonctions virales prédites. Ceci permet de poser l'hypothèse que ce génome bactérien héberge un prophage qui n'a à ce jour pas été détecté comme tel. L'analyse bioinformatique par l'utilisation du logiciel Prophinder (Lima-Mendez *et al.*, 2008), m'a permis de détecter la présence d'un génome prophagique d'une taille de 41497 bp, contenant au moins 64 ORFs. Parmi ceux-ci certains sont donc communs avec GTV1. Une nouvelle fois, se pose la question des modalités de dispersion de ces structures génétiques puisque *G. thermoleovorans* CCB\_US3\_UF5 est issue d'une source chaude (terrestre ou marine) située en Malaisie, ce qui indiquerait une aire de dispersion couvrant une région plus large que l'océan Indien, ce qui pourrait alors signaler une dispersion très ancienne impliquant la dérive des plaques.

Quoique ces éléments d'analyse génomique ne soient que très parcellaires, ils apportent un éclairage intéressant sur l'existence de différents éléments viraux chez les représentants thermophiles des genres *Geobacillus* et *Bacillus*, éléments viraux qui partagent des gènes en commun synonyme d'échanges génétiques.



# Conclusion et perspectives :

L'écologie virale a connu un développement considérable suite à la découverte d'une abondance phénoménale de VLP dans la mer, quantifiées à l'aide de méthodologies de dénombrement directes. En utilisant la microscopie électronique à transmission, Berg et collaborateurs ont découvert une abondance virale aquatique de  $10^3$  à  $10^7$  fois plus élevée que les estimations antérieures qui avaient été faites en utilisant la méthodologie de dénombrement par plages de lyse (Bergh *et al.*, 1989), bouleversant ainsi la perception des écologistes microbiens sur l'importance des virus dans les écosystèmes naturels. Par extrapolation à partir des évaluations d'abondance procaryotique dans des milieux naturels différents, il a été estimé que les virus constitueraient l'entité biologique la plus abondante de la biosphère avec une abondance de  $1.2 \times 10^{30}$  particules dans l'océan ouvert,  $2.6 \times 10^{30}$  dans le sol,  $3.5 \times 10^{31}$  dans la sub-surface océanique et comprise entre 0.25 et  $2.5 \times 10^{31}$  dans la sub-surface des sols (Mokili *et al.*, 2012). Les virus seraient donc omniprésents dans tous types d'environnement, y compris les milieux extrêmes. Ainsi, l'abondance virale serait de l'ordre de  $10^6$ - $10^8$  particules/ml dans les glaces polaires et de  $10^6$  dans les eaux sous-jacentes, de  $10^9$  particules/g dans les sédiments marins profonds et atteindrait les abondances les plus élevées mesurées dans les systèmes aquatiques, allant jusqu'à  $10^9$  particules/ml dans les milieux hypersalins tels que les marais salants et les lacs alcalins (Le Romancer *et al.*, 2007).

Les valeurs du VPR permettent d'apporter des informations complémentaires et précieuses à la simple mesure de l'abondance procaryotique et virale. Elles sont généralement élevées dans les environnements riches en éléments nutritifs, suggérant une plus forte productivité virale de la part des procaryotes lorsque ces derniers sont dans des conditions favorables à leur croissance (Wommack & Colwell, 2000). Il est généralement admis que les facteurs influençant le taux d'élimination viral sont de nature physico-chimique (rayonnement UV, température, pH, etc.) ou biologique (broutage par des protozoaires, dégradation par des exo - ou ecto-enzymes, adsorption dans la matière détritique, etc.). Toutefois, les effets de ces différents paramètres sur les virions demeurent encore peu connus et nécessitent vraiment d'être documentés (Sime-Ngando & Colombet, 2009).

Parmi les environnements qualifiés d'extrêmes, les environnements à haute température représentent un modèle intéressant pour l'étude de la dynamique virale notamment en raison de la faible influence de ses paramètres biologiques sur cette dernière. En effet, un nombre important de sources hydrothermales qui ont été étudiées ont une température qui excède la limite maximale tolérée par les organismes eucaryotiques. Les virus deviennent alors les seuls prédateurs connus des organismes procaryotiques dans ces milieux (Breitbart *et al.*, 2004b). Si aujourd'hui plusieurs études majeures ont été menées pour analyser et comprendre l'abondance et la dynamique des populations virales dans les

océans et les milieux dulquacicoles, très peu de données sont actuellement disponibles sur ces aspects dans les systèmes chauds. On dénombre à ce jour huit études, la moitié consacrée aux sources chaudes terrestres (Chiura *et al.*, 2002; Breitbart *et al.*, 2004b; Schoenfeld *et al.*, 2008), l'autre aux sources marines (Juniper *et al.*, 1998; Wommack *et al.*, 2004; Ortmann & Suttle, 2005; Manini *et al.*, 2008; Williamson *et al.*, 2008).

De l'analyse de la littérature, il ressort que l'abondance procaryotique et virale est généralement faible dans sources hydrothermales, puisque évaluée à  $10^4$ - $10^5$  particules/ml. Deux principales hypothèses mutuellement non exclusives ont été émises pour expliquer une faible abondance virale dans les sources hydrothermales : l'instabilité des virions à haute température et une tendance vers les cycles viraux à phase intracellulaire prolongée (lysogénie, infection chronique et pseudolysogénie). La première hypothèse suggère que les virions subirait des dommages irréversibles suite à l'exposition de manière prolongée à des hautes températures, combinées à d'autres paramètres environnementaux défavorables, tels que des pH acides (Fulton *et al.*, 2009). La deuxième est basée sur une constatation faite sur les virus hyperthermophiles isolés et caractérisés. Exceptés le TTV<sub>1</sub> de l'archée *Thermoproteus* qui est lytique (Prangishvili, 2006b), tous les virus hyperthermophiles isolés à ce jour sont lysogènes ou se maintiennent en état porteur. La deuxième hypothèse rejoint la première dans la mesure où les conditions défavorables de l'environnement favoriseraient le développement de virus dont le cycle de vie permet une exposition minimale aux conditions hostiles (Rice *et al.*, 2001; Ortmann *et al.*, 2006). Favorisée par un état porteur, la production plus ou moins constante de virions sans mort cellulaire permettrait de ce fait à la fois la propagation des virus, tout en assurant simultanément le maintien des virus résidant dans les populations procaryotiques qui les produisent. Les hôtes de ces virus sont par ailleurs souvent insensibles aux agents inducteurs (Prangishvili, 2006b). Les rares virus lytiques hyperthermophiles font donc exception et vont à l'encontre de cette théorie. La stabilité à haute température des particules virales hyperthermophiles n'a été que très rarement étudiée. La relative faible biomasse cellulaire caractérisant en général ces écosystèmes à haute température pourrait également expliquer la faible densité en particules virales qui y est retrouvée (Rice *et al.*, 2001; Prangishvili, 2006a). Il est fort probable que chacune des hypothèses émises contribue peu ou prou à la faible concentration en particules virales dans les sources hydrothermales.

Les travaux que j'ai menés sur les sources chaudes de différents territoires des TAAF ont vocation à enrichir nos connaissances dans ce domaine, et ce d'autant que rares sont les études menées sur des systèmes chauds en hémisphère sud et en zone totalement isolées et dans un contexte plutôt froid. Malheureusement, la contrepartie de l'isolement de ces environnements vierges de toute pollution humaine est la grande difficulté à y mener des suivis temporels. Les résultats obtenus au cours de mon travail suite aux dénombrements des populations procaryotique et virale dans les sources chaudes de Kerguelen ou de Saint Paul montrent que ces systèmes hydrothermaux suivent bien la tendance générale des environnements chauds, à savoir la présence d'une abondance procaryotique et virale globalement faible. Peu de variation dans les abondances cellulaire et virale peut être constatée entre les différentes sources malgré une certaine variabilité dans les paramètres physico-chimiques de ces dernières. Les valeurs VPR relativement basses calculées pour ces sources suggèrent que la productivité virale y est faible. Hormis toute considération du caractère thermophile de ces écosystèmes, les données d'abondance procaryotique et virale combinées aux valeurs de VPR mesurées dans les sources chaudes sont tout à fait similaires à celles caractérisant les environnements oligotrophes.

Dans un avenir proche, il serait important de poursuivre ces études d'abondance dans les nombreuses sources présentes sur la péninsule Rallier du Baty (Kerguelen), dont les paramètres physico-chimiques diffèrent des sources de Val Travers (Kerguelen) et de Saint Paul. Davantage d'études sur l'abondance des microorganismes dans les systèmes chauds sur une échelle plus globale seraient nécessaires pour explorer les caractéristiques oligotrophes de ces milieux. Cela pourrait permettre notamment d'apporter des informations quant au type d'habitat et à l'effet de différents paramètres sur les communautés procaryotiques et les virus associés. Il est envisageable que la haute température soit moins défavorable à la croissance microbienne et ait un effet moins nocif sur les particules virales qu'estimé actuellement. La faible abondance virale pourrait ainsi être plus intimement liée à l'état physiologique des populations-hôtes, dont la croissance serait influencée par l'oligotrophie du milieu. Ainsi, les paramètres physico-chimiques pourraient avoir une influence indirecte plus importante que directe sur l'abondance des microorganismes.

Mes travaux m'ont vraiment permis de prendre conscience de la grande difficulté à dénombrer correctement les abondances populationnelles de ces écosystèmes aquatiques chauds en employant les méthodologies communément utilisées pour ce type de mesure dans les systèmes tempérés. La faiblesse relative des abondances, qui frôle dangereusement la limite de détection par les méthodes de dénombrement directes, nécessite d'analyser des volumes d'échantillon plus importants, ce qui impose plus de manipulations (concentration, etc.) et induit certainement une perte en composants cellulaires ou viraux plus importante. La méthodologie d'ultrafiltration tangentielle permettrait de concentrer des volumes importants d'eau avec une méthode qui a été mise

au point pour le virioplancton marin par Suttle et collaborateurs (Suttle *et al.*, 1991) et optimisé par Wommack et collaborateurs (Wommack *et al.*, 2004). Des concentrations importantes de 4000 à 20 000 fois ont été notamment nécessaires pour effectuer l'étude de la communauté des phages dans les sources chaudes de la Californie menée par Breitbart et collaborateurs (Breitbart *et al.*, 2004b), ainsi que pour réaliser l'étude de métagénomiques et de dénombrements viraux menée par Schoenfeld et collaborateurs (Schoenfeld *et al.*, 2008). Une concentration permettrait également de faciliter l'observation potentielle en MET de nouveaux morphotypes viraux, les environnements à haute température ayant contribué de manière importante à la découverte de plusieurs nouvelles familles de virus ces dernières décennies (Pina *et al.*, 2011; Ackermann & Prangishvili, 2012). Cependant, si la concentration permettrait une meilleure détection des microorganismes, une nécessité d'optimisation des protocoles de dénombrement adaptés aux échantillons de sources hydrothermales subsiste. Les protocoles des méthodes de dénombrement direct ont été mis au point pour les micro-organismes marins essentiellement au courant des 15 dernières années. L'application de la CMF pour les comptages de particules virales devient progressivement plus courante. Cependant, la mise au point de la détection du virioplancton a été faite à l'aide d'échantillons aquatiques tempérés. Les travaux de Brussaard et collaborateurs (Brussaard *et al.*, 2000) ont permis de démontrer que plusieurs populations virales différentes peuvent être détectées et discernées entre-elles. Toutefois, les auteurs notent que le positionnement relatif des populations virales dans les cytogrammes ne peut pas être prédit en fonction de la taille du génome et ou de la morphologie des virus dénombrés. De plus, il est possible que des variations existent dans les résultats de dénombrement lorsque les mêmes échantillons sont analysés dans des laboratoires différents (Duhamel & Jacquet, 2006). Il serait, de ce fait, intéressant de régler de manière précise les protocoles de dénombrement afin d'identifier les populations virales (hyper)thermophiles. Il existe, à l'heure actuelle, huit familles d'archéovirus hyperthermophiles de morphotype différent, ainsi que plusieurs familles encore non-reconnues (Ackermann & Prangishvili, 2012). Des représentants de chacune des familles étant disponibles en culture pure, des paramètres de détection par chacune d'entre-elles en CMF pourraient être définis. Les protocoles de CMF, parmi lesquels figurent notamment l'étape de perméabilisation des virions par traitement à haute température, seraient ainsi adaptés aux virus hyperthermophiles. Certains cytomètres sont également munis d'un dispositif permettant de récupérer des populations identifiées. Des populations virales pourraient potentiellement être récupérées par la suite, lors de l'analyse d'échantillons bruts, et visualisées en MET.

Au laboratoire est actuellement en projet la mise en place de l'utilisation d'aptamères pour la détection et la concentration virale (Odile Vandenabeele-Trambouze). Les aptamères sont utilisés comme outils en virologie clinique. Ils peuvent servir dans la purification et la détection de biomolécules, en tant qu'agents antiviraux et potentiellement dans la thérapie génique (James, 2007). Les aptamères sont acides nucléiques simple brin

(ADNss ou ARNss), ayant des propriétés de reconnaissance moléculaire similaires à celles des anticorps. A la différence à ces derniers, la sélection des aptamères d'intérêt peut être faite *in vitro*, facilitant de ce fait leur obtention (Odile Vandenabeele-Trambouze, communication personnelle). Le processus de production de la plupart des aptamères est dénommé « SELEX » pour «systematic evolution of ligands by exponential enrichment ». Le procédé est basé sur la production de séquences (ADNss ou ARNss) aléatoires incubées *in vitro* en présence de la molécule d'intérêt. Les séquences avec les plus hautes affinités sont alors récupérées et amplifiées (James, 2007). L'usage de ces derniers serait alors envisageable essentiellement selon deux manières : la purification et la concentration des particules virales et l'indentification de virus (couplé à leur dénombrement), et ceci dans des échantillons bruts ou des surnageants de cultures. Pour la purification et concentration des particules virales, les aptamères seraient fixés sur un support, dans une colonne, à travers laquelle un échantillon brut (ou un surnageant de culture) est coulé. Les virions seraient retenus et pourraient être ultérieurement récupérés permettant ainsi une concentration virale et/ou l'identification de virions spécifiques. Cette méthode pourrait répondre au besoin de protocoles efficaces de concentration virale dans les cultures ou les échantillons bruts et servirait ainsi d'alternatif aux méthodologies de concentrations par PEG6000 ou FeCl<sub>3</sub> couramment utilisées à l'heure actuelle. L'indentification des particules virales en utilisant les aptamères serait envisageable par incubation des échantillons bruts en présence de ces derniers, auxquels seraient greffés des fluorochromes. Les échantillons seraient ensuite analysés au cytomètre en flux où l'identification de virions se ferait plus aisément, à l'aide d'un signal fluorescent annexe provenant du fluorochrome.

Les environnements à très haute température étant essentiellement peuplés par des archées hyperthermophiles (López-García & Forterre, 2000), il serait également intéressant d'identifier ces dernières sur les cytogrammes en utilisant des cultures pures. Elles pourraient également être récupérées lors de leur identification ultérieure dans des échantillons bruts, cultivées en laboratoire, et criblées pour la présence d'éléments génétiques mobiles.

Aux virus et leurs hôtes (hyper)thermophiles s'ajoutent les « membrane-vesicles », ou « MV » (Soler *et al.*, 2008; Gaudin *et al.*, 2012). Présentant des caractéristiques similaires aux virus, telles que la taille, la morphologie et la présence d'ADN, elles peuvent être facilement confondues avec de vrais virus. Caractérisés dans les milieux tempérés, l'ADN libre ou attaché aux particules colloïdales (Deflaun *et al.*, 1987; Paul *et al.*, 1987; Paul *et al.*, 1989), ainsi que les GTA et les « phage-like particles » (Lang *et al.*, 2012) peuvent également se présenter sous forme de faux-positifs lors du dénombrement de particules virales par les méthodes de comptage directe. Ainsi, se pose la question fondamentale de la proportion de vrais virus parmi ceux qui figurent dans les résultats de l'estimation de l'abondance virale. Forterre et collaborateurs arrivent également à cette conclusion (Forterre *et al.*, 2013) (Figure 77). Les auteurs soulignent également que la ME est utilisée lors de la construction

de métagénomés viraux pour valider la présence de virus et l'absence de contaminants cellulaires dans les échantillons environnementaux. Ils notent que l'abondance des GTA et des MV est probablement plus élevée qu'estimé actuellement et constatent qu'à l'heure actuelle il n'existe pas de manière suffisamment fiable de discriminer les GTA et les MV des « vrais » virus.

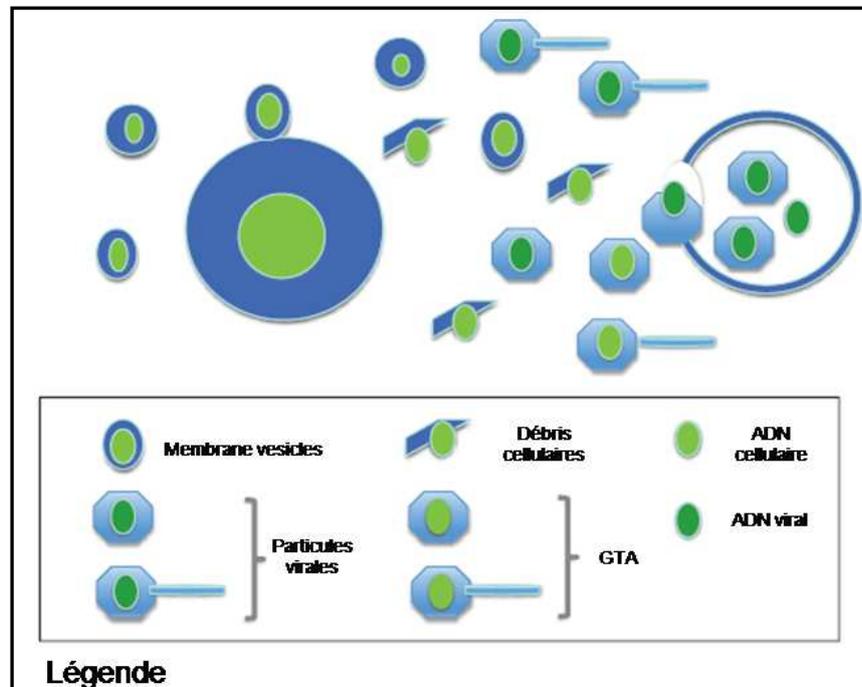


Figure 77. Schéma représentant différents types de particule contenant des acides nucléiques dans l'environnement et pouvant fluorescer lors des analyses en microscopie à épifluorescence. Le cercle bleu plein à gauche représente une cellule produisant des vésicules (« membrane vesicles ») et de l'ADN extracellulaire. Le cercle bleu vide à droite représente une « virocell » (= cellule productrice de virion, définie par Forterre et collaborateurs (Forterre, 2010)) produisant des particules virales et des GTA (« Gene transfer agents »). L'ADN est représenté sous forme de cercle ovoïde plein de couleur vert, faisant référence à la fluorescence. L'ADN de couleur vert foncé est viral et verte claire est cellulaire. Adapté à partir de (Forterre *et al.*, 2013)

Le problème de discrimination entre les vrais virus et les autres particules contenant des acides nucléiques est très difficile en ME. En revanche, la CMF étant à priori capable de discriminer entre différentes populations (et de récupérer des populations identifiées pour des manipulations ultérieures), il semblerait crucial d'effectuer des analyses de tous types de particules contenant des acides nucléiques afin d'explorer la proportion des faux positifs parmi les particules virales. Comme pour les virus de haute température, les analyses pourraient être réalisées dans un premier temps à l'aide de cultures pures afin d'estimer la production de MV et de GTA, qui demeure encore à ce jour peu connue. Dans un deuxième temps, les proportions de MV, de GTA et d'ADN libre pourraient être évaluées dans les échantillons bruts. Le dénombrement par MET pourrait servir de méthode complémentaire, comme le fait également remarquer Forterre et collaborateurs (Forterre *et al.*, 2013). Il est important de noter que dans le contexte de cette étude, la production de GTA, de MV et

d'ADN libre n'a pas été encore quantifiée dans les systèmes à haute température. De plus, la présence même de GTA et d'ADN libre n'a pas été, à ma connaissance, décrite dans les sources chaudes. Il est cependant probable que leur présence ne représente qu'une proportion minime dans ces écosystèmes. A haute température les acides nucléiques libres se dénaturent probablement rapidement en absence de protection capsidique ou vésiculaire. Dans le cas de figure où les GTA, les MV et l'ADN libre constitueraient une fraction importante des VLP dénombrées, il serait sans doute judicieux d'employer la notion « gene transfert agents » au lieu de VLP par millilitre d'échantillon. Dans cette circonstance, il serait raisonnable d'élargir la notion « d'agent de transfert de gène » pour y inclure également les MV, l'ADN libre (associé à des particules colloïdales), dont la capacité de transfert de gènes a déjà été démontrée (Deflaun *et al.*, 1987; Paul *et al.*, 1989; Lang *et al.*, 2012).

La métagénomique virale a connu des avancées importantes depuis la mise au point de protocoles pour la construction de métagénomoviraux marins (Breitbart *et al.*, 2002). Les progrès dans les méthodes de séquençage et la diminution du coût associé ont permis la construction de 24 métagénomoviraux à partir d'échantillons environnementaux. A travers ces métagénomoviraux, il a été possible d'explorer la structure de communautés virales et d'identifier de nouveaux virus ainsi que de nouveaux gènes viraux (Rosario & Breitbart, 2011). L'étude des communautés virales à grande échelle, menée par Angly et collaborateurs (Angly *et al.*, 2006), a suggéré une diversité virale générale très élevée dans les océans, les échantillons contenant probablement jusqu'à plusieurs centaines de milliers d'espèces. L'avantage de l'approche métagénomique est l'exploration des virus « cultivables » et « non-cultivables », reflétant les structures des communautés virales dans leur ensemble. Les communautés virales des sources chaudes restent encore très majoritairement inexplorées. Il existe, à l'heure actuelle, trois métagénomoviraux construits à partir d'échantillons de sources hydrothermales : deux proviennent de sources hydrothermales océaniques profondes et un de sources chaudes terrestres. Snyder et Young suggèrent que les environnements acides à haute température seraient idéales pour des études de métagénomique comparative (Snyder & Young, 2011). Les auteurs argumentent que ce type d'environnement contient une diversité microbienne restreinte, composée typiquement de moins de 10 espèces d'archées dominantes et 10-100 types viraux dominants. La dynamique virale pourrait ainsi être étudiée en construisant des métagénomoviraux procaryotiques et viraux, dont l'évolution serait suivie en fonction du temps. Les résultats préliminaires obtenus à partir d'échantillons de Yellowstone révéleraient une dynamique virale intéressante fluctuant sur une échelle de temps se comptant en mois.

Cependant, si les progrès technologiques continuent à faciliter l'acquisition importante de données brutes, la grande majorité demeure inexploitable. Ceci est la conséquence de l'analyse bioinformatique qui permet l'identification des séquences des métagénomoviraux obtenues. A l'heure actuelle, les métagénomoviraux comprennent 810 Mpb de séquences

(représentant ~ 70 % de la totalité des séquences obtenues par la métagénomique virale) qui ne présentent aucune similarité avec les bases de données (Rosario & Breitbart, 2011). L'absence de similarité de séquence est sans doute lié au faible nombre de virus séquencés (721 génomes de bactériovirus et seulement 38 génomes d'archéovirus), au biais lié à la nature de virus séquencés (la majorité des phages séquencés sont des virus de bactéries pathogènes de l'humain et des animaux, plutôt que des phages de bactéries environnementales non-pathogènes) et à celui de l'annotation et de la validation des gènes des virus séquencés (30 % des gènes viraux auraient une fonction encore inconnue (Rosario & Breitbart, 2011). La métagénomique virale présente ainsi un potentiel intéressant pour la compréhension de la structure des communautés virales, leur répartition sur une petite et une grande échelle, ainsi que de l'évolution au cours du temps de ces aspects. Afin de pouvoir exploiter les données générées par la construction de métagénomiques virales, la nécessité de décrire plus de nouveaux virus devient indispensable. La découverte de nouveaux virus, leur séquençage et l'annotation de gènes validés par des manipulations *in vitro* seraient essentiels pour alimenter les bases de données contre lesquelles sont comparées les séquences.

Les méthodes culturales influencent fortement la découverte de nouvelles souches procaryotiques et des virus associés. Les enrichissements de culture en fiole permettent essentiellement la culture d'un nombre restreint de souches procaryotiques. Les souches poussant les plus aisément dominent vite la culture d'enrichissement diminuant en conséquence la diversité microbienne. Une manière de préserver une certaine diversité microbienne est d'effectuer des cultures en bioréacteur. Les échantillons bruts sont alors mis en culture dans des conditions contrôlées (pH, température, flux du milieu choisi, apport en gaz) et la culture en continu permet de récupérer à fur et à mesure les microorganismes s'y développant. Dans la culture d'échantillons bruts des cheminées hydrothermales en fiole, il a pu être constaté que les *Thermococcales* se développaient généralement vite et dominaient les cultures d'enrichissement. Néanmoins, en utilisant des bioréacteurs, une plus grande diversité microbienne a pu être maintenue, avec le développement de plusieurs espèces bactériennes au cours du temps (Postec *et al.*, 2005; Postec *et al.*, 2007).

La mise en place d'une méthodologie complémentaire à la culture en bioréacteur est actuellement en cours au laboratoire: l'immobilisation de procaryotes dans des billes de polymère (Gwenaëlle Le Blay ; communication personnelle). Des fragments d'échantillons environnementaux sont immobilisés dans des billes de 1 à 2 mm de diamètre, composées de gellane et de xanthane. Ces billes sont ensuite mises en culture dans un bioréacteur, dont elles occupent approximativement 30 % du volume. Les microorganismes se développent au sein du gel dont les échanges avec les nutriments présents dans le milieu de culture sont maintenus. Les cellules colonisent progressivement les billes et sont pour partie relarguées dans le milieu de culture. L'avantage de l'immobilisation cellulaire, par rapport aux cultures « planctoniques », est notamment une meilleure stabilité des différentes populations

microbiennes qui peuvent être cultivées sur de longues périodes, l'absence de lessivage des souches les moins compétitives qui sont maintenues dans les billes, la protection des cellules face aux forces de cisaillement, une protection contre l'oxygène (dans le cas de cultures anaérobies), ainsi qu'une meilleure interaction entre les cellules et la formation potentielle de biofilms (Cinquin *et al.*, 2004) et (Gwenaëlle Le Blay; communication personnelle).

Une diversité microbienne intéressante ayant été détectée dans les sources hydrothermales des TAAF par des approches moléculaires lors de travaux antérieurs à ce travail de thèse, il serait ainsi envisageable d'isoler de nouvelles espèces procaryotiques en réalisant des cultures en bioréacteur. Le milieu de culture sortant des bioréacteurs pourrait être également analysé pour la présence de VLP et utilisé pour effectuer des tests d'infection sur des isolats déjà disponibles. Cette approche a déjà fait ses preuves. Des études menées sur des enrichissements, effectués en bioréacteur en anaérobiose à 85°C, inoculés avec des échantillons provenant de sources hydrothermales de Yellowstone ont révélé la présence de plusieurs morphotypes viraux différents, incluant des virions caudés, filamenteux, sphériques et en forme de cuillère (Rachel *et al.*, 2002; Garrett *et al.*, 2010). Au laboratoire, la présence d'un signal positif en épifluorescence a déjà été détecté dans un milieu de culture provenant d'un bioréacteur (à culture « planctonique ») contenant un enrichissement fait avec des échantillons de cheminées hydrothermales (Byrne *et al.*, 2009). Il serait ainsi intéressant de poursuivre cette étude en incluant la méthodologie d'immobilisation de procaryotes.

Les méthodes culturales fournissant des souches permettraient le criblage de nouveaux virus. Il est probable que les virus d'archées isolés, constituant les nouvelles familles virales des procaryotes décrits ces dernières décennies, ne représenteraient qu'une fraction des familles virales existantes et encore non découvertes. De plus, les virus d'archées décrits n'ont été isolés qu'à partir d'un nombre limité d'espèces archéennes, provenant d'une gamme étroite d'habitats. Par opposition, la dernière description d'un virus de bactérie constituant une nouvelle famille virale a été faite dans les années 1970 (Ackermann & Prangishvili, 2012). Prestel et collaborateurs (Prestel *et al.*, 2012) ont cependant découvert une variabilité morphologique inattendue des bactériovirus dans des environnements extrêmes, suggérant qu'une diversité de morphotype viral de phage pourrait encore attendre sa découverte.

Il serait ainsi intéressant de poursuivre la description de la VLP découverte associée à la souche MC 6 de *Thermosipho africanus*. Pour ceci, il serait nécessaire d'obtenir de hautes concentrations de particules afin de pouvoir en extraire le génome. Une haute concentration serait également nécessaire pour définir sa densité sur un gradient de chlorure de césium ou d'iodixanol, permettant également la purification des particules virales. Pour la formation d'un gradient adéquat, le type de rotor utilisé est sans doute

important. Selon les recommandations de Lawrence et Steward dans le Manuel d'Écologie Virale Aquatique (Lawrence & Steward, 2010), les rotors à angle fixe peuvent être utilisés pour une séparation isopycnique. Cependant, plusieurs tentatives de purification avec des protocoles différents ont été effectuées sur la VLP de la souche MC 6 et sur le virus GTV1 durant ce travail sans succès, hélas. Le protocole de gradient de densité en utilisant l'iodixanol, qui a été mis au point en se basant sur des données différentes détaillées par le fournisseur Axis-Shield (Application Sheet n°Vo3 : <http://www.axis-shield-density-gradient-media.com/Vo3.pdf>), a permis d'obtenir une fraction virale lorsque ce protocole a été testé avec les particules virales de GTV1. La séparation avec une allure zonale plutôt qu'isopycnique. Toutefois, il semblerait que l'utilisation d'un rotor du type « swing-bucket » soit nécessaire pour une meilleure séparation (constatation personnelle ; Julien Lossouarn, communication personnelle). Les rotors du type « swing-bucket » sont par ailleurs couramment utilisés pour la purification virale et seraient parfaits pour une séparation zonale et isopycnique (Lawrence & Steward, 2010).

La description de nouveaux couples hôte-virus permettrait aussi d'apporter des éléments pour mieux comprendre la dynamique des populations procaryotiques et virales dans les écosystèmes chauds. La recherche de nouveaux virus pourrait aboutir à la découverte de représentants de nouvelles familles virales et/ou des virus ayant subi des modifications morphologiques permettant l'adaptation à ce type de milieu. Un exemple est celui du virus Sol P11, qui est un siphovirus, mais dont la queue forme un « ruban » se substituant aux fibres caudales, qui pourraient représenter des structures trop fragiles dans son environnement (Prestel *et al.*, 2012). Si plusieurs familles virales avec des morphotypes très variés ont été découvertes dans les milieux à très haute température, aucun virus de l'ordre des *Caudovirales* n'a été encore décrit à des températures excédant 80°C. La présence de *Caudovirales* a cependant déjà été constatée dans des enrichissements à 85°C (Rachel *et al.*, 2002) et dans des souches de méthanogènes hyperthermophiles *in silico* (Krupovic *et al.*, 2010). En revanche, à des températures moins élevées, plusieurs virus appartenant à l'ordre des *Caudovirales* ont été décrits, notamment associés à des *Geobacillus* et des *Thermus*. Il serait intéressant d'effectuer des comparaisons de séquence de virus au sein des *Geobacillus* afin d'explorer les similarités. Cela pourrait notamment apporter des informations quant aux échanges de modules génétiques au sein des virus des systèmes chauds.

La comparaison de séquences microbiennes pourrait apporter des éléments de réponse à la question de l'occurrence de gènes communs au sein des populations thermophiles, isolées par des barrières virtuelles mésophiles. Ainsi, la caractérisation des populations microbienne et virale permettrait non seulement d'alimenter les bases données génomiques, mais également de comparer les génomes de ces espèces. A travers ces comparaisons génomiques, il serait possible de postuler des hypothèses quant à la dispersion des microorganismes extrêmophiles. Les sources chaudes constituent-elles des « îlots dans un océan mésophile virtuel », caractérisés par une diversité microbienne et

virale propre à chaque source du fait de leur isolement géographique ? Peut-on, au contraire, retrouver des populations apparantées au sein des sources chaudes ? Si oui, à une échelle locale, continentale ou planétaire ? Existerait-il une dissémination des microorganismes thermophiles à la manière postulé par Breitbart et Rohwer (Breitbart & Rohwer, 2005) où « tout est partout et l'environnement détermine les espèces dominantes et dominées » et où « l'ensemble des espèces constituent une "banque" génomique inactive avec une potentialité d'activation déclenchée par l'environnement » ? Si la dissémination des microorganismes par voie aéroportée et par les courants d'eau a été démontrée pour les microorganismes mésophiles, il n'existe virtuellement aucune donnée sur ces aspects pour les populations microbienne et virale extrêmophiles. Quelques données obtenues par Audrey Gramain sur les sources de Rallier du Baty suggèrent qu'une dissémination par voie aéroportée est cependant possible. Ainsi, les populations microbiennes se déplacent probablement de source en source par voie souterraine, mais également par voie aérienne. Si cela est vrai pour les cellules, il est tout à fait concevable que la dissémination des virus se fasse de manière similaire. Ainsi, un échange de gènes médié par les virus entre les populations microbiennes serait envisageable à la manière « d'un courrier aérien » entre différents sources chaudes.

De manière complémentaire à la comparaison génomique des populations microbienne et virale, il serait également intéressant de comparer les séquences de myovirus de *Geobacillus* avec celles des myovirus de différentes espèces de *Bacillus*. La gamme de température à laquelle croissent les *Geobacillus* est large (30°C - 80°C) et leurs habitats sont variés (Coorevits *et al.*, 2012). Ainsi, un échange potentiel d'éléments génétiques mobiles avec des espèces de *Bacillus* mésophiles pourrait être envisageable, malgré le fait que la gamme d'hôtes des virus de procaryote soit généralement restreinte aux espèces d'un même genre (Ackermann & Prangishvili, 2012). L'échange d'éléments génétiques mobiles entre microorganismes mésophiles thermotolérants et thermophiles modérés permettrait ainsi une alimentation génétique remontant une échelle virtuelle de température.

Afin de mieux comprendre la dynamique des populations virales dans les écosystèmes chauds, il faudrait poursuivre les dénombrements viraux de GTV<sub>1</sub> *in vitro*, suite à l'induction par différents stress. La production virale pourrait être mesurée par exemple suite à l'ajout de différents taux de NaCl, à l'ajout d'autres types de sel, à des fluctuations de température ou de pH. L'effet inducteur de la carence nutritive pourrait également être exploré. Ces manipulations permettraient de simuler les conditions subites *in vivo*, et le couple SP<sub>4</sub> SD-GTV<sub>1</sub> servirait ainsi de modèle pour une meilleure compréhension des paramètres influençant la production virale. D'autres couples hôtes-virus pourraient être isolés et l'influence de différents paramètres sur la production virale pourraient être étudiée. Il est probable que l'effet inducteur de différents paramètres sur différentes espèces procaryotiques n'est sans doute pas le même. Ainsi, si le NaCl a un effet inducteur sur *Escherichia coli* (Groman, 1965; Shkilnyj & Koudelka, 2007) et *Streptococcus thermophilus*

(Husson-Kao *et al.*, 2000), il n'en est rien pour un genre proche, *Salmonella thompson* (Smith, 1953). Les résultats des analyses effectuées avec le couple hôte-virus étudié dans ce travail ont permis d'éclairer l'effet que pourraient potentiellement avoir différents paramètres environnementaux sur la production virale.

L'exploration de la diversité virale par la MET a suggéré la présence de nouveaux types de VLP associés aux microorganismes qui se développent dans ces sources chaudes. La présence de MV a également été notée, témoignant l'importance potentielle que ces dernières pourraient avoir en tant qu'agents de transfert de gènes. Les observations en MET ont également permis l'observation de nouvelles structures cellulaires chez les organismes thermophiles, à savoir l'existence de gaines flagellaires. Leur rôle demeure un mystère, mais elles pourraient participer à la colonisation de certains types d'environnement spécifique, comme cela a été suggéré pour la gaine de *Helicobacter pylori* (Kostrzynska *et al.*, 1991).

Les données obtenues suite à l'exploration de l'abondance procaryotique et virale et de la diversité virale par la MET, ainsi que les résultats acquis avec le modèle hôte-virus SP4 SD - GTV<sub>1</sub>, permettent de dessiner un esquisse du type d'écosystème que sont les sources hydrothermales des Terres australes et antarctiques françaises. Les résultats sont en accord avec la littérature actuelle sur les écosystèmes chauds et les populations microbienne et virale qui les peuplent. Ainsi, ces travaux permettent d'alimenter la connaissance sur ce type de milieux. Les résultats obtenus au cours de cette thèse ne concernent cependant qu'une fraction des communautés microbiennes et virales qui peuplent ces sources chaudes. Une poursuite de la caractérisation des populations procaryotiques et l'étude de la dynamique virale au sein de ces sources chaudes, isolées d'environ 3000 km de tout continent et indemne de toute activité humaine, serait séduisant pour une compréhension plus complète de l'activité microbienne dans ce type d'écosystème.





# Références Bibliographiques

## A

- Abrescia, N. G., D. H. Bamford, J. M. Grimes and D. I. Stuart** (2012). "Structure unifies the viral universe." *Annu Rev Biochem* **81**: 795-822.
- Abrescia, N. G., J. M. Grimes, E. E. Fry, J. J. Ravantti, D. H. Bamford and D. I. Stuart** (2010). "What does it take to make a virus: the concept of the viral "self."." In *Emerging Topics in Physical Virology* ed. **PG Stockley, R Twarock, London: Imperial College Press**: 35-58.
- Ackermann, H.-W. and M. S. DuBow** (1987). "Viruses of Prokaryotes." In: *General Properties of Bacteriophages* (CRC Press, Boca Ranton) **1**.
- Ackermann, H.-W. and M. Heldal** (2010). "Basic electron microscopy of aquatic viruses." In S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer, and Suttle C.A. [eds.], *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO.: 182-192.
- Ackermann, H. W.** (1992). "Frequency of morphological phage descriptions." *Arch Virol* **124** (3-4): 201-209.
- Ackermann, H. W.** (1996). "Frequency of morphological phage descriptions in 1995." *Arch Virol* **141** (2): 209-218.
- Ackermann, H. W.** (2001). "Frequency of morphological phage descriptions in the year 2000. Brief review." *Arch Virol* **146** (5): 843-857.
- Ackermann, H. W.** (2007). "5500 Phages examined in the electron microscope." *Arch Virol* **152** (2): 227-243.
- Ackermann, H. W., R. R. Azizbekyan, R. L. Bernier, H. de Barjac, S. Saindoux, J. R. Valero and M. X. Yu** (1995). "Phage typing of *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis*." *Res Microbiol* **146** (8): 643-657.
- Ackermann, H. W. and D. Prangishvili** (2012). "Prokaryote viruses studied by electron microscopy." *Arch Virol* **157** (10): 1843-1849.
- Ackermann, H. W. and K. L. Tiekotter** (2012). "Murphy's law-if anything can go wrong, it will: Problems in phage electron microscopy." *Bacteriophage* **2** (2): 122-129.
- Adant, M.** (1928). "Les bactériophages des microbes thermophiles." *Compt. Rend. Soc.Biol* **99**: 1244-1245.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman** (1990). "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* **215** (3): 403-410.
- Amend, J. P., K. L. Rogers and D. R. Meyer-Dombard** (2004). "Microbially mediated sulfur-redox: Energetics in marine hydrothermal vent systems." In: *Sulfur Biochemistry, Past and Present* (n°379) (Amend, J.P., Edwards, K.J., Lyons, T.W. eds) Geological Society of America: 17-34.
- Anderson, R. E., W. J. Brazelton and J. A. Baross** (2011). "Using CRISPRs as a metagenomic tool to identify microbial hosts of a diffuse flow hydrothermal vent viral assemblage." *FEMS Microbiol Ecol* **77** (1): 120-133.
- Angly, F. E., B. Felts, M. Breitbart, P. Salamon, R. A. Edwards, C. Carlson, A. M. Chan, M. Haynes, S. Kelley, H. Liu, J. M. Mahaffy, J. E. Mueller, J. Nulton, R. Olson, R. Parsons, S. Rayhawk, C. A. Suttle and F. Rohwer** (2006). "The marine viromes of four oceanic regions." *PLoS Biol* **4** (11): e368.
- Ansari, S. A., S. R. Farrah and G. R. Chaudhry** (1992). "Presence of human immunodeficiency virus nucleic acids in wastewater and their detection by polymerase chain reaction." *Appl Environ Microbiol* **58** (12): 3984-3990.
- Arakawa, C. K., R. E. Deering, K. H. Higman, K. H. Oshima, P. J. O'Hara and J. R. Winton** (1990). "Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a nucleoprotein gene sequence of infectious hematopoietic necrosis virus." *Dis.Aquat. Org.* **8**: 165-170.

**Ash, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks and M. D. Collins** (1991). "Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences." *13* (4): 202-206.

**Auguet, J. C., H. Montanié and P. Lebaron** (2006). "Structure of Virioplankton in the Charente Estuary (France): Transmission Electron Microscopy versus Pulsed Field Gel Electrophoresis." *Microb Ecol* **51**: 197-208.

**Aziz, R. K., D. Bartels, A. A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R. A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E. M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G. J. Olsen, R. Olson, A. L. Osterman, R. A. Overbeek, L. K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G. D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke and O. Zagnitko** (2008). "The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology." *BMC Genomics* **9**: 75.

**Aziz, R. K., S. Devoid, T. Disz, R. A. Edwards, C. S. Henry, G. J. Olsen, R. Olson, R. Overbeek, B. Parrello, G. D. Pusch, R. L. Stevens, V. Vonstein and F. Xia** (2012). "SEED servers: high-performance access to the SEED genomes, annotations, and metabolic models." *PLoS One* **7** (10): e48053.

## B

**Bailey, J. E., J. Fazel-Makjlessi, D. N. McQuitty, Y. N. Lee, J. C. Allred and J. A. Oro** (1977). "Characterization of bacterial growth by means of flow microfluorometry." *Science* **198** (4322): 1175-1176.

**Balch, W. E., G. E. Fox, L. J. Magrum, C. R. Woese and R. S. Wolfe** (1979). "Methanogens: reevaluation of a unique biological group." *Microbiol Rev* **43** (2): 260-296.

**Baltimore, D.** (1971). "Expression of animal virus genomes." *Bacteriol Rev* **35** (3): 235-241.

**Bamford, D. H.** (2003). "Do viruses form lineages across different domains of life?" *Res Microbiol* **154**: 231-236.

**Bamford, D. H., R. M. Burnett and D. I. Stuart** (2002). "Evolution of viral structure." *Theor Popul Biol* **61** (4): 461-470.

**Bamford, D. H., J. M. Grimes and D. I. Stuart** (2005). "What does structure tell us about virus evolution?" *Curr Opin Struct Biol* **15** (6): 655-663.

**Bandea, C. I.** (1983). "A new theory on the origin and the nature of viruses." *J Theor Biol* **105** (4): 591-602.

**Bari, W., K. M. Lee and S. S. Yoon** (2012). "Structural and functional importance of outer membrane proteins in *Vibrio cholerae* flagellum." *J Microbiol* **50** (4): 631-637.

**Bath, C., T. Cukalac, K. Porter and M. L. Dyal-Smith** (2006). "His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, Salterprovirus." *Virology* **350** (1): 228-239.

**Bath, C. and M. L. Dyal-Smith** (1998). "His1, an archaeal virus of the Fuselloviridae family that infects *Haloarcula hispanica*." *J Virol* **72** (11): 9392-9395.

**Bell, P. J.** (2001). "Viral eukaryogenesis: was the ancestor of the nucleus a complex DNA virus?" *J Mol Evol* **53** (3): 251-256.

**Ben Hania, W., R. Ghodbane, A. Postec, C. Brochier-Armanet, M. Hamdi, M. L. Fardeau and B. Ollivier** (2011). "Cultivation of the first mesophilic representative ("mesotoga") within the order Thermotogales." *Syst Appl Microbiol* **34** (8): 581-585.

**Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Bratbak and M. Heldal** (1989). "High abundance of viruses found in aquatic environments." *Nature* **340** (6233): 467-468.

**Bertoldo, C. and G. Antranikian** (2006). "The Order Thermococcales." In: *The Prokaryotes: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes* (Chapter 5) (Dworking, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. and Stackebrandt, E. eds) Springer LLC **3**: 69-81.

- Bettarel, Y., T. Bouvier, M. Agis, C. Bouvier, T. V. Chu, M. Combe, X. Mari, M. N. Nghiem, T. T. Nguyen, T. T. Pham, O. Pringault, E. Rochelle-Newall, J. P. Torreton and H. Q. Tran (2011a).** "Viral distribution and life strategies in the Bach Dang Estuary, Vietnam." *Microb Ecol* **62** (1): 143-154.
- Bettarel, Y., T. Bouvier, C. Bouvier, C. Carre, A. Desnues, I. Domaizon, S. Jacquet, A. Robin and T. Sime-Ngando (2011b).** "Ecological traits of planktonic viruses and prokaryotes along a full-salinity gradient." *FEMS Microbiol Ecol* **76** (2): 360-372.
- Bettarel, Y., T. Sime-Ngando, C. Amblard and H. Laveran (2000).** "A comparison of methods for counting viruses in aquatic systems." *Appl Environ Microbiol* **66** (6): 2283-2289.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979).** "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7** (6): 1513-1523.
- Borrel, G., J. Colombet, A. Robin, A. C. Lehours, D. Prangishvili and T. Sime-Ngando (2012).** "Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat." *ISME J*.
- Borsheim, K. Y., G. Bratbak and M. Heldal (1990).** "Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy." *Appl Environ Microbiol* **56** (2): 352-356.
- Bradley, D. E. (1965).** "The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope." *J R Microsc Soc* **84** (3): 257-316.
- Bradley, D. E. (1967).** "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins." *Bacteriol Rev* **31** (4): 230-314.
- Bradley, D. E. (1971).** "A comparative study of the structure and biological properties of bacteriophages." In: *Comparative Virology* (Maramorosch, K. and Kurstak, E. eds.) Academic Press, New York.: 207-253.
- Breitbart, M., B. Felts, S. Kelley, J. M. Mahaffy, J. Nulton, P. Salamon and F. Rohwer (2004a).** "Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community." *Proc Biol Sci* **271** (1539): 565-574.
- Breitbart, M. and F. Rohwer (2005).** "Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?" *Trends Microbiol* **13**: 278-284.
- Breitbart, M., P. Salamon, B. Andresen, J. M. Mahaffy, A. M. Segall, D. Mead, F. Azam and F. Rohwer (2002).** "Genomic analysis of uncultured marine viral communities." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (22): 14250-14255.
- Breitbart, M., L. Wegley, S. Leeds, T. Schoenfeld and F. Rohwer (2004b).** "Phage community dynamics in hot springs." *Appl Environ Microbiol* **70** (3): 1633-1640.
- Brenner, S., G. Streisinger, R. W. Horne, S. P. Champe, L. Barnett, S. Benzer and M. W. Rees (1959).** "Structural Components of Bacteriophage." *J. Mol. Biol.* **1**: 281-292.
- Brock, T. D. (1967).** "Life at high temperatures. Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed." *Science* **158** (3804): 1012-1019.
- Brock, T. D., K. M. Brock, R. T. Belly and R. L. Weiss (1972).** "Sulfolobus: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature." *Arch Mikrobiol* **84** (1): 54-68.
- Brussaard, C. P. (2004).** "Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry." *Appl Environ Microbiol* **70** (3): 1506-1513.
- Brussaard, C. P., D. Marie and G. Bratbak (2000).** "Flow cytometric detection of viruses." *J Virol Methods* **85** (1-2): 175-182.
- Brussaard, C. P. D., J. P. Payet, C. Winter and M. G. Weinbauer (2010).** "Quantification of aquatic viruses by flow cytometry." In S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer, and Suttle C.A. [eds.], *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO.: 102-109.
- Brussow, H., M. Fremont, A. Bruttin, J. Sidoti, A. Constable and V. Fryder (1994).** "Detection and classification of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from industrial milk fermentation." *Appl Environ Microbiol* **60** (12): 4537-4543.
- Büchen-Osmond, C. (2003a).** "Taxonomy and Classification of Viruses." In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. (Murray, P., Baron, J.E., Jorgensen, J.H., Tenover, J.C., Tenover, J.C., eds) Washington 1217-1225.

**Büchen-Osmond, C.** (2003b). "The universal virus database ICTVdb." *Computing in Science & Engineering* **5**: 2-11.

**Byrne, N., F. Lesongeur, N. Bienvenu, C. Geslin, K. Alain, D. Prieur and A. Godfroy** (2009). "Effect of variation of environmental conditions on the microbial communities of deep-sea vent chimneys, cultured in a bioreactor." *Extremophiles* **13** (4): 595-608.

## C

**Campbell, N. A. and J. B. Reece** (2001). "Biology (6th edition)." Pearson education, Inc. (Benjamin Cummings).

**Cann, A. J., S. E. Fandrich and S. Heaphy** (2005). "Analysis of the virus population present in equine faeces indicates the presence of hundreds of uncharacterized virus genomes." *Virus Genes* **30** (2): 151-156.

**Carrolo, M., M. J. Frias, F. R. Pinto, J. Melo-Cristino and M. Ramirez** (2010). "Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*." *PLoS One* **5** (12): e15678.

**Casjens, S.** (2003). "Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?" *Mol Microbiol* **49** (2): 277-300.

**Charvis, P., M. Recq, S. Operto and D. Brefort** (1995). "Deep structure of the northern Kerguelen Plateau and hotspot-related activity." *Geophys. J. Int.* **122**: 899-924.

**Chavagnac, V., C. Boulart, D. Guillaume, A. Gramain and M. Le Romancer** "Iron flux and microbial ecosystems from hydrothermal activity on the Kerguelen Islands (Southern Ocean)."

**Chen, F., J. R. Lu, B. J. Binder, Y. C. Liu and R. E. Hodson** (2001). "Application of digital image analysis and flow cytometry to enumerate marine viruses stained with SYBR gold." *Appl Environ Microbiol* **67** (2): 539-545.

**Chen, F. and C. A. Suttle** (1995). "Amplification of DNA polymerase gene fragments from viruses infecting microalgae." *Appl Environ Microbiol* **61** (4): 1274-1278.

**Chiura, H. X.** (2002). "Broad host range xenotrophic gene transfer by virus-like particles from a hot spring." *Microb. Environ.* **17**: 53-58.

**Chiura, H. X., K. Kogure, S. Hagemann, A. Ellinger and B. Velimirov** (2011). "Evidence for particle-induced horizontal gene transfer and serial transduction between bacteria." *FEMS Microbiol Ecol* **76** (3): 576-591.

**Chiura, H. X., H. Yamamoto, D. Koketsu, H. Naito and K. Kato** (2002). "Virus-Like Particles derived from a Bacterium belonging to the Oldest Lineage of the Domain *Bacteria*." *Microb Environ* **17** (1): 48-52.

**Cinquin, C., G. Le Blay, I. Fliss and C. Lacroix** (2004). "Immobilization of infant fecal microbiota and utilization in an in vitro colonic fermentation model." *Microb Ecol* **48** (1): 128-138.

**Cissoko, M., A. Desnues, M. Bouvy, T. Sime-Ngando, E. Verling and Y. Bettarel** (2008). "Effects of freshwater and seawater mixing on viral and bacterioplankton in a tropical estuary." *Freshwater Biol* **53**: 1154-1162.

**Clasen, J. L., J. S. Brigden, J. P. Payet and C. Suttle** (2008). "Evidence that viral abundance across oceans and lakes is driven by different biological factors." *Freshwater Biol* **53**: 1090-1100.

**Claverie, J. M. and H. Ogata** (2009). "Ten good reasons not to exclude giruses from the evolutionary picture." *Nat Rev Microbiol* **7** (8): 615; author reply 615.

**Collins, R. F., S. A. Frye, S. Balasingham, R. C. Ford, T. Tonjum and J. P. Derrick** (2005). "Interaction with type IV pili induces structural changes in the bacterial outer membrane secretin PilQ." *J Biol Chem* **280** (19): 18923-18930.

- Comeau, A. M., G. F. Hatfull, H. M. Krisch, D. Lindell, N. H. Mann and D. Prangishvili** (2008). "Exploring the prokaryotic virosphere." *Res Microbiol* **159** (5): 306-313.
- Coorevits, A., A. E. Dinsdale, G. Halket, L. Lebbe, P. De Vos, A. Van Landschoot and N. A. Logan** (2012). "Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* **62** (Pt 7): 1470-1485.
- Craig, L., R. K. Taylor, M. E. Pique, B. D. Adair, A. S. Arvai, M. Singh, S. J. Lloyd, D. S. Shin, E. D. Getzoff, M. Yeager, K. T. Forest and J. A. Tainer** (2003). "Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin." *Mol Cell* **11** (5): 1139-1150.

## D

- d'Herelle, F.** (1917). "Sur un microbe invisible antagonistic des bacilles dysenterique." *C. R. Acad. Sci. Paris* **165**: 373-375.
- De Robertis, E. and C. M. Franchi** (1951). "Electron microscope observation on the fine structure of bacterial flagella." *Exp. Cell Research* **2**: 295.
- Deflaun, M. F., J. K. Fredrickson, H. Dong, S. M. Pfiffner, T. C. Onstott, D. L. Balkwill, S. H. Streger, E. Stackebrandt, S. Knoessen and E. van Heerden** (2007). "Isolation and characterization of a *Geobacillus thermoleovorans* strain from an ultra-deep South African gold mine." *Syst Appl Microbiol* **30** (2): 152-164.
- Deflaun, M. F., J. H. Paul and W. H. Jeffrey** (1987). "Distribution and Molecular Weight of Dissolved DNA in Subtropical Estuarine and Oceanic Environments." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **38**: 65-73.
- Degryse, E., N. Glansdorff and A. Pierard** (1978). "A comparative analysis of extreme thermophilic bacteria belonging to the genus *Thermus*." *Arch Microbiol* **117** (2): 189-196.
- DePamphilis, M. L. and J. Adler** (1971). "Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer, lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane." *J Bacteriol* **105** (1): 396-407.
- Deveau, H., J. E. Garneau and S. Moineau** (2010). "CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions." *Annu Rev Microbiol* **64**: 475-493.
- Dinsdale, A. E., G. Halket, A. Coorevits, A. Van Landschoot, H. J. Busse, P. De Vos and N. A. Logan** (2011). "Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus*." *Int J Syst Evol Microbiol* **61** (Pt 8): 1802-1810.
- Disz, T., S. Akhter, D. Cuevas, R. Olson, R. Overbeek, V. Vonstein, R. Stevens and R. A. Edwards** (2010). "Accessing the SEED genome databases via Web services API: tools for programmers." *BMC Bioinformatics* **11**: 319.
- Donk, P. J.** (1920). "A Highly Resistant Thermophilic Organism." *J Bacteriol* **5** (4): 373-374.
- Doucet, S., A. Giret, D. Weis and J. Scoates** (2003). "Les îles Amsterdam et Saint-Paul." *Géologues* **137**: 10-15.
- Drake, L. A., K.-H. Choi, A. G. E. Hastell and F. C. Dobbs** (1998). "Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA." *Aquat Microb Ecol* **16**: 17-25.
- Duckworth, D. H.** (1976). ""Who discovered bacteriophage?"" *Bacteriol Rev* **40** (4): 793-802.
- Duhamel, S. and S. Jacquet** (2006). "Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments." *J Microbiol Methods* **64** (3): 316-332.

**Dyall-Smith, M., S. L. Tang and C. Bath** (2003). "Haloarchaeal viruses: how diverse are they?" *Res Microbiol* **154** (4): 309-313.

## E

**Edwards, D., A. B. Selkirk and R. B. Taylor** (1979). "Determination of the Stability of Mitomycin C by High Performance Liquid Chromatography." *Int. J. Pharm.* **4**: 21-26.

**Edwards, R. A. and F. Rohwer** (2005). "Viral metagenomics." *Nat Rev Microbiol* **3** (6): 504-510.

**Egbert, L. N. and H. K. Mitchell** (1967). "Characteristics of Tphi3, a bacteriophage for *Bacillus stearothermophilus*." *J Virol* **1** (3): 610-616.

**Ellis, E. L. and M. Delbruck** (1939). "The Growth of Bacteriophage." *J Gen Physiol* **22** (3): 365-384.

**Erauso, G., D. Prieur, A. Godfroy and G. Raguénes** (1995). "Plate cultivation technique for strictly anaerobic, thermophilic, sulfur-metabolizing Archaea." *Archaea* (Robb, F.T. & Place, A.R. eds.) 25-29.

**Evilevitch, A., W. H. Roos, I. L. Ivanovska, M. Jeembaeva, B. Jonsson and G. J. Wuite** (2011). "Effects of salts on internal DNA pressure and mechanical properties of phage capsids." *J Mol Biol* **405** (1): 18-23.

**Ewert, D. L. and M. J. Paynter** (1980). "Enumeration of bacteriophages and host bacteria in sewage and the activated-sludge treatment process." *Appl Environ Microbiol* **39** (3): 576-583.

**Ewert, D. L. and M. J. Paynter** (1980b). "Technique for determining total bacterial virus counts in complex aqueous systems." *Appl Environ Microbiol* **39** (1): 253-260.

## F

**Fiers, W., R. Contreras, F. Duerinck, G. Haegeman, D. Iserentant, J. Merregaert, W. Min Jou, F. Molemans, A. Raeymaekers, A. Van den Berghe, G. Volckaert and M. Ysebaert** (1976). "Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene." *Nature* **260** (5551): 500-507.

**Filee, J. and P. Forterre** (2005). "Viral proteins functioning in organelles: a cryptic origin?" *Trends Microbiol* **13** (11): 510-513.

**Finn, R. D., J. Mistry, J. Tate, P. Coghill, A. Heger, J. E. Pollington, O. L. Gavin, P. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy and A. Bateman** (2010). "The Pfam protein families database." *Nucleic Acids Res* **38** (Database issue): D211-222.

**Follett, E. A. and J. Gordon** (1963). "An Electron Microscope Study of *Vibrio* Flagella." *J Gen Microbiol* **32**: 235-239.

**Forterre, P.** (2001). "Genomics and early cellular evolution. The origin of the DNA world." *C R Acad Sci III* **324** (12): 1067-1076.

**Forterre, P.** (2006). "The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions." *Virus Res* **117** (1): 5-16.

**Forterre, P.** (2006). "Three RNA cells for ribosomal lineages and three DNA viruses to replicate their genomes: a hypothesis for the origin of cellular domain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103** (10): 3669-3674.

**Forterre, P.** (2008). "In a world of microbes, where should microbiology stand?" *Res Microbiol* **159** (1): 74-80.

**Forterre, P.** (2009). "Evolution, viral." In: Moselio S (ed.) *The Encyclopedia of Microbiology*, 3rd edn: 370-389.

- Forterre, P.** (2010). "Defining life: the virus viewpoint." *Orig Life Evol Biosph* **40** (2): 151-160.
- Forterre, P.** (2010). "Manipulation of cellular syntheses and the nature of viruses: The virocell concept." *C. R. Chim.* **14**: 392-399.
- Forterre, P. and D. Prangishvili** (2009). "The great billion-year war between ribosome- and capsid-encoding organisms (cells and viruses) as the major source of evolutionary novelties." *Ann N Y Acad Sci* **1178**: 65-77.
- Forterre, P., N. Soler, M. Krupovic, E. Marguet and H. W. Ackermann** (2012). "Fake virus particles generated by fluorescence microscopy." *Trends Microbiol.*
- Forterre, P., N. Soler, M. Krupovic, E. Marguet and H. W. Ackermann** (2013). "Fake virus particles generated by fluorescence microscopy." *Trends Microbiol* **21** (1): 1-5.
- Francisco, D. E., R. A. Mah and A. C. Rabin** (1973). "Acridine orange-epifluorescence technique for counting bacteria in natural waters." *Trans Am Microsc Soc* **92** (3): 416-421.
- Fronzes, R., H. Remaut and G. Waksman** (2008). "Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria." *EMBO J* **27** (17): 2271-2280.
- Fuhrman, J. A.** (1999). "Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects." *Nature* **399** (6736): 541-548.
- Fulton, J., T. Douglas and A. M. Young** (2009). "Isolation of viruses from high temperature environments." In: *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions* (M.R. J. Clokie, A.M. Kropinski (eds.)) **501**: 43-54.

## G

- Garrett, R. A., D. Prangishvili, S. A. Shah, M. Reuter, K. O. Stetter and X. Peng** (2010). "Metagenomic analyses of novel viruses and plasmids from a cultured environmental sample of hyperthermophilic neutrophiles." *Environ Microbiol* **12** (11): 2918-2930.
- Gaudin, M., E. Gaudiard, S. Schouten, L. Houel-Renault, P. Lenormand, E. Marguet and P. Forterre** (2012). "Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA." *Environmental Microbiology Reports*: no-no.
- Gautier, I., D. Weis, J.-P. Mennessier, P. Vidal, A. Giret and M. Loubet** (1990). "Petrology and geochemistry of the Kerguelen Archipelago basalts (South Indian Ocean): evolution of the mantle sources from ridge to intraplate position." *Earth and Planetary Science Letters* **100**: 59-76.
- Geslin, C., M. Le Romancer, G. Erauso, M. Gaillard, G. Perrot and D. Prieur** (2003a). "PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic euryarchaeote, "Pyrococcus abyssi"." *J Bacteriol* **185** (13): 3888-3894.
- Geslin, C., M. Le Romancer, M. Gaillard, G. Erauso and D. Prieur** (2003b). "Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deep-sea hydrothermal vents." *Res Microbiol* **154** (4): 303-307.
- Geslin, C., M. Le Romancer, M. Gaillard and D. Prieur** (2005). "Diversité virale associée aux écosystèmes hydrothermaux océaniques profonds et aux sources chaudes terrestres." *Virologie* **9**: 357-366.
- Gibbs, A. J., B. D. Harrison, D. H. Watson and P. Wildy** (1966). "What's in a Virus Name?" *Nature* **209**: 450-454.
- Giret, A., D. Weis, M. Grégoire, N. Mattielli, B. Moine, G. Michon, J. Scoates, S. Tourpin, G. Delpech, M. C. Gerbe, S. Doucet, R. Ethien and J.-Y. Cottin** (2003). "L'Archipel de Kerguelen : les plus vieilles îles dans le plus jeune océan." *Géologues* **137**: 15-23.
- Glauert, A. M., D. Kerridge and R. W. Horne** (1963). "The Fine Structure and Mode of Attachment of the Sheathed Flagellum of *Vibrio Metchnikovii*." *J Cell Biol* **18**: 327-336.

- Goldsmith, C. S. and S. E. Miller** (2009). "Modern uses of electron microscopy for detection of viruses." *Clin Microbiol Rev* **22** (4): 552-563.
- Gorlas, A., E. V. Koonin, N. Bienvenu, D. Prieur and C. Geslin** (2012). "TPV1, the first virus isolated from the hyperthermophilic genus *Thermococcus*." *Environ Microbiol* **14** (2): 503-516.
- Gottesmann, M. and A. Oppenheim** (1994). "Lysogeny and prophage." In: *Encyclopedia of Virology* (Webster, R.G. and Granoff, A., Eds): 814-823.
- Gouy, M., S. Guindon and O. Gascuel** (2010). "SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building." *Mol Biol Evol* **27** (2): 221-224.
- Grabow, W.** (2001). "Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water." *WaterSA Vol.27* (2): 251-268.
- Gramain, A., F. Brillet, J. L. Birrien and M. Le Romancer** (2010). "Novel Hyperthermophilic Archaea Flying Over The Kerguelen Islands: A Dissemination Study " Communication sous forme de Poster au congrès "8th International Congress On Extremophiles", Açores, Portugale, 12-16.09.2010.
- Gray, J. W., A. V. Carrano, L. L. Steinmetz, M. A. Van Dilla, D. H. Moore, 2nd, B. H. Mayall and M. L. Mendelsohn** (1975). "Chromosome measurement and sorting by flow systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72** (4): 1231-1234.
- Griffin, D. W., C. J. Gibson, 3rd, E. K. Lipp, K. Riley, J. H. Paul, 3rd and J. B. Rose** (1999). "Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys." *Appl Environ Microbiol* **65** (9): 4118-4125.
- Grimes, S. and D. Anderson** (1997). "The bacteriophage phi29 packaging proteins supercoil the DNA ends." *J Mol Biol* **266** (5): 901-914.
- Groman, N. B.** (1965). "Factors in lysis and lysis inhibition by lambda bacteriophage." *J Bacteriol* **90** (6): 1563-1568.

## H

- Hall, C. E.** (1955). "Electron densitometry of stained virus particles." *J Biophys Biochem Cytol* **1** (1): 1-12.
- Hara, S., K. Terauchi and I. Koike** (1991). "Abundance of viruses in marine waters: assessment by epifluorescence and transmission electron microscopy." *Appl Environ Microbiol* **57** (9): 2731-2734.
- Hara, S. K., K. Koike, H. Terauchi, H. Kamiya and E. Tanoue** (1996). "Abundance of viruses in deep oceanic waters." *Mar.Ecol.Pro.Ser.* **145**: 269-277.
- Haring, M., X. Peng, K. Brugger, R. Rachel, K. O. Stetter, R. A. Garrett and D. Prangishvili** (2004). "Morphology and genome organization of the virus PSV of the hyperthermophilic archaeal genera *Pyrobaculum* and *Thermoproteus*: a novel virus family, the Globuloviridae." *Virology* **323** (2): 233-242.
- Haring, M., G. Vestergaard, R. Rachel, L. Chen, R. A. Garrett and D. Prangishvili** (2005). "Virology: independent virus development outside a host." *Nature* **436** (7054): 1101-1102.
- Harmsen, H., D. Prieur and C. Jeanthon** (1997). "Distribution of microorganisms in deep-sea hydrothermal vent chimneys investigated by whole-cell hybridization and enrichment culture of thermophilic subpopulations." *Appl Environ Microbiol* **63** (7): 2876-2883.
- Hatfull, G. F.** (2008). "Bacteriophage genomics." *Curr Opin Microbiol* **11** (5): 447-453.
- Hegde, N. R., M. S. Maddur, S. V. Kaveri and J. Bayry** (2009). "Reasons to include viruses in the tree of life." *Nat Rev Microbiol* **7** (8): 615; author reply 615.
- Hendrix, R. W.** (2003). "Bacteriophage genomics." *Curr Opin Microbiol* **6** (5): 506-511.
- Hendrix, R. W., G. F. Hatfull and M. C. Smith** (2003). "Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution." *Res Microbiol* **154** (4): 253-257.

- Hendrix, R. W., J. G. Lawrence, G. F. Hatfull and S. Casjens** (2000). "The origins and ongoing evolution of viruses." *Trends Microbiol* **8** (11): 504-508.
- Hendrix, R. W., M. C. Smith, R. N. Burns, M. E. Ford and G. F. Hatfull** (1999). "Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (5): 2192-2197.
- Hennes, K. P. and C. A. Suttle** (1995). "Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures using epifluorescence microscopy." *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1050-1055.
- Hercher, M., W. Mueller and H. M. Shapiro** (1979). "Detection and discrimination of individual viruses by flow cytometry." *J Histochem Cytochem* **27** (1): 350-352.
- Herskowitz, I. and F. Banuett** (1984). "Interaction of phage, host, and environmental factors in governing the lambda lysis-lysogeny decision." In: Chopra VL, Joshi BC, Sharma RP, Bansal HC (eds) *Proceedings of the XV international congress of genetics, Vol1.* Oxford and I.B.H., New Delhi. **01**: 59-73.
- Hofer, J. S. and R. Sommaruga** (2001). "Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake: importance of filamentous forms." *Aquat Microb Ecol* **26**: 1-11.
- Holmes, F. O.** (1948). "Order Virales." In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (6th edn, Breed, R.S. *et al.*, eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD.: 1126-1286.
- Horvath, P. and R. Barrangou** (2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea." *Science* **327** (5962): 167-170.
- Hudson, J. A. and R. M. Daniel** (1988). "Enumeration of thermophilic heterotrophs in geothermally heated soils from mount eribus, ross island, antarctica." *Appl Environ Microbiol* **54** (2): 622-624.
- Hudson, J. A., R. N. Daniel and H. W. Morgan** (1988). "Isolation of a strain of *Bacillus schlegelii* from geothermally heated antarctic soil." *FEMS Microbiol Lett* **51**: 27-60.
- Husson-Kao, C., J. Mengaud, J. C. Gripon, L. Benbadis and M. P. Chapot-Chartier** (2000). "Characterization of *Streptococcus thermophilus* strains that undergo lysis under unfavourable environmental conditions." *Int J Food Microbiol* **55** (1-3): 209-213.
- Huxley, H. E. and G. Zubay** (1961). "Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy." *J Biophys Biochem Cytol* **11**: 273-296.

## I & J

- Isabella, V. M. and V. L. Clark** (2011). "Deep sequencing-based analysis of the anaerobic stimulon in *Neisseria gonorrhoeae*." *BMC Genomics* **12**: 51.
- Jacquet, S., I. Domaizon, S. Personnic, A. Sriram, P. RAM, M. Heldal, S. Duhamel and T. Sime-Ngando** (2005). "Estimates of protozoan- and viral-mediated mortality of bacterioplankton in Lake Bourget (France)." *Freshwater Biol* **50**: 627-645.
- James, W.** (2007). "Aptamers in the virologists' toolkit." *J Gen Virol* **88** (Pt 2): 351-364.
- Janekovic, D., S. Wunderl, I. Holz, W. Zillig, A. Gierl and H. Neumann** (1983). "TTV1, TTV2 and TTV3, a family of viruses of the extremophilic, anaerobic, sulfur reducing archaeobacterium *Thermoproteus tenax*." *Mol Gen Genet* **192**: 39-45.
- Jeembaeva, M., M. Castelnovo, F. Larsson and A. Evilevitch** (2008). "Osmotic pressure: resisting or promoting DNA ejection from phage?" *J Mol Biol* **381** (2): 310-323.
- Jensen, R. B., S. C. Wang and L. Shapiro** (2002). "Dynamic localization of proteins and DNA during a bacterial cell cycle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3** (3): 167-176.
- Jiang, S. C. and J. H. Paul** (1994). "Seasonal and diel abundance of viruses and occurrence of lysogeny/bacteriocinogeny in the marine environment." *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **104**: 163-172.

- Jiang, S. C. and J. H. Paul** (1995). "Viral contribution to dissolved DNA in the marine environment as determined by differential centrifugation and kingdom probing." *Appl Environ Microbiol* **61** (1): 317-325.
- Jiang, S. C. and J. H. Paul** (1996). "Occurrence of Lysogenic Bacteria in Marine Microbial Communities as Determined by Prophage Induction." *Mar Ecol Prog Ser* **142**: 27-38.
- Jiang, S. C. and J. H. Paul** (1998). "Significance of Lysogeny in the Marine Environment: Studies with Isolates and a Model of Lysogenic Phage Production." *Microb Ecol* **35**: 235-243.
- Jiang, W., Z. Li, Z. Zhang, M. L. Baker, P. E. Prevelige, Jr. and W. Chiu** (2003). "Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions." *Nat Struct Biol* **10** (2): 131-135.
- John, S. G., C. B. Mendez, L. Deng, B. Poulos, A. K. Kauffman, S. Kern, J. Brum, M. F. Polz, E. A. Boyle and M. B. Sullivan** (2011). "A simple and efficient method for concentration of ocean viruses by chemical flocculation." *Environ Microbiol Rep* **3** (2): 195-202.
- Juhala, R. J., M. E. Ford, R. L. Duda, A. Youlton, G. F. Hatfull and R. W. Hendrix** (2000). "Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdaoid bacteriophages." *J Mol Biol* **299** (1): 27-51.
- Juniper, S. K., D. F. Bird, M. Summit, M. P. Vong and E. T. Baker** (1998). "Bacterial and viral abundances in hydrothermal event plumes over northern Gorda Ridge." *Deep Sea Res. Part II* **45** (12): 2739-2749.

## K

- Kellenberger, E. and W. Arber** (1957). "Electron microscopical studies of phage multiplication. I. A method for quantitative analysis of particle suspensions." *Virology* **3** (2): 245-255.
- Keller, M., F. J. Braun, R. Dirmeier, D. Hafenbradl, S. Burggraf, R. Rachel and K. O. Stetter** (1995). "Thermococcus alcaliphilus sp. nov., a new hyperthermophilic archaeum growing on polysulfide at alkaline pH." *Arch Microbiol* **164** (6): 390-395.
- King, A., E. Lefkowitz and M. J. Adams** (2011). "Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." In Elsevier: London-Waltham-San Diego.
- Klatt, C. G., J. M. Wood, D. B. Rusch, M. M. Bateson, N. Hamamura, J. F. Heidelberg, A. R. Grossman, D. Bhaya, F. M. Cohan, M. Kuhl, D. A. Bryant and D. M. Ward** (2011). "Community ecology of hot spring cyanobacterial mats: predominant populations and their functional potential." *ISME J* **5** (8): 1262-1278.
- Koonin, E. V., T. G. Senkevich and V. V. Dolja** (2009). "Compelling reasons why viruses are relevant for the origin of cells." *Nat Rev Microbiol* **7** (8): 615; author reply 615.
- Kopecka, H., S. Dubrou, J. Prevot, J. Marechal and J. M. Lopez-Pila** (1993). "Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization." *Appl Environ Microbiol* **59** (4): 1213-1219.
- Koser, S.** (1926). "Action of the Bacteriophage on a Thermophilic Bacillus." *Exp Biol Med* **24** (1): 109-111.
- Kostrzynska, M., J. D. Betts, J. W. Austin and T. J. Trust** (1991). "Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella." *J Bacteriol* **173** (3): 937-946.
- Kott, Y.** (1965). "Estimation of Low Numbers of *Escherichia coli* Bacteriophage by Use of the Most Probable Number Method." *Appl Microbiol* **14**: 141-144.
- Kropinski, A. M., D. Prangishvili and R. Lavigne** (2009). "Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of Bacteria and Archaea." *Environ Microbiol* **11** (11): 2775-2777.

**Krupovic, M., P. Forterre and D. H. Bamford** (2010). "Comparative analysis of the mosaic genomes of tailed archaeal viruses and proviruses suggests common themes for virion architecture and assembly with tailed viruses of bacteria." *J Mol Biol* **397** (1): 144-160.

**Krupovic, M., D. Prangishvili, R. W. Hendrix and D. H. Bamford** (2011). "Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere." *Microbiol Mol Biol Rev* **75** (4): 610-635.

**Krupovic, M., M. F. White, P. Forterre and D. Prangishvili** (2012). "Postcards from the edge: structural genomics of archaeal viruses." *Adv Virus Res* **82**: 33-62.

**Kubori, T., Y. Matsushima, D. Nakamura, J. Uralil, M. Lara-Tejero, A. Sukhan, J. E. Galan and S. I. Aizawa** (1998). "Supramolecular structure of the Salmonella typhimurium type III protein secretion system." *Science* **280** (5363): 602-605.

**Kuisiene, N., J. Raugalas and D. Chitavichius** (2004). "Geobacillus lituanicus sp. nov." *Int J Syst Evol Microbiol* **54** (Pt 6): 1991-1995.

## L

**La Scola, B., S. Audic, C. Robert, L. Jungang, X. de Lamballerie, M. Drancourt, R. Birtles, J. M. Claverie and D. Raoult** (2003). "A giant virus in amoebae." *Science* **299** (5615): 2033.

**Lang, A. S., O. Zhaxybayeva and J. T. Beatty** (2012). "Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange." *Nat Rev Microbiol* **10** (7): 472-482.

**Lavigne, R., P. Darius, E. J. Summer, D. Seto, P. Mahadevan, A. S. Nilsson, H. W. Ackermann and A. M. Kropinski** (2009). "Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity." *BMC Microbiol* **9**: 224.

**Lawrence, J. E. and G. F. Steward** (2010). "Purification of viruses by centrifugation." In S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer, and Suttle C.A. [eds.], *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO.: 166-181.

**Le Fourn, C., G. Brasseur, C. Brochier-Armanet, L. Pieulle, A. Brioukhanov, B. Ollivier and A. Dolla** (2011). "An oxygen reduction chain in the hyperthermophilic anaerobe *Thermotoga maritima* highlights horizontal gene transfer between Thermococcales and Thermotogales." *Environ Microbiol* **13** (8): 2132-2145.

**Le Romancer, M., M. Gaillard, C. Geslin and D. Prieur** (2007). "Viruses in extreme environments." *Rev Environ Sci Biotechnol* **6**: 17-31.

**Lemarchand, K., N. Parthuisot, P. Catala and P. Lebaron** (2001). "Comparative assessment of epifluorescence microscopy, flow cytometry and solid-phase cytometry used in the enumeration of specific bacteria in water." *Aquat Microb Ecol* **25**: 301-309.

**Lenski, R. E.** (1988). "Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage." *Adv. Microb. Ecol.* **10**: 1-44.

**Levine, M.** (1961). "Effect of Mitomycin C on Interactions between Temperate Phages and Bacteria." *Virology* **13**: 493-499.

**Lewis, G. D. and T. G. Metcalf** (1988). "Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples." *Appl Environ Microbiol* **54** (8): 1983-1988.

**Lima-Mendez, G., J. Van Helden, A. Toussaint and R. Leplae** (2008). "Prophinder: a computational tool for prophage prediction in prokaryotic genomes." *Bioinformatics* **24** (6): 863-865.

**Liu, B., S. Wu, Q. Song, X. Zhang and L. Xie** (2006). "Two novel bacteriophages of thermophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal fields." *Curr Microbiol* **53** (2): 163-166.

**Liu, B., S. Wu and L. Xie** (2010). "Complete genome sequence and proteomic analysis of a thermophilic bacteriophage BV1." *Acta Oceanol. Sin* **29**: 84-89.

- Liu, B. and X. Zhang** (2008). "Deep-sea thermophilic Geobacillus bacteriophage GVE2 transcriptional profile and proteomic characterization of virions." *Appl Microbiol Biotechnol* **80** (4): 697-707.
- Liu, B., F. Zhou, S. Wu, Y. Xu and X. Zhang** (2009). "Genomic and proteomic characterization of a thermophilic Geobacillus bacteriophage GBSV1." *Res Microbiol* **160** (2): 166-171.
- Liu, F., S. Ge, L. Li, X. Wu, Z. Liu and Z. Wang** (2012). "Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens." *Res Vet Sci* **93** (2): 553-559.
- Livny, J. and D. I. Friedman** (2004). "Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system." *Mol Microbiol* **51** (6): 1691-1704.
- López-García, P. and P. Forterre** (2000). "Thermal Stress in Hyperthermophiles." In: *Bacterial Stress Responses*, Chapter 5 (Ed. Storz, G. and Hengge-Aronis, R.), ASM Press, Washington, D.C.: 369-382.
- Lopez-Garcia, P. and D. Moreira** (2009). "Yet viruses cannot be included in the tree of life." *Nat Rev Microbiol* **7** (8): 306-311.
- Los, M. and G. Wegrzyn** (2012). "Pseudolysogeny." *Adv Virus Res* **82**: 339-349.
- Lowy, J. and J. Hanson** (1965). "Electron Microscope Studies of Bacterial Flagella." *J Mol Biol* **11**: 293-313.
- Ludmir, E. B. and L. W. Enquist** (2009). "Viral genomes are part of the phylogenetic tree of life." *Nat Rev Microbiol* **7** (8): 615; author reply 615.
- Lwoff, A.** (1953). "Lysogeny." *Bacteriol Rev* **17** (4): 269-337.
- Lwoff, A.** (1957). "The concept of virus." *J. gen. Microbiol.* **17**: 239-253.
- Lwoff, A.** (1967). "Principles of Classification and Nomenclature of Viruses." *Nature Rev.* **209**: 13-14.
- Lwoff, A., R. Horne and P. Tournier** (1962). "A system of viruses." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**: 51-55.
- Lwoff, A. and F. Jacob** (1952). "Induction de la production de bactériophages et d'une colicine par les peroxydes, les éthylaneimines et les halogénoalcoylamines." *C. R. Acad. Sci.* **234**: 2308-2310.
- Lwoff, A., L. Siminovitch and N. Kjeldgaard** (1950). "Induction de la production de bacteriophages chez une bactérie lysogène." *Ann. inst. Pasteur* **79**: 815-859.

## M

- Maaty, W. S., A. C. Ortmann, M. Dlakic, K. Schulstad, J. K. Hilmer, L. Liepold, B. Weidenheft, R. Khayat, T. Douglas, M. J. Young and B. Bothner** (2006). "Characterization of the archaeal thermophile *Sulfolobus* turreted icosahedral virus validates an evolutionary link among double-stranded DNA viruses from all domains of life." *J Virol* **80** (15): 7625-7635.
- Manini, E., G. M. Luna, C. Corinaldesi, D. Zeppilli, G. Bortoluzzi, G. Caramanna, F. Raffa and R. Danovaro** (2008). "Prokaryote diversity and virus abundance in shallow hydrothermal vents of the Mediterranean Sea (Panarea Island) and the Pacific Ocean (north Sulawesi-Indonesia)." *Microb Ecol* **55** (4): 626-639.
- Maranger, R. and D. F. Bird** (1995). "Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters." *Mar Ecol Prog Ser* **121** (217-226).
- Marie, D., C. P. D. Brussaard, R. Thyraug, G. Bratbak and D. Vaultot** (1999). "Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry." *Appl Environ Microbiol* **65** (1): 45-52.
- Marsh, P. and E. M. H. Wellington** (1994). "Phage-host interactions in soil." *FEMS Microbiol Ecol* **15**: 99-108.
- Marvin, D. A.** (1998). "Filamentous phage structure, infection and assembly." *Curr Opin Struct Biol* **8** (2): 150-158.
- Maugeri, T. L., V. Lentini, A. Spanò and C. Gugliandolo** (2013). "Abundance and Diversity of Picocyanobacteria in Shallow Hydrothermal Vents of Panarea Island (Italy)." *Geomicrobiol J* **30**: 93-99.

- Middelboe, M., S. Jacquet and M. G. Weinbauer** (2008). "Viruses in freshwater ecosystems: an introduction to the exploration of viruses in new aquatic habitats." *Freshwater Biol* **53**: 1069–1075.
- Middelboe, M., L. Riemann, G. F. Steward, V. Hansen and O. Nybroe** (2003). "Virus-induced transfer of organic carbon between marine bacteria in a model community." *Aquat Microb Ecol* **33**: 1-10.
- Miroshnichenko, M. L. and E. A. Bonch-Osmolovskaya** (2006). "Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents." *Extremophiles* **10** (2): 85-96.
- Mochizuki, T., M. Krupovic, G. Pehau-Arnaudet, Y. Sako, P. Forterre and D. Prangishvili** (2012). "Archaeal virus with exceptional virion architecture and the largest single-stranded DNA genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109** (33): 13386-13391.
- Mokili, J. L., F. Rohwer and B. E. Dutilh** (2012). "Metagenomics and future perspectives in virus discovery." *Curr Opin Virol* **2** (1): 63-77.
- Montanié, H., H. J. Hartmann, C. Cottreau and C. Trichet** (2002). "Virus-like particle analysis in a seston-rich coastal pond using transmission electron microscopy." *Aquat. Microb. Ecol.* **28**: 105–115.
- Moreira, D. and P. Lopez-Garcia** (2009). "Ten reasons to exclude viruses from the tree of life." *Nat Rev Microbiol* **7** (4): 306-311.
- Moriya, T., T. Hikota, I. Yumoto, T. Ito, Y. Terui, A. Yamagishi and T. Oshima** (2011). "Calditerricola satsumensis gen. nov., sp. nov. and Calditerricola yamamurae sp. nov., extreme thermophiles isolated from a high-temperature compost." *Int J Syst Evol Microbiol* **61** (Pt 3): 631-636.

## N

- Nakagawa, S. and K. Takai** (2006). "The Isolation of Thermophiles from Deep-Sea Hydrothermal Environments." *Method. Microbiol.* **35**: 55-91.
- Navas-Castillo, J.** (2009). "Six comments on the ten reasons for the demotion of viruses." *Nat Rev Microbiol* **7** (8): 615; author reply 615.
- Nazina, T. N., T. P. Tourova, A. B. Poltarus, E. V. Novikova, A. A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunyaka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev and M. V. Ivanov** (2001). "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.*" *Int J Syst Evol Microbiol* **51** (Pt 2): 433-446.
- Nesbo, C. L., D. M. Bradnan, A. Adebussuyi, M. Dlutek, A. K. Petrus, J. Foght, W. F. Doolittle and K. M. Noll** (2012). "*Mesotoga prima* gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the Thermotogales." *Extremophiles* **16** (3): 387-393.
- Nesbo, C. L., M. Dlutek, O. Zhaxybayeva and W. F. Doolittle** (2006). "Evidence for existence of "mesotogas," members of the order Thermotogales adapted to low-temperature environments." *Appl Environ Microbiol* **72** (7): 5061-5068.
- Nesbo, C. L., R. Kumaraswamy, M. Dlutek, W. F. Doolittle and J. Foght** (2010). "Searching for mesophilic Thermotogales bacteria: "mesotogas" in the wild." *Appl Environ Microbiol* **76** (14): 4896-4900.
- Nicolaus, B., L. Lama, E. Esposito, M. C. Manca, G. di Prisco and A. Gambacorta** (1996). ""*Bacillus thermoantarcticus*" sp. nov., from Mount Melbourne, Antarctica: a novel thermophilic species." *Polar Biol* **16**: 101-104.
- Niederberger, T. D., D. K. Gotz, I. R. McDonald, R. S. Ronimus and H. W. Morgan** (2006). "*Ignisphaera aggregans* gen. nov., sp. nov., a novel hyperthermophilic crenarchaeote isolated from hot springs in Rotorua and Tokaanu, New Zealand." *Int J Syst Evol Microbiol* **56** (Pt 5): 965-971.

**Noble, R. T. and J. A. Fuhrman** (1998). "Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria." *Aquat Microb Ecol* **14**: 113-118.

**Nougier, J., R. Ballestracci and B. Blavoux** (1982). "Les manifestations post-volcaniques dans les îles australes françaises (T.A.A.F.): zones fumeroliennes et sources thermo-minérales." *C.R.Acad.Sc.Paris* **295**: 389-392.

## O

**Onodera, N.** (1961). "On Some Characteristics of a Newly Isolated Thermophilic Bacteriophage and Consideration of its Thermostability." *J. Electron Microsc.* **10** (2): 91-102.

**Orange, F. and co-workers** "Experimental fossilisation of the thermophilic Gram-positive Bacteria *Geobacillus* SP7A: a long duration morphological and survival study." *Geobiology*.

**Ortmann, A. C. and C. A. Suttle** (2005). "High abundances of viruses in a deep-sea hydrothermal vent system indicates viral mediated microbial mortality." *Deep Sea Res. Part I* **52**: 1515-1527.

**Ortmann, A. C., B. Wiedenheft, T. Douglas and M. Young** (2006). "Hot crenarchaeal viruses reveal deep evolutionary connections." *Nat Rev Microbiol* **4** (7): 520-528.

**Oshima, T. and T. Moriya** (2008). "A preliminary analysis of microbial and biochemical properties of high-temperature compost." *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 338-344.

**Otsuji, N., M. Sekiguchi, T. Iijima and Y. Takagi** (1959). "Induction of phage formation in the lysogenic *Escherichia coli* K-12 by mitomycin C." *Nature* **184(Suppl 14)**: 1079-1080.

**Overbeek, R., T. Begley, R. M. Butler, J. V. Choudhuri, H. Y. Chuang, M. Cohoon, V. de Crecy-Lagard, N. Diaz, T. Disz, R. Edwards, M. Fonstein, E. D. Frank, S. Gerdes, E. M. Glass, A. Goessmann, A. Hanson, D. Iwata-Reuyl, R. Jensen, N. Jamshidi, L. Krause, M. Kubal, N. Larsen, B. Linke, A. C. McHardy, F. Meyer, H. Neuweger, G. Olsen, R. Olson, A. Osterman, V. Portnoy, G. D. Pusch, D. A. Rodionov, C. Ruckert, J. Steiner, R. Stevens, I. Thiele, O. Vassieva, Y. Ye, O. Zagnitko and V. Vonstein** (2005). "The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes." *Nucleic Acids Res* **33** (17): 5691-5702.

**Overbeek, R., T. Disz and R. Stevens** (2004). "The SEED: A peer-to-peer environment for genome annotation." *Communications of the ACM archive - Bioinformatics* **47** (11): 46-51.

## P

**Paredes-Sabja, D., P. Setlow and M. R. Sarker** (2011). "Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved." *Trends Microbiol* **19** (2): 85-94.

**Partensky, F., J. Blanchot and D. Vaultot** (1999). "Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* in oceanic waters: a review." *Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco, n°spécial* **19**: 457-475.

**Patel, A., R. T. Noble, J. A. Steele, M. S. Schwalbach, I. Hewson and J. A. Fuhrman** (2007). "Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I." *Nat Protoc* **2** (2): 269-276.

**Patschkowski, T., D. M. Bates and P. J. Kiley** (2000). "Mechanisms for Sensing and Responding to Oxygen Deprivation." In: *Bacterial Stress Responses*, Chapter 5 (Ed. Storz, G. and Hengge-Aronis, R.), ASM Press, Washington, D.C.: 61-78.

**Paul, J. and C. Kellogg** (2000). "Ecology of bacteriophages in nature." In: *Viral Ecology* (Hurst, C., Eds), Academic Press, San Diego: 211-246.

**Paul, J. H.** (2008). "Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas?" *ISME J* **2** (6): 579-589.

**Paul, J. H., W. H. Jeffrey, A. W. David, M. F. Deflaun and L. H. Cazares** (1989). "Turnover of Extracellular DNA in Eutrophic and Oligotrophic Freshwater Environments of Southwest Florida." *Appl Environ Microbiol* **55**: 1823-1828.

**Paul, J. H., W. H. Jeffrey and M. F. Deflaun** (1987). "Dynamics of extracellular DNA in the marine environment." *Appl Environ Microbiol* **53**: 170-179.

**Pederson, D. M., L. C. Welsh, D. A. Marvin, M. Sampson, R. N. Perham, M. Yu and M. R. Slater** (2001). "The protein capsid of filamentous bacteriophage PH75 from *Thermus thermophilus*." *J Mol Biol* **309** (2): 401-421.

**Pedulla, M. L., M. E. Ford, J. M. Houtz, T. Karthikeyan, C. Wadsworth, J. A. Lewis, D. Jacobs-Sera, J. Falbo, J. Gross, N. R. Pannunzio, W. Brucker, V. Kumar, J. Kandasamy, L. Keenan, S. Bardarov, J. Kriakov, J. G. Lawrence, W. R. Jacobs, Jr., R. W. Hendrix and G. F. Hatfull** (2003). "Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes." *Cell* **113** (2): 171-182.

**Pétursdóttir, S. K. and J. K. Kristjánsson** (1995). "The relationship between physical and chemical conditions and low microbial diversity in the Blue Lagoon geothermal lake in Iceland." *FEMS Microbiol Ecol* **19**: 39-45.

**Pfankuch, E. and G. A. Kausche** (1940). "Isolierung und übermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen." *Naturwissenschaften* **28**: 46.

**Pina, M., A. Bize, P. Forterre and D. Prangishvili** (2011). "The archaeoviruses." *FEMS Microbiol Rev* **35**: 1035-1054.

**Platt, M. D., M. J. Schurr, K. Sauer, G. Vazquez, I. Kukavica-Ibrulj, E. Potvin, R. C. Levesque, A. Fedynak, F. S. Brinkman, J. Schurr, S. H. Hwang, G. W. Lau, P. A. Limbach, J. J. Rowe, M. A. Lieberman, N. Barraud, J. Webb, S. Kjelleberg, D. F. Hunt and D. J. Hassett** (2008). "Proteomic, microarray, and signature-tagged mutagenesis analyses of anaerobic *Pseudomonas aeruginosa* at pH 6.5, likely representing chronic, late-stage cystic fibrosis airway conditions." *J Bacteriol* **190** (8): 2739-2758.

**Poli, A., I. Romano, G. Caliendo, G. Nicolaus, P. Orlando, A. Falco, L. Lama, A. Gambacorta and B. Nicolaus** (2006). "Geobacillus toebii subsp. decanicus subsp. nov., a hydrocarbon-degrading, heavy metal resistant bacterium from hot compost." *J Gen Appl Microbiol* **52** (4): 223-234.

**Polz, M. F., D. E. Hunt, S. P. Preheim and D. M. Weinreich** (2006). "Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes." *Phil. Trans. R. Soc. B* **361**: 2009-2021.

**Porter, K., B. E. Russ and M. L. Dyall-Smith** (2007). "Virus-host interactions in salt lakes." *Curr Opin Microbiol* **10** (4): 418-424.

**Porter, K., B. E. Russ, A. N. Thorburn and M. L. Dyall-Smith** (2008). "Viruses Infecting Euryarchaea." *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*: 411-423.

**Porter, K. G. and Y. S. Fei** (1980). "The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora." *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948.

**Postec, A., M. Ciobanu, J. L. Birrien, N. Biennu, D. Prieur and M. Le Romancer** (2010). "Marinitoga litoralis sp. nov., a thermophilic, heterotrophic bacterium isolated from a coastal thermal spring on Ile Saint-Paul, Southern Indian Ocean." *Int J Syst Evol Microbiol* **60** (Pt 8): 1778-1782.

**Postec, A., F. Lesongeur, P. Pignet, B. Ollivier, J. Querellou and A. Godfroy** (2007). "Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys." *Extremophiles* **11**: 747-757.

**Postec, A., L. Urios, F. Lesongeur, B. Ollivier, J. Querellou and A. Godfroy** (2005). "Continuous enrichment culture and molecular monitoring to investigate the microbial diversity of thermophiles inhabiting deep-sea hydrothermal ecosystems." *Curr Microbiol* **50** (3): 138-144.

**Poyraz, O., H. Schmidt, K. Seidel, F. Delissen, C. Ader, H. Tenenboim, C. Goosmann, B. Laube, A. F. Thunemann, A. Zychlinsky, M. Baldus, A. Lange, C. Griesinger and M. Kolbe** (2010). "Protein refolding is required for assembly of the type three secretion needle." *Nat Struct Mol Biol* **17** (7): 788-792.

- Pradeep Ram, A. S., D. Boucher, T. Sime-Ngando, D. Debroas and J. C. Romagoux** (2005). "Phage Bacteriolysis, Protistan Bacterivory Potential, and Bacterial Production in a Freshwater Reservoir: Coupling with Temperature." *Microb Ecol* **50**.
- Prangishvili, D.** (2006a). "Hyperthermophilic Virus-Host Systems: Detection and Isolation." In *Methods in Microbiology* **35**: 331-347.
- Prangishvili, D.** (2006b). "Families of DNA viruses infecting hyperthermophilic Crenarchaea." In: *Archaea - Evolution, Physiology and Molecular Biology* (Garret, R.A. et Klenk, H.P. eds.) Blackwell Publishing: 59-74.
- Prangishvili, D., H. P. Arnold, D. Gotz, U. Ziese, I. Holz, J. K. Kristjansson and W. Zillig** (1999). "A novel virus family, the Rudiviridae: Structure, virus-host interactions and genome variability of the *Sulfolobus* viruses SIRV1 and SIRV2." *Genetics* **152** (4): 1387-1396.
- Prangishvili, D. and R. A. Garrett** (2005). "Viruses of hyperthermophilic Crenarchaea." *Trends Microbiol* **13** (11): 535-542.
- Prangishvili, D., R. A. Garrett and E. V. Koonin** (2006b). "Evolutionary genomics of archaeal viruses: unique viral genomes in the third domain of life." *Virus Res* **117** (1): 52-67.
- Prangishvili, D. and M. Krupovic** (2012). "A new proposed taxon for double-stranded DNA viruses, the order "Ligamenvirales"." *Arch Virol* **157** (4): 791-795.
- Prangishvili, D., G. Vestergaard, M. Haring, R. Aramayo, T. Basta, R. Rachel and R. A. Garrett** (2006c). "Structural and genomic properties of the hyperthermophilic archaeal virus ATV with an extracellular stage of the reproductive cycle." *J Mol Biol* **359** (5): 1203-1216.
- Prestel, E., C. Regeard, J. Andrews, P. Oger and M. S. Dubow** (2012). "A Novel Bacteriophage Morphotype with a Ribbon-like Structure at the Tail extremity." *Res. J. Microbiol.* **7**: 75-81.
- Prieur, D., G. Erauso, C. Geslin, S. Lucas, M. Gaillard, A. Bidault, A. C. Mattenet, K. Rouault, D. Flament, P. Forterre and M. Le Romancer** (2004). "Genetic elements of Thermococcales." *Biochem Soc Trans* **32** (Pt 2): 184-187.
- Proctor, L. M. and J. A. Fuhrman** (1992). "Mortality of marine bacteria in response to enrichments of the virus size fraction from seawater." *Mar.Ecol.Pro.Ser.* **87**: 283-293.
- Proux, C., D. van Sinderen, J. Suarez, P. Garcia, V. Ladero, G. F. Fitzgerald, F. Desiere and H. Brussow** (2002). "The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like Siphoviridae in lactic acid bacteria." *J Bacteriol* **184** (21): 6026-6036.

## R

- R-Development-Core-Team** (2005). "R: A language and environment for statistical computing, reference index version 2.2.1." R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- Rachel, R., M. Bettstetter, B. P. Hedlund, M. Haring, A. Kessler, K. O. Stetter and D. Prangishvili** (2002). "Remarkable morphological diversity of viruses and virus-like particles in hot terrestrial environments." *Arch Virol* **147** (12): 2419-2429.
- Raimondo, L. M., N. P. Lundh and R. J. Martinez** (1968). "Primary adsorption site of phage PBS1: the flagellum of *Bacillus subtilis*." *J Virol* **2** (3): 256-264.
- Rakonjac, J., N. J. Bennett, J. Spagnuolo, D. Gagic and M. Russel** (2011). "Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications." *Curr Issues Mol Biol* **13** (2): 51-76.
- Raoult, D.** (2009). "There is no such thing as a tree of life (and of course viruses are out!)." *Nat Rev Microbiol* **7** (8): 615; author reply 615.
- Raoult, D. and P. Forterre** (2008). "Redefining viruses: lessons from Mimivirus." *Nat Rev Microbiol* **6** (4): 315-319.

- Ravot, G., M. Magot, M. L. Fardeau, B. K. Patel, G. Prensier, A. Egan, J. L. Garcia and B. Ollivier** (1995). "Thermotoga elfii sp. nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil-producing well." *Int J Syst Bacteriol* **45** (2): 308-314.
- Reaney, D. C. and S. C. N. Marsh** (1972). "The ecology of viruses attacking *Bacillus stearothermophilus* in soil." *Soil Biol. Biochem.* **5**: 399-408.
- Reaney, D. C. and M. Wood** (1973). "Phages for facultatively thermophilic strains of *Bacillus stearothermophilus*: Phage D-5." *N.Z. J. Sci.* **16**: 681-695.
- Reich, E., A. J. Shatkin and E. L. Tatum** (1961). "Bacteriocidal action of mitomycin C." *Biochim Biophys Acta* **53**: 132-149.
- Reysenbach, A.-L.** (2001). "Thermotogales." In: Ed: DR Boone, GM Garrity *Bergey's Manual of systematic bacteriology vol 1, 2nd edn.* Springer, Berlin Heidelberg New York: 369-387.
- Rice, G., K. Stedman, J. Snyder, B. Wiedenheft, D. Willits, S. Brumfield, T. McDermott and M. J. Young** (2001). "Viruses from extreme thermal environments." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (23): 13341-13345.
- Rice, G., L. Tang, K. Stedman, F. Roberto, J. Spuhler, E. Gillitzer, J. E. Johnson, T. Douglas and M. Young** (2004). "The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101** (20): 7716-7720.
- Riedel, G. and H. Ruska** (1941). "Uebermikroskopische Bestimmung der Teilchenzahl eines Sols über dessen aerodispersen zustand. 96, 86-96." *Kolloid-Z.* **96**: 86-96.
- Ripp and Miller** (1997). "The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment." *Microbiology* **143**: 2065-2070.
- Robert, P.** (2007). "Le nouveau PETIT ROBERT dictionnaire alphabétique et analogique de la langue française." Nouvelle édition remaniée et amplifiée (Rey-Debove, J. et Rey, A.). SNL Le Robert, 1967 pour la première édition du *Petit Robert*.
- Roingard, P.** (2008). "Viral detection by electron microscopy: past, present and future." *Biol Cell* **100** (8): 491-501.
- Rosario, K. and M. Breitbart** (2011). "Exploring the viral world through metagenomics." *Curr Opin Virol* **1** (4): 289-297.
- Rose, T. M., E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrokovski, C. M. McCallum and S. Henikoff** (1998). "Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences." *Nucleic Acids Res* **26** (7): 1628-1635.
- Rossello-Mora, R. and R. Amann** (2001). "The species concept for prokaryotes." *FEMS Microbiol Rev* **25** (1): 39-67.
- Ruigrok, R. W., T. Crepin and D. Kolakofsky** (2011). "Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses." *Curr Opin Microbiol* **14** (4): 504-510.
- Ruska, H.** (1940). "Über die Sichtbarmachung der bakteriophagen Lyse im Übermikroskop." *Naturwissenschaften* **28**: 45-46.
- Ruska, H.** (1943). "Versuch zu einer Ordnung der Virusarten." *Arch. Ges. Virusforsch* **2**: 480-498.
- Rutberg, L.** (1965). "On the Induction of *Escherichia Coli* K (Lambda) with High Hydrostatic Pressure." *Virology* **26**: 190-198.

## S

- Saitou, N. and M. Nei** (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* **4** (4): 406-425.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis** (1989). "Molecular Cloning - A laboratory Manual Second Edition." Cold Spring Harbor Laboratory Press (CSH).

**Sanger, F., G. M. Air, B. G. Barrell, N. L. Brown, A. R. Coulson, C. A. Fiddes, C. A. Hutchison, P. M. Slocombe and M. Smith** (1977). "Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA." *Nature* **265** (5596): 687-695.

**Sano, E., S. Carlson, L. Wegley and F. Rohwer** (2004). "Movement of viruses between biomes." *Appl Environ Microbiol* **70** (10): 5842-5846.

**Santos, F., P. Yarza, V. Parro, I. Meseguer, R. Rossello-Mora and J. Anton** (2012). "Culture-independent approaches for studying viruses from hypersaline environments." *Appl Environ Microbiol* **78** (6): 1635-1643.

**Saunders, G. F. and L. L. Campbell** (1966). "Characterization of a thermophilic bacteriophage for *Bacillus stearothermophilus*." *J Bacteriol* **91** (1): 340-348.

**Schmitt, R., I. Raska and F. Mayer** (1974). "Plain and complex flagella of *Pseudomonas rhodos*: analysis of fine structure and composition." *J Bacteriol* **117** (2): 844-857.

**Schoenfeld, T., M. Patterson, P. M. Richardson, K. E. Wommack, M. Young and D. Mead** (2008). "Assembly of viral metagenomes from yellowstone hot springs." *Appl Environ Microbiol* **74** (13): 4164-4174.

**Sédillot, C.** (1878). *Comptes rendus de l'Académie des sciences*, tome 86, 1878, p. 634 - In: "La Lettre de la Société française de terminologie, n°15, Hiver 2009. Editorial par Depecker, L."

**Selva, L., D. Viana, G. Regev-Yochay, K. Trzcinski, J. M. Corpa, I. Lasa, R. P. Novick and J. R. Penades** (2009). "Killing niche competitors by remote-control bacteriophage induction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106** (4): 1234-1238.

**Shafia, F. and T. L. Thompson** (1964a). "Calcium Ion Requirement for Proliferation of Bacteriophage Phi Mu-4." *J Bacteriol* **88**: 293-296.

**Shafia, F. and T. L. Thompson** (1964b). "Isolation and preliminary characterization of bacteriophage phi-mu-4." *J Bacteriol* **87** (5): 999-1002.

**Sharp, D. G.** (1949). "Enumeration of virus particles by electron micrography." *Proc Soc Exp Biol Med* **70** (1): 54-59.

**Sharp, R. J., S. I. Ahmad, A. Munster, B. Dowsett and T. Atkinson** (1985). "The Isolation and Characterization of Bacteriophages Infecting Obligately Thermophilic Strains of *Bacillus*." *J. gen. Microbiol.* **132**: 1709-1722.

**Shiba, S., A. Terawaki, T. Taguchi and J. Kawamata** (1959). "Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* by mitomycin C." *Nature* **183** (4667): 1056-1057.

**Shibata, A., Y. Goto, H. Saito, T. Kikuchi, T. Toda and S. Taguchi** (2006). "Comparison of SYBR Green I and SYBR Gold stains for enumerating bacteria and viruses by epifluorescence microscopy." *Aquat Microb Ecol* **43**: 223-231.

**Shkilnyj, P. and G. B. Koudelka** (2007). "Effect of salt shock on stability of lambda daimm434 lysogens." *J Bacteriol* **189** (8): 3115-3123.

**Sime-Ngando, T. and J. Colombet** (2009). "Virus et prophages dans les écosystèmes aquatiques." *Rev. Can. Microbiol* **55**: 95-109.

**Sime-Ngando, T., J.-P. Mignot, C. Amblard, G. Bourdier, C. Desvillettes and C. Quiblier-Llobéras** (1996). "Caractérisation des particules virales planctoniques dans un lac du Massif Central français : aspects méthodologiques et premiers résultats." *Anns Limnol.* **32** (4): 259-263.

**Sjoblád, R. D., C. W. Emala and R. N. Doetsch** (1983). "Invited review: bacterial flagellar sheaths: structures in search of a function." *Cell Motil* **3** (1): 93-103.

**Skerker, J. M. and H. C. Berg** (2001). "Direct observation of extension and retraction of type IV pili." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (12): 6901-6904.

**Smeesters, P. R., P. A. Dreze, S. Bousbata, K. J. Parikka, S. Timmerly, X. Hu, D. Perez-Morga, M. Deghorain, A. Toussaint, J. Mahillon and L. Van Melderen** (2011). "Characterization of a novel temperate phage originating from a cereulide-producing *Bacillus cereus* strain." *Res Microbiol* **162** (4): 446-459.

**Smith, H. O., C. A. Hutchison, 3rd, C. Pfannkoch and J. C. Venter** (2003). "Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (26): 15440-15445.

- Smith, H. W.** (1953). "The effect of physical and chemical changes on the liberation of phage particles by lysogenic strains of Salmonella." *J Gen Microbiol* **8** (1): 116-134.
- Snyder, J. C. and M. J. Young** (2011). "Advances in understanding archaea-virus interactions in controlled and natural environments." *Curr Opin Microbiol* **14** (4): 497-503.
- Soler, N., M. Gaudin, E. Marguet and P. Forterre** (2011). "Plasmids, viruses and virus-like membrane vesicles from Thermococcales." *Biochem Soc Trans* **39** (1): 36-44.
- Soler, N., E. Marguet, J. M. Verbavatz and P. Forterre** (2008). "Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales." *Res Microbiol* **159** (5): 390-399.
- Spang, A., R. Hatzenpichler, C. Brochier-Armanet, T. Rattei, P. Tischler, E. Spieck, W. Streit, D. A. Stahl, M. Wagner and C. Schleper** (2010). "Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota." *Trends Microbiol* **18** (8): 331-340.
- Stewart, F. M. and B. R. Levin** (1984). "The population biology of bacterial viruses: why be temperate." *Theor Popul Biol* **26** (1): 93-117.
- Stubbs, G. and A. Kendall** (2012). "Helical viruses." *Adv Exp Med Biol* **726**: 631-658.
- Suttle, C. A.** (1993). "Enumeration and isolation of viruses." In P.F. Kemp (ed.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology* CRC Press, Boca Raton, Fla.: 121-134.
- Suttle, C. A.** (2005). "Viruses in the sea." *Nature* **437** (7057): 356-361.
- Suttle, C. A.** (2007). "Marine viruses--major players in the global ecosystem." *Nat Rev Microbiol* **5** (10): 801-812.
- Suttle, C. A., A. M. Chan and M. T. Cottrell** (1991). "Use of ultrafiltration to isolate viruses from seawater which are pathogens of marine phytoplankton." *Appl Environ Microbiol* **57** (3): 721-726.
- Suttle, C. A. and F. Chen** (1992). "Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater." *Appl Environ Microbiol* **58** (11): 3721-3729.
- Suttle, C. A. and J. A. Fuhrman** (2010). "Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy." In S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer, and Suttle C.A. [eds.], *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO.: 145-153.

## T

- Takai, K., T. Komatsu, F. Inagaki and K. Horikoshi** (2001). "Distribution of archaea in a black smoker chimney structure." *Appl Environ Microbiol* **67** (8): 3618-3629.
- Takami, H., S. Nishi, J. Lu, S. Shimamura and Y. Takaki** (2004). "Genomic characterization of thermophilic *Geobacillus* species isolated from the deepest sea mud of the Mariana Trench." *Extremophiles* **8** (5): 351-356.
- Takemura, M.** (2001). "Poxviruses and the origin of the eukaryotic nucleus." *J Mol Evol* **52** (5): 419-425.
- Tamano, K., S. Aizawa, E. Katayama, T. Nonaka, S. Imajoh-Ohmi, A. Kuwae, S. Nagai and C. Sasakawa** (2000). "Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors." *EMBO J* **19** (15): 3876-3887.
- Tarasov, V. G.** (2006). "Effects of Shallow-Water Hydrothermal Venting on Biological Communities of Coastal Marine Ecosystems of the Western Pacific." *Adv. Mar. Biol.* **50**: 267 - 410.
- Tarasov, V. G., A. V. Gebruk, A. N. Mironov and L. I. Moskalev** (2005). "Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: Two different phenomena?" *Chem. Geol.* **224**: 5-39.
- Tarasov, V. G., A. V. Gebruk, V. M. Shulkin, G. M. Kamenev, V. I. Fadeev, V. N. Kosmynin, V. V. Malakhov, D. A. Starynin and A. I. Obzhirov** (1999). "Effect of shallow-water hydrothermal venting on the biota of Matupi Harbour (Rabaul Caldera, New Britain Island, Papua New Guinea)." *Cont. Shelf Res.* **19** 79-116.

**Thingstad, T. F.** (2000). "Elements of a Theory for the Mechanisms Controlling Abundance, Diversity, and Biogeochemical Role of Lytic Bacterial Viruses in Aquatic Systems." *Limnol. Oceanogr.* **45** (6): 1320-1328.

**Thingstad, T. F. and R. Lignell** (1997). "Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand." *Aquat Microb Ecol* **13**: 19-27.

**Thompson, T. L. and F. Shafia** (1962). "Energy requirement for adsorption of bacteriophage  $\phi\mu 4$ ." *Biochem Biophys Res Commun* **8** (6): 467-470.

**Thurber, R. V., M. Haynes, M. Breitbart, L. Wegley and F. Rohwer** (2009). "Laboratory procedures to generate viral metagenomes." *Nat Protoc* **4** (4): 470-483.

**Torrella, F. and R. Y. Morita** (1979). "Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications." *Appl Environ Microbiol* **37** (4): 774-778.

**Torsvik, T. and I. D. Dundas** (1980). "Persisting Phage Infection in *Halobacterium salinarum* str. 1." *J. gen. Virol* **47**: 29-36.

**Trotter, J.** (1995). "WinMDI. A flow cytometry analysis software." Obtained by anonymous FTP from [Ftp.scripps.edu](http://Ftp.scripps.edu)

**Tsai, Y. L., M. D. Sobsey, L. R. Sangermano and C. J. Palmer** (1993). "Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction." *Appl Environ Microbiol* **59** (10): 3488-3491.

**Twort, F. W.** (1915). "An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses." *Lancet* **2**: 1241-1243.

## V

**van Iterson, W.** (1953). "Some remarks on the present state of our knowledge of bacterial flagellation." in "Bacterial Cytology", Symposium, 6th Internat. Congr. Microbiol., Rome, 1953, 24.

**Van Regenmortel, M. H. V. and B. W. J. Mahy** (2004). "Emerging Issues in Virus Taxonomy." *Emerg Infect Dis* **10** (1): 8-13.

**Vestergaard, G., M. Haring, X. Peng, R. Rachel, R. A. Garrett and D. Prangishvili** (2005). "A novel rudivirus, ARV1, of the hyperthermophilic archaeal genus *Acidianus*." *Virology* **336** (1): 83-92.

**Vives-Rego, J., P. Lebaron and G. Nebe-von Caron** (2000). "Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology." *FEMS Microbiol Rev* **24** (4): 429-448.

## W

**Wagner, I. D. and J. Wiegel** (2008). "Diversity of thermophilic anaerobes." *Ann N Y Acad Sci* **1125**: 1-43.

**Wang, D., L. Coscoy, M. Zylberberg, P. C. Avila, H. A. Boushey, D. Ganem and J. L. DeRisi** (2002). "Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (24): 15687-15692.

**Wang, D., A. Urisman, Y. T. Liu, M. Springer, T. G. Ksiazek, D. D. Erdman, E. R. Mardis, M. Hickenbotham, V. Magrini, J. Eldred, J. P. Latreille, R. K. Wilson, D. Ganem and J. L. DeRisi** (2003). "Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays." *PLoS Biol* **1** (2): E2.

**Wang, Y., F. Hammes, K. De Roy, W. Verstraete and N. Boon** (2010). "Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology." *Trends Biotechnol* **28** (8): 416-424.

**Wang, Y. and X. Zhang** (2008). "Characterization of a novel portal protein from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2." *Gene* **421** (1-2): 61-66.

**Wang, Y. and X. Zhang** (2010). "Genome analysis of deep-sea thermophilic phage D6E." *Appl Environ Microbiol* **76** (23): 7861-7866.

**Ward, D. M., R. W. Castenholz and S. R. Miller** (2012). "Cyanobacteria in Geothermal Habitats." *Ecology of Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time* (Whitton, B.A. ed.): 39-65.

**Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr and H. G. Trüper** (1987). "Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." *Int J Syst Bacteriol* **37**: 463-464.

**Wei, D. and X. Zhang** (2008). "Identification and characterization of a single-stranded DNA-binding protein from thermophilic bacteriophage GVE2." *Virus Genes* **36** (1): 273-278.

**Weinbauer, M. G.** (2004). "Ecology of prokaryotic viruses." *FEMS Microbiol Rev* **28** (2): 127-181.

**Weinbauer, M. G., D. Fuks, S. Puskaric and R. Peduzzi** (1994). "Diel, Seasonal, and Depth-Related Variability of Viruses and Dissolved DNA in the Northern Adriatic Sea." *Microb Ecol* **30**: 25-41.

**Weinbauer, M. G. and C. A. Suttle** (1996). "Potential significance of lysogeny to bacteriophage production and bacterial mortality in coastal waters of the gulf of Mexico." *Appl Environ Microbiol* **62** (12): 4374-4380.

**Weinbauer, M. G. and C. A. Suttle** (1997). "Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters." *Aquat Microb. Ecol.* **13**: 225-232.

**Weitz, J. S. and S. W. Wilhelm** (2012). "Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles." *F1000 Biol Rep* **4**: 17.

**Welker, N. E. and L. L. Campbell** (1965). "Induction and Properties of a Temperature Bacteriophage from *Bacillus Stearothermophilus*." *J Bacteriol* **89**: 175-184.

**Wen, K., A. C. Ortmann and C. A. Suttle** (2004). "Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence microscopy." *Appl Environ Microbiol* **70** (7): 3862-3867.

**White, R., C. E. Georgi and W. Militzer** (1955). "Characteristics of a thermophile bacteriophage." *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **88**: 373-377.

**Wilhelm, S. W. and C. A. Suttle** (1999). "Viruses and Nutrient Cycles in the Sea." *BioScience* **49** (10): 781-788.

**Wilhelm, S. W., M. G. Weinbauer, C. A. Suttle, R. J. Pledger and D. L. Mitchell** (1998). "Measurements of DNA damage and photoreactivation imply that most viruses in marine surface waters are infective." *Aquat. Microb. Ecol.* **14**: 215-222.

**Williamson, S. J., S. C. Cary, K. E. Williamson, R. R. Helton, S. R. Bench, D. Winget and K. E. Wommack** (2008). "Lysogenic virus-host interactions predominate at deep-sea diffuse-flow hydrothermal vents." *ISME J* **2** (11): 1112-1121.

**Williamson, S. J., M. R. McLaughlin and J. H. Paul** (2001). "Interaction of the PhiHSIC virus with its host: lysogeny or pseudolysogeny?" *Appl Environ Microbiol* **67** (4): 1682-1688.

**Wilson, W. H. and N. H. Mann** (1997). "Lysogenic and lytic viral production in marine microbial communities." *Aquat Microb Ecol* **13**: 95-100.

**Woese, C. R. and G. E. Fox** (1977). "Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (11): 5088-5090.

**Wommack, K. E. and R. R. Colwell** (2000). "Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems." *Microbiol Mol Biol Rev* **64** (1): 69-114.

**Wommack, K. E., R. T. Hill, M. Kessel, E. Russek-Cohen and R. R. Colwell** (1992). "Distribution of viruses in the Chesapeake Bay." *Appl Environ Microbiol* **58** (9): 2965-2970.

**Wommack, K. E., S. J. Williamson, A. Sundbergh, R. R. Helton, B. T. Glazer, K. Portune and S. C. Cary** (2004). "An instrument for collecting discrete large-volume water samples suitable for ecological studies of microorganisms." *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* **51**: 1781-1792.

# Y-Z

**Yu, M. X., M. R. Slater and H. W. Ackermann** (2006). "Isolation and characterization of *Thermus* bacteriophages." *Arch Virol* **151** (4): 663-679.

**Zeigler, D. R.** (2001). "The Genus *Geobacillus*." In *Bacillus Genetic Stock Center Catalog of Strains*, Seventh Edition **3**.

**Zillig, W., A. Kletzin, C. Schleper, I. Holtz, D. Janekovic, J. Hain, M. Lanzendörfer and J. K. Kristjansson** (1994). "Screening for *Sulfolobales*, their plasmids and their viruses in Icelandic solfataras." *System. Appl. Microbiol.* **16**: 609-628.

**Zillig, W., D. Prangishvilli, C. Schleper, M. Elferink, I. Holz, S. Albers, D. Janekovic and D. Gotz** (1996). "Viruses, plasmids and other genetic elements of thermophilic and hyperthermophilic Archaea." *FEMS Microbiol Rev* **18** (2-3): 225-236.

## Références informatiques

Site internet actuel de l'International committee on taxonomy of viruses (ICTV):  
[www.ictvdb.org/](http://www.ictvdb.org/)

Site internet actuel du National Center for Biotechnology Information (NCBI):  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Site internet actuel de l'Institut Paul Emile Victor (IPEV): <http://www.institut-polaire.fr/>

Site internet actuel des Terres australes et antarctique françaises: <http://www.taaf.fr/>





# Annexe



1 ***Calditerricola clavaformis* sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a geothermal**  
2 **soil of the Saint Paul Island, Southern Indian Ocean**

3 Kaarle Joonas Parikka<sup>1†</sup>, Samuel Dupont<sup>1,2†</sup>, Karine Alain<sup>1</sup>, Olivier Le Goff<sup>1,3</sup>, Audrey  
4 Gramain<sup>1</sup>, Jean Louis Birrien<sup>1</sup> and Marc Le Romancer<sup>1</sup>

5

6 <sup>1</sup> Université de Brest, CNRS, IFREMER, UMR 6197 Laboratoire de microbiologie des  
7 environnements extrêmes, OSU-IUEM, Technopôle Brest Iroise, Avenue Dumont D'Urville,  
8 29280 Plouzané, France.

9 <sup>2</sup> Present adress :

10 <sup>3</sup> Present adress :

11

12 **Corresponding author :**

13 Marc Le Romancer

14 E-mail : marc.leromancer@univ-brest.fr

15 Phone number : +33-(0)2-98-49-87-50

16 Fax: 33-(0)2-98-49-87-05

17

18 **Category:** New Taxa- Firmicutes and Related Organisms

19

20 **Running title:** *Calditerricola clavaformis* sp. nov.

21 **Footnote:**

22 † Both authors contributed equally to this work

23 The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the 16S rRNA gene sequence of  
24 *Calditerricola clavaformis* OLG2<sup>T</sup> is FN398054.

25

26 **Abstract**

27 **A novel thermophilic, heterotrophic, aerobic bacterium, designated strain OLG2<sup>T</sup>, was**  
28 **isolated from a geothermally heated soil of Saint-Paul Island, in the Southern Indian**  
29 **Ocean. Cells of strain OLG2<sup>T</sup> were Gram-positive spore-forming motile rods of 5-6 µm long.**  
30 **Growth was observed at temperatures ranging from 55° to 90°C (optimum at 78°C),**  
31 **between pH 6.5 and 8.5 (optimum at 7.5) and with 0.0-2.5 %(w/v) NaCl (optimum at**  
32 **1.0%).The total DNA G+C content was 63.7 mol% . The dominant fatty acids in strain OLG2<sup>T</sup>**  
33 **were iso-C<sub>17:0</sub> and anteiso C<sub>17:0</sub>. It contained MK7 as main respiratory quinone, together**  
34 **with MK6 and MK8. On the basis of 16S rRNA gene sequence similarity, the novel isolate**  
35 **belongs to the order *Bacillales* and is related to the genus *Calditerricola*. It shares 99.4%**  
36 **and 99.1% 16S rRNA sequence identity with *Calditerricola satsumensis* and *C. yamamurae*,**  
37 **its closest phylogenetic relatives. On the basis of DNA-DNA low relatedness, genotypic and**  
38 **phenotypic distinctness, we propose that strain OLG2<sup>T</sup> represents a novel species of the**  
39 **genus *Calditerricola*, for which the name *Calditerricola clavaformis* sp. nov. is proposed.**  
40 **The type strain is OLG2<sup>T</sup> (DSM 22675 = JCM 16306 = UBOCC 3068).**

41

42 The high-temperature environments are crucial biotopes for the understanding of  
43 fundamental biological and evolutionary processes on Earth. If most areas of geothermal  
44 activities studied so far are located in the North hemisphere (Yellowstone, Iceland,  
45 Kamchatka, etc.), the South hemisphere harbors also such singular ecosystems, and  
46 surprisingly in polar and subpolar regions. This is the case of French Southern and Antarctic  
47 Territories (Terres Australes et Antarctiques Françaises). Microbial communities of these  
48 archipelagos, and notably those of the Kerguelen and Saint Paul Islands, remain unexplored  
49 and represent for scientists a future full of promises due to their extreme geographic  
50 isolation.

51

52 Geothermal soils harbor a variety of moderately and highly thermophilic micro-organisms.  
53 Several strains isolated from such particular habitats belong to the genera *Geobacillus* (Blanc  
54 *et al.*, 1997; Coorevits *et al.*, 2012;) and *Anoxybacillus* of the family *Bacillaceae* (Belduz *et*  
55 *al.*, 2003; Dulger *et al.*, 2004; Poli *et al.*, 2006, 2009). Recently, two strains belonging to the  
56 novel genus *Calditerricola* within the family *Bacillaceae* were isolated from a Japanese high  
57 temperature compost by Oshima and co-workers (Oshima *et al.*, 2008; Moriya *et al.*, 2011).  
58 *Calditerricola satsumensis* and *Calditerricola yamamurae* are aerobic, Gram-negative, non-  
59 spore-forming, extremely thermophilic bacteria growing optimally at temperatures of 78°C  
60 and 72°C, respectively.

61

62 In this study, a novel thermophilic bacterial isolate, strain OLG2<sup>T</sup>, isolated from a geothermal  
63 soil of the Saint Paul Island is described. Based on the results of a polyphasic taxonomic  
64 analysis, strain OLG2<sup>T</sup> represents a novel species of the genus *Calditerricola*.

65 Saint-Paul Island (38°43' S, 77°31'E) is a tiny island corresponding to the emerged part of a  
66 partially sunk volcano located in the vicinity of the Southern Indian Ridge in the South Indian  
67 Ocean. Its crater harbors terrestrial and shallow submarine hot springs as well as heated  
68 soils. In 2006, geothermally heated soils at 61°C were sampled and stored at 4°C until  
69 analysis.

70 About 10 mg of soil were used to inoculate 5 ml of medium 160 (Skirnisdottir *et al.*, 2001)  
71 and incubated at temperatures ranging from 60°C to 80°C. The medium 160 contained (l<sup>-1</sup>):  
72 2.5g yeast extract (Difco Laboratories), 2.5g tryptone, 10g NaCl, 0.132g nitrilotriacetic acid,  
73 0.2g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 40mg CaSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 1.47mg Na<sub>3</sub>citrate.2H<sub>2</sub>O, 1.35mg FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 10.88mg  
74 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 42.8mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O. The medium was supplemented with 0.5ml of trace  
75 elements which contained (l<sup>-1</sup>): 12.8g nitrilotriacetic acid, 1.0g FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0.5g MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O,  
76 0.3g CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 0.2g ZnCl<sub>2</sub>, 0.05g CuCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.05g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0.02g H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, 0.02g  
77 NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O. The pH of the medium was adjusted to 7.2 and plates were prepared with 2.8%  
78 (w/v) agar. After 2-3 days incubation, orange-yellow round and smooth colonies were  
79 observed on plates incubated at 72°C. They were about 2 mm in diameter after 2 days  
80 incubation. One well isolated colony was picked and purified by repeated streaking (3 times)  
81 at 72°C on medium 160 plates and referenced as strain OLG2<sup>T</sup>.

82 Morphological characteristics of the cells were determined by light microscopy (Olympus,  
83 BX60) and by transmission electron microscopy (Jeol JEM 100 CX II) after negative staining  
84 with 2% (w/v) uranyl acetate.

85 Observations revealed rod-shaped cells of 2.5-3.8 µm in length and 0.4-0.7 µm in width (Fig.  
86 1a). Cells occurred mostly singly. Most cells produced a terminal spore of approximately 1.1  
87 µm diameter (Fig. 1b) when incubated at temperatures below the optimal temperature for  
88 growth (78°C). Spores were also consistently detected in old cultures, whatever the

89 conditions in which they were grown. Spores deformed cells. For Gram determination,  
90 vegetative cells were stained using the method of Gregersen (1978) and the Gram type was  
91 confirmed using the KOH test (Buck, 1982). Both methods clearly demonstrated that the  
92 isolate was a Gram-positive bacterium.

93

94 Unless stated otherwise, physiological characterization was carried out aerobically in  
95 medium 160 in duplicate and the cell suspension was incubated with agitation in the dark.  
96 Growth was monitored routinely by measuring the increase in optical density at 600 nm  
97 using a spectrophotometer or by direct cell counting using a modified Thoma chamber  
98 (depth 10  $\mu\text{m}$ ). Growth rates were calculated using linear regression analysis of five to nine  
99 points along the logarithmic portions of the resulting growth curves. The determination of  
100 the temperature range for growth was tested over the range 45-95°C (with increments of  
101 5°C). The strain was found to be hyperthermophilic, growing at 55-90°C. Salt tolerance was  
102 tested at 78°C in medium 160 prepared with 0-6% (w/v) NaCl (with increments of 1%). The  
103 NaCl concentrations allowing growth ranged from 0% to 2.5% NaCl, with an optimum at 1%.  
104 The pH range for growth was tested at initial pH 2.0-9.0 (at intervals of 0.5 pH unit) at 78°C,  
105 in medium 160 buffered and adjusted to the required pH (initial pH at 20 °C), as described  
106 elsewhere (Alain *et al.*, 2002). Growth was observed at pH 6.5-8.5 (optimum about pH 7.5).  
107 The strain was found to be strictly aerobic. Heterotrophic growth was observed in medium  
108 160 containing trace elements and proteinaceous substrates. To examine possible carbon  
109 sources other than yeast extract and tryptone, strain OLG2<sup>T</sup> was cultivated in a minimal  
110 medium (medium 160 without tryptone and yeast extract) containing one single carbon  
111 source. Amino acids (0.2% w/v) and carbohydrates (0.2% w/v) were tested as potential  
112 carbon and energy sources. Growth was not observed when tryptophan, tyrosine, proline,

113 asparagine, threonine, glutamate or glutamine were used as substrates. Under these  
114 experimental conditions, the isolate did not metabolize L(+)-arabinose, D(+)-galactose,  
115 D(+)-lactose, D(+)-cellobiose, D(-)-ribose, D(+)-xylose, starch, D(+)-rhamnose, cellulose,  
116 (D+)-maltose, (D+)-mannose or D(+)-glucose. The isolate utilized polypeptides or protein  
117 sources such as peptone (Difco), tryptone (Difco), vitamin free-casein acid hydrolysate  
118 (Sigma) as well as complex sources such as beef extract (Difco) or yeast extract (Difco) as  
119 carbon and energy. The ability of the strain to grow anaerobically and to ferment complex  
120 organic matter or carbohydrates (yeast-extract 2 g.l<sup>-1</sup>, peptone 2 g.l<sup>-1</sup> and glucose 2 g.l<sup>-1</sup>) was  
121 investigated under an atmosphere of N<sub>2</sub> (100%) on a degassed and reduced medium 160.  
122 Strain OLG2<sup>T</sup> did not ferment proteinaceous substrates nor carbohydrates. Differential  
123 phenotypic characters of strain OLG2<sup>T</sup> and *Calditerricola* species are shown in Table 1.

124

125 In order to analyze fatty acids and respiratory quinones, strain OLG2<sup>T</sup> was grown on medium  
126 160 at 70°C for 12h. Fatty acid analysis was performed using the MIDI system (Microbial  
127 Identification System). Quinone and fatty acid analyses were carried out by the Identification  
128 Service of the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. The fatty acid  
129 composition of the novel isolate in the mid-exponential phase of growth was dominated by  
130 iso-C<sub>17:0</sub> (62.43%) and by anteiso-C<sub>17:0</sub> (15.73%), accounting for approximately 78% of the  
131 total. The presence of C<sub>18:1</sub>ω<sub>9c</sub>, an unsaturated fatty acid, was detected in OLG2<sup>T</sup>, whereas  
132 the two other strains of the genus *Calditerricola* harbored the unsaturated C<sub>18:2</sub>ω<sub>9,12c</sub> fatty  
133 acids instead. Strain OLG2<sup>T</sup> also contained iso-C<sub>18:1</sub>ω<sub>7c</sub> and iso-C<sub>18:1</sub>ω<sub>9c</sub>, not found in the  
134 other two *Calditerricola* strains.

135 The respiratory quinones in strain OLG2<sup>T</sup> consisted of the major compound MK7 (96%) and  
136 minor amounts of MK6 (2%) and MK8 (2%).

137

138 The DNA G+C content was determined by HPLC method (Mesbah *et al.*, 1989; Tamaoka &  
139 Komagata, 1984) after purification of cell DNA by chromatography on hydroxyapatite  
140 according to Cashion *et al.* (1977). The novel isolate had a DNA G+C content of 63.7 mol%  
141 close to the value obtained for *C. yamamurae* YMO722<sup>T</sup> (64.0 mol%) but far from that of *C.*  
142 *satsumensis* YMO81<sup>T</sup> (70.0 mol%).

143

144 Both strands of the almost complete 16S rRNA gene of strain OLG2<sup>T</sup> were amplified from a  
145 single colony using the universal primers 8F, 1492R (DeLong *et al.*, 1992) and Eub-int (5'-GCG  
146 CCA GCA GCC GCG GTA A-3'), and then sequenced with the Bid Dye technology (Beckman  
147 Coulter Genomics, Essex, UK). Contiging was performed from 5 overlapping sequence  
148 fragments. The sequence obtained was a continuous stretch of 1455 bp. An initial  
149 comparison of this sequence to those in available databases by use of the BLAST program  
150 (Altschul *et al.*, 1990) revealed that this strain was closely related to *Calditerricola*  
151 *satsumensis* YMO81<sup>T</sup> and *Calditerricola yamamurae* YMO722<sup>T</sup>. A multiple 16S rRNA gene  
152 sequence file was then generated with the closest phylogenetic neighbours using the  
153 program BioEdit and a phylogenetic reconstruction was performed using SEAVIEW version 4  
154 (Gouy *et al.*, 2010). The evolutionary distance matrices were calculated by the method of  
155 Jukes & Cantor (1969) and a phylogenetic tree was constructed using the neighbor joining  
156 algorithm (Saitou & Nei, 1987)( Fig. 2). Phylogenetic reconstruction indicated that the novel  
157 isolate belonged to the genus *Calditerricola*, family *Bacillaceae*, order *Bacillales*, phylum  
158 *Firmicutes*. Within this lineage, the novel isolate grouped robustly with *C. satsumensis* and *C.*  
159 *yamamurae*, sharing respectively 99.4% and 99.1% 16S rRNA gene sequence identity with  
160 the type strains of these species.

161

162 To further elucidate the taxonomic relationships of strain OLG2<sup>T</sup> with the two  
163 representatives of the genus *Calditerricola*, DNA-DNA hybridizations were performed. For  
164 DNA-DNA hybridizations, cellular DNA was purified according to Cashion *et al.* (1977). Public  
165 collections were unable to provide active growing cells of *C. satsumensis* YMO81<sup>T</sup> so DNA-  
166 DNA hybridizations were performed only between *C. yamamurae* YMO722<sup>T</sup> and strain  
167 OLG2<sup>T</sup>. Hybridizations were carried out as described by De Ley *et al.* (1970) with  
168 modifications described by Huss *et al.* (1983), using a model Cary 100 Bio UV/VIS-  
169 spectrophotometer equipped with a Peltier-thermostatted 6x6 multicell changer and a  
170 temperature controller with *in situ* temperature probe (Varian). These analyses were carried  
171 out by the Identification Service of the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und  
172 Zellkulturen. The mean degree of DNA-DNA relatedness between strain OLG2<sup>T</sup> and *C.*  
173 *yamamurae* YMO722<sup>T</sup> was 55.1% (value of 49.2% in the second measurement). This value  
174 falls below the threshold value of 70% for species delineation, indicating that both strains  
175 are distinct genomic species. In addition, the large difference in DNA G+C contents of strain  
176 OLG2<sup>T</sup> and *C. satsumensis* YMO81<sup>T</sup> suggests that these two strains belong also to two  
177 different species (Rossellò-Mora & Amann, 2000) (Table 1).

178

179 *Calditerricola satsumensis* YMO81<sup>T</sup> and *Calditerricola yamamurae* YMO722<sup>T</sup> are  
180 heterotrophic, aerobic, Gram-negative, non-spore forming, rod-shaped bacteria distantly  
181 related to the genera *Planifilum* and *Geobacillus*. While species of the genera *Planifilum* and  
182 *Geobacillus* are thermophilic or moderate thermophilic, species of *Calditerricola* are  
183 extremely thermophilic with optimal temperatures for growth of 78°C for *C. satsumensis*,  
184 72°C for *C. yamamurae* and 78°C for the novel strain OLG2<sup>T</sup>. Such as strain OLG2<sup>T</sup>, *Planifilum*

185 and *Geobacillus* species were described to produce endospores (Moriya *et al.*, 2011;  
186 Hatayama *et al.*, 2005), but *Calditerricola satsumensis* and *C. yamamurae* were not. Strain  
187 OLG2<sup>T</sup> differs also from the two species of the genus *Calditerricola* by its Gram reaction as  
188 determined by KOH test and staining. Although Gram staining is sometimes known to vary  
189 among species of the same genus, e.g. the genus *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001; Coorevits  
190 *et al.*, 2012), spore-formation constitutes a distinctive characteristic, involving multiple gene  
191 expression in the formation and germination of the spores within the order *Bacillales*  
192 (Paredes-Sabja *et al.*, 2011) .

193

194 On the basis of these observations, and of phenotypic and genotypic distinctness, we  
195 propose that strain OLG2<sup>T</sup> should be described as a novel species of the genus *Calditerricola*,  
196 for which the name *Calditerricola clavaformis* is proposed.

197

#### 198 **Description of *Calditerricola clavaformis* sp.nov.**

199 *Calditerricola clavaformis* (cla'va.for.mis. cla'va from L.n. *clava*, a cudgel, club; L.adj. *formis*  
200 morphology; N. L. adj. *clavaformis* club-shaped)

201 Cells are Gram-positive, rod-shaped, 2.5-3.8 µm in length and 0.4-0.7 µm in width, with  
202 terminal and oval endospores. Optimal growth occurs aerobically at 78°C (range 55-90°C),  
203 pH 7.5 (range 6.5-8.5), 1% (w/v) NaCl (range 0.0-2.5). No hydrolysis of arabinose, galactose,  
204 lactose, cellobiose, ribose, xylose, starch, rhamnose, cellulose, maltose and mannose  
205 observed. Utilizes tryptone and yeast extract, beef extract as carbon and energy sources.  
206 The DNA G+C content is 63.7%.

207 We also propose that sporulation should be included as a feature belonging to the genus  
208 *Calditerricola*.

209 The type strain is *Caldiclava clavaformis*, OLG2<sup>T</sup>, DSM 22675T = JCM 16306T = UBOCC 3068.

210

211

## 212 **Acknowledgements**

213 We would like to thank G. Siquin for help with the scanning electron microscope and Dr  
214 Jean P.Euzéby (Ecole Nationale Vétérinaire, France) for the etymology of the new organism's  
215 name. This research was funded by the 'Territoire des Terres Australes et Antarctiques  
216 Françaises' and the French Polar Institute (IPEV-Hotvir 408 project). The study was supported  
217 by grants from the French Ministry of Higher Education and Research for KJP and from the  
218 Région Bretagne for AG.

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231 **References:**

- 232 **Alain, K., Pignet, P., Zbinde, M., Quillevere, M., Duchiron, F., Donval, J.P., Lesongeur, F.,**  
233 **Raguenes, G., Crassous, P. et al. (2002).** *Caminicella sporogenes* gen. nov., sp. nov., a novel  
234 thermophilic spore-forming bacterium isolated from an East-Pacific Rise hydrothermal vent.  
235 *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1621-8.
- 236 **Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E. & Lipman, D. (1990).** Basic local alignment tool. *J*  
237 *Mol Biol* **215**, 403-10.
- 238 **Belduz, A.O., Dulger, S. & Demirbag, Z., (2003).** *Anoxybacillus gonensis* sp. nov., a  
239 moderately thermophilic, xylose-utilizing, endospore-forming bacterium. *Int J Syst Evol*  
240 *Microbiol* **53**, 1315-20.
- 241 **Blanc, M., Marilley, L., Beffa, T. & Aragno, M. (1997).** Rapid identification of heterotrophic,  
242 thermophilic, spore-forming bacteria isolated from hot composts. *Int J Syst Bacteriol* **47**,  
243 1246-8.
- 244 **Buck, J. D. (1982).** Nonstaining (KOH) method for determination of Gram reactions of marine  
245 bacteria. *Appl Environ Microbiol* **44**, 992-993.
- 246 **Cashion, P., Holder-Franklin, M.A., MacCully, J. & Franklin, M. (1977).** A rapid method for  
247 the base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem* **81**, 461-466.
- 248 **Coorevits, A., Dinsdale, A., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A. & Logan,**  
249 **N.A. (2012).** Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G.*  
250 *stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans*  
251 (nom. corrig., formerly '*thermoglucosidasius*'); transfer of *Bacillusthermantarcticus* to the  
252 genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillusdebilis* gen. nov., comb.

253 nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov. ; and proposal  
254 of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **62**, 1470-85.

255 **De Ley, J., Cattoir, H. & Reynaerts, A. (1970).** The quantitative measurement of DNA  
256 hybridization from renaturation rates. *Eur J Biochem* **12**, 133-142.

257 Delong et al, 1992

258 **Dulger, S. Demirbag, Z. & Belduz, A.O. (2004).** *Anoxybacillus ayderensis* sp. nov. and  
259 *Anoxybacillus kestanbolensis* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol* **54** , 1499-503.

260 **Gouy, M., Guindon, S. & Gascuel, O. (2010).** SeaView version 4: A multiplatform graphical  
261 user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* **27**, 221-  
262 224.

263 **Gregersen, T. (1978).** Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive  
264 bacteria. *Eur J Appl Microbiol* **5**, 123-127.

265 **Hatayama, K., Shoun, H., Ueda, Y. & Nakamura, A. (2005).** *Planifilum fimeticola* gen. nov.,  
266 sp. nov. and *Planifilum fulgidum* sp. nov., novel members of the family  
267 'Thermoactinomycetaceae' isolated from Compost. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 2101-04.

268 **Jukes, T.H. & Cantor, C.R. (1969).** Evolution of protein molecules. In: *Mammalian Protein*  
269 *Metabolism*, vol. 3, pp. 21-132. Edited by H.N.Munro. New York: Academic Press.

270 **Mesbah, M., Premachandran, U. & Whitman, W. (1989).** Precise measurement of the G+C  
271 content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. *Int J Syst Bact*  
272 **39**, 159-167.

273 **Moriya, T., Hikota, T., Yumoto, I., Ito, T., Terui, Y., Yamagishi, A. & Oshima, T. (2011).**  
274 *Calditerricola satsumensis* gen. nov., sp. nov. and *Calditerricola yamamurae* sp. nov., extreme

275 thermophiles isolated from a high-temperature compost. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 631-  
276 636.

277 **Nazina, T. N., Tourova, T. P. , Poltarau, A. B. , Novikova, E. V., Grigoryan, A. A. , Ivanova,**  
278 **A. E. , Lysenko, A. M. , Petrunyaka, V. V. , Osipov, G. A. et al. (2001).** Taxonomic study of  
279 aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and  
280 *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus*  
281 *stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus*  
282 *kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as  
283 the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G.*  
284 *kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**,  
285 433–446.

286 **Oshima, T. & Moriya, T. (2008).** A preliminary analysis of microbial and biochemical  
287 properties of high-temperature compost. *Ann. N Y Acad Sci* **1125**, 338-44.

288 **Paredes-Sabja, D., Setlow, P. & Sarker, M.R., (2011).** Germination of spores of Bacillales  
289 and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved. *Trends Microbiol* **19**, 85-94.

290 **Poli, A., Esposito, E., Lama, L., Orlando, P., Nicolaus, G., de Appolonia, F., Gambacorta, A. &**  
291 **Nicolaus B. (2006).** *Anoxybacillus amylolyticus* sp. nov., a thermophilic amylase producing  
292 bacterium isolated from Mount Rittmann (Antarctica). *Syst Appl Microbiol* **29**, 300-307.

293 **Poli, A., Romano, .I, Cordella, P., Orlando, P., Nicolaus, B. & Ceschi Berrini, C. (2009).**  
294 *Anoxybacillus thermarum* sp. nov., a novel thermophilic bacterium isolated from thermal  
295 mud in Euganean hot springs, Abano Terme, Italy. *Extremophiles* **13**, 867-874.

296 **Rosselò-Mora, R. & Amann, R. (2001).** The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol*  
297 *Rev* **25**, 39-67.

298 **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing  
299 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.

300 **Skirnisdottir, S., Hreggvidsson, G.O., Holst, O. & Kristjansson, J.K. (2001).** Isolation and  
301 characterization of a mixotrophic sulfur-oxidizing *Thermus scotoductus*. *Extremophiles* **5**, 45-  
302 51.

303 **Tamaoka, J. & Komagata, K. (1984).** Determination of DNA base composition by reversed-  
304 phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol lett* **25**, 125-128.

305

306

307

308

309

310

311

312

313

314

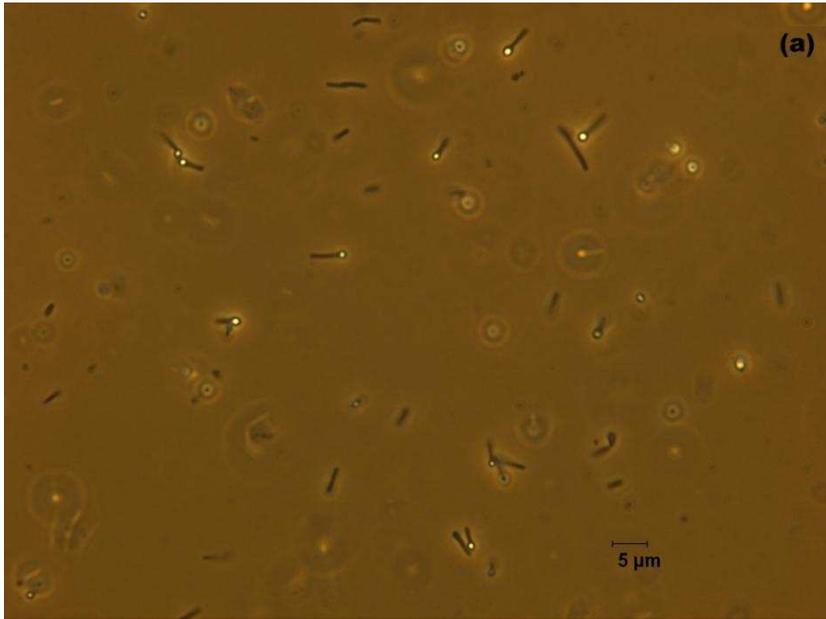
315

316

317

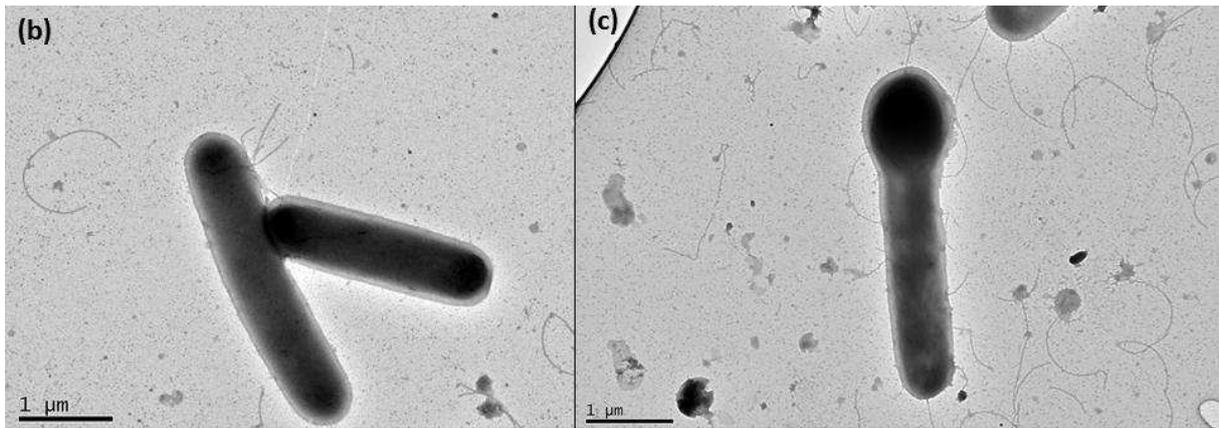
318

319



320

321



322

323 **Fig. 1**

324 Contrast-phase micrograph (a) and transmission electron micrograph (b – c) of cells of strain

325 OLG2<sup>T</sup> showing endospore shape and position. Bars, 5 μm (a) and 1 μm (b-c)

326

327

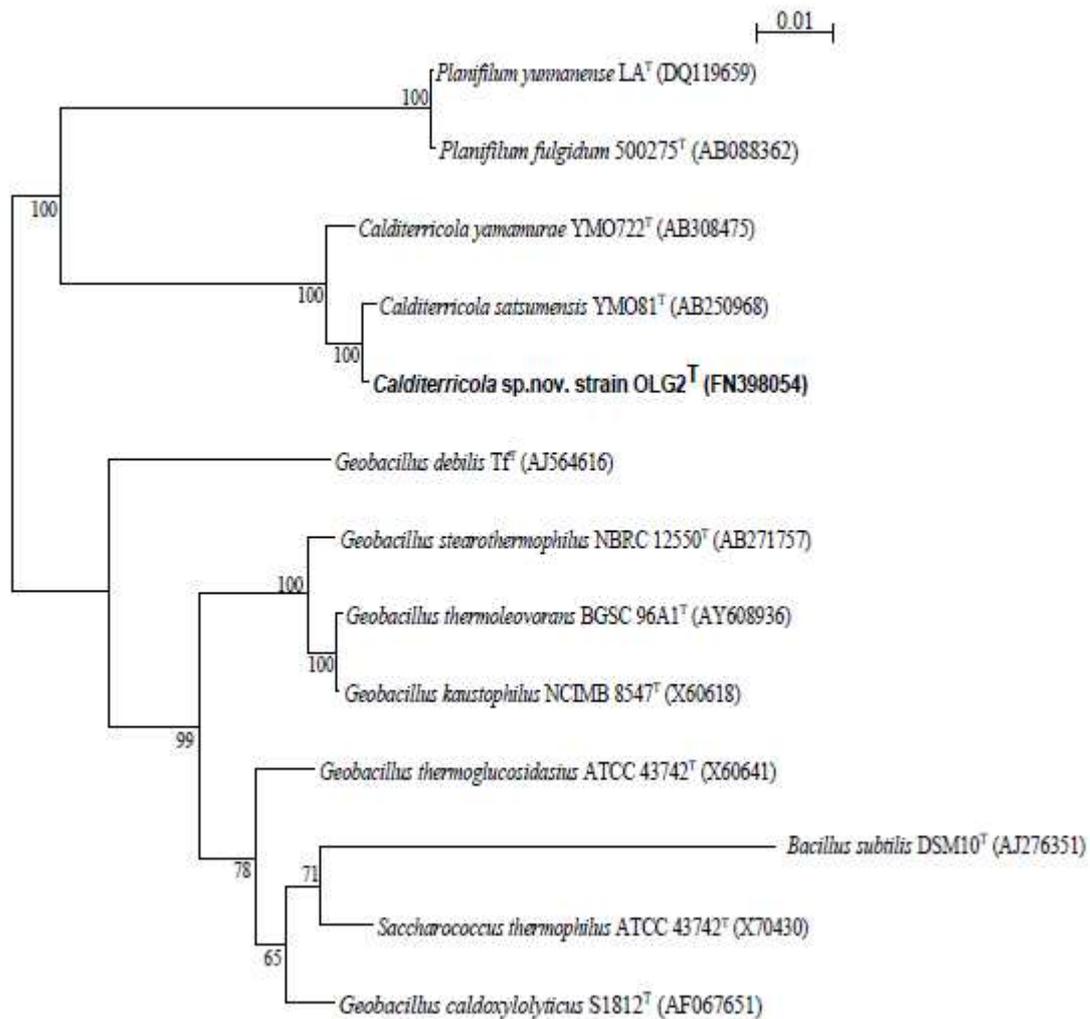
328

Characteristics	YMO81 <sup>T</sup>	YMO722 <sup>T</sup>	OLG2 <sup>T</sup>
<i>Colony colour</i>	Cream-yellow	Cream-yellow	Orange-yellow
<i>Spores</i>	No	No	Terminal
<i>Gram</i>	Negative	Negative	Positive
<i>Growth conditions</i>			
Temperature range	56-83	56-81	55-90
Optimum temperature (°C)	78	72	78
NaCl range (% w/v)	0.3-4.0	0.0-2.0	0.0-2.5
Optimum NaCl (% w/v)	2	1,6	1
pH range	6.6-8.9	6.3-9.1	6.5-8.5
Optimum pH	7,5	7	7,5
<i>DNA G+C content (mol%)</i>	70	64	63.7
<i>Polar lipids</i>	PE, APL	PE,PGL,APL	ND
<i>Major cellular fatty acids (%)</i>			
iso-C <sub>15:0</sub>	10.5	11.3	4.78
anteiso-C <sub>15:0</sub>	2.2	2.6	3.01
C <sub>16:0</sub>	6.4	6.9	4.93
iso-C <sub>16:0</sub>	11	9.7	5.59
C <sub>17:0</sub>	1,6*	no	0.61
iso-C <sub>17:0</sub>	55.4	54.3	62.43
anteiso-C <sub>17:0</sub>	13.7	14.3	15.73
C <sub>18:0</sub>	1.1*	0.4	0.83
iso-C <sub>18:0</sub>	no	no	0.98
iso-C <sub>19:0</sub>	no	no	0.29
iso-C <sub>18:2</sub> $\omega$ 9,12 <i>c</i>	0.9	0,8	no
iso-C <sub>18:1</sub> $\omega$ 7 <i>c</i>	no	no	0.23
iso-C <sub>18:1</sub> $\omega$ 9 <i>c</i>	no	no	0.65

329 **Table 1**

330 Comparison of phenotypic characteristics of *Calditerricola satsumensis* strain YMO81<sup>T</sup>,  
331 *Calditerricola yamamurae* strain YMO722<sup>T</sup> (Moriya *et al.*, 2011) and strain OLG2<sup>T</sup> (this study).

332 ND= not determined, \*= values obtained at 70°C.



334

335 **Fig. 2**

336 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences using the neighbour-joining method

337 (Saitou & Nei, 1987) showing the position of strain OLG2<sup>T</sup> within the genus *Calditerricola* and

338 among related taxa. Numbers at branching points refer to bootstrap values based (1000

339 resamplings). Bar, 1 substitution per 100 nucleotides positions.

340









## **Résumé :**

Les virus peuvent être retrouvés dans tout les écosystèmes où de la vie est présente. Ils constituent l'entité biologique la plus abondante de la biosphère. Si de nombreuses données sont disponibles sur l'abondance et la dynamique virale dans les écosystèmes aquatiques tempérées, peu d'études ont été menées sur ces aspects dans les milieux extrêmes, dont les sources hydrothermales. Dans l'étude présentée dans ce manuscrit, les communautés procaryotiques et virales des sources hydrothermales des Terres australes et antarctiques françaises (TAAF) ont été explorées. Dans un premier temps, les cellules procaryotiques et les particules de type viral (VLP) ont été dénombrées dans plusieurs sources chaudes terrestres et marines côtières. L'abondance microbienne et virale est de l'ordre de  $10^5 - 10^6$  particules/ml dans les deux types de source avec des rapports VLP/procaryotes (VPR) qui sont généralement faibles, concordant ainsi avec les données rares actuellement disponibles dans la littérature. Dans un second temps, la diversité morphologique des VLP a été analysée par observation au microscope électronique à transmission. La présence de VLP de morphologies différentes a pu être constatée dans quelques échantillons bruts, mais également dans des cultures d'enrichissement, où elles étaient associées à des *Thermococcales* et des *Thermotogales*. Finalement, quelques souches isolées de ces échantillons ont été criblées pour la présence de virus aboutissant à la description d'un nouveau bactériovirus tempéré associé à une bactérie thermophile *Geobacillus*. L'effet d'un choc osmotique en présence de NaCl et l'effet d'un stress anoxique sur la production virale ont également été étudiés. La caractérisation du virus GTV1 a ensuite été entamée. Il appartient à la famille des *Myoviridae* et a un génome composé d'ADN double brin de 38841 pb, composé de 71 ORF prédits. Enfin, l'étude de la diversité microbienne a permis de décrire une nouvelle espèce bactérienne hautement thermophile, *Calditerricola clavaformis* sp.nov.

---

## **Abstract:**

Viruses thrive in all types of ecosystems where life is found. They represent the most abundant biological entity of our biosphere. Though several studies have been conducted on viral abundance and dynamics in mesophilic aquatic ecosystems, these aspects remain largely unexplored in extremophilic environments, such as hot springs. In this study, prokaryotic and associated viral communities of the French Southern and Antarctic Lands hot springs were explored. First, prokaryotic cells and Virus-like particles (VLP) were enumerated in several terrestrial and inshore hot springs. The results reveal an abundance of  $10^5 - 10^6$  particles/ml in both types of hot springs studied. The virus-to-prokaryote ratios (VPR) were generally low, confirming thus actual knowledge in these types of ecosystems. The morphological diversity of VLP was then studied in raw samples as well as in enrichment cultures containing *Thermococcales* and *Thermotogales*. Several isolates obtained from these samples were then screened for viral particles which led to the discovery and description of a temperate phage (GTV1) of a thermophilic bacterium belonging to the genus *Geobacillus*. The effect of NaCl and anoxic stress on the viral production was studied. The genomic characterization of the GTV1 was started and revealed a 38441 bp genome with 71 predicted ORF. Finally, microbial diversity studies led also to the discovery of a new extremely thermophilic bacterium, *Calditerricola clavaformis* sp.nov.