Découverte et caractérisation des premiers virus de Thermotogales (bactéries thermophiles et anaérobies) issus de sources hydrothermales océaniques profondes

Julien Lossouarn

▶ **To cite this version:**

Julien Lossouarn. Découverte et caractérisation des premiers virus de Thermotogales (bactéries thermophiles et anaérobies) issus de sources hydrothermales océaniques profondes. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2014. Français. NNT : 2014BRES0058 . tel-02103752

HAL Id: tel-02103752
https://theses.hal.science/tel-02103752

Submitted on 18 Apr 2019

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

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

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

Julien Lossouarn

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

Découverte et caractérisation des premiers virus de *Thermotogales* (bactéries thermophiles et anaérobies) issus de sources hydrothermales océaniques profondes

Thèse soutenue le Vendredi 21 mars 2014
devant le jury composé de :

Patrick FORTERRE **RAPPORTEUR**
Professeur, Université Paris-sud 11

Paulo TAVARES **RAPPORTEUR**
Directeur de recherche, Laboratoire de Virologie Moléculaire et Structurale

Tamara BASTA-LE BERRE **EXAMINATRICE**
Maître de conférences, Université Paris-sud 11

Christopher PAYAN **EXAMINATEUR**
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Télesphore SIME-NGANDO **EXAMINATEUR**
Directeur de recherche, Université Blaise Pascal

Mohamed JEBBAR **DIRECTEUR DE THESE**
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Claire GESLIN **CO-DIRECTRICE DE THESE**
Maître de conférences, Université de Bretagne Occidentale

Remerciements

Mes remerciements s'adressent en premier lieu aux membres du jury :

Je tiens à remercier Mr Mohamed Jebbar, directeur de thèse, de m'avoir accueilli au Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, d'avoir été présent et attentif tout au long de l'avancée de ces travaux. Le meeting Thermophiles à Regensburg est un bon souvenir.

Je voudrais ensuite remercier tout particulièrement M^me^ Claire Geslin, co-directrice de thèse et encadrante scientifique. Claire, tu as d'abord grandement contribué, de par tes enseignements à l'Université, à révéler mon intérêt pour la microbiologie et la virologie. J'ai effectué mes premiers pas en laboratoire avec toi et avoir pu poursuivre cette aventure en doctorat fut à la fois un plaisir et un privilège. Ta disponibilité, ton expertise, tes conseils mais aussi ton humour et ta personnalité auront été très précieux durant ces quelques années qui se concluent par la rédaction de ce manuscrit auquel tu as apporté d'indispensables corrections.

Je remercie M^r^ Patrick Forterre et M^r^ Paulo Tavares d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux. Je suis particulièrement sensible à l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger mon travail.

Je remercie M^me^ Tamara Basta-Le Berre, M^r^ Télesphore Sime-Ngando et M^r^ Christopher Payan d'avoir accepté les fonctions d'examinateurs et de contribuer à enrichir la discussion autour de ces travaux.

Mes remerciements vont ensuite vers certaines des personnes avec lesquelles j'ai plus spécifiquement interagi :

J'aimerais chaleureusement remercier Nadège Bienvenu Quintin. Nadège, j'ai eu beaucoup de chance de pouvoir bénéficier de ta force de travail et de tes connaissances, ainsi que de toutes tes anecdotes. Je garderai d'excellents souvenirs de notre travail en binôme. Merci pour tout.

Je remercie Aurore Gorlas pour ces connaissances, son aide, son attention et sa bonne humeur qui auront vraiment été très appréciables. Te revoir et discuter avec toi est toujours un très grand plaisir.

Mes remerciements s'adressent également à Anne-Claire Baudoux. Merci beaucoup Anne-Claire pour ton apport en cytométrie, tes conseils, ta disponibilité et ta gentillesse. Les visites à Roscoff restent pour moi de bons souvenirs.

Merci à Gérard Sinquin et Philippe Elies de la Plateforme d'Imagerie et de Mesures en Microscopie de l'UBO.

J'aimerais remercier Odile Vandenabeele-Trambouze qui restera « ma reine » de l'ATPmétrie.

J'adresse des remerciements appuyés aux deux stagiaires de Master 2, Julien Farasin et Coraline Mercier qui ont terriblement souffert sous ma dure férule. Je ne sais pas si la réciproque est vraie mais interagir avec vous aura été très enrichissant. Merci pour tout le travail accompli ! Je suis particulièrement fier de vous car vous avez toujours été à la hauteur lors des pots au labo, c'est la marque des grands.

Je remercie enfin Samuel Dupont, grand ami que j'ai retrouvé avec plaisir pour quelques mois à l'occasion de son retour en postdoc au laboratoire. La chasse aux virus est un loisir particulièrement prenant, tu verras. Etant en période de rédaction au moment de ton retour, nous n'avons hélas pas pu interagir ensemble au laboratoire, dommage. Notre complicité est néanmoins toujours intacte et promet encore de belles rigolades. Merci pour le travail fastidieux de mise en page que tu as fourni pour rendre ce manuscrit présentable. Je remercie également Charlotte, ta future épouse, pour sa gentillesse et son amitié.

Je vais maintenant remercier le laboratoire en m'attardant un peu plus sur sa composante IUEM :

Je souhaite remercier les enseignants et les chercheurs : Gwenaelle Le Blay et Odile Vandenabeele-Trambouze, précédemment citée, dont les arrivées ont été des « plus ». Je garderai un excellent souvenir de notre périple commun à Clermont-Ferrand, à l'occasion de l'AFEM. Cette dernière remarque vaut bien sûr également pour Karine Alain qui aura toujours été disponible. Merci aussi à Frédérique Duthoit pour sa bonne humeur et sa gentillesse. Je remercie Marc Le Romancer et le terrible Jean-Louis Birrien. Ces remerciements ne seraient pas complets sans saluer Daniel Prieur que j'ai eu la grande chance de connaître.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble des ITA en soulignant l'importance du travail qu'ils accomplissent quotidiennement afin que le laboratoire puisse fonctionner dans les meilleures conditions. Parmi ces derniers : Monsieur Stéphane L'Haridon, grand artificier des repas de Noël et autres festivités avec lequel ce fut un réel plaisir de collaborer ; Morgane Chalopin, une assistante ingénieur tout à fait charmante qui à elle seule justifie ma profonde tristesse de voir cette thèse se terminer (pas mal, hein). Oufae Rouxel toujours sympa et souriante ; Mickael Beauverger, l'âme du Roudourou ; et Nadège Bienvenu Quintin, oui encore elle. A ces quelques personnes viennent s'ajouter Annaick Barbou et « p'tite » Claire Hémon, deux filles super chouettes et Stéphanie Renard, la meilleure secrétaire du monde.

Je remercie aussi la composante Ifremer du laboratoire : Anne Godeffroy, directrice de l'unité, Christine Lamy, Valérie Cueff-Gauchard ainsi qu'Adrien Vigneron pour la qPCR, Didier Flament grand organisateur des journées Archaea et tous les autres dont les docs et post-docs Gaëlle, Sandrine, Aline, Nolwenn, Perrine, Lucile, Tom et Simon.

Je remercie les supers collègues du labo:

Pauline Vannier qui fut une grande complice et à qui je dois un certain surnom. Je peux désormais assurer, grâce à toi, qu'il est très difficile de compter en cellule de Thoma en étant pris de fou rire. Merci d'avoir était là et de rester présente.

Maria Ciobanu ou serait-ce Maria Costache ? A moins que ce ne soit Maria Drucker ? Merci à toi et à ta famille (Vlad et Matthias) pour tous ces bons moments.

Vos départs du labo, Pauline et Maria, combinés à celui d'Aurore m'ont laissé un peu orphelin … Si si c'est vrai.

Heureusement, ai-je bénéficié du soutien d'un admirable collègue finlandais en la personne de Joonas Parikka. J'ai vraiment eu beaucoup de chance de t'avoir comme acolyte ces dernières années avec énormément de souvenirs à la clef. Ton amitié compte beaucoup. Peut-être un seul regret, celui que cette complicité n'ait pu plus s'exprimer en termes de manips. Un jour peut-être mon ami. Il paraît que les viroboys préparent un nouvel album ! J'en profite pour embrasser la toujours pétillante Nina.

Arrive le tour de Grégoire Michoud dont tous les sobriquets les plus extravagants que j'ai pu contribuer à lui trouver n'ont jamais entamé le flegme. Ton humour, ton cynisme, ta grande serviabilité font de toi un personnage attachant. Tu as eu beaucoup de patience pour supporter mes blagues. Je conclurai par ces mots, inspirés de ta longue culture marxiste : Vive le front de gauche !

Frédéric Gaboyer, un stakhanoviste du travail et du sport. Voilà qui nous faisait dès le départ des points communs… J'ai vraiment beaucoup apprécié converser avec toi et partager tant de bon moments avec en points d'orgue, par exemple, le décès de ta voiture sur la voie express ou quelques scènes grandioses à l'occasion de films de thèse. Chacun va désormais suivre sa ligne mais j'espère que les nôtres ne seront jamais trop éloignées.

Matthieu Landreau, ton esprit vif et ton humour m'ont tout de suite beaucoup plu. Bien que je n'ai pas donné suite à ta surprenante candidature de stage et ai souligné ton insolence en M2, tu as quand même décroché une bourse de thèse. Tu t'es très vite intégré dans ce bureau, du reste, en te montrant capable, toi aussi, d'aligner des séquences. J'espère que nous resterons en contact et rassure toi, tu n'es pas trop vieux pour jouer aux billes.

Coraline Mercier, c'est avec beaucoup de plaisir que je te vois arriver en thèse pour poursuivre sur la thématique « virus ». Cette chasse aux virus et/ou vésicules (débris cellulaires ?) est passionnante, tu as beaucoup de compétences et je suis persuadé que tu feras des choses géniales. Je serai toujours là pour boire un verre et rigoler miss.

Cécile Dalmasso, j'ai forcément moins d'anecdotes avec toi qu'avec les autres petits camarades car tu viens d'arriver. Néanmoins c'est un plaisir d'avoir fait ta connaissance et je te souhaite le meilleur pour cette thèse.

Je salue également les postdocs et ATER : Audrey Gramain, Axel Thiel, Yann Moalic et Yann Raineau. Sans oublier les stagiaires, parmi lequels : Méline Bes, Sarah Ben Maamar, Delphine Colombo, Jordan Morizur et François « Mowgli » Brillet.

Je salue et remercie les collègues et amis :

Au LUBEM : Marlène, Roccio, Guillaume et Kévin.

Je fais plein de bisous à l'ensemble de la troupe du LEMAR et assimilés dont les films de thèses sont toujours extraordinaires. Par contre, je ne comprends toujours pas ce que vous trouvez d'excitant à étudier des coquillages. Merci pour tous ces souvenirs à JP toujours là, infaillible dans la déconne et Chloé toujours adorable, l'inénarrable Bichon et la charmante Joana (soit pas jaloux Guévélou), Romain et Aude qui sont tops, Marco et Morgana, Seb et Mélanie les futurs mariés. Après ce n'est peut-être plus des couples, j'ai un doute mais je continue Cédric et Tony, Matthias et Marc, Malwenn et Camille (faut que l'on voit pour le Brésil au fait), Myrina et Adeline, Violette et Nolwenn sans oublier Marie et Marie et les autres.

Céline Le Lay, grande amie et complice depuis pas mal de temps. Toujours là pas très loin, merci. Je te souhaite le meilleur pour la suite et en profite pour saluer amicalement ta collègue Vanessa Rédou.

Youenn Alexandre, mon pote. J'ai vraiment apprécié que l'on soit dans le même bateau (de la thèse) ensemble. Nos séances de décompression furent salutaires. Toujours présent, jamais très loin, ton amitié et ta personnalité comptent beaucoup. Une grande complicité, émaillée de débats toujours intenses. J'en profite pour embrasser et remercier également ta femme Claire-Alice.

Thibaut Le Moan, l'homme de Douarnenez. Même si nous ne nous voyons plus aussi régulièrement qu'à une époque malheureusement, tu restes un super pote que je ne pouvais oublier. J'ai aussi une pensée pour Fabien Salaun et El Amine Mahamoud.

Pierre-Yves Guillerme, l'un de mes plus anciens complices encore en activité. Tant de souvenirs qu'il est impossible d'en sélectionner un au moment d'écrire ces quelques lignes. Tu sais tout le bien que je pense de toi. Il paraît que ça fait plus de quinze ans que nous sévissons tous les deux. J'attends le prochain voyage en Irlande avec impatience. J'en profite pour saluer chaleureusement aussi, ta femme Valérie qui est une amie, ta famille et les deux petis jeunes Thomas et sa charmante cousine Fanny. J'allais oublier Monsieur Vincent Bouguennec, la terreur des bouteilles de Porto, grand ami de plus de quinze ans lui aussi.

Je remercie enfin mes parents pour tout ce qu'ils m'ont apporté et m'apportent toujours ainsi que l'ensemble de ma famille et les amis proches de celle-ci. Mention spéciale à Marc qui souhaitait être cité.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS
TABLE DES MATIERES
TABLE DES ILLUSTRATIONS
LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE 1
LES VIRUS **2**
1. LEUR DECOUVERTE 2
2. LES VIRUS AUJOURD'HUI 4
2.1. DEFINITION ET CONCEPTION CLASSIQUE 4
2.2. DECOUVERTES RECENTES 6
LES VIRUS DE PROCARYOTES **9**
1. HISTORIQUE 9
1.1. DECOUVERTE DES BACTERIOPHAGES 9
1.2. PREMIERES OBSERVATIONS 10
1.3. LE « GROUPE DU PHAGE » 11
1.4. DECOUVERTE DES VIRUS D'ARCHEES 11
2. LEUR CLASSIFICATION 12
3. LES CYCLES VIRAUX 15
4. LES GENOMES DES VIRUS DE PROCARYOTES 16
4.1. LES GENOMES DES BACTERIOVIRUS 16
4.2. LES GENOMES DES ARCHEOVIRUS 20
4.3. LES SYSTEMES CRISPR/Cas 21
4.4. UN ROLE ECOLOGIQUE MAJEUR 23
4.5. L'ABONDANCE VIRALE EN MILIEU MARIN 24
4.6. L'IMPACT VIRAL SUR LA MORTALITE MICROBIENNE 32
4.7. L'IMPLICATION DANS LES CYCLES BIOGEOCHIMIQUES 33
4.8. LA STRUCTURATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES 34
LES VIRUS ASSOCIES AUX BACTERIES ET ARCHEES THERMOPHILES ET HYPERTHERMOPHILES **37**
1. LA NOTION DE THERMOPHILIE 37

2. LES SOURCES CHAUDES TERRESTRES 39
2.1. LOCALISATION ET DESCRIPTION 39
2.2. LES MICRORGANISMES ISOLES 40
2.3. DIVERSITE VIRALE ASSOCIEE AUX SOURCES CHAUDES TERRESTRES 43
3. LES SOURCES HYDROTHERMALES OCÉANIQUES PROFONDES 60
3.1. UNE DECOUVERTE MAJEURE 60
3.2. LOCALISATIONS ET FORMATION 61
3.3. DES OASIS DE VIE 63
3.4. LES MICROORGANISMES CHIMIOSYNTHETIQUES 66
3.5. SEPT SYSTEMES HOTE/VIRUS CARACTERISES 68

PRESENTATION GENERALE DU TRAVAIL DE THESE 73

CHAPITRE I : CRIBLAGE D'ELEMENTS GENETIQUES MOBILES CHEZ LES THERMOTOGALES 76
1. MATERIELS ET METHODES 78
1.1. LES SOUCHES DE THERMOTOGALES CRIBLEES 78
1.2. MISE EN CULTURE DES SOUCHES DE THERMOTOGALES 80
1.3. EXTRACTION D'ADNccc SUR LES SOUCHES DE THERMOTOGALES 81
1.4. ANALYSE DES ADNccc EXTRAITS EN RFLP 82
1.5. INDUCTION DE LA PRODUCTION VIRALE DE CERTAINES SOUCHES PAR ADDITION DE MITOMYCINE C 82
1.6. ANALYSE DE LA PRODUCTION DE VLPs CHEZ LES SOUCHES DE THERMOTOGALES EN MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE 82
1.7. RECHERCHE DE VLPs EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION 83
1.8. EXTRACTION D'ADN TOTAL SUR LES SOUCHES DE THERMOTOGALES 84
1.9. SÉQUENÇAGE DES ADNCCC ET ADN TOTAUX 85
1.10. TRAITEMENT INFORMATIQUE DES SÉQUENCES D'ADN 85
2. RESULTATS & DISCUSSIONS 85
2.1. LES EXTRACTIONS D'ADNccc 85
2.2. LES ANALYSES EN MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE 95
2.3. LES ANALYSES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION 101
2.4. DECOUVERTE DE PROVIRUS AU SEIN DES SOUCHES INFECTEES 104
2.5. LE BILAN DE CE CRIBLAGE 110

CHAPITRE II : CARACTERISATION DE MPV1 111
PRESENTATION GENERALE DU TRAVAIL 112
MENAGE A TROIS': A SELFISH GENETIC ELEMENT USES A VIRUS TO PROPAGATE WITHIN A *THERMOTOGALES* STRAIN 114
SUPPLEMENTARY DATA 137

ETUDE SUPPLEMENTAIRE : MISE EN EVIDENCE PAR ATPMETRIE DU DETOURNEMENT DU METABOLISME D'UN HOTE PAR UN VIRUS 144
1. MATÉRIELS ET MÉTHODES 148
1.1. LES 3 SOUCHES UTILISÉES 148
1.2. MISE EN CULTURE 148
1.3. LES MESURES D'ATPMÉTRIE 148
1.4. LE DÉNOMBREMENT DES CELLULES AU COURS DE LA CROISSANCE 149
1.5. ANALYSE DES CULTURES EN MICROSCOPIE OPTIQUE 150
2. RESULTATS ET DISCUSSIONS 150
2.1. DOSAGES ATPMETRIQUES EFFECTUES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MARINITOGA CAMINI MV1075 150
2.2. DOSAGES ATPMETRIQUES EFFECTUES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MARINITOGA OKINAWENSIS TFS10-5T 152
2.3. DOSAGES ATPMETRIQUES EFFECTUES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MARINITOGA PIEZOPHILA KA3 155

CONCLUSION GENERALE 159
LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES 160
LA VIROSPHERE DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES 161
MIEUX CONNAITRE CETTE VIROSPHERE : POURQUOI AVOIR CIBLE LES THERMOTOGALES ? 164
LA DECOUVERTE DE MPV1 165
LE CONCEPT DE VIROCELL : L'UTILITE DE L'ATPMETRIE POUR DEFINIR UNE SIGNATURE DE « L'ACTIVITE METABOLIQUE VIRALE »? 170
POURSUIVRE L'ETUDE DE LA VIROSPHERE DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES 173

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 174

ANNEXES 194

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Introduction générale

Figure 1: Trois pionniers de la virologie. 2
Figure 2 : L'homme à l'origine du concept de virus 3
Figure 3 : Représentation schématique d'un virus assimilé à son virion 4
Figure 4 : Arbre phylogénétique du vivant 5
Figure 5 : Le virus géant Mimivirus en microscopie électronique à transmission (MET) 7
Figure 6 : Proposition d'un monde du vivant partagé entre virus et organismes cellulaires 8
Figure 7 : Les découvreurs des bactériophages 9
Figure 8 : L'apport de la microscopie électronique 10
Figure 9 : Trois membres du "groupe du phage" 11
Figure 10 : L'une des grandes contributions aux recherches sur les archées et aux virus leur étant associés 12
Figure 11 : 3 Exemples de bactériovirus appartenant à l'ordre des *Caudovirales* en MET 13
Figure 12 : Représentation schématique des différents morphotypes des virus de procaryotes 14
Figure 13 : Organisation schématique de génomes de bactériovirus caudés 19
Figure 14 : Organisation générale d'un locus CRISPR 22
Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'un système CRISPR/Cas 23
Figure 16 : Trois méthodes utilisées afin de dénombrer des VLPs 25
Figure 17 : Biomasse et abondance des procaryotes, virus et protiste dans les océans 26
Figure 18 : Comparaison entre GTAs et particules virales transductrices 28
Figure 19 : Les quatre GTAs isolés en MET 29
Figure 20 : Exemples de vésicules membranaires produites au sein du domaine *Bacteria* et *Archaea* 30
Figure 21 : Les quatre premiers pelagiphages isolés observés en MET 32
Figure 22 : Représentation schématique de l'impact viral sur la pompe biologique 34
Figure 23 : La découverte de la vie à haute température 37
Figure 24 : Deux « chasseurs de thermophiles » échantillonnant dans les solfatares islandais de Kerlingarfjöll 38
Figure 25 : Trois exemples d'environnements chauds terrestres 39
Figure 26 : Tapis microbien composé de cyanobactéries au niveau d'une source chaude 40
Figure 27 : 3 exemples de microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles terrestres observés en MET 42
Figure 28 : Quelques exemples de myovirus thermophiles observés en MET 46
Figure 29 : Les trois siphovirus thermophiles observés en MET 47
Figure 30 : 2 tectivirus thermophiles ont été caractérisés mais plusieurs ont été observés en MET 48

Figure 31 : L'unique inovirus thermophile décrit à ce jour observé en MET.....49
Figure 32 : Quelques membres de la famille des *Fuselloviridae* observés en MET.....51
Figure 33 : L'unique membre de la famille des *Bicaudaviridae* observé en MET.....52
Figure 34 : L'un des représentants de la famille des *Lipothrixviridae* observé en MET 53
Figure 35 : L'un des *Rudiviridae* observé en MET.....54
Figure 36 : Représentation schématique des principales étapes du cycle infectieux de SIRV2 ..55
Figure 37 : Le seul membre des *Guttaviridae* observé en MET 56
Figure 38 : L'un des deux membres de la famille des *Globuloviridae* observé en MET.....57
Figure 39 : Le représentant de la famille des *Ampullaviridae* observé en MET.....58
Figure 40 : Le seul et unique membre des *Clavaviridae*.....59
Figure 41 : Le représentant des *Spiraviridae* observé en MET 60
Figure 42 : L'existence d'un riche écosystème hydrothermal à plus de 2600 m de profondeur .61
Figure 43 : L'exploration des sources hydrothermales océaniques profondes 62
Figure 44 : Représentation schématique d'une source hydrothermale océanique profonde 63
Figure 45 : Trois représentants de la macrofaune hydrothermale.....64
Figure 46 : Représentation schématique de la faune luxuriante à proximité d'une cheminée hydrothermale.....65
Figure 47 : Quatre exemples de microorganismes hydrothermaux marins profonds observés en MET 68
Figure 48 : Quatre des cinq bactériovirus thermophiles marins profonds observés en MET 70
Figure 49 : Les deux seuls virus hyperthermophiles marins (profonds) décrits à ce jour observés en MET.....72

Chapitre 1

Figure 1 : Quatre exemples d'ADNccc extraits à partir des souches de *Thermotogales* criblées 86
Figure 2 : Résultats, sur gel d'agarose 0,8%, des analyses en RFLP obtenues pour 19 des 21 ADNccc extraits en lyse alcaline à partir des différentes souches de *Thermotogales* criblées....87
Figure 3 : Les produits des restrictions obtenus sur gel d'agarose à l'issue des analyses en RFLP des ADNccc des souches de référence *Marinitoga piezophila* et *Marinitoga okinawensis* 89
Figure 4 : Carte de l'ADNccc découvert chez la souche de référence *Marinitoga okinawensis* .91
Figure 5 : Quelques résultats des analyses des surnageants de cultures de *Thermotogales* observés en microscopie à épifluorescence.....97
Figure 6 : Effet inducteur de la mytomicine C sur la production virale chez *Marinitoga piezophila* 99
Figure 7 : Surnageant de la culture MV1070 observé en MET 102
Figure 8 : Les 7 premiers bactériovirus associés à l'ordre des *Thermotogales* observés en MET 103
Figure 9 : Comparaison des provirus putatifs découverts au sein des souches *Marinitoga piezophila* KA3, *Thermosipho africanus* H17ap60334 et *Thermosipho melanesiensis* BI429. .105
Figure 10 : Comparaison des provirus putatifs découverts au sein des souches *Marinitoga camini* DV1155, *Marinitoga piezophila* KA3 et Marinitoga *camini* DV1197. 108

Figure 11 : La répartition biogéographique des particules virales de type *Siphoviridae* découvertes chez les *Thermotogales*.. 109

Etude supplémentaire

Figure 1 : Concentration en ATP total par millilitre de culture de la souche *Marinitoga Camini* MV1075, qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance 151
Figure 2 : La souche *Marinitoga camini* MV1075 observée en microscopie optique 152
Figure 3 : Concentration en ATP total par millilitre de culture de la souche *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^{T}, qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance. 154
Figure 4 : La souche *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^{T} observée en microscopie optique 154
Figure 5 : Concentration en ATP total par millilitre de culture de la souche *Marinitoga piezophila* KA3, qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance 156
Figure 6 : Illustration de la lyse virale chez *Marinitoga piezophila* 157

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1

Tableau 1 : Liste des 55 souches de *Thermotogales* passées au crible.....79
Tableau 2 : Les 21 souches répertoriées comme porteuses d'un ADNccc 86
Tableau 3 : Résultats des restrictions enzymatiques réalisées sur les ADNccc découverts respectivement chez les souches de référence *Marinotoga piezophila* et *Marinitoga okinawensis* 89
Tableau 4 : Analyse préliminaire des 23 ORFs prédits sur RAST qui composent l'ADNccc découvert chez la souche de référence *Marinitoga okinawensis* 92
Tableau 5 : Bilan des analyses menées en microscopie à épifluorescence sur les surnageants de cultures de *Thermotogales* pré sélectionnées car porteuses d'un ADNccc.. 96
Tableau 6 : Bilan des analyses menées en microscopie en épifluorescence sur les surnageants de cultures de 15 souches du genre *Marinitoga* suivant qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance.....100
Tableau 7 : Bilan des principaux résultats obtenus à l'issue du criblage consacré à la recherche de virus et plasmides chez 55 souches de *Thermotogales*.....110

Etude supplementaire

Tableau 1 : Résultats des dosages d'ATP au cours de la croissance *de la souche Marinitoga camini* MV1075.....151
Tableau 2 : Résultats des dosages d'ATP au cours de la croissance de la souche *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^{T}.....153
Tableau 3 : Résultats des dosages d'ATP au cours de la croissance de la souche *Marinitoga piezophila* KA3 155

Conclusion générale

Tableau 1 : Caractéristiques des archéovirus et des bactériovirus issus des sources hydrothermales océaniques profondes 162
Tableau 2 : Caractéristiques communes partagées par les pirates moléculaires caractérisés chez *S. solfataricus, E. coli, S. aureus* et le pirate supposé décrit chez *M.piezophila*.....168

INTRODUCTION GENERALE

LES VIRUS

LES VIRUS DE PROCARYOTES

LES VIRUS ASSOCIES AUX BACTERIES ET ARCHEES THERMOPHILES ET HYPERTHERMOPHILES

LES VIRUS

1. LEUR DECOUVERTE

La première mention du mot virus, du latin poison, est attribuée au poète antique Virgile. Il désignait ainsi « un liquide sanieux et purulent » (« *distillat ab inguine virus* » - Les Géorgiques, I.III, V.281). Le sens de ce mot a par la suite progressivement évolué au gré des avancées scientifiques (Chiron, 1998).

Le concept de virus dans son acception moderne émergea à la fin du dix-neuvième siècle. Les scientifiques Adolph Mayer, Dmitrii Iwanowski et Martinus Beijerinck recherchaient alors l'agent responsable de la maladie de la mosaïque du tabac. Leurs travaux contribuèrent, de manière inégale mais complémentaire, à la mise en évidence d'un nouvel agent infectieux, ultra filtrable et transmissible à des plants de tabac sains. L'agent, invisible au microscope, fut dénommé « *Contagium vivum fluidum* » par Beijerinck. (Zaitlin, 1998). Le virus de la mosaïque du tabac ou TMV venait en réalité d'être identifié et cette découverte en 1892 ou 1898, suivant qu'elle soit attribuée à Iwanowski ou plus volontiers à Beijerinck, marqua la naissance de la virologie (Zaitlin, 1998).

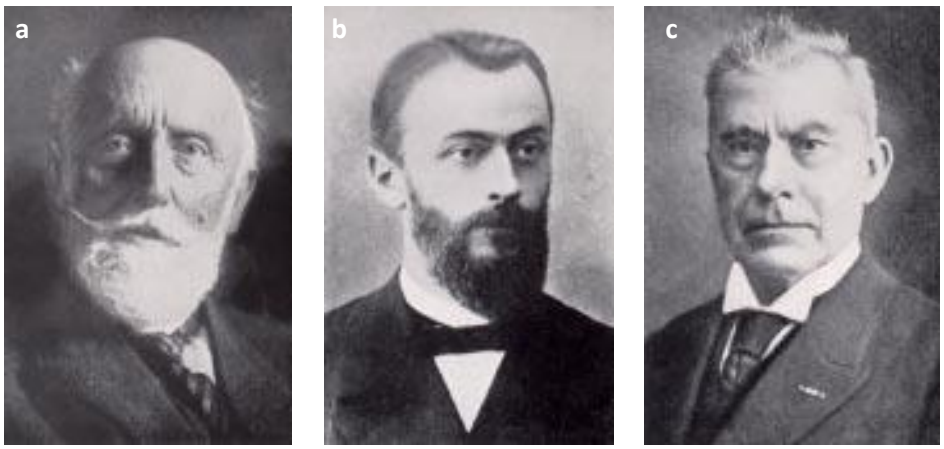


Figure 1: Trois pionniers de la virologie.
a : Adolph Mayer (1843-1942). b : Dmitrii Iwanowski (1864-1920). c : Martinus Beijerinck (1851-1931) (D'après Zaitlin, 1998)

La formulation de Beijerinck de « fluide vivant contagieux » restait cependant encore vague et bien qu'au même moment Friedrich Loeffler et Paul Frosch démontraient conjointement l'origine virale de la fièvre aphteuse affectant le bétail, le concept de virus eut beaucoup de peine à s'imposer (Chiron, 1998). La communauté scientifique concevait en effet très difficilement, à l'époque où la bactériologie triomphait, qu'il puisse exister des agents infectieux submicroscopiques. Seuls les progrès réalisés entre les années 1930 et les années 1950 notamment en biochimie, en cristallographie et en microscopie électronique permirent de certifier de l'existence des virus et de faire admettre que ces derniers constituaient des agents infectieux.

Une soixantaine d'années s'écoula ainsi entre la découverte des premiers virus et la définition proposée par André Lwoff (Chiron, 1998). « Les virus sont infectieux et potentiellement pathogènes ; ce sont des entités nucléo-protéiques (inférieures à 200 nm) possédant un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) ; ils sont reproduits (par la cellule qu'ils parasitent) à partir de leurs matériels génétiques ; ils sont incapables de croître et de se diviser ; ils sont dépourvus du système de Lipmann » (Lwoff, 1957).

Figure 2 : L'homme à l'origine du concept de virus
André Lwoff (1902-1994)
Crédit : Nobelprize.org

2. LES VIRUS AUJOURD'HUI

2.1. DEFINITION ET CONCEPTION CLASSIQUE

Les virus sont aujourd'hui définis comme des parasites intracellulaires détournant la machinerie d'un hôte afin de se multiplier. Entre leurs cycles de reproduction, les virus ont une phase d'existence extracellulaire sous la forme de particules virales ou virions qui leurs permet de se transmettre d'un hôte à un autre, (Poranen *et al*., 2002). La majorité des biologistes s'accordent à définir les virus, uniquement par leurs virions, comme des entités biologiques composées d'acides nucléiques (ADN ou ARN) protégées par une coque protéique appelée capside qui, selon les cas, peut être surmontée par une enveloppe de nature lipidique (Weinbauer *et al*., 2004).

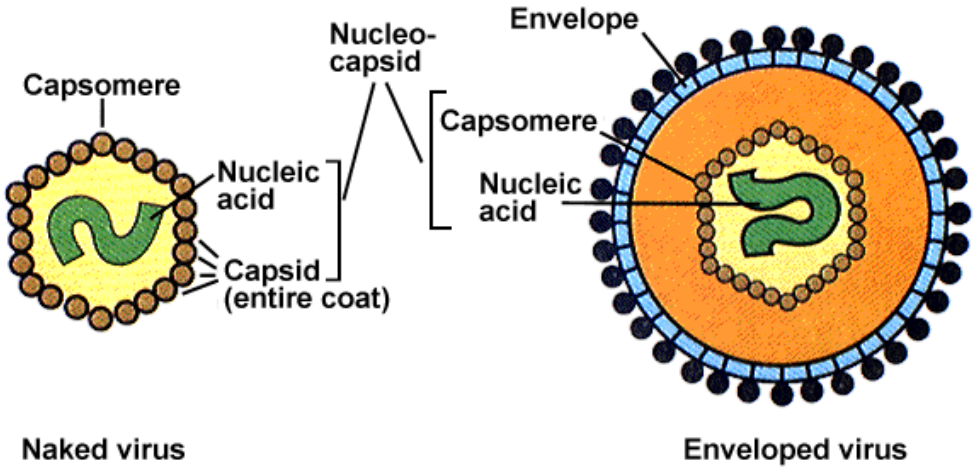


Figure 3 : Représentation schématique d'un virus assimilé à son virion
(D'après Brock, Madigan & Martinko, 2007)

Le caractère parasitaire des virus s'explique notamment par le fait que ces derniers ne possèdent pas le bagage génétique nécessaire à la constitution des ribosomes impliqués dans les mécanismes traductionnels. Ceci empêche, de fait, qu'ils puissent être intégrés au sein de l'arbre universel du vivant proposé par Carl Woese regroupant tous les organismes cellulaires en fonction de critères ribosomiques (Woese *et al*., 1990). En plus d'être dépourvus des gènes

impliqués dans la synthèse protéique, les virus ne possèdent généralement pas non plus de gènes dévolus à la synthèse d'énergie ou au métabolisme du carbone.

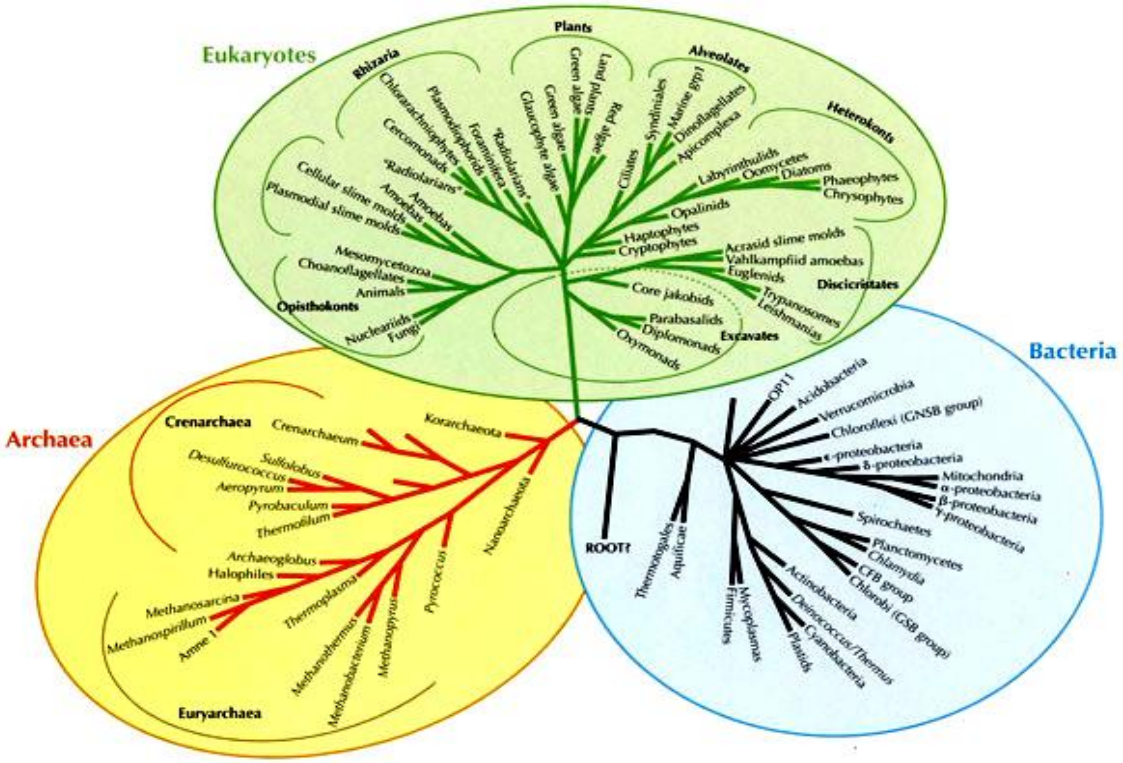


Figure 4 : Arbre phylogénétique du vivant
(D'après Barton *et al.*, 2007)

La nature acellulaire des particules virales et l'hypothèse selon laquelle les génomes viraux correspondraient à des fragments de chromosomes cellulaires devenus autonomes et infectieux à la suite de leur association avec des gènes de capsides, alliés au caractère parasitaire des virus, conduisent nombre de scientifiques à ne pas considérer ces derniers comme des organismes vivants. (Moreira & Lopez-Garcia, 2009)

Ce paradigme quant à l'origine et la nature des virus, vieux de cinquante ans, est toujours celui de très nombreux scientifiques. Il a néanmoins, récemment, été remis en question à la suite de différentes découvertes qui ont contribué à faire considérablement évoluer le regard que portait la communauté scientifique sur les virus (Koonin *et al.*, 2006 ; Claverie & Ogata, 2009 ; Forterre, 2010)

2.2. DECOUVERTES RECENTES

Les virus ne sont plus aussi simplement, comme cela a pu être le cas par le passé, considérés comme des sous-produits de l'évolution. Force est aujourd'hui de constater qu'ils font, bien au contraire, partie intégrante de la biosphère :

- Le nombre de virions se révèle être au moins dix fois supérieur à celui des cellules hôtes dans la nature, ce faisant, ils constituent les entités biologiques les plus abondantes de notre planète. (Poranen *et al*., 2002 ; Suttle, 2007)
- Les virus sont répandus dans l'ensemble de la biosphère et s'étendent à tous les environnements permettant le développement de la vie cellulaire, même les plus extrêmes de la planète (Weinbauer *et al*., 2004).
- Les trois domaines du vivant sont exposés à des infections virales : les cellules eucaryotes, bactériennes et archéennes sont toutes les trois susceptibles d'être infectées. (Poranen *et al*., 2002). Il a ainsi été proposé de distinguer les virus en fonction du domaine qu'ils ciblent par l'utilisation des termes eucariovirus, bactériovirus, et archéovirus (Forterre & Prangishvili, 2009).
- L'analyse de nombreux génomes a révélé, par ailleurs, l'existence d'une importante classe de gènes, dans la biosphère, auxquels on ne peut attribuer aucune fonction par absence d'homologie mais qui aurait une origine virale.
- De nombreuses études démontrent que les virus ont co-évolué avec leurs hôtes cellulaires ; le rôle que ces derniers ont joué dans l'évolution des organismes cellulaires et dans l'apparition de la vie sur Terre se révélerait en fait beaucoup plus important que celui qui leur a longtemps été accordé. (Forterre & Prangishvili, 2009 ; Koonin *et al.*,2006 ; Poranen *et al*., 2002)

Une autre évolution majeure dans la conception des virus tient en la découverte récente de virus géants. Historiquement, les virus étaient perçus comme des agents infectieux ultra filtrables passant aux travers des pores de 0,22 µm (Raoult & Forterre, 2008). En 2003, la découverte de Mimivirus infectant l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* a modifié considérablement la donne. Pour la première fois, un virus était visible en microscopie optique. Le diamètre de la particule virale icosahédrique de 0,8 µm et son génome de 1,18 Mb rapprochent en fait bien plus Mimivirus de certaines petites bactéries, appartenant aux genres *Mycoplasma* par exemple, que de tous les virus précédemment décrits. Mimivirus s'est révélé être un nouveau membre de la

superfamille des NCLDVs (Nucleo Cytoplasmic Large DNA Virus) qui comptait déjà les plus gros virus existant alors (La Scola *et al*., 2003 ; Raoult *et al*., 2007).

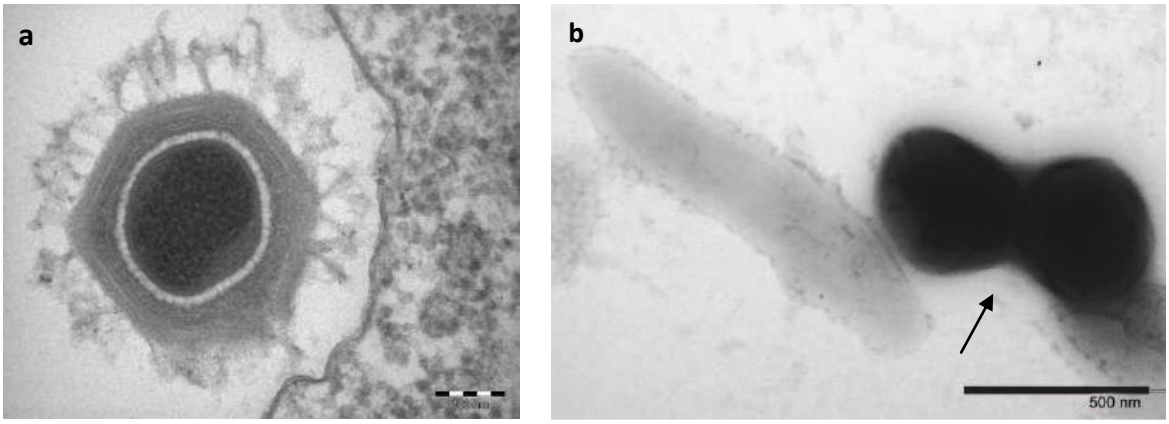


Figure 5 : Le virus géant Mimivirus en microscopie électronique à transmission (MET)
a : Mimivirus dans une vésicule de phagocytose, trente minutes après son inoculation
b : Mimivirus est à droite avec en élément de comparaison la bactérie *Tropheryma whipplei* à gauche
(D'après Raoult *et al.,* 2007)

D'autres virus géants ou girus ont depuis été caractérisés : CroV infectant le protiste *Cafeteria roenbergensis* (Colson *et al*., 2011) ; Mamavirus, Marseillevirus et Megavirus chilensis, infectant des amibes du genre *Acanthamoeba*, sont regroupés avec Mimivirus au sein de la famille des *Megaviridae* (Boyer *et al*., 2009 ; La Scola *et al*., 2008).
Certains de ces virus sont eux-mêmes infectés par d'autres virus appelés virophages comme Sputnik ou Mavirus dont le caractère simplement satellitaire est débattu (Fischer, 2011 ; Krupovic & Cvirkaite-Krupovic, 2011).
Pandoravirus salinus et *Pandoravirus dulcis* sont enfin parmi les derniers virus géants à avoir été découverts. Ils infectent également une amibe du genre *Acanthamoeba* mais n'ont aucune similarité morphologique ou génomique avec les *Megaviridae* ou avec toute autre famille virale ; leurs particules virales ovoïdes d'un micron contenant respectivement des génomes de 1,9 et 2,5 Mb battent, à ce jour, tous les records (Philippe *et al*., 2013).

L'ensemble de ces découvertes, amenant à prendre davantage les virus en considération, ont été favorables à l'émergence de nouveaux concepts, quant à la nature et l'origine des virus. Ils tendent à faire évoluer le statut de ces derniers et à leur accorder une place dans le monde du vivant dont ils sont traditionnellement exclus (Forterre, 2010). Différentes classifications du vivant très controversées, intégrant les virus, ont également été proposées.

Une première proposition consiste en l'existence d'un quatrième domaine du vivant en plus des trois domaines cellulaires *Eukarya, Bacteria* et *Archaea* : le domaine *Akamara* ; celui-ci regroupe les agents infectieux acellulaires possédant des génomes composés d'acides nucléiques**.** (Hurst, 2000). Une seconde proposition vise à définir cellules et virus par leur trait caractéristique respectif, à savoir la capacité à coder pour des ribosomes et la capacité à coder pour des capsides. Le monde du vivant est ainsi partagé entre les REOs (Ribosome-encoding organisms) et les CEOs (Capsid-encoding organisms). Les REOs expriment des ribosomes et se répartissent au sein de trois domaines cellulaires : *Eukarya*, *Bacteria* et *Archaea*. Les CEOs, correspondant aux virus, expriment des capsides qui permettent la production de virions infectant les REOs et utilisent ces derniers pour la synthèse de leurs protéines et de l'énergie nécessaire à leur cycle de vie (Raoult & Forterre, 2008).

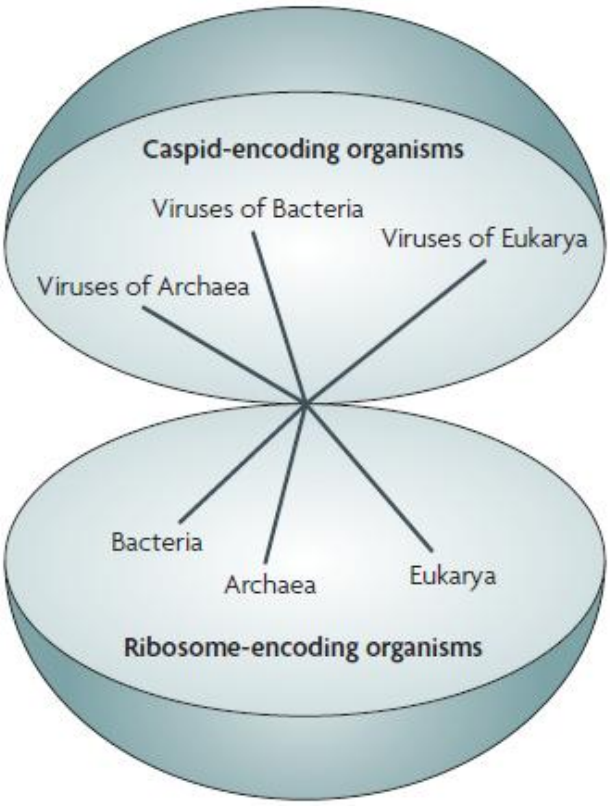


Figure 6 : Proposition d'un monde du vivant partagé entre virus et organismes cellulaires
Les cellules archéennes, eucaryotes et bactériennes sont des REOs (ribosome encoding organisms) ou organismes codant pour des ribosomes ; les virus qui les infectent sont des CEOs (capsid encoding organisms) ou organismes codant pour des capsides
(D'après Raoult et Forterre, 2008)

LES VIRUS DE PROCARYOTES

1. HISTORIQUE

1.1. DECOUVERTE DES BACTERIOPHAGES

Les premiers virus de procaryotes ont été découverts au début du vingtième siècle. La paternité quant à leur découverte reste, et cela depuis son origine ou presque, disputée entre Frederick Twort et Félix d'Hérelle (Prangishvili, 2007).

Twort, en 1915, décrit un agent infectieux et ultra filtrable responsable de la lyse de bactéries du genre *Micrococcus* (Twort, 1915). Il ne précisa toutefois pas la nature de cet agent qui demeura incertaine. Il ne put, sans l'exclure, affirmer être en présence d'un virus et formula d'autres hypothèses, parmi lesquelles, l'implication d'une minuscule amibe ou celle d'une enzyme bactérienne autolytique pour expliquer le phénomène qu'il observait (Duckworth, 1976). D'Hérelle, en 1917, démontra l'existence d'un agent infectieux, ultra filtrable et transmissible, à l'origine de la lyse de la bactérie *Shigella dysenteriae* (D'Hérelle, 1917). Il fit preuve d'une étonnante compréhension quant à la nature de l'agent dont il réalisa la description. Il évoquait « un germe vivant antagoniste de la bactérie et parasite obligatoire de celle-ci pour croître». Aux yeux de d'Hérelle, cet agent était capable de dévorer les bacilles dysentériques. Il lui attribua donc le nom de bactériophage, formé à partir des termes « *bacterium* » et « *phagein* » signifiant manger en grec (Duckworth, 1976 ; Prangishvili, 2007).

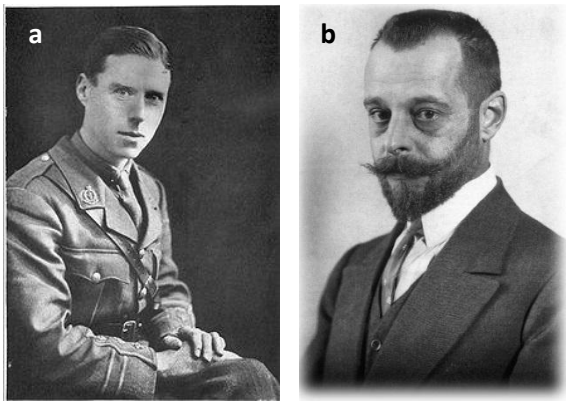


Figure 7 : Les découvreurs des bactériophages
a : Frederick W Twort (1877-1950). b : Félix d'Hérelle (1873-1949)
(D'après Fildes, 1951 et Stent, 2000)

Des deux scientifiques auxquels est créditée cette découverte des bactériophages, d'Hérelle est assurément celui qui a initié et promu leur étude en y consacrant passionnément le reste de sa carrière scientifique. Il fut à l'origine de plusieurs thématiques de recherches impliquant les bactériophages notamment la phagothérapie (Prangishvili, 2007).

1.2. PREMIERES OBSERVATIONS

Le développement de la microscopie électronique, amorcé dans les années 1930, permit à Helmut Ruska d'une part et Edgar Pfankuch et Gustav Kausche d'autre part d'effectuer les premières observations de bactériophages en 1940 (Ruska, 1940 ; Pfankuch & Kausche, 1940). L'obtention de ces premiers micrographes démontra la nature très particulière des bactériophages qui restait jusqu'alors débattue. En 1942, alors que Salvador Luria et Thomas Anderson publiaient d'autres photographies de bactériophages (Luria & Anderson, 1942), Helmut Ruska souligna leur morphologie complexe en observant, à partir de lysats d'*Echerischia coli* et de bactéries appartenant aux genres *Shigella* et *Proteus*, des bactériophages « en forme de club de golf » avec une tête et une queue (Ruska, 1942) ; il introduisit également la même année l'emploi du mot phage, simplification de celui de bactériophage, qui fut longtemps communément utilisé pour désigner les virus de procaryotes (Ackermann, 2003, 2011).

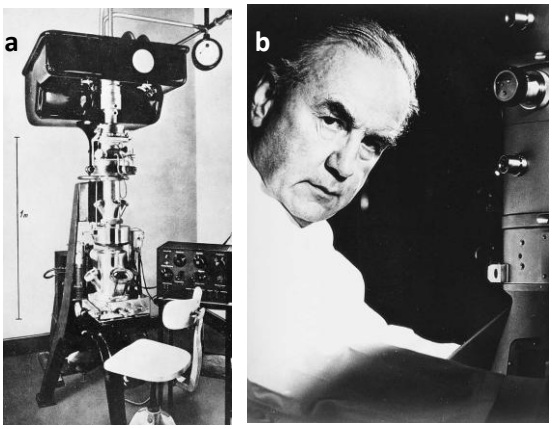


Figure 8 : L'apport de la microscopie électronique

a : Le premier microscope électronique conçu en 1938 par les ingénieurs Ernst Ruska (1906 - 1988) et Bodo von Borries (1905 - 1956) de la compagnie Siemens et Halske. b : Helmut Ruska (1908 - 1973) qui contribua, en étroite collaboration avec les deux ingénieurs, son frère et son beau-frère, au développement de la microscopie électronique en virologie (D'après Kruger *et al.*, 2000)

1.3. LE « GROUPE DU PHAGE »

Entre les années 1940 et 1960, les phages servirent de système modèle à un groupe de scientifiques appelé le « groupe du phage » qui réunissait des microbiologistes, des physiciens et des chimistes. Fondé par Max Delbrück et animé par lui ainsi que Salvador Luria et Alfred Hershey, le « groupe du phage » entreprit d'appréhender, grâce aux bactériophages, les principes moléculaires de la vie. Les travaux des membres de ce groupe furent divers et évoluèrent dans le temps. En 1952, l'expérience d'Alfred Hershey et de Martha Chase avec le phage T2 amena notamment la communauté scientifique à s'accorder sur le fait que l'ADN était bel et bien le support de l'hérédité ; elle confirma ainsi les conclusions d'Oswald, MacLeod et MacCarty huit ans auparavant (Morange, 1994 ; Ronsin, 2005 ; Weinbaueur, 2004).

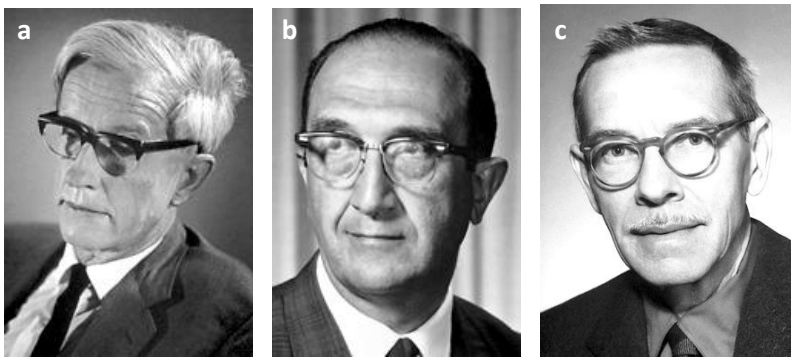


Figure 9 : Trois membres du "groupe du phage"
a : Max Delbrück (1906-1981). b : Salvador Luria (1912-1991). c : Alfred Hershey (1908-1997).
(Crédit : Nobelprize. Org)

1.4. DECOUVERTE DES VIRUS D'ARCHEES

Au début des années 1970, Carl Woese proposa d'utiliser la molécule d'ARN de la petite sous unité du ribosome (16S pour les procaryotes et 18S pour les eucaryotes) comme marqueur moléculaire pour construire un arbre phylogénétique du vivant (Pechman & Woese, 1972). Ceci l'amena, lui est son équipe, à distinguer, à partir de 1977, certains groupes de procaryotes distincts des autres bactéries. Ces groupes, à savoir les méthanogènes, les halophiles extrêmes et les thermoacidophiles, contribuèrent à l'apparition d'un troisième domaine du vivant : le

domaine *Archaea* et, conséquemment, à la subdivision du domaine procaryote en deux domaines distincts : *Archaea* et *Bacteria*. (Woese *et al*., 1990).

Le premier virus d'archée avait en réalité été découvert un peu avant l'apparition même du concept ; il s'agissait d'une particule virale, décrite en 1974 par Torvisk et Dundas, associée à un micro-organisme halophile (Torvisk & Dundas, 1974). D'autres systèmes hôtes/virus issus d'environnements qualifiés d'extrêmes furent, par la suite, découverts chez les *Archaea* ; SSVI, premier virus d'archée hyperthermophile, caractérisé en 1984 par l'équipe de Wolfram Zillig, est un exemple (Martin *et al*., 1984). A l'image de SSV1, les virus d'archées se sont révélés dans un certain nombre de cas très différents des bactériophages tant sur le plan génomique que morphologique contribuant au fait que les microbiologistes aient progressivement restreint l'usage du mot phage aux seuls virus infectant les bactéries. Afin d'opérer cette distinction, les termes d'archéovirus et de bactériovirus ont donc été proposés pour désigner respectivement les virus associés au domaine archéen et ceux associés au domaine bactérien (Prangishvili & Forterre, 2009).

Figure 10 : L'une des grandes contributions aux recherches sur les archées et aux virus leur étant associés
Wolfram Zillig (1925-2005)
(D'après Pfeifer, 2005)

2. LEUR CLASSIFICATION

Actuellement, le comité international de taxonomie des virus ou ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) effectue régulièrement une remise à jour de la classification des virus. Cette classification intègre 5 critères principaux qui sont la nature de

l'acide nucléique (ADN ou ARN) constituant le génome viral, le nombre de brins dont ce dernier est constitué, la présence ou non d'une enveloppe autour de la capside virale, la symétrie de celle-ci et la taille du virus.

En 2012, 6196 virus de bactéries et 88 virus associés à des archées ont été décrits morphologiquement et répartis respectivement au sein de 10 et 15 familles virales différentes.

La grande majorité d'entre eux (96,3 %) présente une morphologie binaire, dite tête queue et appartient à l'ordre des *Caudovirales*. 3 familles de virus y sont assignées : les *Myoviridae* (25 %), les *Siphoviridae* (61 %) et les *Podoviridae* (14 %). Ils se caractérisent par une capside icosaédrique qui renferme leur génome composé d'ADN double brin linéaire et par une queue permanente contractile ou non (Ackermann. 2003, 2007).

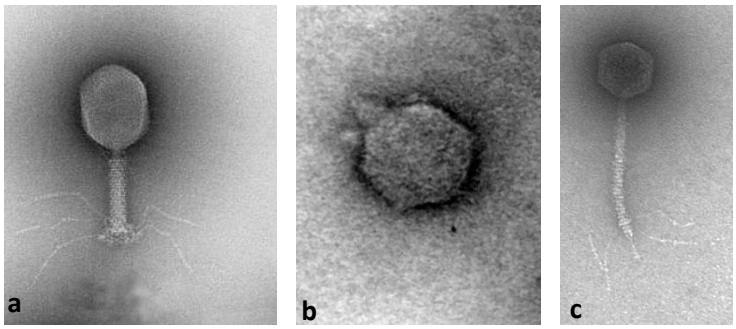


Figure 11 : 3 exemples de bactériovirus appartenant à l'ordre des *Caudovirales* en MET
a : Le virus T4 de la famille des *Myoviridae.* b : Le virus T7 de la famille des *Podoviridae*.
c : Le virus lambda de la famille des *Siphoviridae*.
Crédit : ICTV

Une minorité se caractérise par une morphologie cubique (capside icosaédrique avec absence de queue 2 %), une morphologie hélicoïdale (filament ou bâtonnet 1,7%) ou est qualifiée de virus pléiomorphes (morphologies atypiques 0,3 %, très bien représentées chez les archéovirus). Les génomes de ces virus cubiques, hélicoïdales et pléiomorphes sont majoritairement composés d'ADN double brin linéaire ou circulaire, très rarement d'ADN simple brin linéaire, d'ARN simple brin linéaire polarisé ou d'ARN double brin linéaire segmenté (Ackermann. 2003, 2007).

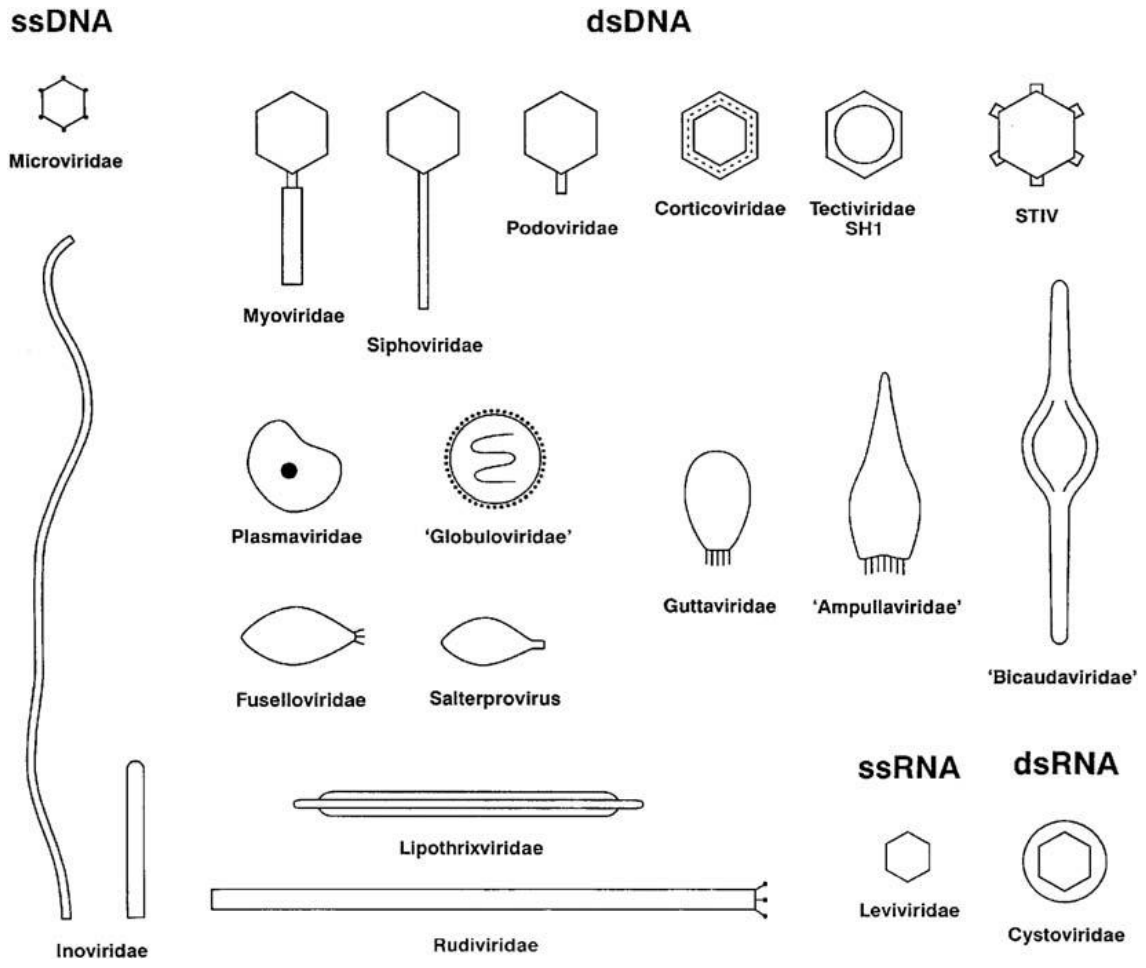


Figure 12 : Représentation schématique des différents morphotypes des virus de procaryotes
(D'après Ackermann, 2009)

3. LES CYCLES VIRAUX

Différents types de relation à l'hôte vont pouvoir se distinguer (Weinbauer, 2004) :

- au cours d'un cycle lytique, les virus virulents, ayant infecté une cellule hôte, réorientent le métabolisme de la cellule hôte vers la production de nouveaux virions. Ces derniers sont libérés lors de la lyse provoquée de la cellule hôte.
- au cours d'un cycle lysogénique, les virus tempérés se maintiennent dans la cellule hôte sous forme de génome. Le génome est intégré au chromosome de la cellule hôte en des sites spécifiques ou plus rarement libre sous une forme linéaire ou circulaire. Il se réplique en même temps que le génome de la cellule hôte et cette relation stable peut durer longtemps jusqu'à ce qu'un stress ne conduise le virus à déclencher un cycle lytique.
- enfin, certains virus établissent avec leurs hôtes une relation du type état porteur ou infection chronique caractérisée par un équilibre entre les multiplications cellulaires et virales et qui se distingue du cycle lysogénique par le fait que la production virale ne puisse être induite.

Des étapes sont communes quelque soit le cycle considéré (Weinbauer, 2004) :

- l'adsorption durant laquelle des structures de la particule virale se lient de manière irréversible à des récepteurs membranaires de la cellule hôte. Dans le cas des *Caudovirus*, ce sont les fibres caudales qui vont assurer de telles liaisons.
- l'injection du génome viral dans la cellule hôte au travers d'une membrane rendue perméable par des enzymes capsidiales ou caudales, la capside virale demeurant à l'extérieur de la cellule hôte.
- l'assemblage de nouvelles particules virales : le génome viral est alors libre dans le cytoplasme, ses gènes sont exprimés, le génome est abondamment répliqué et les copies obtenues sont empaquetées au sein de capsides nouvellement formées.
- la libération des particules virales matures dans le milieu extracellulaire. Celle-ci s'accompagne souvent de la lyse de la cellule hôte, sous l'action combinée de deux types d'enzymes virales : les holines et les endolysines. Les premières créent des pores dans la membrane cellulaire et permettent l'action des secondes qui dégradent le peptidoglycane.

La lyse n'est cependant pas le mode unique de sortie des particules virales, certaines sont libérées par extrusion ou bourgeonnement au travers de la membrane cellulaire.

- l'adsorption potentielle à un nouvel hôte cellulaire.

4. LES GENOMES DES VIRUS DE PROCARYOTES

4.1. LES GENOMES DES BACTERIOVIRUS

Les génomes de bactériovirus constituèrent les premiers génomes complets séquencés. Cette primeur s'explique peut-être par la simplicité d'isolement des bactériovirus et la taille relativement petite de leurs génomes (Hatfull, 2008). A la fin des années 1970, les tous premiers génomes séquencés furent ainsi ceux du bactériovirus MS2, virus à ARN de 3569 nucléotides (Fiers *et al*., 1976) et du bactériovirus φX174, virus à ADN simple brin de 5386 nucléotides (Sanger *et al*., 1977) qui infectent tous deux E. coli. Quelques années plus tard fut obtenu le génome de 48502 pb du bactériovirus lambda qui constitua le premier génome viral à ADN double brin séquencé (Sanger *et al*., 1982).

Les tailles des génomes séquencés, comprises entre moins de 2,5 kb et plus de 300 kb, s'avèrent extrêmement variables. Chez les bactériovirus, les génomes sont répartis selon trois gammes de tailles : les génomes entre 30 et 50 kb sont les plus abondants (environ 50 % des génomes séquencés), viennent ensuite les génomes inférieurs à 10 kb (environ 20 % des génomes séquencés) et enfin les génomes de 100 à 200 kb (environ 6 % des génomes séquencés). Il est cependant à noter que cette répartition est sans doute artificielle et reflète davantage les méthodes permettant d'isoler les bactériovirus et les techniques de séquençage disponibles que la véritable distribution des tailles des génomes viraux dans l'environnement (Hatfull, 2008).

Bien que l'échantillon de génomes disponibles ne soit que très peu représentatif de la diversité réelle des bactériovirus, la diversité des génomes séquencés se révèle déjà tout à fait remarquable. Les génomes des bactériovirus, dont les gammes d'hôtes ne se chevauchent pas, ne partagent que rarement des similarités de séquences et il est présumé que ces derniers soient au moins transitoirement isolés génétiquement les uns des autres. En contrepartie, les génomes de

ceux, dont les gammes d'hôtes se chevauchent, partagent plus fréquemment des similarités de séquences mais ceci n'est toutefois pas obligatoire (Hatfull, 2008).

Les virus caudés, très prédominants chez les bactériovirus, forment en fait un super groupe très divergent. Des séquences nucléotidiques et protéiques homologues ne présentent souvent pas de similarités reconnaissables entre elles.

Ainsi, par exemple, les séquences relatives à la MCP (Major Capsid Protein) ou protéine majoritaire de capside ne présentent chez les plus éloignés des virus caudés, pourtant affiliés, que 10 à 20 % d'identité (Krupovic *et al*., 2011). Il est en revanche apparent que les MCPs, pour lesquelles des données structurales sont disponibles, partagent la même topologie basique (Baker *et al*., 2005). Cette divergence entre séquences homologues s'explique principalement par le phénomène de dérive génétique et l'accumulation de points de mutation (Krupovic *et al*., 2011). Tous les gènes viraux ne sont cependant pas uniformément soumis à l'accumulation de mutations ponctuelles. La grande sous-unité de la terminase, impliquée dans le clivage du concatémère d'ADN viral en unités génomiques et dans l'encapsidation de ces dernières, est peut-être le meilleur exemple de protéine virale conservée. Cette dernière est retrouvée chez les bactériovirus caudés, les archéovirus caudés ainsi que chez les herpesvirus et sa nature enzymatique requière la présence de plusieurs motifs très conservés qui ne tolèrent pas la moindre substitution (Rao & Feiss, 2008 ; Krupovic *et al*., 2011).

Les gènes des bactériovirus caudés sont par ailleurs organisés en modules fonctionnels. L'ensemble des gènes codant pour des protéines impliquées dans un même processus est regroupé au sein d'un même module et régulé par un promoteur commun (Krupovic *et al*., 2011). Différents modules dévolus à la recombinaison, la régulation de la transcription, l'établissement de la lysogénie, la réplication du génome viral, son encapsidation et la morphogénèse du virion peuvent ainsi être distingués (Brüssow & Desiere, 2001). L'ordre des gènes est très souvent conservé à l'intérieur des modules fonctionnels bien que la position de chacun de ces derniers puisse différer en fonction des groupes viraux considérés (Hendrix, 2002).

Il est également établi que de nombreux bactériovirus caudés présentent des génomes organisés en mosaïque. Ce mosaïcisme, constaté chez différents groupes de virus caudés (Juhala *et al.*, 2000 ; Proux *et al.*, 2002 ; Pedulla *et al.*, 2003), se traduit comme une similarité de séquence inégale au cours de la comparaison de deux génomes affiliés (Casjens *et al*., 2011 ; Krupovic *et al*., 2011). La continuité qui peut exister entre deux génomes viraux grâce au haut degré de similarité des séquences est en fait fréquemment interrompue par des régions avec des

degrés de similarité différents (Casjens *et al*., 2011 ; Krupovic *et al*., 2011). Ces régions qui ne présentent souvent que peu, voire aucune similarité, sont interprétées comme des segments génomiques ayant des histoires évolutives différentes, acquis horizontalement entre bactériovirus. Elles sont le plus souvent constituées d'un seul gène, plus rarement d'une partie d'un gène codant pour un domaine protéique ou encore d'un module fonctionnel entier (Krupovic *et al*., 2011 ; Casjens *et al*., 2011).

Le mosaïcisme des génomes viraux peut donc aller de différences significatives dans le degré de similarité entre des séquences homologues jusqu'à des séquences parallèles non homologues codant pour des protéines complètement différentes (Casjens *et al*., 2011). Les modules fonctionnels ne sont pas tous aussi susceptibles de faire l'objet de substitution, insertion ou délétion. En général, les gènes qui codent pour des protéines ayant une interaction co-évoluent (Krupovic *et al*., 2011). Dans la figure 17, la comparaison du génome du bactériovirus HK97 avec d'autres génomes de bactériovirus caudés infectant également *E. coli* ou un genre proche illustre cette organisation en modules fonctionnels et en mosaïque. Le génome du siphovirus HK97 est en effet composé d'un module fonctionnel dévolu à l'assemblage de la queue clairement affilié à celui du siphovirus lambda, mais d'un module fonctionnel impliqué dans l'assemblage de la capside correspondant à celui du myovirus SfV infectant *Shigella flexneri*. Ce génome est par ailleurs composé de gènes précoces, situés sur la partie droite de la carte, où le mosaïcisme est plus fin et les échanges ne concernent que des gènes individuels (Krupovic *et al*., 2011).

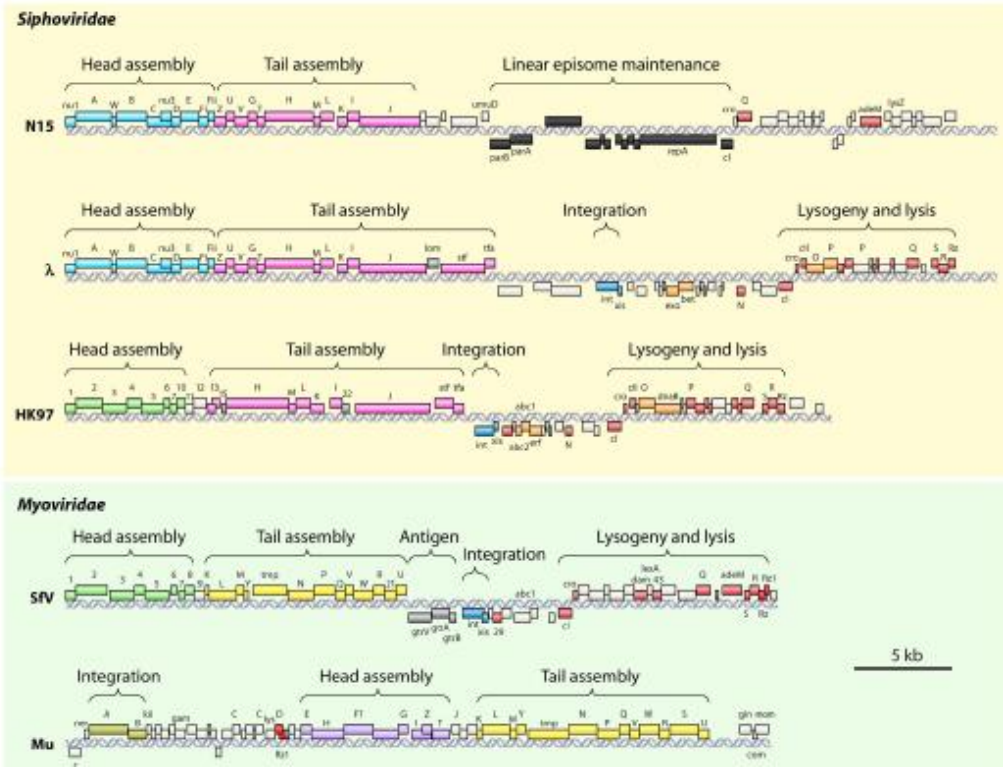


Figure 13 : Organisation schématique de génomes de bactériovirus caudés
Modules fonctionnels et mosaïcisme
Les modules fonctionnels sont délimités par les accolades ; les gènes homologues au sein des modules fonctionnels ont la même couleur ; les gènes analogues sont en orange (D'après Krupovic *et al.,* 2011)

Peu de choses sont précisément connues concernant les mécanismes qui régissent ces évolutions des génomes viraux. Ces dernières seraient davantage le fruit de recombinaisons non homologues se produisant aléatoirement au sein du génome viral plutôt que le résultat de recombinaisons homologues (Casjens *et al*., 2011 ; Krupovic *et al*., 2011 ; Hatfull, 2008). Ces recombinaisons non homologues se produiraient entre deux virus à l'issue d'une co-infection ou plus probablement entre un bactériovirus et un provirus dont l'hôte infecté était déjà porteur (Krupovic *et al*., 2011). Dans la majorité des cas, les génomes ainsi générés seraient non viables et éliminés par la pression de sélection. Seules en de rares circonstances, à savoir la préservation des fonctions virales essentielles et le maintien d'une longueur cohérente du génome, la ou les recombinaisons non homologues aboutiraient à l'apparition de nouveaux génomes fonctionnels (Krupovic *et al*., 2011). Bien que les génomes viraux créés consécutivement à ce type de recombinaison soient très peu fréquents, il est envisagé que ce processus suffise à expliquer la diversité virale observée. Il est estimé que 10^9 à 10^{10} variants génomiques fonctionnels sont ainsi générés toutes les secondes sur la planète et que les nouveaux motifs mosaïques, présentant un avantage sélectif ou au moins aucun désavantage, sont rapidement propagés par recombinaison homologue au sein de la population virale concernée (Krupovic *et al*., 2011).

4.2. LES GENOMES DES ARCHEOVIRUS

Quatre phyla sont aujourd'hui reconnus au sein du domaine *Archaea.* Aux deux principaux que sont ceux les *Euryarchaeota* et les *Crenarchaeota* viennent s'ajouter celui des *Korarchaeota* et celui des *Thaumarchaeota* (Brochier-Armanet *et al*., 2011). Un peu plus de quarante archéovirus ont seulement pour le moment été caractérisés, ces derniers sont exclusivement associés à des crenarchées ou à des euryarchées (Pina *et al*., 2011). Les génomes des virus de crenarchées et ceux des virus d'euryarchées ne partagent pas similarité de séquence. Tous ces virus possèdent des génomes à ADN linéaire ou circulaire qui ne présentent qu'une faible proportion de gènes pour lesquels des fonctions ont pu être déterminées en raison de l'absence de similarité de séquence dans les bases de données. Beaucoup de familles de virus d'archées ne sont, à l'heure actuelle, constituées que de quelques membres voire d'un seul et unique représentant. Des études de génomique comparative ont malgré tout déjà été réalisées sur les familles virales qui en offrent l'opportunité (Krupovic *et al*., 2011).

Les virus associés aux euryarchées sont représentés par une morphologie binaire tête queue comparable à celle des bactériovirus appartenant à l'ordre des *Caudovirales*, une morphologie fusiforme/pléomorphe ou une morphologie cubique (Krupovic *et al*., 2011).

Les virus tête queue sont exclusivement associés à deux ordres taxonomiques archéens : les *Halobacteriales* et les *Methanobacteriales*. Des provirus à l'évidence affiliés ont également été rapportés chez les *Methanococcales*, les *Methanosarcinales* ainsi que les *Archaeoglobales*. L'analyse comparative de ces génomes viraux et proviraux révèle que leur évolution est gouvernée par les mêmes mécanismes que ceux régissant l'évolution des bactériovirus caudés. Des recombinaisons non homologues, des acquisitions de gènes provenant de différentes sources et des réarrangements intergénomiques contribuent également à faire évoluer ces génomes viraux (Krupovic *et al*., 2011).

La diversité morphologique des virus infectant les crenarchées est nettement plus riche ; ces derniers feront l'objet d'une description quasi exhaustive dans le troisième et dernier chapitre de cette synthèse bibliographique. Les analyses de génomique comparative démontrent que certains de ces virus, bien qu'appartenant à différentes familles virales, partagent un petit pool de gènes communs codant principalement pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, la

recombinaison ou la régulation de la transcription. Ces quelques gènes ont vraisemblablement été échangés entre des virus non apparentés et entre les virus et leur hôtes (Krupovic *et al.*, 2011).

4.3. LES SYSTEMES CRISPR/Cas

Les systèmes CRISPR/Cas ne concernent pas directement les génomes des virus de procaryotes. Ils illustrent un mécanisme de défense, antiviral notamment, retrouvé au sein de nombreux génomes bactériens et dans la plupart des génomes archéens (Horvath & Barrangou, 2010 ; Richter *et al.*,2013). Il s'agit précisément d'un système immunitaire qui n'a qu'assez récemment été identifié et qui procure une immunité acquise, spécifique, héritable et adaptative contre des virus et d'autres éléments génétiques mobiles comme les plasmides conjugatifs (Richter *et al.*,2012).

Les CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) sont généralement localisés sur un ou plusieurs loci du chromosome bactérien ou archéen ; ils forment une famille de courtes séquences répétées directes, de 23 à 47 pb, séparées les unes des autres par des séquences généralement uniques, de 21 à 72 pb, appelées spacers (Horvath & Barrangou, 2010). Les répétitions directes, pour la plupart partiellement palindromiques, sont très conservées au sein du même locus (Horvath & Barrangou, 2010). Les spacers, quant à eux hypervariables, correspondent souvent à des fragments dérivant de génomes exogènes, viraux et plasmidiques ; ils constituent donc, notamment, un registre de toutes les infections virales passées dont la cellule procaryote fut l'objet (Marraffini & Sontheimer, 2010 ; Richter *et al.*,2013). La seconde partie des systèmes CRISPR/Cas est représentée par les gènes Cas (CRISPR associated protein) associés aux CRISPR qui leurs sont généralement adjacents. Ces gènes codent pour des protéines dont les fonctions de nucléase, hélicase, polymérase ou de liaison à l'acide nucléique sont fondamentales au cours du mécanisme immunitaire (Richter *et al.*,2013 ; Horvath & Barrangou, 2010).

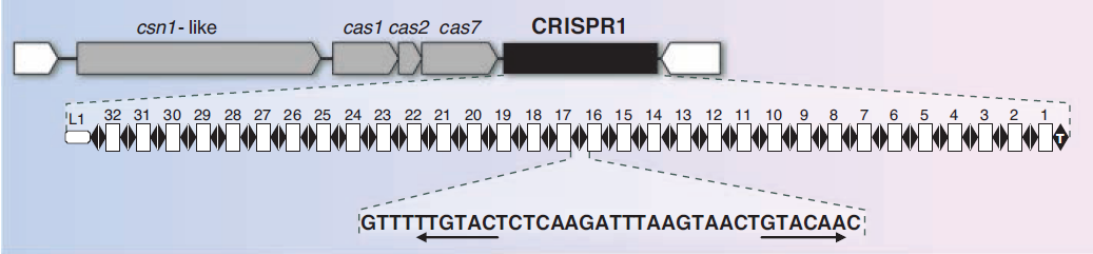


Figure 14 : Organisation générale d'un locus CRISPR

L'un des loci retrouvé chez *Streptococcus thermophilus* DGCC7710.

En noir, la séquence CRISPR avec dans le détail les séquences répétées directes et les spacers (correspondant à des ADN viraux et plasmidiques capturés) respectivement représentés par les losanges noirs et les rectangles blancs. Les extrémités de la séquence L1 et T correspondent respectivement à la séquence leader et à la répétition terminale. En gris, les gènes Cas adjacents à la séquence CRISPR (D'après Horvath & Barrangou, 2010)

Sans entrer dans les détails moléculaires de ce mécanisme, parfois encore peu connus, deux grandes étapes sont à distinguer : l'étape d'adaptation et l'étape d'interférence. L'étape d'adaptation ou d'immunisation d'une cellule procaryote fait suite à la primo exposition de la cellule à un ADN invasif. Elle se traduit par l'intégration au sein du CRISPR, après duplication d'une répétition directe, d'un spacer additionnel correspondant à un fragment de cet ADN invasif (Richter *et al.*, 2013 ; Horvath & Barrangou, 2010). La deuxième étape d'interférence ou d'immunité, s'exerce lorsqu'un ADN viral ou plasmidique invasif, correspondant à l'un des spacers pré existant au sein du CRISPR, est reconnu comme un élément pathogène.

La transcription du CRISPR aboutit en fait à la production de petits ARN relatifs à chacun de ses spacers, appelés ARNcr pour CRISPR. Les ARNcr ciblent chacun spécifiquement un ADN invasif, plus précisément la séquence de celui-ci correspondant au spacer qui est appelée proto-spacer.

Notons qu'un motif PAM (Proto-spacer Adjacent Motif) adjacent au proto-spacer est également nécessaire pour que l'ADN invasif soit effectivement reconnu. Les ARNcr s'associent chacun à un complexe protéique Cas d'interférence qui ainsi guidé élimine ce dernier et immunise ainsi la cellule procaryote (Marraffini & Sontheimer, 2010 ; Richter *et al.*,2013).

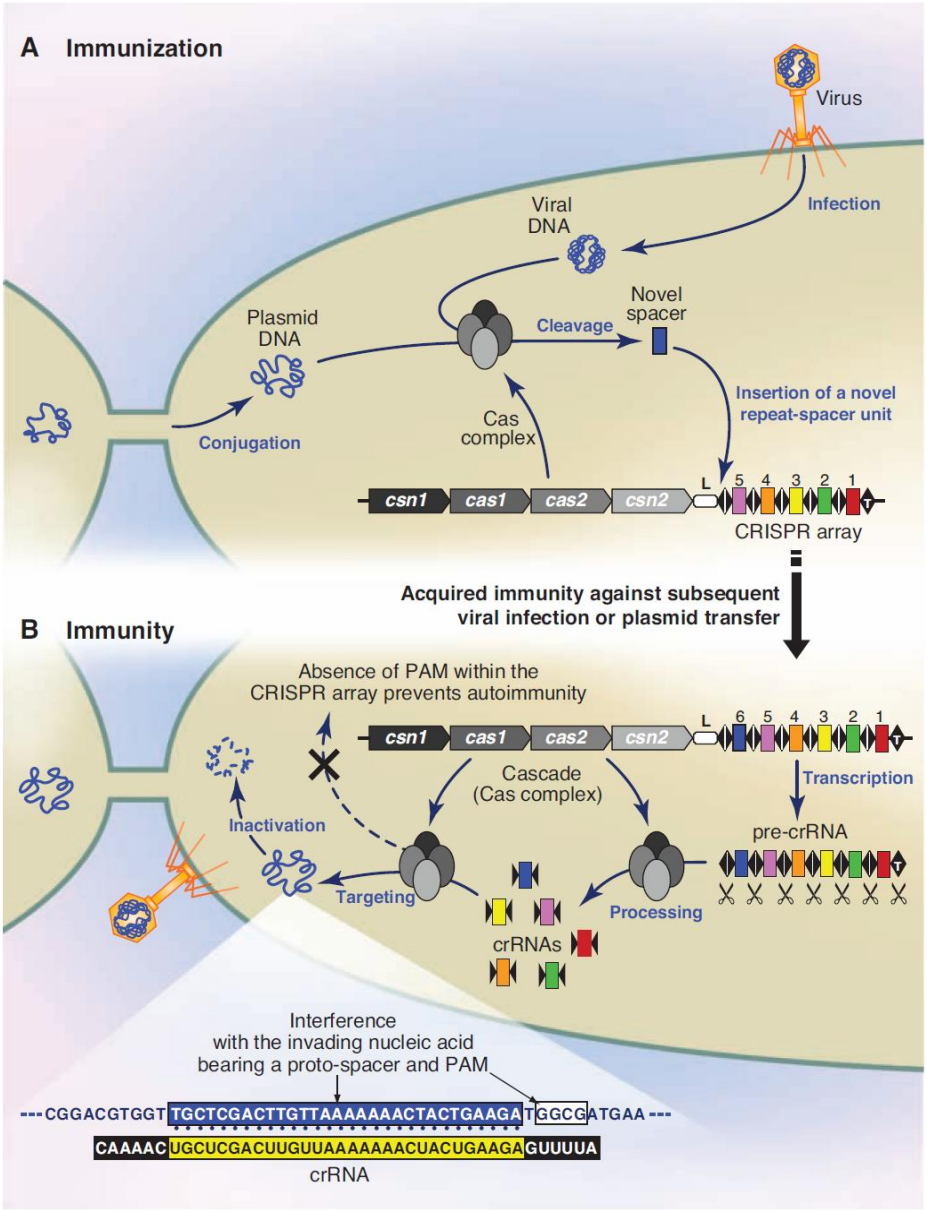


Figure 15 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'un système CRISPR/Cas

A : Processus d'immunisation. Après insertion d'un ADN invasif, viral ou plasmidique, un complexe Cas intègre au niveau de l'extrémité leader de la séquence CRISPR une nouvelle unité répétition-spacer correspondant à l'ADN invasif. B : Processus d'immunité. La séquence CRISPR est transcrite en pré ARN qui aboutit, après traitement par des protéines Cas, aux ARNcr matures. Ces derniers sont utilisés comme guide par le complexe Cas pour interférer et éliminer l'ADN invasif (D'après Horvath & Barrangou, 2010)

4.4. UN ROLE ECOLOGIQUE MAJEUR

La virosphère s'étend à tous les environnements de notre planète, de l'atmosphère à la biosphère profonde. Les virus ont un rôle écologique majeur sur l'ensemble de ces

environnements. Cette importance écologique des virus, notamment ceux de procaryotes, n'est nulle part ailleurs plus évidente que dans les océans (Suttle, 2007).

Bien que la première description d'un virus marin ait eu lieu dans les années 1950 et que, dès la fin des années 1970, il existait des preuves de l'abondance des virus dans les océans, la virologie marine ne s'est réellement développée qu'une dizaine d'années plus tard. Ce développement coïncida avec la publication des premiers dénombrements de VLPs (Virus Like Particles) ou particules de type viral dans les océans, estimant leur nombre à plusieurs millions dans chaque millilitre d'eau de mer (Bergh *et al*., 1989 ; Breitbart *et al*., 2007). Une nouvelle classe de plancton avait jusqu'alors en fait été sous-estimée : le virioplancton (Wommack & Colwell, 2000). La prise de conscience de cette extraordinaire abondance virale en milieu marin eut lieu au moment où les océanographes s'accordaient à reconnaître l'importance des procaryotes et des processus microbiologiques dans le fonctionnement global des océans (Suttle, 2007). Les travaux d'écologie virale, notamment ceux consacrés aux virus de procaryotes se multiplièrent dès lors et n'eurent de cesse de démontrer l'importance de ces derniers dans les océans.

4.5. L'ABONDANCE VIRALE EN MILIEU MARIN

Initialement, les estimations d'abondance virale étaient réalisées en microscopie électronique à transmission (MET). La MET demeure à ce jour la seule méthode qui permette à la fois de révéler la morphologie et l'abondance des virions mais celle-ci s'accompagne fréquemment de sous-estimations (Borsheim, 1990). Les dénombrements de VLPs sont maintenant préférentiellement effectués en microscopie à épifluorescence ou en cytométrie en flux, des méthodes de comptage jugées plus exactes. La microscopie en épifluorescence est basée sur le dénombrement de particules virales dont les acides nucléiques, qu'elles protègent, ont été préalablement marqués à l'aide d'un fluorochrome comme le SYBR green par exemple.

Les virions apparaissent en microscopie comme autant de petits points verts uniformes facilement discernables de cellules procaryotes, potentiellement marquées elles aussi, mais dont les génomes fluorescent sous la forme de points plus gros et moins réguliers (Patel *et al*., 2007 ; Noble & Fuhrman, 1998). La cytométrie en flux repose également sur le marquage des acides nucléiques contenus dans les virions à l'aide d'un fluorochrome. Les particules virales, ainsi

marquées, passent dans le capillaire d'un cytomètre et sont dénombrées notamment en fonction de leur fluorescence. Les populations virales et procaryotiques sont facilement distinguées et différentes sous populations virales peuvent même être détectées (Marie *et al.*,1999).

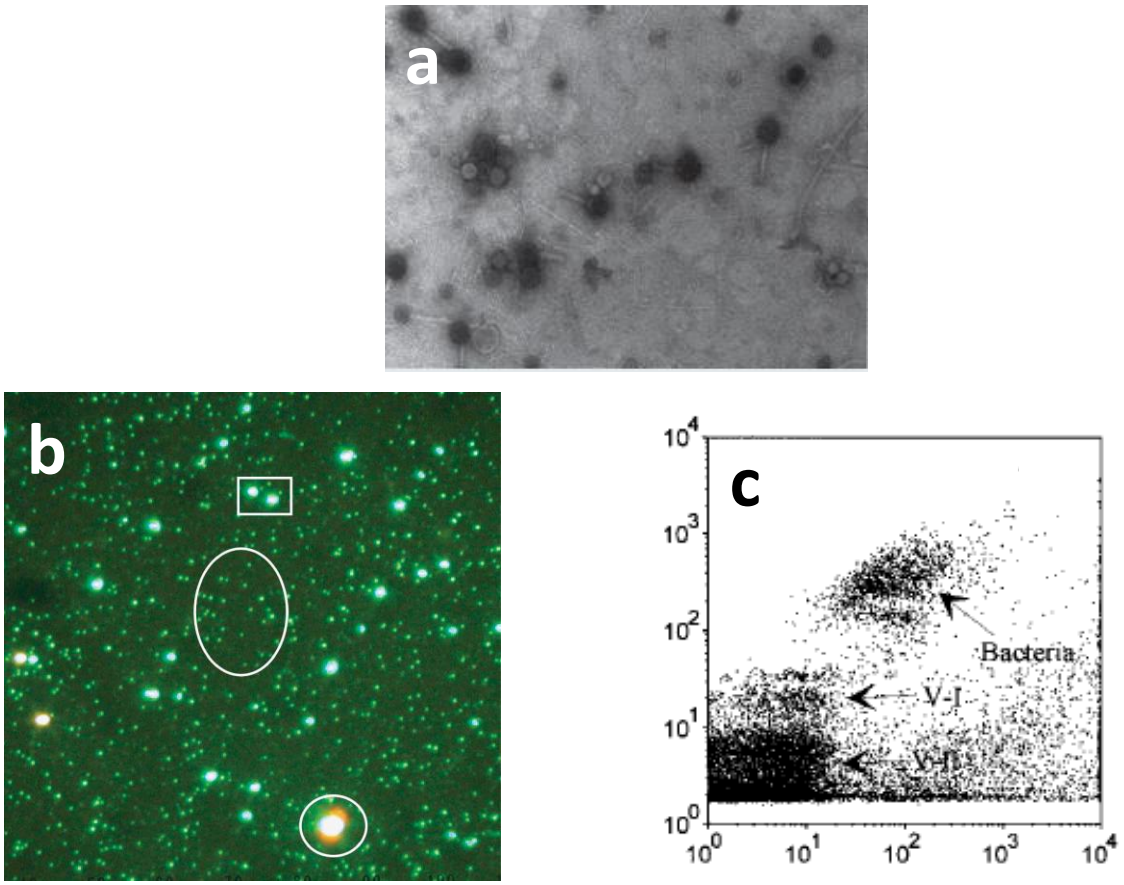


Figure 16 : Trois méthodes utilisées afin de dénombrer des VLPs
a : Image obtenue en MET à partir d'un échantillon d'eau de mer, présence notable de virus caudés
b : Image obtenue en épifluorescence à partir d'un échantillon d'eau de mer
L'ovale indique des VLPs ; le rectangle indique deux procaryotes ; le cercle indique un protiste
c : Cytogramme obtenu à l'issue de l'analyse d'un échantillon d'eau de mer
Deux populations virales différentes sont détectées et notées V-I et V-II
(d'après Suttle *et al.,*2007 ; Patel *et al.,*2007 ; Marie *et al.,*1999)

La microscopie à épifluorescence a permis d'évaluer à un milliard le nombre de VLPs contenu dans un litre d'eau de mer. En rapportant cela au volume total des océans, il s'avère que ces derniers contiendraient approximativement 10^{30} VLPs. Afin de bénéficier d'un ordre d'idée, il est estimé qu'une telle quantité de VLPs séquestre dans les océans plus de carbone que ne le feraient 75 millions de baleines bleues en considérant que le carbone constitue 10 % de la masse sèche des mammifères marins (Suttle, 2005 ; 2007).

De manière plus détaillée, les estimations d'abondance virale sont de l'ordre de 3 x 10^6 VLPs/mL dans l'océan profond et d'environ 10^8 VLPs/mL en ce qui concerne les eaux côtières. L'abondance virale diminue en fonction de l'éloignement de la côte et de la profondeur de la colonne d'eau. Ceci trouve son explication dans le fait que cette abondance est généralement corrélée à l'abondance procaryotique et à la productivité (Suttle, 2005 ; 2007). L'abondance virale est enfin approximativement 15 fois supérieure à celle des procaryotes mais, compte tenu de l'extrême petite taille des virions, ceux-ci ne représentent que 5 % de la biomasse des océans lorsque les procaryotes en représentent plus de 90 % (Suttle, 2007).

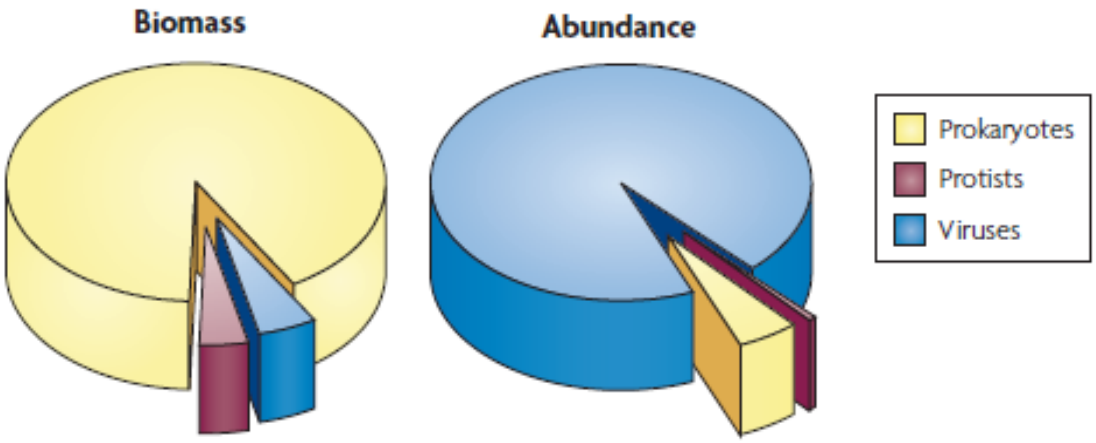


Figure 17 : Biomasse et abondance des procaryotes, virus et protiste dans les océans
(D'après Suttlle, 2007)

Il a initialement été affirmé que ces estimations d'abondance virale constituaient des estimations du nombre de virus par millilitre d'eau de mer. Les méthodes de dénombrement mises en œuvre, qu'il s'agisse de microscopie à épifluorescence ou de cytométrie en flux, reposent pourtant uniquement sur la détection des particules virales libres à la suite du marquage fluorescent de l'acide nucléique qu'elles contiennent. Dans la perspective qu'il y ait à faire une distinction entre virus et virion, il peut donc paraître plus exact d'affirmer qu'il s'agisse d'estimations du nombre de virions par millilitre d'eau de mer. Le caractère infectieux des particules dénombrées n'étant en rien démontré, il s'avère malgré tout difficile de pouvoir parler d'un nombre de virions au sens strict du terme pour évoquer ces abondances. Les

dénombrements réalisés sont en conséquence souvent préférentiellement exprimés sous la forme d'un nombre de particules de type viral ou VLPs par millilitre, l'acronyme VLPs renvoyant ici à des virions dont l'infectiosité n'a pas été démontrée.

Sans renier la qualité des travaux précédents, il apparaît aujourd'hui que les estimations d'abondance virales puissent comme tous protocoles expérimentaux se heurter à certains biais méthodologiques. Il est par exemple admis que l'épifluorescence ne soit pas aussi efficace dans la détection de particules virales à ADN simple brin ou à ARN qui pourraient se révéler bien plus abondantes que ce qui était initialement envisagé dans l'environnement et notamment dans les océans (Lang *et al*., 2009 ; Roux *et al*., 2012). Vient s'ajouter à ces considérations un autre problème potentiel, moins fréquemment abordé. Des études tendent en effet aujourd'hui à envisager que d'autres types d'éléments génétiques mobiles, à l'image des GTAs (Gene Transfert Agents) ou agents de transfert de gène ou des MVs (Membrane Vesicles) ou vésicules membranaires, puissent se révéler abondants dans l'environnement marin notamment. Ces derniers, de par leurs caractéristiques (taille et contenu en acide nucléique), semblent pouvoir être difficilement discriminés de véritables particules virales et en conséquence générer des faux positifs lors d'estimation d'abondance en microscopie à épifluorescence ou en cytométrie (Forterre *et al*., 2012).

Les GTAs sont des entités de type phagique. Ils ressemblent à de petits bactériovirus caudés et encapsident de courts fragments aléatoires d'ADN chromosomique appartenant aux cellules procaryotes produisant ces entités (Stanton, 2007 ; Lang *et al*., 2012). Si cette production n'est pas le résultat d'une infection virale, il existe des connections évolutives entre les GTAs et les virus caudés. Les gènes codant pour les GTAs, ou au moins la majorité d'entre eux, forment des clusters, de 13 à 16 kb, au sein des génomes des cellules productrices et présentent des similarités d'organisation et de séquences avec les génomes de virus caudés (Paul, 2008 ; Lang *et al*., 2012). Ces particules sont vraisemblablement libérées dans l'environnement suite à la lyse des cellules qui les produisent et sont susceptibles de transférer de l'ADN à des cellules réceptrices (Lang *et al*., 2012). Les GTAs contiennent des fragments aléatoires de génomes cellulaires trop petits pour comprendre l'intégralité des gènes nécessaires à leur constitution. Ils n'ont donc jamais l'opportunité de transférer à une cellule réceptrice la capacité de produire à son tour d'autres GTAs. Ces caractéristiques les différencient réellement de particules virales issues de transductions généralisées. Ces dernières sont produites occasionnellement suite à l'expression et la réplication d'un génome viral dans une cellule hôte ; il s'agit de virions

encapsidant par erreur un fragment aléatoire du chromosome de la cellule hôte dont la taille est comparable à celle du génome viral par ailleurs normalement encapsidé (Lang *et al*., 2012).

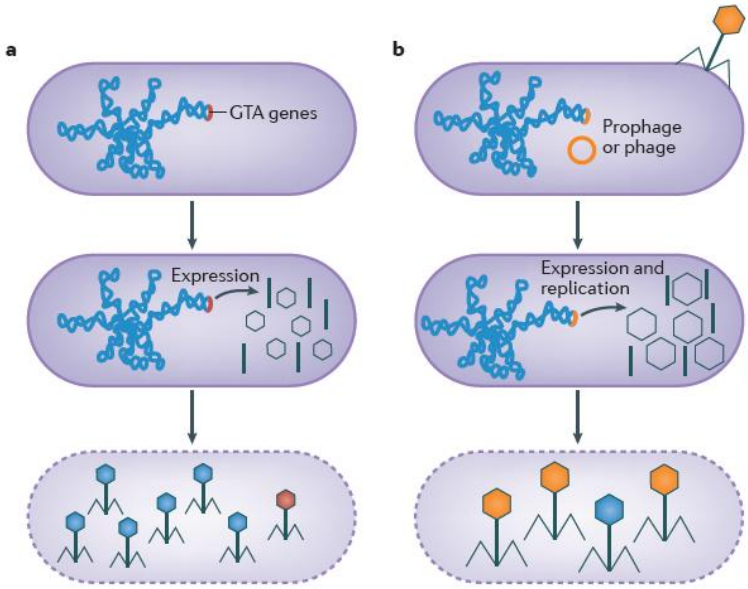


Figure 18 : Comparaison entre GTAs et particules virales transductrices
a : La production de GTAs. b : La production de particules virales de transduction généralisées
(D'après Lang *et al.*, 2012)

Les GTAs n'ont finalement pour le moment encore qu'assez peu été étudiés. Quatre ont seulement à ce jour été décrits en détails, lesquels sont produits par des bactéries des genres *Rhodobacter* (Marrs, 1974), *Desulfovibrio* (Rapp & Wall, 1987), *Brachyspira* (Humphrey *et al*., 1997 Matson *et al*., 2005) et une archée du genre *Methanococcus* (Bertani, 1999 ; Eiserling *et al*., 1999). Quelques études ont depuis lors contribué à révéler la remarquable distribution d'éléments de ce type dans l'environnement et notamment les océans (McDaniel *et al*., 2010 ; Paul, 2008 ; Lang & Beatty, 2007).

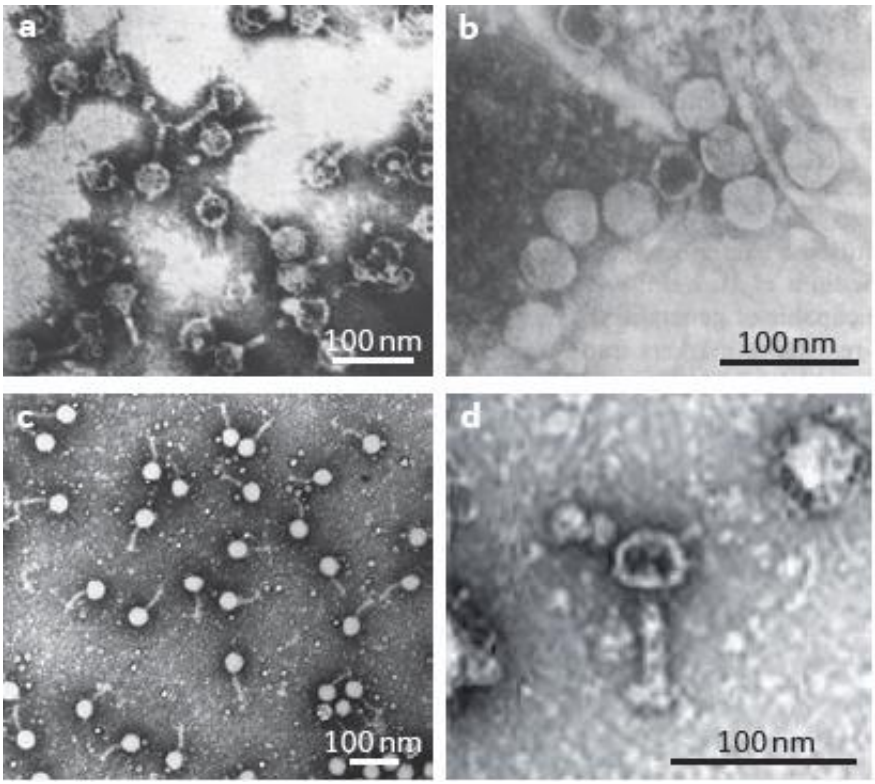


Figure 19 : Les quatre GTAs isolés en MET

a : La particule RcGTA associée à *Rhodobacter capsulatus*. La particule Dd1 associée à *Desulfovibrio desulfuricans* c : La particule VSH-1 associée *Brachyspira hyodysenteriae*. d : La particule VTA associée à *Methanococcus* voltae (D'après Lang *et al.*, 2012)

Les MVs sont des vésicules globuleuses de 50 à 200 nm de diamètre dont la production se révèle être aujourd'hui un processus physiologique fondamental partagé par toutes les cellules vivantes (Forterre *et al*., 2012 ; Gaudin *et al*., 2013).

Cette production n'a d'abord été qu'intensivement étudiée au sein des domaines *Bacteria* et *Eucarya*. Chez les proteobactéries, les MVs précisément connues sous l'acronyme OMVs (Outer Membrane Vesicles) sont produites par bourgeonnement à partir de la membrane externe des cellules et contiennent principalement des composés qui proviennent de cette membrane et du périplasme (Tashiro *et al*., 2012). Elles interviennent dans de nombreux aspects de la vie bactérienne aussi différents que la réponse au stress, la toxicité vis-à-vis de souches compétitrices, la pathogénicité, la détoxification ou encore la protection contre des agressions virales (Gaudin *et al*., 2013 ; Manning & Kuehn, 2011). Chez les eucaryotes, deux types de MVs sont distingués : les exosomes qui résultent de l'invagination de la membrane des endosomes et les ectosomes formés par bourgeonnement à partir de la membrane cytoplasmique et qui contiennent à la fois des composés membranaires et cytoplasmiques. Exosomes et ectosomes sont impliqués dans des processus de signalisation, le transfert de matériel membranaire et

cytosolique ou la modulation de la réponse immunitaire (Raposo & Stoorvogel, 2013 ; Gaudin *et al*., 2012). La prise en compte des MVs au sein du domaine *Archaea* est bien plus récente. Ces dernières sont produites par bourgeonnement à partir de la membrane cytoplasmique et il a notamment été démontré chez les *Sulfolobales* qu'elles transportaient des toxines protéiques (Prangishvili *et al*., 2000 ; Ellen *et al*., 2009, 2011).

Les MVs qu'elles soient bactériennes, eucaryotes ou archéennes se révèlent également capables de fusionner avec des cellules réceptrices et de transporter différents types d'acides nucléiques. Elles constituent de ce fait un autre type d'élément génétique mobile. Au sein du domaine *Eukarya*, les MVs peuvent ainsi contenir des ARN messagers ou des microARN susceptibles d'être transférés puis exprimés dans des cellules réceptrices (Ramachandran & Palanisamy, 2012). Chez les *Bacteria*, il a été démontré que des MVs pouvaient contenir de l'ADN chromosomique ou plasmidique qu'elles contribuent à transférer entre cellules (Dorward *et al*., 1989 ; Velimirov & Hagemann, 2011). Certaines vésicules bactériennes pourraient également contenir de l'ADN phagique (Yaron *et al*., 2000). Enfin, au sein du domaine *Archaea*, la production de vésicules incorporant de l'ADN chromosomique, plasmidique ou encore un ADN viral défectif a été démontrée chez les *Thermococcales* (Soler *et al*., 2008, 2011 ; Gaudin *et al*., 2012, 2013 ; Marguet *et al*., 2013).

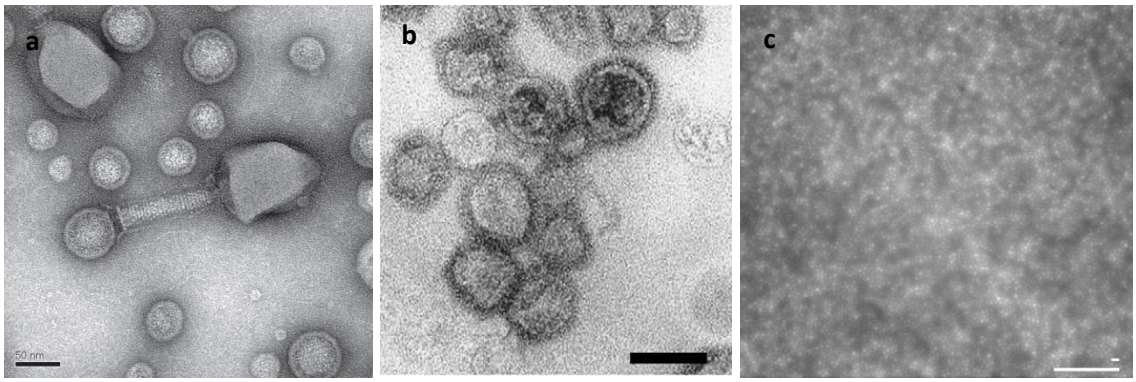


Figure 20 : Exemples de vésicules membranaires produites au sein du domaine *Bacteria* et *Archaea*
a : Complexe observé en MET entre un bactériovirus T4 et une OMV produite par *E. coli*. La vésicule pourrait servir de leurre cellulaire et empêcher ainsi l'infection (D'après Manning & Kuehnn, 2011). b : MVs produites par *Thermococcus nautilus* 30/1 observées en MET. Echelle : 100 nm. (D'après Soler et al., 2008). c : Surnageant d'une culture de *Thermococcus nautilus* 30/1, contenant les MVs, analysé en microscopie à épifluorescence après marquage au SybrGreen. Petite Echelle : 1 µm

L'existence de connections évolutives entre les vésicules membranaires et les virus est envisagée. Certains archéovirus et bactériovirus produisent par exemple des virions pléomorphes caractérisés par des vésicules lipidiques ressemblant énormément aux vésicules membranaires

(Jansson *et al*., 1982 ; Pietilä *et al*., 2012). Il a été proposé qu'à une période précoce de la vie sur terre, antérieure à LUCA, des MVs produites par des protocellules aient pu jouer un rôle dans l'apparition des toutes premières lignées virales sur notre planète (Jalasvuori & Bamford, 2008 ; Forterre & Krupovic, 2012).

L'analyse spécifique des GTAs en microscopie à épifluorescence et cytométrie en flux n'a jamais été réalisée. Il a été démontré, comme en témoigne la figure 24, que les signaux fluorescents obtenus au cours de l'analyse de certaines MVs en microscopie à épifluorescence s'avéraient tout à fait comparables à ceux de particules virales véritables (Soler *et al.*,2008). L'hypothèse selon laquelle GTAs et MVs aient été détectés et dénombrés au cours d'estimations d'abondance virale a donc été formulée ; d'éventuelles surestimations du nombre de virions au cours d'études d'écologie virale auraient en conséquence déjà pu se produire (Forterre *et al*., 2013). Reste maintenant à essayer de déterminer à quelle hauteur les MVs et les GTAs interfèrent réellement dans les estimations d'abondance virale en poursuivant les recherches sur ces éléments génétiques mobiles. S'il se confirme que ces derniers soient bels et bien abondants, il a été proposé que l'acronyme VLPs ne soit plus uniquement, comme c'est souvent le cas, synonyme de virions mais qu'il intègre aussi GTAs et MVs (Forterre *et al*., 2013).

Avoir à l'esprit que d'autres éléments génétiques mobiles puissent être abondants n'occulte pas pour autant la prépondérance des virus véritables dans les océans. La description très récente des premiers virus associés au clade bactérien SAR11 pourrait contribuer à l'illustrer. Ce clade, regroupant des alphaprotéobactéries marines hétérotrophes, est le plus abondant qui existe dans les zones euphotiques de l'océan et il contribue significativement à la connectivité d'ensemble des communautés microbiennes marines planctoniques (Carini *et al*., 2013). Il a été estimé, par extrapolation, que les océans contenaient 2×10^{28} bactéries appartenant au clade SAR11 dont la moitié localisée dans la zone euphotique (Morris *et al*., 2002).

Quatre bactériovirus issus de différents échantillons d'eau de mer se sont révélés capables d'infecter des cultures de *Candidatus pelagibacter ubique* HTCC1062, un représentant cultivé du clade SAR11. Le nom de pelagiphage a été proposé pour désigner ces virus qui appartiennent pour trois d'entre eux à la famille des *Podoviridae* et un à la famille des *Myoviridae*. Les génomes viraux de ces pelagiphages se révèlent être très bien représentés au sein des viromes marins. L'un de ces nouveaux virus, HTVC010P, constitue une nouvelle sous-famille de podovirus qui pourrait correspondre à l'une des sous-familles virales les plus abondantes de notre planète (Zhao *et al.*, 2013).

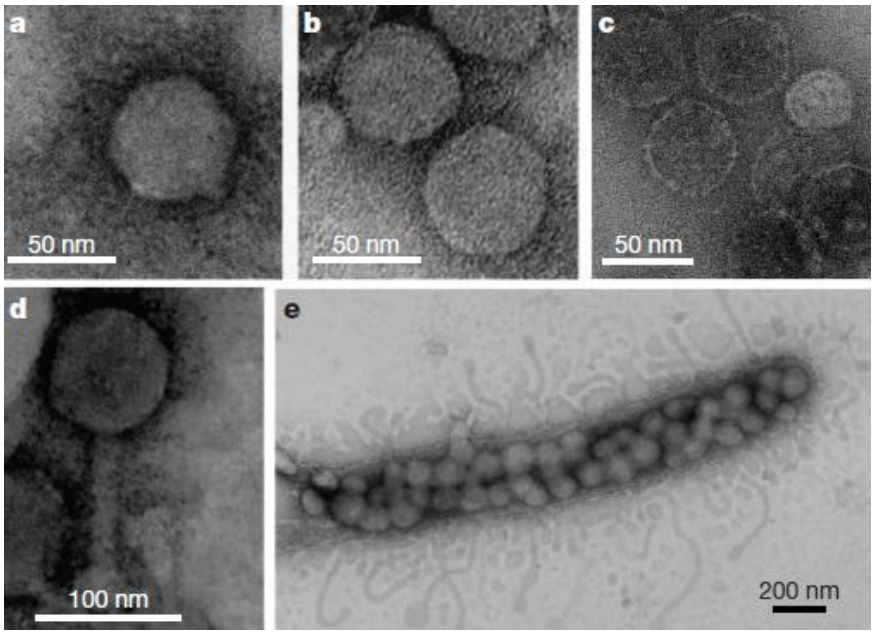


Figure 21 : Les quatre premiers pelagiphages isolés observés en MET
a : Pelagipodovirus HTVC011P. b : PelagipodovirusHTVC019P. c : Pelagipodovirus HTVC010P
d : Pelagimyovirus HTVC008M. e : l'hôte 'Candidatus P. ubique' HTCC1062 infectée par HTVC011P juste avant lyse
(D'après Zhao *et al.*, 2013)

4.6. L'IMPACT VIRAL SUR LA MORTALITE MICROBIENNE

Différentes approches méthodologiques tendent à démontrer que les virus, par l'intermédiaire de la phase lytique de leur cycle, sont l'une des causes majeures de mortalité microbienne dans les océans (Sime-Ngando & Colombet, 2009). Il est estimé qu'entre 10 et 50 % des bactéries marines produites quotidiennement soient lysées par les virus faisant de ces derniers des responsables de la mortalité microbienne aussi importants que les organismes brouteurs au sein des océans. Le taux de mortalité induite par les virus peut considérablement varier selon l'environnement étudié. A l'échelle de la communauté, dans un écosystème donné, le degré de la lyse est fonction de l'abondance et de l'activité de l'hôte, plus généralement de la productivité de l'écosystème considéré et des paramètres physico-chimiques qui y règnent. Il faut enfin garder à l'esprit que les différentes méthodes utilisées pour mesurer l'impact viral sur la mortalité microbienne requièrent souvent l'emploi de facteurs de conversion ou d'algorithmes théoriques construits à partir de culture en laboratoire. A ce titre, toutes ces approches ont certaines limites et les mesures de mortalité microbienne induite par les virus ne sont à extrapoler à l'écosystème naturel qu'avec prudence (Sime-Ngando & Colombet, 2009).

4.7. L'IMPLICATION DANS LES CYCLES BIOGEOCHIMIQUES

L'activité lytique significative des virus de procaryotes dans les océans implique qu'ils jouent un rôle prépondérant dans les cycles biogéochimiques.

Au sein de plusieurs modèles théoriques, les virus virulents catalysent la transformation de la matière organique de l'état particulaire (les organismes vivants ici précisément les microorganismes) à l'état dissout (les produits de la lyse virale : virus, débris et organites cellulaires, molécules et éléments organiques ou inorganiques…) assimilable par les microorganismes non infectés qui composent la communauté microbienne (Sime-Ngando & Colombet, 2009). Ce processus de transformation de la matière organique opéré par les virus porte le nom de « shunt viral » et s'apparente à un programme microbien et viral de recyclage de nutriments et d'énergie (Wilhelm & Suttle, 1999 ; Shelford *et al*., 2012 ; Breitbart, 2012).
Il a pour effet de court-circuiter une partie du transfert de carbone s'effectuant normalement vers les niveaux trophiques supérieurs (protistes, zooplancton et poissons) par le biais de la chaîne alimentaire. En lieu et place, le « court-circuitage viral » maintient un pool de carbone organique dissout et un pool de carbone organique particulaire dans les eaux de surface. Le premier sert à la respiration oxydative microbienne hétérotrophe et le second fait l'objet de la photooxydation par les UV (Suttle, 2005 ; Sime-Ngando & Colombet, 2009).

Ce processus, favorisant la réémission de CO2 dans l'atmosphère et diminuant le taux de sédimentation de carbone organique particulaire (organismes morts, matière détritiques) dans l'océan profond, affecte par la même l'efficacité de la pompe biologique (Suttle, 2005 ; 2007).
La pompe biologique correspond à l'ensemble des processus contribuant au transfert du CO2 atmosphérique dans les eaux de surface où il est capté et utilisé par le phytoplancton, à sa transformation en matière organique et finalement au stockage de la matière organique particulaire en profondeur dans les sédiments. En l'absence d'un tel mécanisme, il est estimé que les concentrations en CO2, principal gaz à effet de serre, seraient trois fois supérieures dans l'atmosphère.

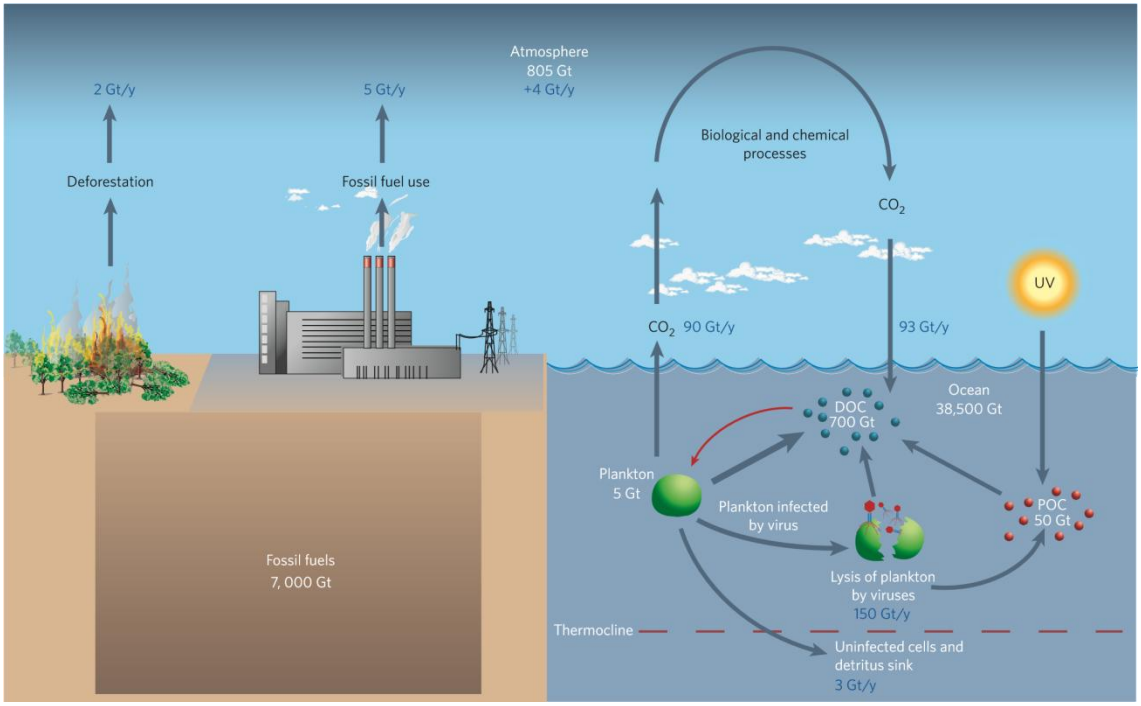


Figure 22 : Représentation schématique de l'impact viral sur la pompe biologique
(D'après Suttle *et al.*, 2005)

4.8. LA STRUCTURATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES

Les virus jouent un rôle conséquent sur la dynamique de la biodiversité microbienne et ce de différentes manières.

Le fait que les virus possèdent généralement une spécificité d'hôte restreinte a amené à considérer que ces derniers puissent participer au contrôle de la composition des communautés microbiennes (Weinbauer & Rassoulzadegan, 2004). Ce concours envisagé des virus a été le point de départ dans l'élaboration d'un modèle de contrôle viral reposant sur la densité microbienne : le modèle « phage kills the winner » ou « killing the winner » (Thingstad & Lignell, 1997 ; Thingstad, 2000). Dans ce concept, le caractère aléatoire de la rencontre entre un virus et son hôte spécifique implique que les espèces microbiennes hôtes les plus abondantes soient aussi les plus exposées aux infections virales ; les virus virulents ciblent donc ordinairement les populations devenues dominantes. Cette activité lytique, en s'exerçant sur ces populations les plus compétitives, permet en conséquence à bon nombre d'espèces moins compétitives de coexister au sein de la même niche écologique et maintient ainsi la diversité et la diversification des communautés microbiennes. (Sime-Ngando & Colombet, 2009).

L'infection par un virus tempéré s'accompagne selon certaines conditions par le maintien du virus, dans la cellule hôte, sous forme de génome. La présence de ce génome, généralement intégré au sein du chromosome de l'hôte, se traduit pour la cellule lysogénisée par l'acquisition de nouvelles propriétés. Le virus contribue ainsi à la conversion lysogénique de la cellule hôte. La présence d'un provirus immunise par exemple la cellule infectée contre d'autres infections virales. En plus de ce caractère préventif, le génome viral intégré va également pouvoir procurer à la cellule lysogène de nouvelles propriétés métaboliques, morphologiques ou immunogéniques. L'exemple le plus connu de conversion lysogénique concerne certaines souches de *Vibrio cholerae* qui ne deviennent réellement pathogènes qu'après avoir été infectées par le phage tempéré CTXϕ. Ces souches expriment alors une entérotoxine, codée au niveau du génome phagique présent dans les cellules lysogènes, qui est absolument nécessaire à leur pleine virulence (Waldor & Mekalanos, 1996).

Les virus, qu'ils soient virulents ou tempérés, sont enfin considérablement impliqués dans les transferts de gènes, dits latéraux ou horizontaux, entre microorganismes et contribuent ainsi grandement à faire évoluer les communautés microbiennes.

Des gènes microbiens libres dans le milieu environnemental, résultant de la lyse virale mais pas uniquement, peuvent être intégrés au patrimoine génétique d'autres microorganismes à l'issue du processus de transformation.

Les particules virales constituent par ailleurs des vecteurs de transfert de gènes à part entière. Au cours du mécanisme de **transduction**, les virions incorporent par erreur une portion du génome de leur hôte. Celle-ci peut ensuite être intégrée au patrimoine génétique d'autres microorganismes suite à l'infection de ces derniers par les particules virales transductrices. Deux types de processus transductionnels sont distingués :

- La transduction généralisée, au cours de laquelle des fragments d'ADN chromosomique aléatoires sont encapsidés à la place du génome viral, implique aussi bien les virus virulents que les tempérés.
- La transduction spécialisée concerne quant à elle uniquement les phages tempérés et correspond à une excision imparfaite du provirus. Une séquence d'ADN chromosomique bordant l'élément viral intégré, donc spécifique, est excisée et empaquetée en même temps que lui.

Ce mécanisme de transduction aurait un impact majeur ; il a en effet été estimé à 10^{24} le nombre de gènes qui circulerait ainsi chaque année entre microorganismes (Jiang & Paul, 1998). Cet apport de gènes tend à améliorer le potentiel génétique des microorganismes (Paul, 2008).
Les transferts horizontaux de gènes se produisent entre les virus et leurs hôtes et ce dans les deux sens. L'un des exemples les plus originaux pour illustrer ce phénomène est l'acquisition par les virus, associés aux cyanobactéries des genres *Synecoccus* et *Prochlorococcus,* de gènes appartenant à leur hôte codant pour des protéines clefs de la photosynthèse. Ceci est interprété comme un moyen trouvé par ces virus pour générer suffisamment d'énergie dans des cellules affaiblies par l'infection et ainsi permettre la production virale. Il apparaît donc au travers de cet exemple que les virus en question assument une part de la production primaire photosynthétique.

LES VIRUS ASSOCIES AUX BACTERIES ET ARCHEES THERMOPHILES ET HYPERTHERMOPHILES

1. LA NOTION DE THERMOPHILIE

Longtemps le fait que la vie microbienne puisse être abondante dans les environnements où la température était élevée resta insoupçonné. A partir de 1966, Thomas Brock et son équipe mirent cependant en évidence l'existence de microorganismes proliférant dans les eaux des sources chaudes du parc de Yellowstone. Ils y isolèrent et décrivirent les premiers procaryotes dont les températures optimales de croissance se situaient aux alentours de 80°C, comme *Thermus aquaticus* ou *Sulfolobus acidocaldarius*, ouvrant ainsi la voie à un champ de recherche tout à fait nouveau : l'étude des microorganismes thermophiles (Gross, 2003 ; Madigan & Martinko, 2007 ; Uldahl & Peng, 2013).

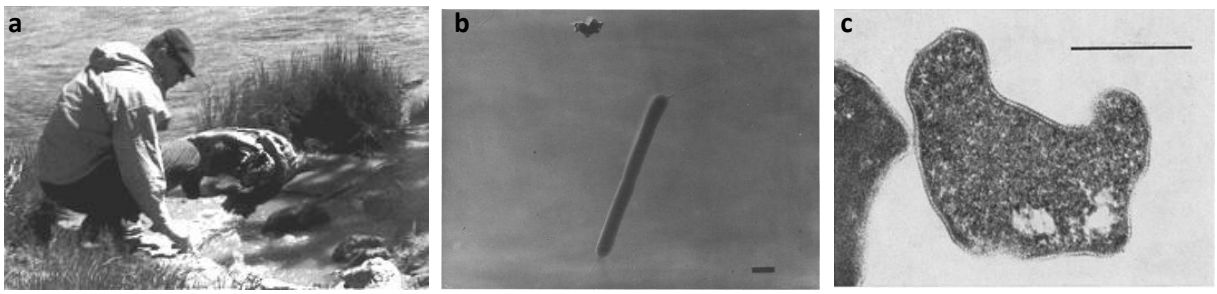


Figure 23 : La découverte de la vie à haute température
a : Thomas Brock échantillonnant à Yellowstone dans les années 1960 (D'après Brock, 1994)
b : *Thermus aquaticus* observé en MET. Echelle : 1 µm (D'après Brock & Feeze, 1969)
c : *Sulfolobus acidocaldarius* en MET (D'après Brock *et al.*, 1972)

Les organismes thermophiles non seulement tolèrent des températures élevées mais les requièrent, c'est-à-dire que de telles températures sont nécessaires à leur croissance et leur survie. En fonction de leur température optimale de croissance, sont précisément distingués les organismes thermophiles dont les optima de température se situent au-delà de 45°C et les organismes hyperthermophiles dont les optima de température dépassent les 80°C.

Des distinctions encore plus précises peuvent être effectuées entre thermophiles modérés, thermophiles extrêmes et hyperthermophiles ; les températures optimales de croissance de ces organismes se situent alors respectivement entre 40 et 60°C, entre 60 et 85°C et au-delà de 85°C. Les limites supérieures de température qui permettent le développement de microorganismes eucaryotes, à savoir des champignons, ne dépassent pas les 60-62°C. Seule la vie procaryote s'avère capable de se développer au-delà de ces températures et le domaine *Archaea* est le plus représenté à mesure que la température de l'environnement augmente (Mehta & Satyanarayana, 2013 ; Uldahl & Peng, 2013).

Les intérêts que suscitent les microorganismes thermophiles et hyperthermophiles sont multiples et de sérieux efforts ont été fournis et sont toujours employés afin de mieux appréhender leur étonnante diversité et de mieux comprendre leur écologie, leur physiologie et leur biochimie.

Depuis les travaux initiés par Brock et ses collaborateurs, de nombreux genres microbiens thermophiles et hyperthermophiles, appartenant au domaine *Bacteria* et au domaine *Archaea* et issus d'environnement chauds naturels ou d'origine anthropique, ont été isolés et caractérisés. Des microbiologistes comme Karl Stetter et Wolfram Zillig, notamment, s'y sont pleinement consacrés, parcourant le monde à la recherche de ces microorganismes dont les deux principales niches écologiques sont les sources chaudes terrestres et les sources hydrothermales océaniques profondes.

Figure 24 : Deux « chasseurs de thermophiles » échantillonnant dans les solfatares islandais de Kerlingarfjöll
Karl Stetter à gauche et Wolfram Zillig à droite
(D'après Horikoshi *et al*, 2011)

2. LES SOURCES CHAUDES TERRESTRES

2.1. LOCALISATION ET DESCRIPTION

Bien que répartis sur l'ensemble de la planète dans des régions à activité géothermique ou volcanique, ces environnements se concentrent notamment dans le parc du Yellowstone aux Etats-Unis, la Nouvelle Zélande, l'Islande, le Japon, l'Italie, le Chili ou encore la région russe du Kamtchatka. Dans les zones à activité volcanique qui correspondent à des zones tectoniquement actives, l'eau de ruissellement percole au travers de fissures de la croûte terrestre et finit par se réchauffer au contact de la chambre magmatique. Lorsque cette eau de ruissellement atteint une température suffisamment élevée, la pression générée conduit à la réémission du fluide en surface et à la formation de différents types de sources chaudes (Mehta & Satyanarayana, 2013).

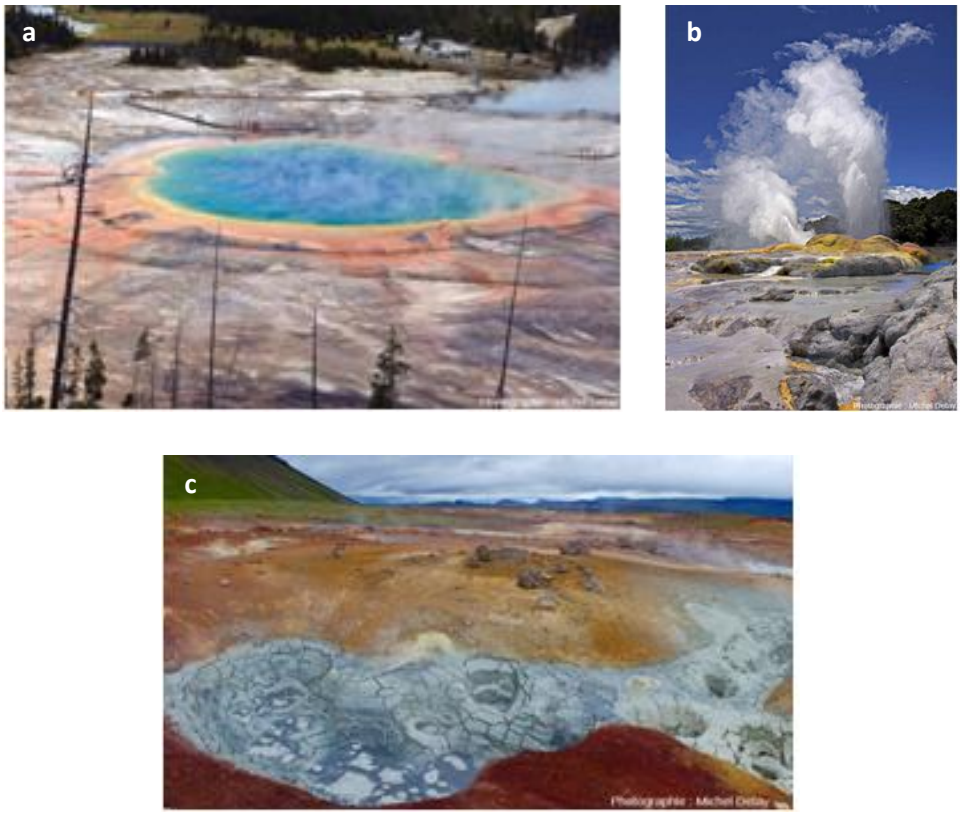


Figure 25 : Trois exemples d'environnements chauds terrestres

a : La source chaude du Grand Prismatic Spring dans le parc national du Yellowstone aux Etats-Unis
b : Le geyser Pohutu en Nouvelle-Zélande. c : Les solfatares de Theistareykir en Islande
(D'après Detay 2013 ; planet-terre.ens-lyon.fr/article/hydrovolcanologie. xml)

2.2. LES MICRORGANISMES ISOLES

Les sources chaudes terrestres sont très intéressantes en termes d'écologie microbienne. Les différents gradients thermiques créés au fur et à mesure de l'écoulement de l'eau chaude, l'apport continu de nutriments et notamment les fortes concentrations en composés soufrés inorganiques ainsi que la forte intensité lumineuse permettent la formation d'importants tapis microbiens. Les tapis formés entre 50 et 75°C ont été particulièrement étudiés. Leur couche supérieure se compose de cyanobactéries thermophiles et regroupe des phototrophes oxygéniques appartenant notamment au genre *Synechococcus, Phormidium* ou *Mastigocladus*. Des bactéries vertes non sulfureuses, capables de phototrophie anoxygénique, du genre *Chloroflexus* ou de genre apparentés comme *Roseiflexus* en constituent la couche inférieure. Les bactéries du genre *Chloroflexus* utilisent les bactériochlorophylles a et c leur permettant de capter l'énergie lumineuse faiblement absorbée par les cyanobactéries de la couche supérieure, utilisatrices elles de la chlorophylle a. Des preuves d'interactions symbiotiques existent par ailleurs entre ces deux types de microorganismes photosynthétiques. Des microorganismes thermophiles chimiotrophes entrent également dans la composition des tapis notamment des hétérotrophes aérobies et anaérobies, des méthanogènes ou des microorganismes réduisant les sulfates (Mehta & Satyanarayana, 2013).

Figure 26 : Tapis microbien composé de cyanobactéries au niveau d'une source chaude dans la région du lac Bogoria au Kenya (D'après Renaut & Jones, 2011)

De nombreux microorganismes thermophiles et hyperthermophiles, en dehors de ceux impliqués dans les tapis microbiens, ont, par ailleurs, été isolés à partir des sources chaudes terrestres.

Des bactéries aux métabolismes variés ont été décrites ; les hétérotrophes aérobies des genres *Thermus, Bacillus ou Geobacillus* (Kristjansson *et al*., 1994 ; Nazina *et al*., 2004), les hétérotrophes anaérobies des genres *Thermoanaerobacter* ou *Fervidobacterium* (Wagner *et al*., 2008 ; Huber *et al*., 1990), les autotrophes aérobies hydrogéno-oxydantes du genre *Hydrogenophilus* (Vésteinsdóttir *et al*., 2011), les autotrophes anaérobies sulfate réductrices du genre *Thermodesulfovibrio* (Haouari *et al*., 2008) et les méthanotrophes du genre *Methylothermus* (Tsubota *et al*., 2005) n'en sont que quelques exemples.

Ces écosystèmes constituent notamment aussi une niche écologique pour les archées appartenant au phylum des *Crenarchaeota*. Cinq ordres composent le phylum :

- Les *Sulfolobales* regroupent des archées hyperthermophiles et majoritairement acidophiles dont les températures optimales de croissance se situent entre 75 et 95°C et les pH optimaux sont compris entre 2 et 4. D'un point de vue métabolique, elles sont majoritairement chimiolithoautotrophes bien que certaines soient capables de chimioorganotrophie. Les *Sulfolobales*, à l'image des archées du genre *Sulfolobus*, peuvent être aérobies et oxyder l'hydrogène sulfuré ou le soufre élémentaire en acide sulfurique ou le fer ferreux en fer ferrique. D'autres *Sulfolobales* sont aérobies facultatives ou anaérobies à l'exemple des archées des genres *Acidianus* et *Stygiolobus* respectivement. En condition anaérobie, ces dernières utilisent le soufre élémentaire comme accepteur d'électron et produisent de l'hydrogène sulfuré.

- Les *Thermoproteales* rassemblent des archées hyperthermophiles et modérément acidophiles avec des températures optimales de croissance comprises entre 75 et 100°C et des pH optimaux allant de 4 à 6. Les *Thermoproteales* sont capables de chimioorganotrophie et de chimiolithotrophie et sont très majoritairement anaérobies strictes à l'image des archées appartenant aux genres *Thermoproteus* et *Thermofilum* qui utilisent le soufre élémentaire en tant qu'accepteur d'électron. Les *Thermoproteales* du genre *Pyrobaculum* sont néanmoins aérobies facultatives et en condition anaérobie ces derniers sont capables d'utiliser, en plus du soufre élémentaire, les nitrates ou le fer ferrique comme accepteur d'électron.

- Les *Acidolobales* sont nettement moins représentées que les 2 ordres précédents puisque seulement 2 genres *Cladisphaera* et *Acidolobus* y ont pour le moment été répertoriés. Les *Acidolobales* sont anaérobies et thermoacidophiles avec des températures optimales de croissance de l'ordre de 70-75°C pour le genre *Cladisphaera* et de l'ordre de 80-85°C pour le genre *Acidolobus*. Toutes ces crenarchées, dont les pH optimaux sont de 3,5-4, sont chimioorganotrophes et leur croissance est stimulée en présence de soufre élémentaire qui sert d'accepteur d'électron (Prokofeva *et al*., 2009).

- Les *Fervidococcales* enfin ne comptent à ce jour qu'un seul représentant isolé et caractérisé *Fervidococcus fontis.* Il s'agit d'une archée thermophile et modérément acidophile dont la température optimale de croissance se situe à 65-70°C et le pH optimal à 5,5-6. Cette archée est par ailleurs fermentaire et anaérobie stricte (Perevalova *et al*., 2010).

- Le cinquième ordre des *Desulfurococcales* comprend des crenarchées hyperthermophiles, neutrophiles, chimiolithoautotrophes ou chimioorganotrophes et anaérobies pour la plupart. Si le genre *Desulfurococcus* est isolé au niveau de solfatares (Perevalova *et al*., 2005), les membres de cet ordre peuplent quand même beaucoup plus généralement les sources hydrothermales côtières et les sources océaniques profondes.

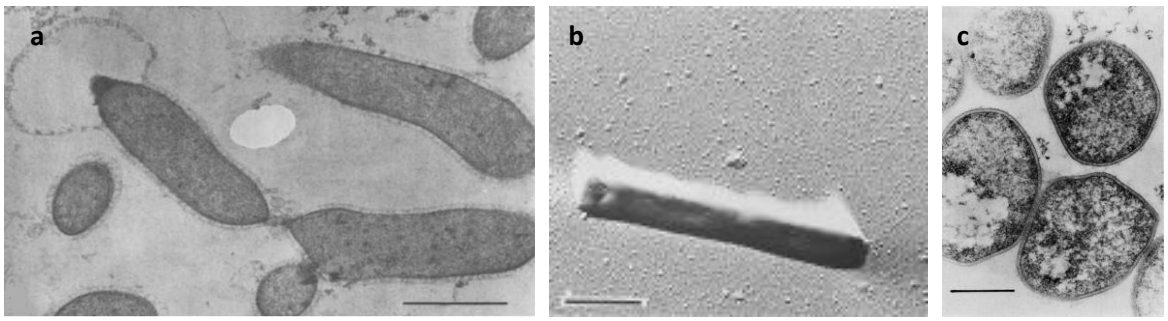


Figure 27 : 3 exemples de microorganismes thermophiles ou hyperthermophiles terrestres observés en MET
a : Coupes ultrafines de *Fervidobacterium islandicus* (D'après Huber *et al*., 1990)
b : *Pyrobaculum aerophylum* (D'après Volkl *et al*., 1993)
c : Coupes ultrafines d'*Acidianus infernus* (D'après Segreger *et al*., 1986)

2.3. DIVERSITE VIRALE ASSOCIEE AUX SOURCES CHAUDES TERRESTRES

Sur approximativement 5600 virus de procaryotes connus aujourd'hui, près d'une soixantaine de virus seulement, dont une majorité d'archéovirus, sont associés à des hôtes thermophiles ou hyperthermophiles. Ces virus ont essentiellement été isolés à partir des sources chaudes terrestres. Les températures optimales de croissance de leurs cellules hôtes sont comprises entre 45 et 75°C en ce qui concerne les bactéries et entre 65 et 100°C pour ce qui est des archées.

Si leur nombre est encore limité, la diversité morphologique de leurs virions est souvent exceptionnelle et leurs génomes sont la source de très nombreuses nouvelles fonctions biologiques (Prangisvili & Garett, 2005 ; Lin *et al*., 2011 ; Peng & Uldahl, 2013).

2.3.1. Système hôtes/virus décrits au sein du domaine bacteria

Treize bactériovirus thermophiles issus des sources chaudes terrestres ont été isolés et caractérisés en détail. Ils sont essentiellement associés au genre *Thermus* mais infectent également des bactéries des genres *Bacillus, Geobacillus, Meiothermus* et *Rhodothermus*. Presque tous ces virus sont lytiques et ils appartiennent très majoritairement aux familles des *Myoviridae* ou des *Siphoviridae*. Seuls trois d'entre eux ont des virions non caudés, deux ont été assignés à la famille des *Tectiviridae* et un à la famille des *Inoviridae* (Uldahl & Peng, 2013). Ces deux familles pourraient néanmoins se révéler mieux représentées qu'il n'y paraît au sein des sources chaudes terrestres. Un vaste criblage a en effet permis l'isolement de 115 particules virales, associées à des bactéries du genre *Thermus*, dont plus de la moitié possédait des morphologies filamenteuses ou cubiques (Yu *et al*., 2006).

- **Au sein de la famille des *Myoviridae***

Sept myovirus thermophiles issus de sources chaudes ont été isolés et caractérisés.

ϕYS40 et **ϕTMA**, isolés au Japon, sont respectivement responsables de la formation de plages de lyse chez les souches *Thermus Thermophilus* HB8 et *Thermus Thermophilus* HB27 cultivées à 65°C. Leurs virions, constitués d'une capside icosaédrique de 125 nm de diamètre et d'une queue rigide et contractile de 178 nm de long et 27 nm de large, sont tout à fait semblables.

Comme au niveau du myovirus T4, une structure d'attachement ornée de six fibres est observée à la base de la queue de ces deux virions. Les génomes de ϕYS40 et ϕTMA sont de longs ADN double brin linéaires, fréquemment circularisés, d'environ 150 kb très similaires entre eux. Ils partagent 155 ORFs et, dans les deux cas, seuls 25 % des protéines prédites ont présentées des similarités de séquence dans les bases de données (Sakaki & Oshima, 1975; Narishkina *et al*., 2006 ; Tamakoshi *et al*., 2011 ; Uldahl & Peng, 2013).

Le troisième *myovirus* thermophile décrit, associé à une bactérie du genre *Thermus*, provient d'une source chaude islandaise. Il s'agit du virus **TS2126** qui infecte *Thermus scotoductus* et dont le génome, un ADN double brin linéaire d'environ 90 kb, porte notamment un gène codant pour une ARN ligase 1 du type de celle retrouvée chez le phage T4. Cette enzyme s'est avérée thermostable et avec de bonnes propriétés de ligation à l'ADN simple brin (Blondal *et al*., 2005 ; Uldahl & Peng, 2013)

Une enzyme de ce type a également été retrouvée au sein du génome du virus **RM378**, un autre myovirus thermophile infectant la souche *Rhodothermus marinus*, également isolée en Islande. Au sein du génome de RM378, le gène de l'ARN ligase est à proximité d'un gène codant pour une polynucléotide kinase qui a été purifiée et caractérisée. L'ARN ligase et la polynucléotide kinase sont deux enzymes notamment codées par le myovirus T4 et utilisées par lui afin de répondre aux mécanismes de défense antiviraux mis en place par son hôte *E.coli*, basés sur la dégradation des ARN de transfert. La polynucléotide kinase intervient dans la synthèse de fragment d'ARNt qui vont permettre la ligation, assurée par l'ARN ligase, des ARN de transfert que l'hôte a lui même volontairement clivés afin d'empêcher la production de virions. Il est donc supposé que le virus RM378 ait à faire face chez *R. marinus* au même mécanisme de défense que celui développé par *E.coli* à l'encontre du phage T4 (Blondal *et al*., 2004., Uldahl & Peng, 2013).

Les myovirus **GBSV1** et **BV1** sont issus de sources chaudes chinoises et apparaissent très similaires. Ils provoquent la lyse de souches, elles même semble-t-il très proches, *Geobacillus* sp. 6K51 et *Geobacillus* sp. 6K512 respectivement, lesquelles sont cultivées à 65°C. Les virions libérés se composent d'une capside icosaédrique de 60 nm de diamètre et d'une queue contractile de 80 nm à 150 nm de long. Les génomes, qu'ils contiennent, des ADN double brin linéaires de 34 à 35 kb, présentent 54 ORFs. L'analyse de ces derniers révèle dans les deux cas que plus de la moitié d'entre eux partagent des similarités de séquence avec plusieurs espèces de *Bacillus* et *Geobacillus* ainsi que leurs bactériovirus. Cette analyse démontre également et plus

étonnamment que sept à huit ORFS, présents au sein des génomes, sont très similaires à ceux retrouvés chez la bactérie pathogène intracellulaire opportuniste *Listeria inoccua.* La présence d'un ORF codant pour une intégrase chez GBSV1 laisse enfin envisager le caractère tempéré de ce dernier, chez qui l'étude des transcrits a par ailleurs démontré la transcription de 47 ORFs dans une direction et celles des 7 autres dans la direction opposée (Liu *et al*., 2009, 2010 ; Uldahl & Peng, 2013).

Le dernier myovirus, **MMP17**, également isolé à partir d'une source chaude chinoise, provoque la lyse de la souche *Meiothermus* TG17 cultivée entre 55 et 60°C. La production virale est maximale dans cette gamme de température et n'a plus lieu au-delà de 62,5°C. Les particules virales contiennent un ADN double brin linéaire de 33,5 à 39,5 kb et sont composées d'une capside icosaédrique de 42 nm de diamètre et d'une queue contractile de 120 nm de long. Ces dernières semblent perdre leur caractère infectieux lorsque la température dépasse les 65-70°C. La plus grande sensibilité apparente à la chaleur de MMP17 en comparaison des autres myovirus, précédemment décrits, trouve sans doute une explication dans le fait que son hôte tolère des maxima de températures plus bas que ceux des autres *myovirus* thermophiles (Lin *et al*., 2011).

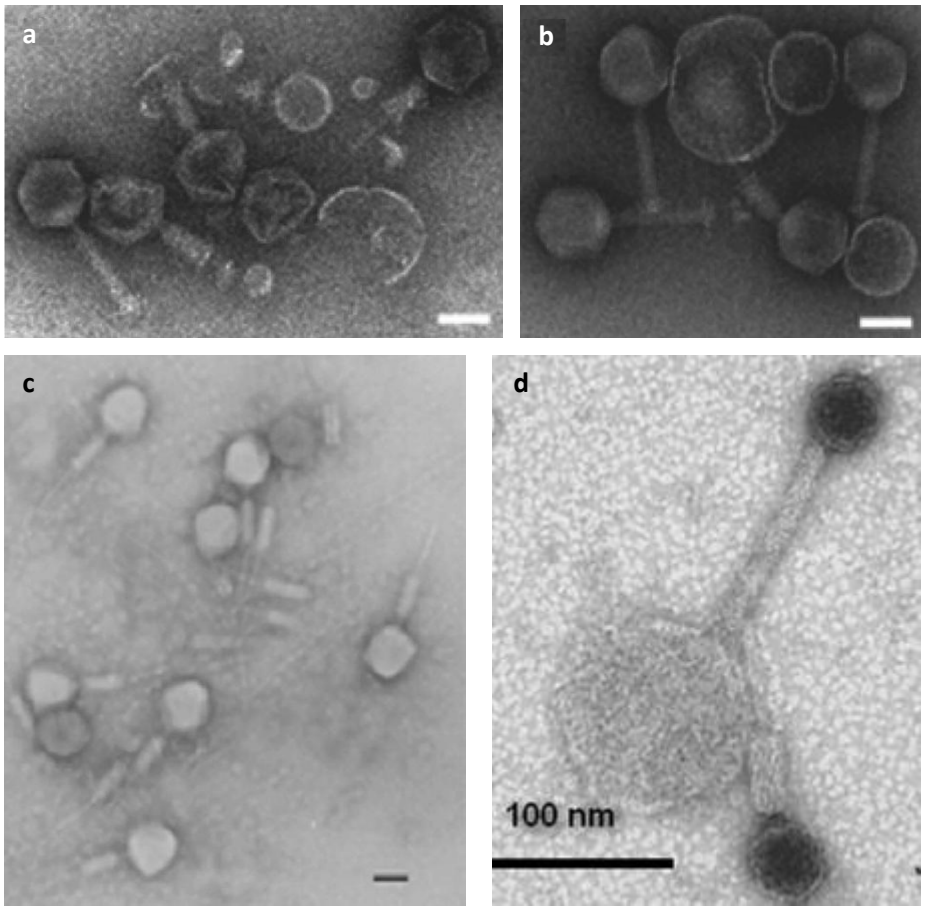


Figure 28 : Quelques exemples de myovirus thermophiles observés en MET
a et b : ϕYS40 et ϕTMA. Echelles : 100 nm (D'après Tamakoshi *et al.*, 2011)
c : GBSV1. Echelle : 50 nm (D'après Liu *et al.*, 2009) . d : MMP17 (D'après Lin *et al.*, 2011)

- **Au sein de la famille des *Siphoviridae***

Trois siphovirus thermophiles ont été isolés et caractérisés à partir de sources chaudes terrestres.

TSP4, infectant une souche de *Thermus* cultivée à 65°C, provient de la région du Tengchong dans le sud-ouest de la Chine. La taille de son génome, composé d'ADN double brin n'a pas été déterminée. Les virions produits à l'issue du cycle lytique se caractérisent par une capside icosaédrique de 73 nm de diamètre et une queue extrêmement longue et flexible de 785 nm de long et 10 nm de large. Le fait que l'extrémité de la queue des virions apparaît très fréquemment adsorbée à des débris cellulaires laisse présumer de la présence terminale de structures d'attachement. Bien que leurs habitats soient situés à des milliers de kilomètres, les caractéristiques morphologiques des virions des deux autres siphovirus thermophiles P23-45 et P74-26, issus de la péninsule russe du Kamtchatka, s'avèrent très similaires à celles des virions de TSP4 (Lin *et al.*, 2010 ; Uldahl & Peng, 2013) .

P23-45 et **P74-26** provoquent l'un comme l'autre la lyse de la souche *Thermus thermophilus* HB8, utilisée pour la production de leurs virions. Ces derniers sont constitués de capsides de 75 nm de diamètre et de très longues queues flexibles de 823 nm de long et 8 nm de large. Les ADN viraux double brin de 83 et 84 kb, contenus dans les capsides, présentent 92 % d'identité nucléotidique et environ 95 % d'ORFs communs. Seuls 25 % des produits des gènes viraux ont pu être prédits ; l'analyse des génomes révèlent notamment la présence, dans leurs plus larges régions intergéniques, de répétitions en miroir d'homopurine et d'homopyrimidine. Ces répétitions, très inhabituelles au niveau d'ADN viral ou bactérien, sont beaucoup plus fréquentes chez les eucaryotes. Elles contribuent à la formation de triplex d'ADN stables, c'est-à-dire des régions où l'ADN double brin adopte une conformation triple brin qui bloque la réplication et la transcription et induit de l'instabilité génétique. Il est en conséquence envisagé que de tels éléments puissent intervenir dans la régulation de la réplication et de l'expression des gènes chez P23-45 et P74-26 (Minakhin *et al*., 2008 ; Yu *et al*., 2006 ; Lin *et al*., 2010 ; Uldahl & Peng, 2013).

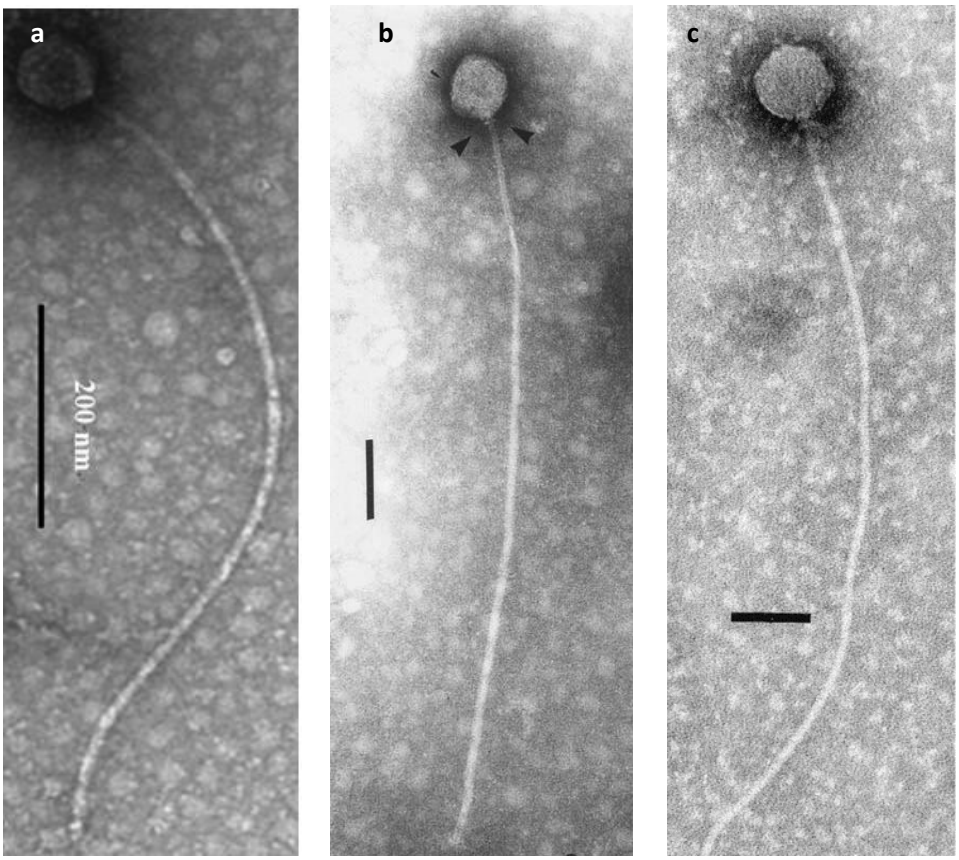


Figure 29 : Les trois siphovirus thermophiles observés en MET
a : TSP4 (D'après Lin *et al*., 2010)
b et c : P23-45 et P74-26. Echelles : 100 nm
(Minakhin *et al*., 2008 ; Yu *et al*., 2006)

- **Au sein de la famille des *Tectiviridae***

Deux tectivirus thermophiles **P23-77** et **ϕ IN93** sont répertoriés. Ces derniers entraînent respectivement la lyse des souches *Thermus Thermophilus* ATCC 33923 cultivée à 70-75°C et *Thermus Thermophilus* TZ2 cultivée à 65°C. Les virions produits, caractéristiques de cette famille, sont composés d'une capside protéique icosaédrique à l'intérieur de laquelle une vésicule membranaire enferme un génome linéaire à ADN double brin. Ces génomes, d'approximativement 17 à 20 kb, semblent ne posséder uniquement que les fonctions basiques nécessaires à leur réplication et encapsidation. Le génome de ϕ IN93 a été étudié plus en détail et 20 % des 39 ORFs qui le composent ont pu se voir attribuer des fonctions. Ont été identifiées notamment des protéines impliquées dans la réplication ou le processus lytique. L'étude des transcrits révèle la présence de quatre unités de transcription au sein du génome. Trois unités, transcrites consécutivement dans la même direction, interviennent au cours du cycle lytique du virus alors que la quatrième unité, dévolue à l'établissement d'un cycle lysogénique, est transcrite dans le sens opposé (Jaatinen *et al*., 2008 ; Matsushita & Yanase, 2009 ; Uldahl & Peng, 2013).

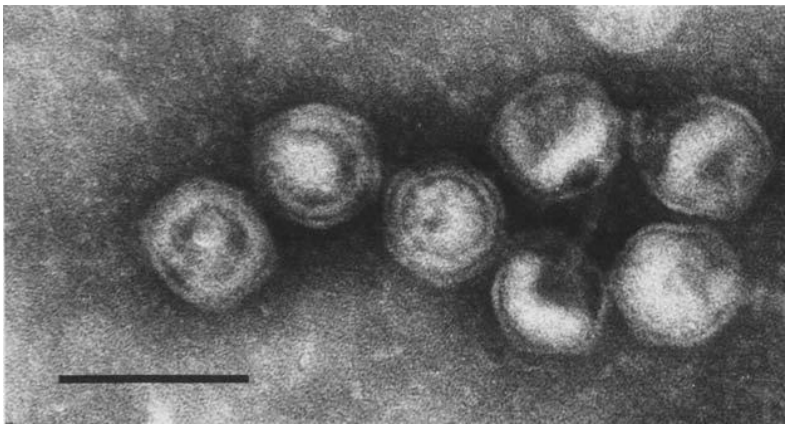


Figure 30 : 2 tectivirus thermophiles ont été caractérisés mais plusieurs ont été observés en MET
L'exemple du tectivirus P37-83 dont les micrographes sont publiés. Echelle : 100 nm
(D'après Yu *et al*., 2006)

- **Au sein de la famille des *Inoviridae***

Un seul représentant thermophile est à ce jour décrit au sein de cette famille. Il s'agit du bactériovirus **PH75** infectant la souche *Thermus Thermophilus* HB8 cultivée à 70°C. Les particules virales filamenteuses sortent des cellules infectées par extrusion sans en provoquer

la lyse. Ces particules font environ 910 nm de long et 6 nm de large et sont munies de deux structures terminales non identiques. Une seule de leurs extrémités, composée de protéines reliées à un pilus, se révèle en fait impliquée dans l'attachement à l'hôte cellulaire. Les capsides hélicoïdales des virions protègent un ADN circulaire simple brin de 6500 nucléotides et sont formées de 2700 copies d'une sous-unité protéique de 46 résidus. Cette sous-unité majoritaire de capside, sans homologie de séquence, se distingue de celles retrouvées chez les virus mésophiles de la famille par sa capacité d'assemblage in vivo à 70°C et sa stabilité jusqu'à 90°C au moins (Pederson *et al.*, 2001 ; Tsuboi *et al.*, 2005 ; Uldahl & Peng, 2013).

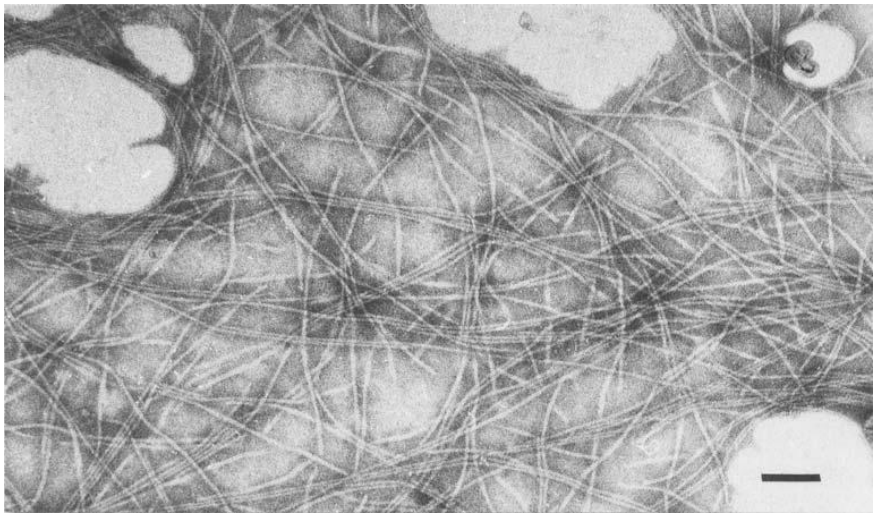


Figure 31 : L'unique inovirus thermophile décrit à ce jour observé en MET
PH75. Echelle : 100 nm (D'après Yu *et al.*, 2006)
Plusieurs autres inovirus ont cependant été observés en MET

2.3.2. *Système hôtes/virus décrits au sein du domaine archaea*

La recherche et la caractérisation de virus thermophiles et hyperthermophiles associés aux archées du phylum des *Crenarchaeota* furent initiées par l'équipe de Wolfram Zillig à l'Institut Max Planck de Martinsried à partir des années 1980. Leurs investigations, couronnées de succès, se traduisirent notamment par la découverte du premier virus hyperthermophile SSV1 associé à la crenarchée *Sulfolobus shibatae.* Ceci marqua en 1983 le point de départ d'une thématique de recherche qui allait se révéler particulièrement excitante et qui se poursuit depuis à l'échelle internationale grâce, notamment, à l'équipe de David Prangishvili à l'Institut Pasteur (Paris) ou celle de Mark Young dans le Montana (Etats-Unis).

Environ 35 virus associés au *Crenarchaeota* et appartenant très majoritairement aux ordres des *Sulfolobales* et des *Thermoproteales* ont aujourd'hui été isolés et caractérisés. La diversité morphologique de leurs particules virales se révèle exceptionnelle et inclue des morphotypes tout à fait uniques. Ces particules virales sont qualifiées de pléomorphes et se distinguent très clairement de celles retrouvées au sein des deux autres domaines du vivant. La distinction des virus de *Crenarchaeota* ne s'arrête pas au seul plan morphologique. Les génomes linéaires ou circulaires de ces virus, après séquençage, ont révélé une majorité de gènes aux fonctions inconnues. Ils sont tous composés d'un ADN double brin, à l'exception de l'un d'entre eux à ADN simple brin. Les virus de *Crenarchaeota* entretiennent, enfin, très majoritairement avec leurs hôtes des relations du type état porteur ou du type lysogénique, 3 de ces virus seulement sont purement lytiques. Les processus viraux, uniques en leur genre, mis en évidence au cours de la libération ou de la propagation de certains des virions chez les *Crenarchaeota* renforcent encore un peu plus l'originalité de ces virus hyperthermophiles.

Sur la base de leur génome et de leur morphologie unique, les virus de *Crenarchaeota* ont contribué à la création de 9 nouvelles familles virales homologuées ou en cours d'homologation :

- **La famille des *Fuselloviridae***

Cette famille, dont les 9 membres sont exclusivement associés à des crenarchées appartenant aux genres *Sulfolobus* et *Acidianus*, est l'une des mieux représentées. Huit *Sulfolobus* spindle-shaped viruses (**SSV1**, **SSV2**, **SSV4**, **SSV5**, **SSV6**, **SSV7**, **SSVk1** and **SSVrh**) et un *Acidianus* spindle-shaped virus (**ASV1**) ont précisément été isolés.

Les particules virales produites, en forme de citron, sont dites fusiformes et font approximativement entre 80 et 100 nm de long pour 55 à 60 nm de large. Ces virions présentent en plus de fines fibres caudales à l'une de leurs extrémités qui leurs permettent d'être régulièrement attachés à des débris cellulaires ou de s'attacher entre eux et contribuer ainsi à la formation de structures en rosette (Pina *et al*., 2011 ; Uldahl & Peng., 2013). Il y a cependant deux exceptions avec SSV6 et ASV1 dont les particules ont tendance à être plus pléomorphes. Ces dernières ne présentent, par ailleurs, que 3 ou 4 fibres caudales plus épaisses qui ne leurs permettent pas de former les rosettes caractéristiques (Redder *et al*., 2009). Du point de vue génomique, les *Fusellovirus* possèdent des génomes à ADN double brin circulaire, très similaires entre eux, dont les tailles sont comprises entre 14,7 et 24,2 kb. Il n'a pour le moment été possible

d'attribuer des fonctions qu'à 7 des 13 ORFs que ces génomes ont en commun. Ils codent tous notamment pour une integrase de la famille des tyrosines recombinase qui a très bien été caractérisée, notamment chez SSV1 et qui permet à ces génomes viraux de s'intégrer au sein du chromosome de leurs hôtes.

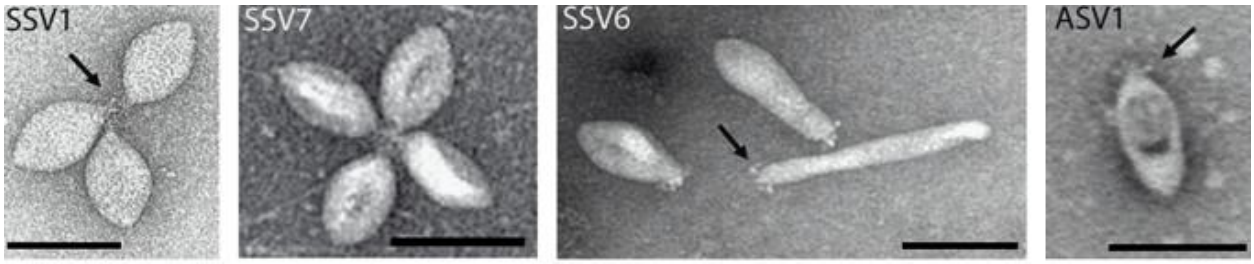


Figure 32 : Quelques membres de la famille des *Fuselloviridae* observés en MET
(D'après Pina *et al.*, 2011)

- **La famille des *Bicaudaviridae***

Son unique représentant est *Acidianus* two tailed virus (**ATV**) qui infecte la crenarchée *Acidianus convivator* AA9 cultivée à 75°C. Le cycle lysogénique du virus, qui implique l'intégration du génome viral au sein du chromosome de son hôte, peut être interrompu à l'issue de l'exposition à différents stress comme les UV ou la mitomycine C. ATV déclenche alors un cycle lytique et possède une propriété unique. Les particules virales fusiformes de 243 nm de long et 119 nm de large, une fois libérées dans le milieu extracellulaire et maintenues à une température proche de celle nécessaire à la croissance de l'hôte, ont l'étonnante capacité de continuer leur développement. Les virions s'allongent en développant deux extensions à leurs extrémités qui se terminent en structures d'ancrage. Ce processus viral, qui s'effectue en dehors et indépendamment de l'hôte initial et de toutes sources d'énergie, augmente nettement la surface de contact des virions dont les dimensions sont alors de 744 nm de long et 85 nm de large. Ce développement extracellulaire des virions est interprété comme un moyen d'accroître leur probabilité d'interaction avec des cellules hôtes potentiels et ainsi pallier les conditions extrêmes de leur environnement à faible densité cellulaire. Du point de vue génomique, ATV se compose d'un ADN double brin circulaire de 62,7 kb. Il code au total pour 72 protéines prédites dont 11 protéines structurales et une intégrase de la famille des tyrosine recombinase (Häring *et al*., 2005 ; Prangishvili *et al*.,2006 ; Pina *et al*., 2011 ; Uldahl *et al*., 2013).

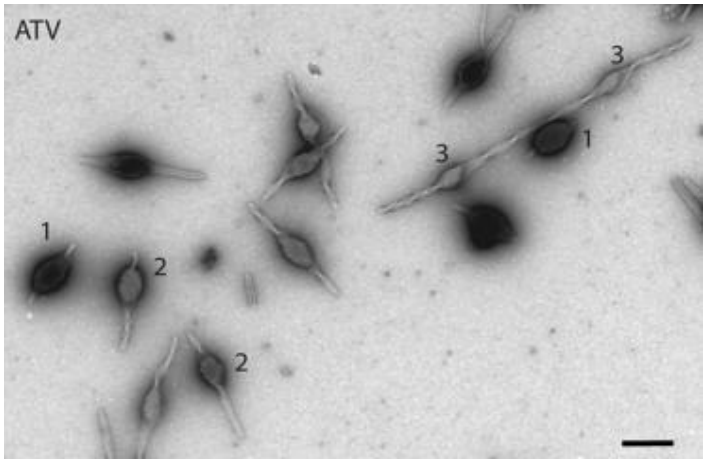


Figure 33 : L'unique membre de la famille des *Bicaudaviridae* observé en MET
ATV aux étapes successives de son développement extracellulaire, notées 1,2 et 3
(D'après Pina *et al.*, 2011)

- **La famille des *Lipothrixviridae***

Cette famille compte 11 représentants isolés incluant sept *Acidianus* filamentous virus (**AFV1, AFV2**, **AFV3**, **AFV6**, **AFV7**, **AFV8** et **AFV9**), 1 *Sulfolobus islandicus* virus (**SIFV**) et 3 *Thermoproteus tenax* virus (**TTV1**, **TTV2** et **TTV3**). Les virions produits par les membres de cette famille correspondent à des filaments flexueux et font globalement entre 900 nm et 2000 nm de long pour environ 24 nm de large. Ils sont recouverts d'une enveloppe dont les lipides proviennent des cellules hôtes infectées et possèdent une structure terminale à leurs 2 extrémités qui leurs permet de s'ancrer aux récepteurs de leurs cellules hôtes. Ces structures caractéristiques vont cependant pouvoir différer en fonction des virions. Sur le plan génomique, tous renferment des génomes à ADN double brin linéaires dont les tailles sont comprises entre 15,8 et 56 kb mais qui se situent majoritairement aux alentours de 40 kb. Ces génomes se caractérisent notamment par le fait d'être flanqués de séquences répétées inversées dont les longueurs varient de 11 pb à 800 pb en fonction des virus. Sur la base des structures terminales de leurs virions, de leurs propriétés génomiques et de leurs possibles stratégies de réplication, *les Lipothrixvirus* ont plus précisément été répartis au sein de 4 genres différents (Prangishvili & Garett, 2005). Sont ainsi distingués les genres *Alphalipothrixvirus* auquel appartient TTV1, *Betalipothrixvirus* avec TTV2, TTV3, SIFV, AFV3 AFV6, AFV7, AFV8 et AFV9, *Gammalipothrixvirus* et *Deltalipothrixvirus* auxquels sont rattachés AFV1 et AFV2 respectivement (Pina *et al*., 2011).

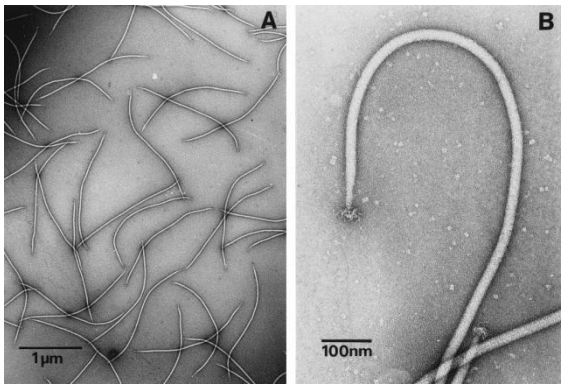


Figure 34 : L'un des représentants de la famille des *Lipothrixviridae* observé en MET
A : plusieurs particules virales SIFV. B : Les extrémités terminales de la particule SIFV
(D'après Arnold *et al.*, 2000)

- **La famille des *Rudiviridae***

Deux *Sulfolobus islandicus* rudivirus (**SIRV1** et **SIRV2**), 1 *Acidianus* rod-shaped virus (**ARV**) et 1 *Stygiolobus* rod-shaped virus (**SRV**) sont les quatre représentants de la famille des *Rudiviridae*. Les particules virales produites, en forme de bâtonnets rigides non enveloppés, font environ 23 nm de large et entre 610 et 900 nm de long. Leur longueur est en fait fonction de la taille des génomes, à ADN double brin linéaire, qu'elles contiennent. Cette caractéristique est également retrouvée chez les bactériovirus, à ADN simple brin, de la famille des *Inoviridae.* Les virions produits par les *Rudiviridae* présentent, par ailleurs, une organisation nucléoprotéique en hélice qui résulte de l'association de l'ADN viral avec de multiples copies d'une protéine majoritaire de capside hautement glycosylée. Cette dernière se révèle sur le seul plan structural très proche de celles du lipothrixvirus AFV1. A chacune de leurs extrémités, sont enfin retrouvées, 3 courtes fibres finales impliquées dans la reconnaissance à la surface des cellules hôtes. (Pina *et al*., 2011 ; Uldahl & Peng, 2013). Sur le plan moléculaire, les quatre génomes de *Rudiviridae* ont des tailles comprises entre 24,6 et 35,8 kb. L'analyse de ces derniers démontre qu'ils sont tous flanqués de longues séquences répétées inversées. Sur les 37 à 54 ORFs qui composent ces génomes, 17 s'avèrent conservés chez tous les *Rudiviridae*. En plus des 4 ORFs codant pour les protéines de structure, sont notamment aussi toujours retrouvés, trois ORFs codant pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN (Prangishvili *et al*., 1999 ; Vestergaard *et al*., 2005 ; Vestergaard *et al*., 2008 ; Pina *et al*., 2011 ; Uldahl & Peng, 2013).

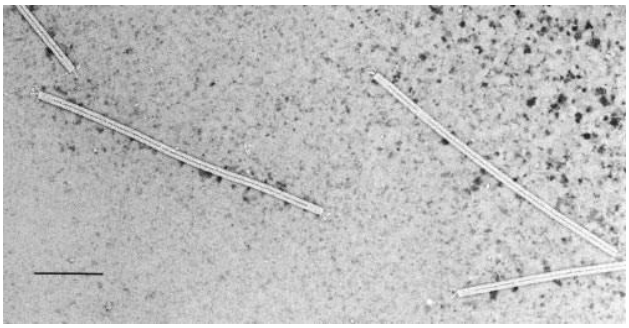


Figure 35 : L'un des *Rudiviridae* observé en MET
SIRV2 (D'après Prangishvili *et al.*, 1999)

Il était initialement envisagé que ces quatre virus entretiennent avec leurs hôtes une relation du type état porteur. L'étude détaillée du cycle de reproduction de SIRV2 a finalement démontré le caractère lytique de ce dernier et mis en évidence un mécanisme viral de libération des virions tout à fait original. De manière surprenante, l'infection de la souche *Sulfolobus islandicus* LAL14/1 par le virus SIRV2 s'accompagne de la formation intracellulaire de VAPs (Virus-Associated Pyramids) ou pyramides associées au virus. Ces structures pyramidales, géométriques et stables, résultent de l'auto assemblage d'une seule protéine, P98, codée par SIRV2. Les pyramides, une fois formées, sont utilisées pour permettre la libération des virions. A la fin du cycle infectieux les VAPs, qui pointent à la surface de la cellule infectée, finissent par perforer la paroi cellulaire, elles s'ouvrent et contribuent ainsi à l'apparition de très nombreuses ouvertures desquelles s'échappent les particules virales matures et les cellules infectées se vident en conséquence (Bize *et al.*, 2009 ; Quax *et al.*,2011). Ce processus a été décrit chez un autre virus de crenarchée hyperthermophile, très différent et à ce jour non classé, *Sulfolobus* turreted icosahedral virus 1 (STIV1) (Maaty *et al*., 2006 ; Fu & Johnson, 2012). L'appellation « virodome » a été proposée pour désigner les structures virales pyramidales caractéristiques (Quax & Prangishvili., 2013) impliquées dans ce processus de lyse qui, d'après certaines données de métagénomique, pourrait s'avérer en fait très répandu chez les virus infectant les thermoacidophiles (Snyder *et al*., 2013).

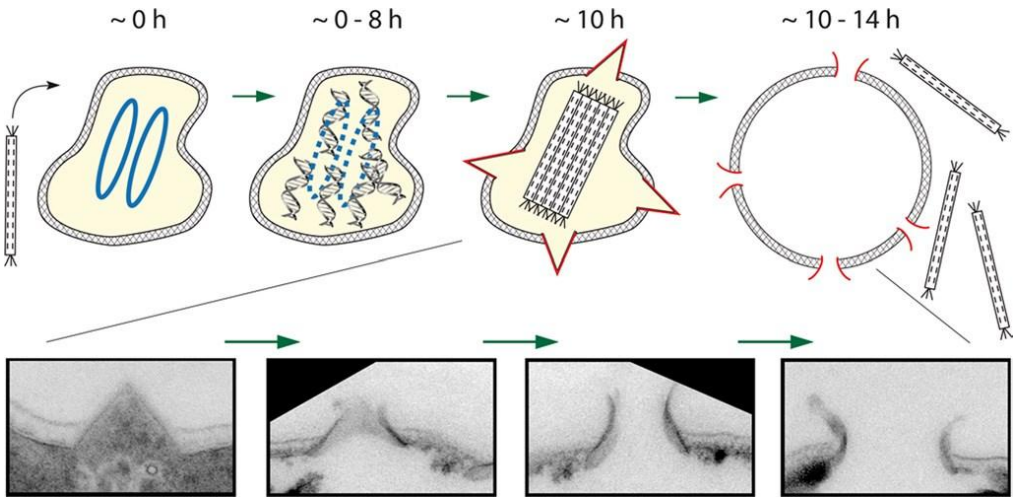


Figure 36 : Représentation schématique des principales étapes du cycle infectieux de SIRV2
A t 0h infection de l'hôte par SIRV2. Entre t 0h et t 8h dégradation du génome cellulaire et synthèse concomitante de l'ADN viral. A t 10h les virions sont regroupés dans le cytoplasme et les VAPs pointent à la surface de la cellule hôte. Entre t 10h et t 14h les VAPs s'ouvrent permettant la libération des virions (D'après Bize *et al.*, 2009)

Les *Lipotrixviridae* et les *Rudiviridae* constituent à ce jour les deux seules familles de virus dont les virions linéaires contiennent un ADN double brin. Si les membres de ces familles diffèrent significativement tant du point de vue de la complexité de leurs virions que des mécanismes impliqués dans la réplication de leurs génomes, des études structurales et génomiques ont depuis peu révélé l'existence d'un lien évolutif solide entre eux. Sur la base de ces résultats, il a donc été proposé d'unifier ces deux familles d'archéovirus hyperthermophiles au sein du nouvel ordre taxonomique des *Ligamenvirales* (Prangishvili & Krupovic, 2012).

- **La famille des *Guttaviridae***

Sulfolobus neozelandicus droplet-shaped virus (**SNDV**) constitue ou constituait le seul représentant de la famille des *Guttaviridae*. Il était associé à la souche néozélandaise *Sulfolobus* STH3/1 cultivée à 80°C et entretenait avec celle-ci une relation du type état porteur. Les particules virales enveloppées, en forme de gouttelette ou de ruche de 110 à 185 nm de long et 70 à 95 nm de large, avec à l'une de leurs extrémités un bouquet de fines et longues fibres hypothétiquement impliquées dans la reconnaissance hôte/virus, contenaient un génome à ADN double brin circulaire de 20 kb modifié par des méthylations dam. La caractérisation de ce virus, n'a pu être approfondie car il semble qu'il ait naturellement été curé des cultures en collection (Arnold *et al*., 2000 ; Pina *et al*., 2011 ; Uldahl *et al*., 2013).

Figure 37 : Le seul membre des *Guttaviridae* observé en MET
SNDV (D'après Pina *et al*., 2011)

- **La famille des *Globuloviridae***

Pyrobaculum spherical virus (**PSV**) et *Thermoproteus tenax* virus 1 (**TTSV1**) ont tous deux contribué à la création de cette famille. Obtenus initialement à partir de cultures d'enrichissement, leurs virions sont capables d'infecter les souches *Pyrobaculum* sp. D11 et *Thermoproteus tenax* cultivées à 85°C desquels ils sont ensuite continuellement produits sans que cela n'entraine de lyse ou de retard de croissance. Les virions libérés sont très similaires tant du point de vue morphologique que génomique. Il s'agit de particules enveloppées sphériques de 100 nm de diamètre pour PSV et de 70 nm de diamètre pour TTSV1. Trois protéines structurales dont une principale de 33 kDa ont été identifiées pour ces virions qui présentent une organisation nucléoprotéique hélicoïdale. Les génomes viraux de 28,3 (PSV) et 21,6 kb (TTSV1), qu'ils protègent, sont composés d'ADN double brin linéaires avec des séquences terminales répétées inversées. Ils portent par ailleurs des gènes essentiellement putatifs et sans homologies. Quinze ORFs retrouvés au sein de ces génomes sont homologues entre eux (Häring *et al*., 2004 ; Pina *et al*., 2011).

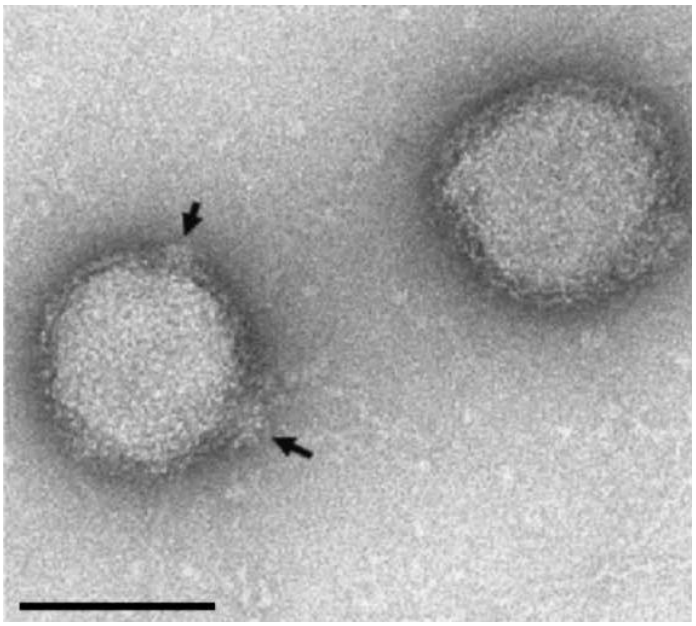


Figure 38 : L'un des deux membres de la famille des *Globuloviridae* observé en MET
Deux particules virales PSV (d'après Häring *et al.*, 2004)

- **La famille des *Ampullaviridae***

Cette famille ne compte elle aussi qu'un seul et unique membre *Acidianus* bottle-shaped virus (**ABV**). Ce dernier infecte une souche d'*Acidianus* cultivée à 75°C et la production des particules virales, en forme de bouteille, s'accompagne d'un net retard de croissance pour l'hôte. Les dimensions des virions sont de 230 nm de long pour 4 nm de large au niveau du goulot et 75 nm de large au niveau du culot. Six protéines entrent dans la constitution de ces virions qui ne présentent aucun élément de symétrie icosaédrique ou hélicoïdale et qui, structurellement, sont parmi les plus complexes qui aient jamais été répertoriés en virologie. Le génome d'ABV est un ADN double brin linéaire de 23,9 kb pour lequel 57 ORFs ont été prédits. Seul trois d'entre eux présentent des similarités de séquences dans les bases de données. Il y a notamment un ORF codant pour une ADN polymérase de la famille B retrouvée chez le bactériovirus phi29, les archéovirus halophiles His1 et His2 ou l'adénovirus humain (Häring *et al*., 2005a ; Pina et al., 2011 ; Uldahl *et al*., 2013).

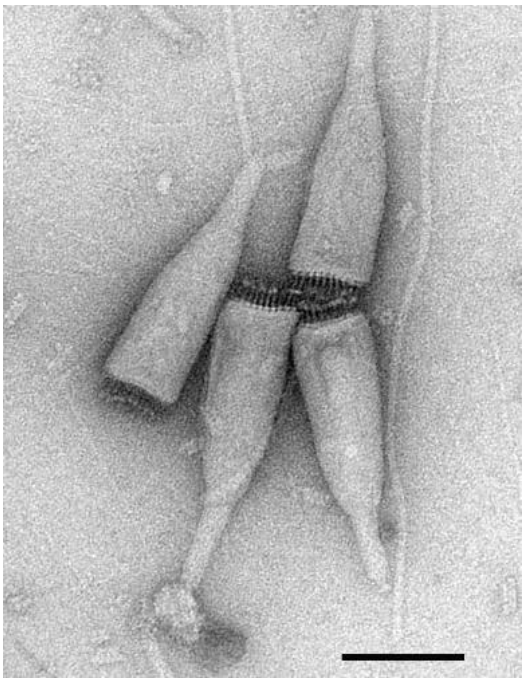


Figure 39 : Le représentant de la famille des *Ampullaviridae* observé en MET
Les particules virales ABV (D'après Häring *et al.,* 2005)

- **La famille des *Clavaviridae***

Elle a été créée consécutivement à la découverte d'*Aeropyrum pernix bacilliform* virus 1 (**APBV1**) dont les virions ont initialement été détectés dans des enrichissements de cultures, obtenus à partir d'échantillons de source thermale côtière. S'avérant notamment capable d'infecter la souche aérobie *Aeropyrum pernix* K1-K cultivée à 90°C, APBV1 représente le premier virus associé à l'ordre des *Desulfurococcales*. Il entretient avec son hôte une relation du type état porteur. Les particules virales produites sont en forme de bacille de 140 nm de long et 20 nm de large, avec une extrémité pointue et l'autre arrondie et ne sont composées que d'une seule protéine majeure glycosylée. Le génome qu'elles contiennent, un ADN double brin circulaire de 5278 pb, constitue à ce jour le plus petit génome de virus procaryote à ADN double brin qui ait été répertorié. Quatorze gènes putatifs, tous situés sur un seul brin et sans homologie de séquence, entrent dans sa composition (Mochizuki *et al*., 2010 ; Pina *et al.*,2011 ; Uldahl *et al*., 2013).

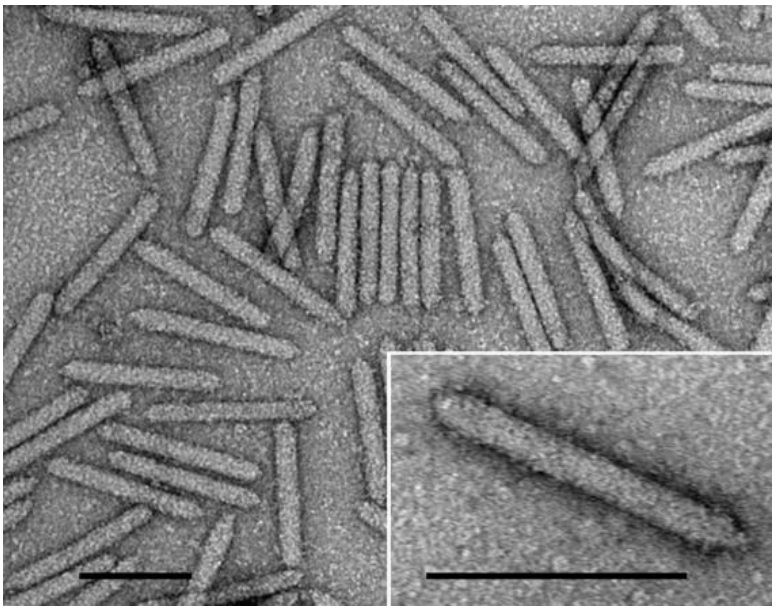


Figure 40 : Le seul et unique membre des *Clavaviridae*
Les particules virales APBV1 (D'après Mochizucki *et al.,* 2010)

- **La famille des *Spiraviridae***

Aeropyrum coil-shaped virus (**ACV**) est un second virus associé à l'ordre des *Desulfurococcales.* Il a été isolé à partir d'une autre souche d'*Aeropyrum pernix* cultivée à 90°C sans que son infectiosité puisse être démontrée. Les particules produites sont non enveloppées et se présentent sous la forme de cylindres de 220 nm de long et 28 nm de large avec des appendices. L'organisation hélicoïdale complexe de ces virions est le résultat d'une seule et unique nucléoprotéine circulaire protégeant un génome à ADN simple brin circulaire de 24,8 kb. ACV est à ce jour le seul virus à ADN simple brin caractérisé chez les archéovirus hyperthermophiles, il s'agit, en plus, du plus grand génome viral à ADN simple brin qui ait été répertorié. Sur les 57 ORFs qui composeraient ce génome, seuls 12 codent pour des protéines auxquelles des fonctions ont pu être attribuées. Ils codent notamment pour des protéines de liaison à l'ADN, des protéines impliquées dans le métabolisme des sucres et une recombinase. Les propriétés de son génome, alliées à l'architecture des virions qui le contiennent, font d'ACV un virus particulièrement original au sein du monde viral *(*Mochizuki *et al.*,2012).

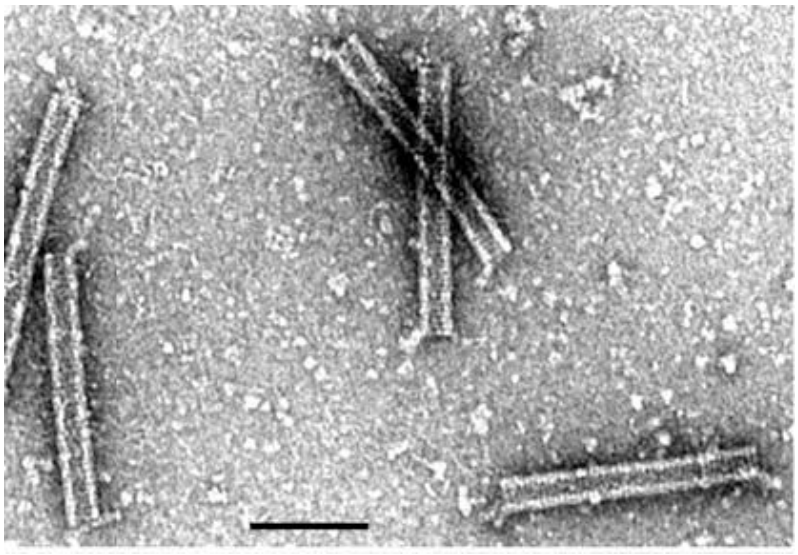


Figure 41 : Le représentant des *Spiraviridae* observé en MET
Les particules virales ACV (D'après Mochizucki *et al.*, 2010)

3. LES SOURCES HYDROTHERMALES OCÉANIQUES PROFONDES

3.1. UNE DECOUVERTE MAJEURE

L'océan profond, c'est à dire à plus de 1000 m de profondeur, recouvre les 2/3 du globe terrestre. Compte tenu des faibles températures et des fortes pressions hydrostatiques qui y règnent ainsi que des faibles concentrations en nutriments en raison de l'obscurité ambiante empêchant toute activité photosynthétique, cet environnement a longtemps été considéré comme étant l'un des plus pauvres de notre planète (Prieur, 1997). Cette conception des milieux abyssaux fut considérablement modifiée en 1977. Cette année-là, des géologues américains embarquèrent à bord du submersible Alvin afin d'explorer la dorsale du Pacifique aux larges des îles Galapagos ; ils y découvrirent la première source hydrothermale océanique profonde. L'équipage constata, avec étonnement, que des communautés animales tout à fait luxuriantes peuplaient cet environnement, pourtant situé à 2600 m de profondeur (Corliss & Ballard, 1977). Cette découverte eut un grand retentissement car elle témoignait et ce, pour la première fois, de l'existence d'un riche écosystème, basé sur la chimiosynthèse et à l'évidence indépendant de l'énergie solaire (Prieur, 1997).

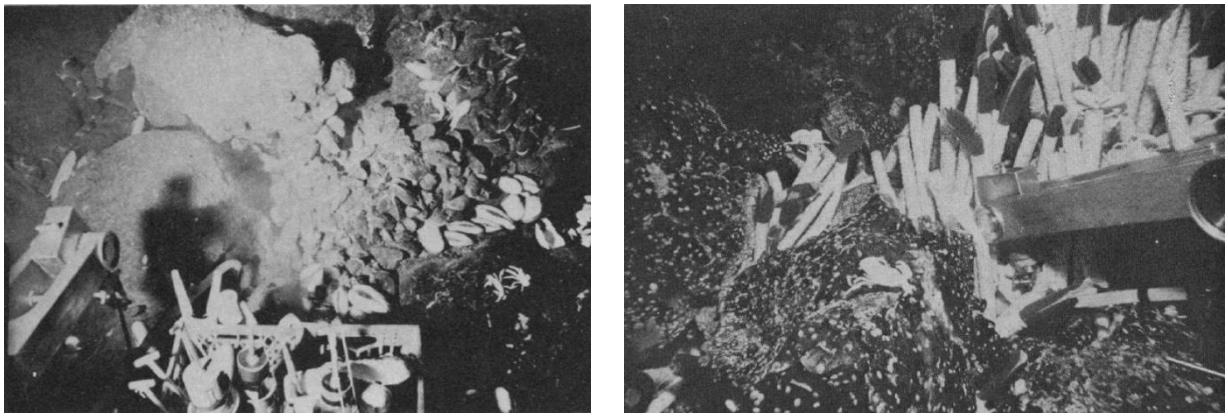


Figure 42 : L'existence d'un riche écosystème hydrothermal à plus de 2600 m de profondeur
Photographies réalisées à bord du submersible l'Alvin
(D'après Corliss *et al.*, 1979)

3.2. LOCALISATIONS ET FORMATION

De nombreuses autres sources hydrothermales océaniques profondes ont, depuis lors été répertoriées et explorées dans tous les océans, le long des dorsales médio-océaniques, à des profondeurs allant de 1000 à 4000 m environ. (Prieur *et al.*, 2004). D'autres sources hydrothermales océaniques profondes sont également retrouvées au niveau d'arcs volcaniques, de zones de points chauds et de bassins arrière arcs.

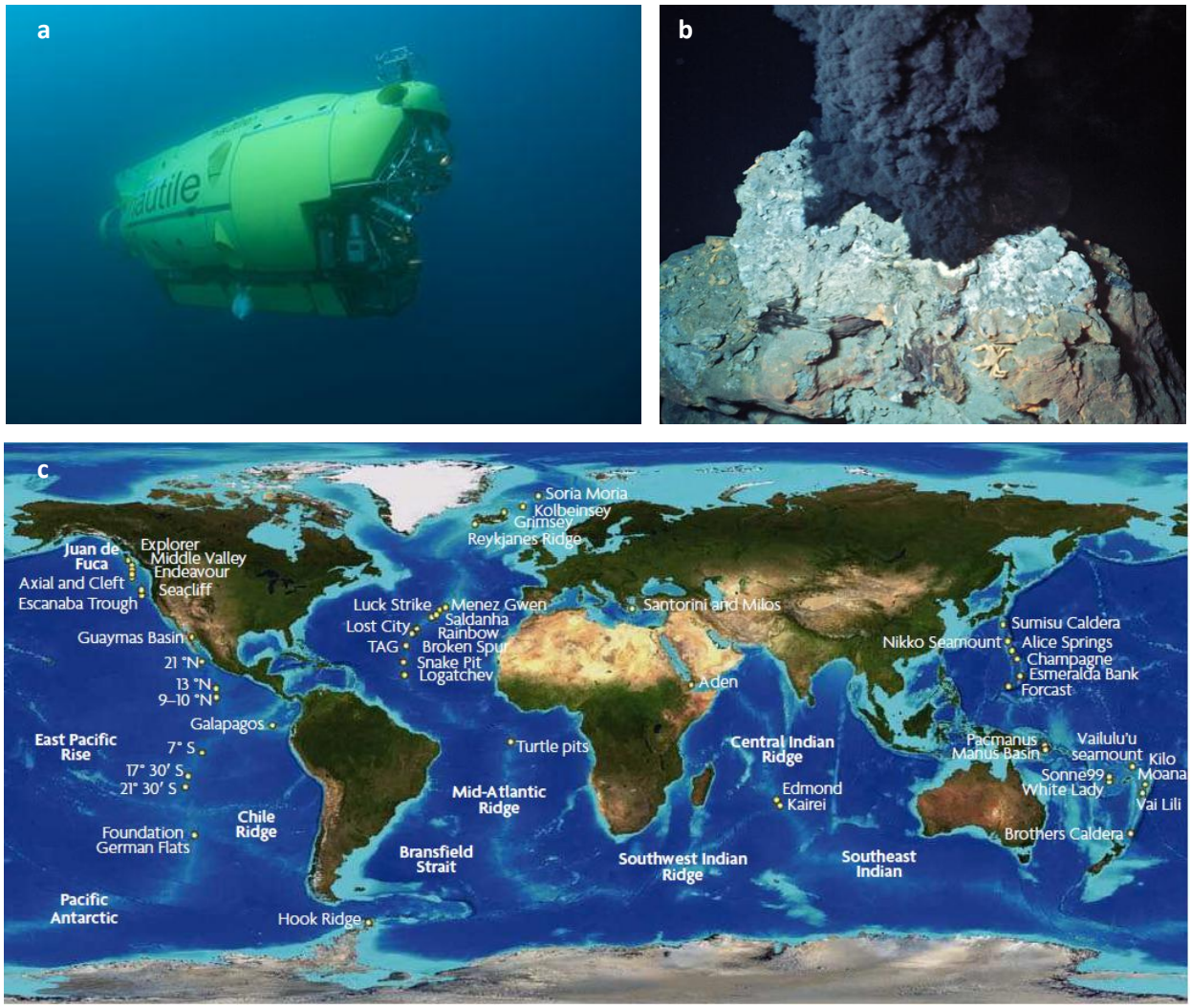


Figure 43 : L'exploration des sources hydrothermales océaniques profondes

a : La nécessité d'appareillages sous-marins : l'exemple du Nautile, sous-marin habité d'IFREMER(IFREMER)

b : L'exploration de « Snake Pit », l'un des nombreux sites hydrothermaux découverts depuis 1977 (WHOI)

c : Distribution globale des sources hydrothermales océaniques profondes (D'après Martin *et al.,* 2008)

Les dorsales médio-océaniques sont des zones à forte activité tectonique. Cette activité entraîne une remontée du magma qui forme des poches ou chambres magmatiques à quelques km de profondeur. En se refroidissant, le magma se rétracte et conduit à l'apparition d'anfractuosités dans la croûte terrestre. Les sources hydrothermales océaniques profondes sont la résultante de l'infiltration de l'eau de mer dans la croûte terrestre fracturée. L'eau de mer, qui s'est infiltrée, s'enrichit en divers minéraux et gaz dissouts en lessivant les roches qu'elle traverse et se réchauffe au contact de la chambre magmatique.

Au terme d'un circuit complexe, elle finit par rejaillir sous la forme de fluides hydrothermaux. Ces fluides, qui rejaillissent en des points focalisés du plancher océanique, sont très chauds (de l'ordre de 350°C), acides, anoxiques et enrichis en certains éléments et gaz dissouts. Ils précipitent, au contact de l'eau de mer froide (environ 2°C) et oxygénée, pour former des cheminées hydrothermales encore appelées fumeurs (Prieur, 1997). Les fumeurs noirs et les fumeurs blancs ou diffuseurs sont les deux principaux édifices hydrothermaux formés à cette occasion.

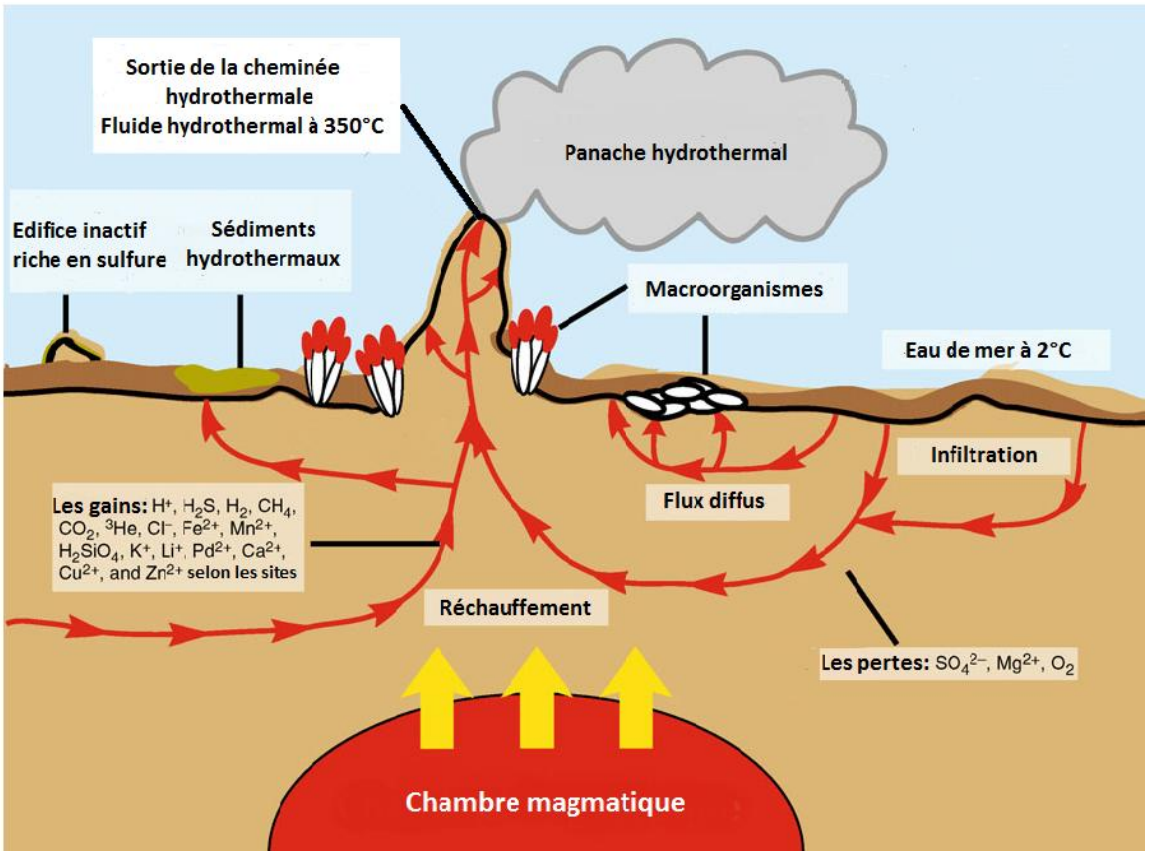


Figure 44 : Représentation schématique d'une source hydrothermale océanique profonde
(D'après Flores & Reysenbach, 2011)

3.3. DES OASIS DE VIE

Sur un plan biologique, les sources hydrothermales océaniques profondes constituent de véritables oasis de vie. Une macrofaune caractéristique se développe à proximité quasi immédiate des cheminées hydrothermales contribuant au caractère exubérant de ces environnements. Plus de 440 espèces animales ont déjà été observées au sein des différentes

sources hydrothermales explorées et plus de 90 % de ces espèces sont considérées comme endémiques. Les communautés animales hydrothermales sont isolées géographiquement et éphémères (Kelley *et al*., 2002). Elles se composent principalement d'invertébrés qui varient selon les régions océaniques concernées. Il va s'agir notamment de vestimentifères, de bivalves, de gastéropodes, d'annélides ou encore de crevettes (Prieur, 1997).

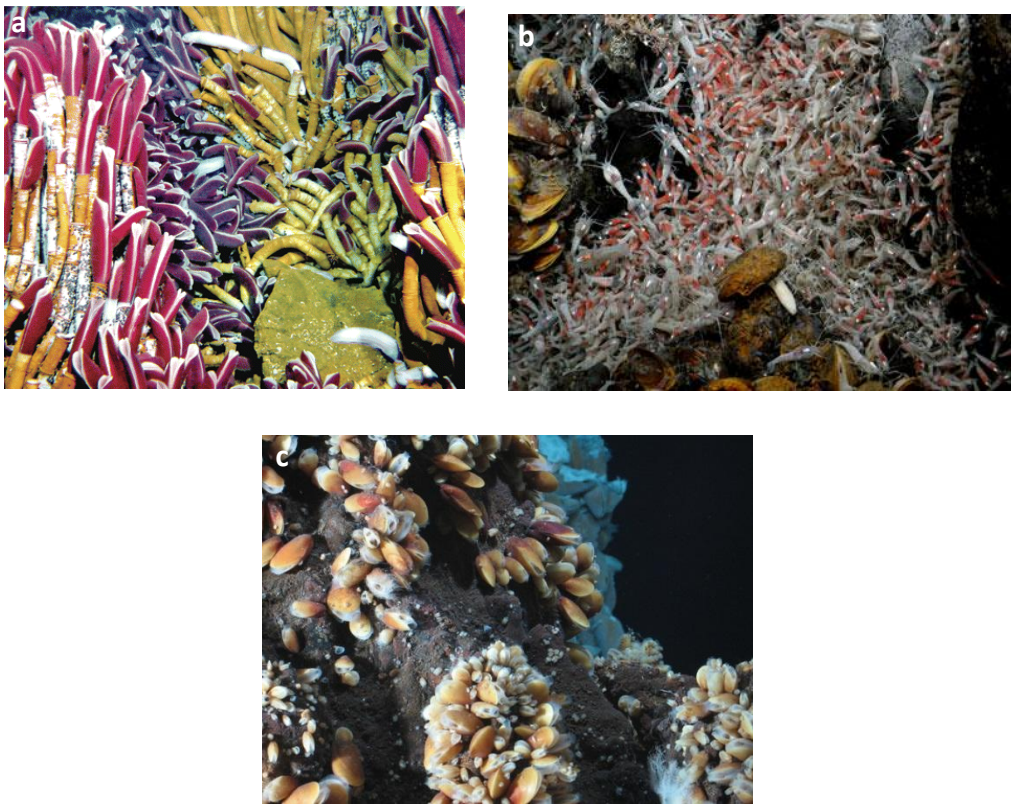


Figure 45 : Trois représentants de la macrofaune hydrothermale
a : Les tubes vers géants *Riftia pachyptila*, EPR 13°N (IFREMER, campagne PHARE 2002)
b : Essaim de crevettes du genre *Rimicaris* sur le site Logatchev (IFREMER, campagne Serpentine 2007)
c : Les moules *bathymodiolus azoricus* sur l'édifice hydrothermal Tour Eiffel (IFREMER, mission MoMARSAT 2010)

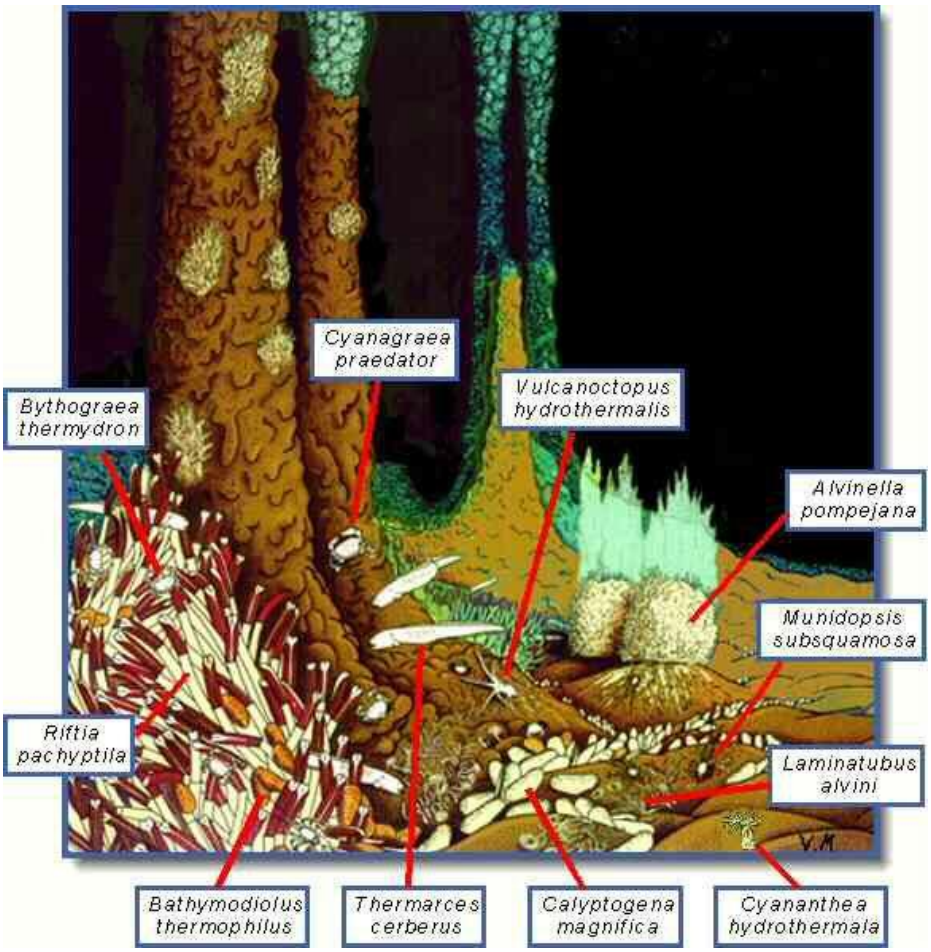


Figure 46 : Représentation schématique de la faune luxuriante à proximité d'une cheminée hydrothermale avec quelques unes des espèces caractéristiques de cet environnement
(Un dessin de V. Martin, IFREMER)

Le caractère temporaire de ces communautés s'explique par le fait que ces macroorganismes dépendent de producteurs primaires microbiens chimiosynthétiques, eux-mêmes entièrement dépendants de l'activité hydrothermale et de l'apport en pouvoir réducteur. Les communautés hydrothermales se développent sur des échelles de temps s'étendant sur plusieurs mois voire sur plusieurs décennies. Seules quelques espèces de crabes hydrothermaux sont prédatrices d'autres espèces animales. La majorité des macroorganismes hydrothermaux exploitent les microorganismes chimiosynthétiques en établissant des associations symbiotiques ou en consommant directement les microorganismes présents en suspensions ou sous forme de tapis (Kelley *et al*., 2002).

3.4. LES MICROORGANISMES CHIMIOSYNTHETIQUES

Les microorganismes ont un rôle majeur au sein des sources hydrothermales océaniques profondes. Ils sont, tout bonnement, à la base de ces écosystèmes en réalisant la chimiosynthèse. Ces derniers puisent l'énergie nécessaire à la synthèse de matière organique à partir de réactions chimiques, les substrats nécessaires à ces réactions étant les composés chimiques apportés par les fluides hydrothermaux. Les microbiologistes sont parvenus à isoler et caractériser une grande diversité de microorganismes chimiosynthétiques à partir de fragments de cheminées hydrothermales, d'animaux hydrothermaux, d'échantillons de flux diffus ou de panaches hydrothermaux. Il s'agit de microorganismes procaryotes qui appartiennent au domaine *Archaea* ou au domaine *Bacteria* ; la plupart d'entre eux sont anaérobies, ils peuvent être thermophiles ou hyperthermophiles et possèdent des stratégies métaboliques très variées (Prieur *et al*., 2004).

Parmi les chimiolithoautotrophes qui assurent la production primaire en utilisant des sources d'énergie et de carbone inorganique, vont pouvoir être décrites :

- Des bactéries mésophiles sulfo-oxydantes et ferro-oxydantes appartenant au phylum des *Proteobacteria.* Elles constituent les symbiontes clefs d'invertébrés évoqués précédemment ou sont bien représentées parmi les microorganismes en suspension dans les flux hydrothermaux diffus, ainsi que sur les cheminées ou dans les tapis microbiens. Ce groupe de bactéries inclue notamment les genres *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Ferrobacillus* ou *Beggiatoa* (Kelley *et al*., 2002).
- Des bactéries méthanotrophes et méthylotrophes appartenant également aux phyla des *Proteobacteria* (Kelley *et al*., 2002).
- Des bactéries thermophiles anaérobies hydrogéno-oxydantes de l'ordre des *Aquificales*, notamment du genre *Persephonella.* (Nakagawa *et al*., 2003).
- Des euryarchées méthanogènes hyperthermophiles anaérobies strictes appartenant à l'ordre des *Methanococcales* et plus précisément aux genres *Methanocaldococcus* et *Methanotorris.* (L'haridon *et al*., 2003).
- Des crenarchées hyperthermophiles anaérobies strictes hydrogéno-oxydantes et soufre réductrices de l'ordre des *Desulfurococcales* et du genre *Ignicoccus.*

Parmi les chimioorganohétérotrophes se servant de sources d'énergie et de carbone organique sont notamment retrouvées :

- Des bactéries thermophiles aérobies des genres *Bacillus, Geobacillus* et *Thermus.*
- Des euryarchées hyperthermophiles anaérobies strictes appartenant aux ordres des *Thermococcales* et des *Archaeoglobales.* Les *Thermococcales* ont un métabolisme similaire à celui des *Thermotogales* et se subdivisent en 3 genres *Pyrococcus*, *Thermococcus*, et *Paleococcus* qui est le moins représenté. Les *Archaeoglobales* retrouvées au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes appartiennent aux genres *Archaeoglobus* et *Geoglobus* et réduisent respectivement sulfates ou sulfites et thiosulfate ou fer ferrique.
- Des bactéries thermophiles anaérobies strictes de l'ordre des *Thermotogales*. Cet ordre, unique au sein de la classe des *Thermotogae* et du phylum du même nom, regroupe des bactéries à Gram négatif, non sporulantes, très majoritairement thermophiles ou hyperthermophiles, organohétérotrophes et anaérobies (Bonch-Osmolovskaya, 2008 ; Reysenbach *et al*., 2013). Les *Thermotogales* se présentent sous la forme de bâtonnets surmontés d'une toge ou « toga » caractéristique ayant contribué à leur dénomination (Bonch-Osmolovskaya, 2008). Sur le plan métabolique, ces bactéries sont capables de fermenter de nombreux sucres simples et complexes ou d'autres composés organiques complexes. La production d'hydrogène résultant de l'activité fermentaire inhibe potentiellement la croissance des *Thermotogales* et, suivant les espèces, l'addition de composés soufrés pallie cette inhibition en contribuant à la formation d'hydrogène sulfuré comme produit final (Bonch-Osmolovskaya, 2008). Plus de 70 espèces de *Thermotogales* ont à ce jour été isolées et sont réparties au sein de 13 genres différents (Reysenbach *et al*., 2013 ; Gupta & Bhandari, 2011). Si cet ordre ne doit plus être considéré comme exclusivement thermophile depuis la description du genre *Mesotoga* (Nesbo *et al*., 2012 ; Ben Hania *et al.*,2013), les *Thermotogales* ont très majoritairement été isolées à partir d'environnements chauds géothermiques et volcaniques variés (Bonch-Osmolovskaya, 2008 ; Gupta & Bhandari, 2011). Ces derniers incluent les sources hydrothermales océaniques profondes où les *Thermotogales* isolées et décrites appartiennent notamment aux genres *Marinitoga* (Wery *et al.*,2001 ; Alain *et al.*,2002 ; Postec *et al.*,2005 ; Nunoura *et a*l., 2007) et *Thermosipho* (Antoine *et al.*,1997 ; Takai & Horikoshi, 2000 ; Urios *et al.*,2004 ; Kuwabara *et al.*,2011 ; Podosokorskaya *et al*., 2011).

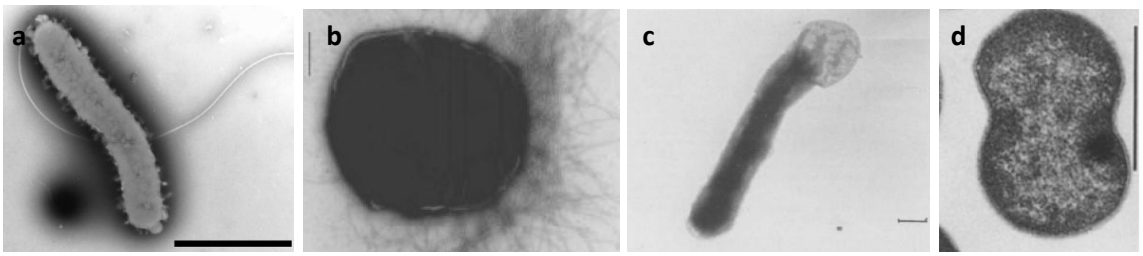


Figure 47 : Quatre exemples de microorganismes hydrothermaux marins profonds observés en MET
a : *Persephonella hydrogeniphila* (*Bacteria*) (D'après Nakagawa *et al.*, 2003)
b : *Methanocaldococcus indicus* (*Archaea*) (D'après l'Haridon *et al.*, 2003)
c : *Thermosipho melanesiensis* (*Bacteria*) (D'après Antoine *et al.*, 1997)
d : Coupe ultrafine de *Pyrococcus abyssi* en division (*Archaea*) (D'après Erauso *et al.*, 1993)

Il ne s'agit ici que de quelques exemples de microorganismes chimiosynthétiques qui composent les communautés microbiennes hydrothermales et des métabolismes qui leurs sont associés.

Enfin, si l'obscurité est une réalité au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes et que ces écosystèmes sont fondés sur la chimiosynthèse, toute activité photosynthétique n'y serait quand même pas exclue. La souche GSB1 représente une nouvelle espèce de bactérie verte sulfureuse hydrothermale qui utiliserait l'énergie lumineuse émise par les radiations géothermiques provenant d'une cheminée hydrothermale (Beatty *et al.*, 2005).

3.5. SEPT SYSTEMES HOTE/VIRUS CARACTERISES

Le nombre de virus associés à des procaryotes issus de sources hydrothermales océaniques profondes à avoir été observé, isolé et caractérisé reste à ce jour encore faible. Seuls 5 systèmes hôte/virus ont été décrits au sein du domaine *Bacteria* et deux chez les *Archaea*.

Au sein du domaine *Bacteria*, les quatre premiers virus ont été décrits chez les *Bacillales*. Il s'agit de virus virulents qui infectent quatre souches aérobies chimioorganohétérotrophes appartenant aux genres *Bacillus* ou *Geobacillus* dont les températures optimales de croissances se situent aux alentours de 65°C.

BVW1, à ce jour non classé, infecte la souche *Bacillus* W13 et les virions libérés sont composés d'une capside icosaédrique de 70 nm de diamètre et une longue queue de 300 nm. La taille du génome de ce virus, un ADN double brin linéaire, est estimée à 18 kb (Liu *et al.*, 2006).
GVE1 et **GVE2** sont vraisemblablement des virus très proches qui infectent la ou les souches *Geobacillus* E26323 et E263 et appartiennent à la famille des *Siphoviridae*. Les particules virales

de GVE1 comprennent une capside icosaédrique de 130 nm de diamètre et une queue flexible de 180 nm de long et 30 nm de large. Elles protègent un génome à ADN double brin linéaire de 41 kb (Liu *et al*., 2006). GVE2, dont l'étude a notamment permis la caractérisation d'une lysine et d'une nouvelle protéine portale, pourrait être capable de lysogénie (Ye & Zhang, 2008 ; Liu & Zhang, 2008 ; Wang & Zhang, 2008).

D6E, infectant une autre souche *Geobacillus* E263, est un virus du type *Myoviridae*. Les virions ont une capside icosaédrique de 60 nm de diamètre et une queue contractile de 60 nm de long. Ils contiennent un ADN double brin linéaire de près de 50kb dont l'analyse révèle un important mosaïsisme de gènes avec des bactériovirus mésophiles et des bactériovirus thermophiles, notamment GVE2 (Wang & Zhang, 2010).

Le cinquième bactériovirus est associé à une epsilonproteobacterie. Il s'agit d'un virus tempéré modéré qui infecte la souche chimiolithoautotrophe anaérobie et micro aérophile *Nitratiruptor* sp. SB155-2 cultivée à 55°C. **NrS-1** (*Nitratiruptor* sp *Siphoviridae* 1) appartient à la famille des *Siphoviridae*, les particules virales produites sont constituées d'une capside icosaédrique de 64 nm de diamètre et une queue flexible de 210 nm de long et 10 nm de large. Son génome composé d'un ADN double brin linéaire de 37 kb présente des séquences répétées à ces extrémités et est susceptible de se circulariser. L'analyse génomique de NrS-1 a révélé une large distribution de gènes homologues chez les *Epsilonproteobacteria.*

Cette dissémination laisse envisager que la coévolution entre les *Epsilonproteobacteria* et leurs virus tempérés soit très ancienne, en fait antérieure à la divergence d'habitat et en conséquence aux adaptations physiologiques qui ont par la suite marqué l'histoire évolutive de ces bactéries (Yoshida-Takashima *et al*., 2013).

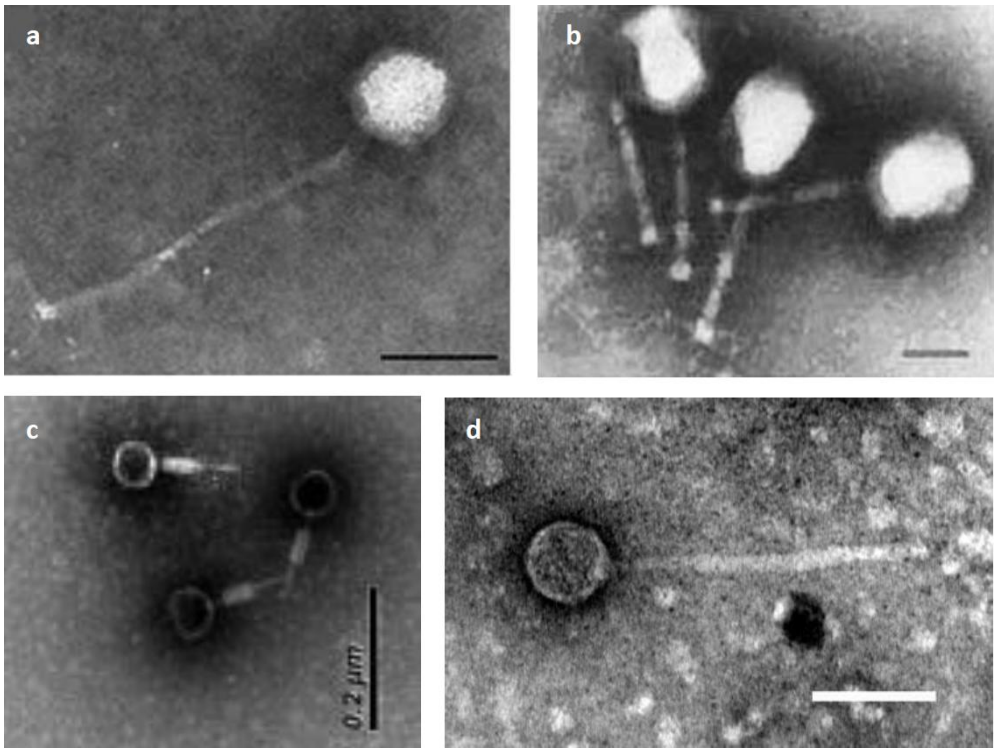


Figure 48 : Quatre des cinq bactériovirus thermophiles marins profonds observés en MET
a : BVW1 (D'après Liu *et al.*, 2006). b : GVE1 (D'après Liu *et al.*, 2006)
c : D6E (D'après Wang & Zhang, 2010) d : NrS-1 (D'après Yoshida-Takashima *et al.*, 2013)

Chez les *Archaea*, la recherche et la caractérisation de virus associés aux *Thermococcales* sont menées au Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes depuis 1999. Le choix des *Thermococcales* s'explique par le fait que ces derniers constituent un groupe de microorganismes hétérotrophes majoritairement hyperthermophiles très bien représenté au sein des sources hydrothermales océaniques profondes.

Une recherche systématique de VLPs a tout d'abord été entreprise sur des cultures d'enrichissement, obtenues à partir d'échantillons de cheminées hydrothermales ou de sédiments, collectés sur les dorsales Est Pacifique (EPR 9°N et 13°N) et Medio Atlantique (MAR 36°N et 37°N), en privilégiant la croissance de *Thermococcales*. L'analyse en microscopie électronique à transmission des cultures d'enrichissement obtenues à 85°C a permis la détection de très nombreuses VLPs aux morphologies diverses et variées. Le morphotype citron est le plus représenté parmi ces VLPs mais des bâtonnets, des formes filamenteuses ainsi que des morphologies pléomorphes tout à fait nouvelles ont également été observées. Cette étude rend finalement compte de l'existence de similitudes frappantes dans les morphologies des VLPs,

associées aux archées hyperthermophiles, qu'elles soient issues des sources chaudes terrestres ou des sources hydrothermales océaniques profondes (Geslin *et al.*, 2003a).

Deux virus associés à des *Thermococcales* ont, par la suite, été isolés et caractérisés. Ils constituent les deux seuls virus hyperthermophiles marins connus à ce jour.

Le premier, *Pyrococcus abyssi* virus 1 (PAV1), a été caractérisé chez la souche GE23 de *Pyrococcus abyssi* collectée à 2000 m de profondeur au niveau du bassin Nord Fidjien. Cette souche hôte est cultivée à 85-90°C. La particule virale en forme de citron, de 120 nm de long et 80 nm de large, contient un génome à ADN double brin circulaire de 18 kb dont le séquençage a révélé une majorité de gènes aux fonctions inconnues. Le génome viral se caractérise, par ailleurs, par le fait d'être présent sous la forme d'une soixantaine de copies d'ADNccc dans le cytoplasme de son hôte. Les tentatives d'inductions en exposant l'hôte à différents stress physicochimiques n'ont jamais accru la production virale. La relation qui lie ce virus et son hôte est du type état porteur. Le virus est spontanément et continuellement libéré dans le milieu, sans que l'on observe de lyse ou de retard de croissance de l'hôte. Son infectiosité a pu être démontrée via la méthode des spots tests inversés, l'ajout de PAV1 conduisant à un retard de croissance de la souche *Pyrococcus glycovorans* (Geslin *et al*., 2003b ; Geslin *et al*., 2007 ; Gorlas *et al*., 2013).

Le second, *Thermococcus prieuri* virus 1 (TPV1), a été isolé de la souche *Thermoccocus prieurii* récoltée sur le site hydrothermal Sarah Spring au niveau de la dorsale Est Pacifique à 2700 m de profondeur. Cette souche hôte est cultivée à 80°C (Gorlas *et al*., 2013a). La particule virale, également une forme de citron de 140 nm de long et 80 nm de large, contient un génome à ADN double brin circulaire de 21,5 kb avec une majorité de gènes aux fonctions inconnues. Parmi les quelques gènes auxquels il a pu être attribué une fonction, citons la présence notable d'un gène codant pour une intégrase de type SSV appartenant à la famille des tyrosine recombinases ; plusieurs homologues, plus ou moins proches, sont retrouvés chez de nombreux archéovirus et éléments intégrés chez les archées. TPV1 ne partage avec PAV1 que deux gènes homologues codant pour des protéines à domaine concanavaline qui pourraient être impliquées dans la reconnaissance hôte/virus. Le génome de TPV1 est, en outre, retrouvé sous la forme d'une vingtaine de copies d'ADNccc dans le cytoplasme de l'hôte. En terme de relation à l'hôte, TPV1 est un virus du type pseudo lysogénique. L'infection virale n'aboutit jamais à la lyse des cellules hôtes mais la production virale peut être induite par un traitement aux UV. Cette production lysogénique s'accompagne alors d'une diminution du nombre de cellules hôtes. La méthode des spots tests inversés a contribué à mettre en évidence le caractère infectieux du virus en lui

attribuant une gamme d'hôtes assez large chez les archées du genre *Thermococcus* dont *T. kodakaraensis* (Gorlas *et al*, 2012 ; Gorlas *et al*., 2013).

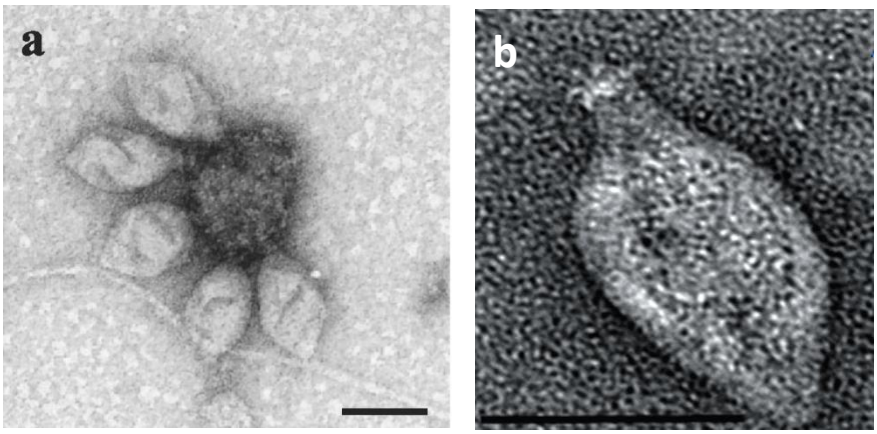


Figure 49 : Les deux seuls virus hyperthermophiles marins (profonds) décrits à ce jour observés en MET
a : PAV1 (D'après Geslin *et al.*, 2003b). b : TPV1 (D'après Gorlas *et al*., 2012)

PRESENTATION GENERALE DU TRAVAIL DE THESE

Nos connaissances de l'abondance, de la distribution et de la diversité des virus isolés d'écosystèmes extrêmes tels les sources hydrothermales océaniques profondes demeurent encore limitées ; et cela malgré des efforts de recherche menés notamment par le LM2E depuis une dizaine d'années. Au laboratoire, cette recherche de virus a été focalisée à l'ordre des *Thermococcales*, composé d'archées anaérobies et hétérotrophes métabolisant le soufre et constituant l'un des groupes prédominants des communautés microbiennes hyperthermophiles des sources marines profondes. Ces travaux ont notamment abouti à la caractérisation des archéovirus, PAV1 et TPV1 (Geslin *et al*., 2003b ; Gorlas *et al*, 2011).

Pour compléter notre connaissance de la diversité virale au sein de ces environnements extrêmes et l'élargir au domaine des *Bacteria*, les *Thermotogales*, bactéries thermophiles, anaérobies, ont été plus particulièrement ciblées. Ces bactéries, chimio-organotrophes, ont un métabolisme proche de celui des *Thermococcales* et sont également bien représentées au sein des sources hydrothermales océaniques profondes. Aucun virus n'avait encore été décrit au sein de cet ordre bien qu'il soit envisagé qu'ils aient joué un rôle majeur au cours de l'histoire évolutive des *Thermotogales*, émaillée de nombreux transferts latéraux de gènes. Plusieurs de leurs gènes auraient en effet été acquis horizontalement et proviendraient ainsi d'autres taxons, en particulier de *Firmicutes* thermophiles et, en moindre mesure, d'*Archaea* appartenant à l'ordre des *Thermococcales* (Zhaxybayeva *et al.*, 2009, Nelson *et al.*,1999).

De plus, la description de séquences CRISPR au sein de plusieurs génomes de *Thermotogales* témoigne de la mise en place d'immunité vis-à-vis d'infections virales passées (Zhaxybayeva *et al.*,2009). Pour autant, jusqu'à ce travail de thèse, aucune preuve concrète d'infection virale n'avait encore été fournie chez les *Thermotogales* et 3 mini-plasmides constituaient les seuls éléments génétiques mobiles décrits au sein de cet ordre bactérien (Harriot *et al.*, 1994 ; Akimkina *et al.*,1999 ; Zhaxybayeva, 2013).

Dans ce contexte, il nous semblait intéressant de poursuivre l'exploration de cet ordre afin de mettre en évidence de nouveaux éléments génétiques mobiles.

Ces travaux de thèse qui ont principalement abouti à la caractérisation du premier système hôte/virus associé à l'ordre des *Thermotogales* s'organisent principalement en 2 parties :

- Le premier chapitre se consacre aux résultats du criblage d'une cinquantaine de souches de *Thermotogales* afin de rechercher de potentiels éléments génétiques mobiles leur étant associés. Outre la découverte de deux plasmides respectivement associés aux souches de référence *Marinitoga piezophila* KA3 (pMP1, 13kb) et *Marinitoga okinawensis* (pMO1, 27kb), ce criblage a conduit à l'isolement des sept premiers bactériovirus associés à 7 souches de *Thermotogales*. Trois d'entre elles sont associées à trois souches de *Thermosipho melanesiensis*, en incluant la souche de référence BI429 et les trois autres sont associées à trois souches appartenant au genre *Marinitoga* dont la souche de référence *Marinitoga piezophila* et 2 souches de l'espèce *camini*. Ces bactériovirus sont tous du type *Siphoviridae*. Leurs particules virales, observées en microscopie électronique à transmission, se caractérisent par une capside icosaédrique de 50 à 55 nm de diamètre et une queue flexible de 150 à 200 nm de long et 10 nm de large. La relation qui lie ces virus à leurs hôtes est du type lysogénique et une analyse préliminaire des provirus putatifs est proposée.

- La deuxième partie de ce travail présente la caractérisation du premier bactériovirus issu de l'ordre des Thermotogales, associé à la souche thermophile et piezophile Marinitoga piezophila KA3. MPV1 (Marinitoga piezophila virus 1) est un virus tempéré du type Siphoviridae dont le génome de 43, 7 kb est identique au provirus intégré au sein du génome séquencé de la souche hôte M. piezophila. Etonnamment, la majorité des virions transporte un matériel génétique qui ne correspond pas à l'ADN viral. Les particules virales transportent en effet préférentiellement l'ADNccc, pMP1, de 13,3 kb avec lequel MPV1 partage son hôte. Ce "ménage à 3" pourrait constituer un nouvel exemple de piratage moléculaire.

- Une étude suplémentaire est enfin consacrée au suivi de la croissance de notre principal modèle d'étude *M. piezophila* par ATPmétrie. Cette étude préliminaire a permis de révéler un impact de la production virale sur le métabolisme de la cellule hôte et illustre donc par ATPmétrie le possible détournement du métabolisme d'un hôte par un virus.

CHAPITRE I

CRIBLAGE D'ELEMENTS GENETIQUES MOBILES CHEZ LES THERMOTOGALES ET RESULTATS PRELIMINAIRES

CRIBLAGE D'ELEMENTS GENETIQUES MOBILES CHEZ LES THERMOTOGALES ET RESULTATS PRELIMINAIRES

Ce criblage a été réalisé en s'inspirant de ce qui se faisait au laboratoire dans le cadre des recherches de virus (et/ou plasmides) associés aux *Thermococcales* (Geslin *et al.*, 2003 ; Gorlas *et al.*,2012). Les *Thermotogales*, comme les *Thermococcales*, ne constituent pas des modèles très adaptés pour la réalisation de plages de lyses classiquement employées afin d'isoler des virus purement lytiques. La réduction de composés soufrés qui accompagnent la croissance de ces microorganismes entraîne en effet l'apparition sur boîte de halos clairs très difficilement discernables d'éventuelles plages de lyses (Gorlas *et al.*, 2013).

Le parti pris a été de soumettre d'abord une cinquantaine de souches de *Thermotogales* appartenant très majoritairement à une collection propre au LM2E (Souchothèque de Bretagne UBOCC et collection Ifremer), à des extractions en lyse alcaline. L'objectif était ainsi de révéler la présence potentielle d'**ADNccc** (circular covalently closed) ou ADN circulaire fermé covalemment. Chez les bactériovirus, les génomes viraux sont certes le plus souvent encapsidés sous une forme linéaire mais il peut arriver que certains d'entre eux se circularisent à l'intérieur du cytoplasme de leurs hôtes et qu'ils puissent ainsi être détectés par lyse alcaline. L'autre possibilité était que ces ADNccc correspondent à des plasmides également recherchés. Les souches apparues porteuses d'un ADNccc ont fait l'objet du second volet du criblage consistant en l'analyse de leurs surnageants en microscopie à épifluorescence. Le but de cette analyse était de visualiser la présence de **VLPs** (Virus Like Particles) ou particules de type viral chez ces différentes souches de *Thermotogales*. L'observation d'une telle production était en effet susceptible de traduire une libération de virions chez des systèmes hôtes/virus en état porteur ou chez des systèmes hôtes/virus tempérés avec une production virale basale. Afin d'essayer de mettre plus spécifiquement en évidence des systèmes hôtes/virus tempérés, des essais d'induction de la production virale ont été effectués sur une quinzaine de souches. Seules les souches considérées comme les plus susceptibles de produire des VLPs, au terme de ces analyses en épifluorescence, ont fait l'objet du troisième et dernier volet du criblage reposant sur l'analyse des surnageants de culture en microscopie électronique à transmission (MET). La MET constituait l'étape finale, indispensable, pour déterminer si les productions potentielles de VLPs

constatées en épifluorescence illustraient réellement la libération de **virions** ou si les VLPs produites se révélaient plutôt correspondre à des **vésicules membranaires** par exemple.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. LES SOUCHES DE THERMOTOGALES CRIBLEES

Cinquante-cinq souches de *Thermotogales* ont été passées au crible dans le but de découvrir des bactériovirus et/ou plasmides leurs étant associés. Cinquante-trois de ces souches sont provenues de la collection propre au LM2E (Souchothèque de Bretagne UBOCC et collection Ifremer). Ces souches en collections appartenaient aux genres *Thermosipho* ou *Marinitoga* pour celles dont le genre était déterminé et comprenaient 5 souches de référence. Les 53 souches de la Souchothèque ont été isolées à partir des sites hydrothermaux du Bassin de Lau (latitude, 22°32'S; longitude, 176"43'O; profondeur, 1832 à 1887 m), de la Ride Est-Pacifique (latitude, 12°48721'N; longitude, 103°56351'O; profondeur, 2630 m) et de la Dorsale Médio-Atlantique (latitude, 36°139N; longitude, 33°549O; profondeur, 2775 m). La souche de référence *Marinitoga okinawensis*, a été commandée à la DSMZ, et a été isolée sur un site hydrothermal de la fosse d'Okinawa (latitude, 24°50,938'N; longitude, 122°40,020'E; profondeur, 1365 m). La souche *Thermosipho africanus* H17ap60334, issue d'un puit de petrole profond (Hibernia) a enfin été fournie par Camilla Nesbø dans le cadre d'une collaboration. Les 55 souches criblées et quelques informations les concernant sont regroupées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Liste des 55 souches de *Thermotogales* passées au crible

[1] Les 6 souches de référence. [2] Commandée à la DSMZ. [3] Souche non hydrothermale fournie par Camilla Nesbø.

* Souche finalement réaffiliée sur la base de l'analyse du gène codant pour l'ARNr16S à l'issue de ces travaux

Souches	Genres si déterminés	Espèce si déterminées	Sites d'i'solements	Echantillons à l'origine de l'isolement si indiqués
BI429[1]	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Bassin de Lau	Branchie d'une moule
BI430	*Thermosipho*		Bassin de Lau	Branchie d'un gastéropode
BI431	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Bassin de Lau	Cheminée active
BI432	*Thermosipho*		Bassin de Lau	Cheminée active
BI433	*Thermosipho*		Bassin de Lau	Branchie d'une moule
BI434	*Thermosipho*		Bassin de Lau	
BI487	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Bassin de Lau	Cheminée active
AM1110			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1111			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1112			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1113			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1133			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1134			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1135			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1136			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1137	*Marinitoga*		EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
AM1138			EPR 13°N	*Alvinella pompejana*
KA3[1]	*Marinotoga*	*piezophila*	EPR 13°N	Cheminée active
MV1061	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
MV1062	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
MV1063	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
MV1070	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
MV1074	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
MV1075[1]	*Marinitoga*	*camini*	Menez Gwen	Cheminée active
MV1078	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
MV1089	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
MV1090	*Thermosipho*		Menez-Gwen	Cheminée active
DV1120	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1123	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1124	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1129	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1130	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1140[1]	*Thermosipho*	*atlanticus*	Menez Gwen	Fumeur noir
DV1141	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1142	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1143	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1150	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir

DV1153	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1154	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1155	*Marinitoga*	*camini*	Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1157	*Marinitoga*		Menez-Gwen	Fumeur noir
DV1197	*Marinitoga*	*camini*	Lucky-Strike	Module de colonisation
DV1199	*Marinitoga*		Lucky-Strike	Module de colonisation
DV1200	*Marinitoga*		Lucky-Strike	Module de colonisation
DV1201	*Marinitoga*		Lucky-Strike	Module de colonisation
AT1222-VC15	*Thermosipho*		Rainbow	Cheminée active
AT1223-VC20	*Thermosipho*		Rainbow	Cheminée active
AT1224-VC22	*Thermosipho*		Rainbow	Cheminée active
AT1225-VC34	*Thermosipho*		Rainbow	*Rimicaris*
AT1244-VC14*	*Marinitoga**	*camini**	Rainbow	active chimney
AT1253-VC28	*Marinitoga*	*camini*	Rainbow	Cheminée active
AT1271[1]	*Marinitoga*	*hydrogenitolerans*	Rainbow	Cheminée active
AT1272	*Thermosipho*		Rainbow	Cheminée active
TFS10-5^{T} [1,2]	*Marinitoga*	*okinawensis*	Yonaguni Knoll IV	Champs hydrothermal
H17ap60334[3]	*Thermosipho*	*africanus*	Hibernia	Puits de pétrole profond

1.2. MISE EN CULTURE DES SOUCHES DE THERMOTOGALES

Les souches ont été cultivées dans un milieu de Ravot modifié : un milieu riche qui permet la croissance de microorganismes chimio-organo-hétérotrophes. Il est composé pour un litre de : 0,2 g de NH_4Cl, 0,5 g de $MgCl_2$ $6H_2O$, 0,1 g de $CaCl_2$ $2H_2O$, 0,5 g de KCl, 0,83 g de CH_3COONa $2H_2O$, 30 g de NaCl, 2 g d'extrait de levure, 2 g de tryptone, 3,3 g de piperazine-*N*,*N*_-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), 2 g de maltose and 0.001 g de resazurin pour s'assurer de l'absence d'oxygène. Une fois son pH ajusté à 6, le milieu est autoclavé 20 minutes à 120°C. Deux sources de phosphates, K_2HPO_4 et KH_2PO_4, sont ensuite ajoutées à 0,035% en concentrations finales dans le milieu stérile ainsi qu'1 mL d'une solution de polyvitamines (Sigma Aldrich). En raison du très fréquent caractère sulfo-réducteur des *Thermotogales*, du soufre élémentaire ou de la L-cystine est ajouté à ce milieu réparti en fiole pénicilline. L'anaérobiose est obtenue dans la fiole par 10 cycles vide-gaz qui permettent d'éliminer l'O_2 de

la phase gazeuse et de le remplacer par de l'azote. Un agent réducteur, le Na_2S, est ajouté à une concentration finale de 0,1 % pour réduire la phase liquide. Les souches de *Thermotogales* sont alors ensemencées à 1 % et les fioles sont incubées à des températures de 55, 60, 65 ou 70°C en fonction des températures optimales de croissance des différentes souches.

1.3. EXTRACTION D'ADNccc SUR LES SOUCHES DE THERMOTOGALES

Les extractions d'ADNccc ou ADN circular covalently closed ont été réalisées selon une méthode de lyse alcaline classique avec quelques modifications (Birnboim & Doly. 1979 ; Geslin *et al*., 2003). 150 mL de culture en fin de croissance exponentielle sont centrifugés durant 20 min à 7500 g et 4°C. Le culot cellulaire obtenu est repris dans 600 µL de tampon TNE froid (100 mM TrisHCl pH 8,0 ; 100 mM NaCl ; 50 mM EDTA pH 8,0). La suspension est transférée dans un microtube et du lysozyme (cf : 3 µg/mL) y est ajouté, le mélange est alors incubé 15 min à température ambiante (étape facultative). 600 µL de solution de lyse (0,2 N NaOH ; 1% SDS) préparée extemporanément sont ensuite ajoutés et le mélange est homogénéisé. 700 µL de solution de neutralisation froide (CH_3COOK 3 M) sont enfin ajoutés et le mélange homogénéisé.

Le lysat fait alors l'objet d'une centrifugation de 15 minutes à 14 000 g et 4°C et le surnageant obtenu est transféré dans deux nouveaux microtubes à raison de 850 µL dans chacun d'eux. L'ajout de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (PCI) (24 : 25 : 1) dans les microtubes, volume à volume, précède une centrifugation de 15 min à 14 000 g et 4°C qui amène à l'observation de deux phases séparées par une crêpe protéique. Les phases aqueuses supérieures des deux tubes sont conservées dans deux nouveaux microtubes et, à celles-ci, est ajouté le chloroforme volume à volume. Une centrifugation de 5 min à 14 000 g et 4°C conduit aussi à deux phases dans les tubes et, seules, les phases supérieures sont transférées dans deux nouveaux microtubes. L'ADNccc, contenu dans ces 2 phases aqueuses est précipité dans 0,7 volume d'isopropanol, incubé 2 h à – 20°C avant d'être culotté à la suite d'une centrifugation de 20 min à 14 000 g et 4°C. Le culot est ensuite lavé dans 500 µL d'éthanol 75 % et centrifugé 5 minutes à 14 000 g et 4°C. Le contenu en éthanol dans les deux microtubes est éliminé à la micropipette et les culots d'ADNccc dans chacun des deux tubes sont repris dans 25 µL d'eau milliQ autoclavée stérile. Une fois que l'ADN s'est suffisamment réhydraté à 4°C, il est traité à la RNase (cf : 50 µg/mL) et incubé 1 heure à 37°C. L'ADNccc en suspension est conservé à -20°C.

1.4. ANALYSE DES ADNccc EXTRAITS EN RFLP

Au cours des analyses en RFLP (Restriction Fragment Lengh Polymorphism), les ADNccc extraits ont été digérés par les enzymes de restrictions : *Eco*RI et/ou *Hind*III et/ou *Hha*I et/ou *Eco*RV et/ou *Sma*III et ou *Bam*HI et les couples *DpnI*/*Mbo*I et *Bst* NI/*Scr* FI (Promega). Entre 100 et 300 ng d'ADNccc ou d'ADN encapsidés sont ajoutés du tampon de restriction, de la BSA à des concentrations finales de 1X et 2U d'enzyme de restriction pour un volume réactionnel de 25 µL. La restriction est réalisée pendant 2 h à 37°C. Les différents produits de restriction sont déposés sur gel à 0,8% d'agarose contenant 5 mg/mL de BET et migrent à 70 V pendant 1h 30 dans du tampon TAE 1 X.

1.5. INDUCTION DE LA PRODUCTION VIRALE DE CERTAINES SOUCHES PAR ADDITION DE MITOMYCINE C

Des tentatives d'induction de la production virale par addition de mitomycine C ont plus particulièrement été entreprises sur quinze souches du genre *Marinitoga* regroupées au sein du tableau 2. Concrètement, des duplicats de cultures sont incubées 3 h 30 de manière à ce que les différentes souches arrivent en début de phase exponentielle de croissance. Une concentration finale en mitomycine C de 5 µg/mL est alors ajoutée et ce uniquement dans l'une des 2 cultures qui composent chaque duplicat. Toutes les cultures sont ensuite réincubées 2 h 30 avant qu'elles ne fassent l'objet d'analyses en microscopie à épifluorescence ou en microscopie électronique à transmission. Dans chaque duplicat, la culture qui n'est pas exposée à l'antibiotique sert de contrôle négatif et permet d'évaluer l'effet de la mitomycine C sur la production virale potentielle des souches exposées.

1.6. ANALYSE DE LA PRODUCTION DE VLPs CHEZ LES SOUCHES DE THERMOTOGALES EN MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE

La production potentielle de VLPs a été analysée chez les souches révélées porteuses d'un ADNccc et celles ayant fait l'objet des tests d'induction à la mitomycine C. Cette analyse a été effectuée en microscopie à épifluorescence selon un protocole classique (Suttle & Fuhrman. 2010 ; Noble & Fuhrman. 1998). 1,5 mL de culture bactérienne, en phase stationnaire de croissance ou après induction à la mitomycine C selon les cas, sont fixés dans du glutaraldéhyde

(cf : 0,5 %) pendant 15 min à 4°C avant de faire l'objet d'un « flash freeze » dans de l'azote liquide. Les cultures ont ainsi pu être conservées dans des cryotubes à – 80°C. Cette méthode a permis d'optimiser considérablement la qualité des observations et des comptages. Toutes les solutions employées par la suite ont été filtrées sur 0,02 µm (Anotop 25, Whatman) de manière à s'affranchir de toute contamination éventuelle. Après décongélation de l'échantillon, une centrifugation de 20 min à 10 000 g et 4°C est réalisée afin de culotter les cellules. L'échantillon est toujours dilué 50 x, pour ce faire, 100µL de surnageant sont prélevés par échantillon et placés chacun dans un tube falcon de 15mL contenant 4.9mL de tampon de resuspension pour virus (Tris-HCL : 10 mM, NaCl : 100 mM, CaCl2 : 5 mM, $MgCl_2$: 20 Mm). Les 5 mL sont homogénéisés puis filtrés séquentiellement sur un filtre seringue 0,45 µm (Acrodisc 25 mm, Pall) et sur un filtre 0,02 µm (Anodisc 25, Anopore, Whatman) sous pompe à vide. Ce filtre 0,02 µm qui a retenu les virus est laissé à sécher en présence de silicagel pendant 10 min avant d'être coloré. Afin de réaliser cette coloration, 70µL de SYBR green I (Invitrogen-Molecular Probes ; concentré 10 x) sont déposés dans une boîte de pétri et la face inférieure du filtre est placée en contact avec le SYBR green I. Après15 min à l'obscurité, le filtre est séché 10 min en présence de silicagel. Il est alors placé sur une lame de microscope où ont été préalablement déposés 25 µL de solution d'antifading. La solution d'antifading est préparée en ajoutant 10µL d'une solution de N-N dimethyl-1,4-phenylene diamine sulfate (cf : 10%) dans 990µL d'une solution de PBS 1X/glycérol (v/v) (PBS1X : NaCl : 0,85 % (p/v) ; Na_2HPO_4 : 0,5M ; pH à 7). 25µL d'antifading sont ensuite ajoutés sur la face supérieure du filtre et une lamelle est enfin déposée sur le filtre. Le filtre ainsi monté entre lame et lamelle est prêt à être observé en microscopie à épifluorescence (Olympus BX60 ; filtre WIB ; longueur d'onde d'excitation : 475 nm ; grossissement 1000 x).

1.7. RECHERCHE DE VLPs EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Cette recherche n'a concerné que les souches jugées les plus susceptibles de produire des VLPs au terme des analyses effectuées en microscopie à épifluorescence. 100 mL de culture en phase stationnaire de croissance ou 15 mL de culture induite à la mitomycine C sont centrifugés 15 min à 7 500 g et 4°C afin de culotter les cellules et/ou les débris cellulaires. Le surnageant obtenu, contenant potentiellement les VLPs, est ultracentrifugé 1 h à 37 000 RPM et 4°C (Beckman Optima LE-80 K ; rotor 70.1.Ti) et les culots obtenus sont resuspendus dans un

volume final de 100 µL de tampon de resuspension (10 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl2, 20 Mm $MgCl_2$). 5 µL de la suspension ainsi concentrée sont déposés pendant 2 min sur une grille en cuivre recouverte de carbone Formwar. L'excès de liquide est éliminé par capillarité à l'aide de papier Whatman avant que 5 µL d'une solution d'acétate d'uranyle à 2%, nécessaire au contraste, ne soient déposés sur la grille. L'excédent de liquide est absorbé comme précédemment et la grille est observée en microscopie électronique à transmission (JEOL 100 CXII, à 120 kV).

1.8. EXTRACTION D'ADN TOTAL SUR LES SOUCHES DE THERMOTOGALES

Seuls les ADN totaux des souches les plus susceptibles de posséder des éléments génétiques (provirus et/ plasmides) ont été extraits et ces derniers ont été obtenus par une méthode classique d'extraction (Charbonnier *et al*., 1992). 100 mL de culture en fin de croissance exponentielle sont centrifugés durant 20 min à 7500 g et 4°C. Le culot cellulaire obtenu est repris dans 700 µL de tampon TNE froid (100 mM TrisHCl pH 8,0 ; 100 mM NaCl ; 50 mM EDTA pH 8,0). La suspension est alors transférée dans un microtube, du lysozyme (cf : 3 µg/mL) et de la RNAse (cf : 50 µg/mL) y sont ajoutés. Ce mélange est homogénéisé doucement puis incubé 15 min à température ambiante. Du SDS (cf : 1 %), du N lauryl sarkosyl (cf : 1 %) et de la proteinase K (cf : 1 mg/mL) sont ensuite ajoutés et le mélange est incubé 1 h à 55°C. Une fois refroidi, un volume de PCI (24 : 25 : 1) est ajouté dans le microtube qui est centrifugé 15 min à 14 000 g et 4°C. 2 phases séparées par une crêpe protéique sont obtenues dans le microtube et seule la phase aqueuse supérieure, contenant l'ADN, est transférée dans un nouveau microtube. Un volume de chloroforme y est ajouté et le microtube est centrifugé 5 min à 14 000 g et 4°C.

La phase aqueuse supérieure, résultant de cette centrifugation, est transférée dans un nouveau microtube. Ces additions de PCI puis de chloroforme servent à renforcer l'élimination des protéines. L'ADN total, contenu dans cette phase aqueuse est alors précipité dans 0,7 volume d'isopropanol puis incubé 2 h à – 20°C avant d'être culotté au terme d'une centrifugation de 20 min à 14 000 g et 4°C. Le culot d'ADN, ainsi, obtenu est ensuite lavé dans 500 µL d'éthanol 75 % et centrifugé 5 minutes à 14 000 g et 4°C. Le contenu en éthanol dans le microtube est éliminé à la micropipette et le culot d'ADN est repris dans 80 µL d'eau milliQ autoclavée stérile. Une fois que l'ADN s'est suffisamment réhydraté à 4°C, il est conservé à – 20°C.

1.9. SÉQUENÇAGE DES ADNCCC ET ADN TOTAUX

Les ADNccc et les ADN totaux ont été sequencés via la technologie Ion Torrent à partir d'un séquenceur personnel (Université d'Alberta), d'un kit « Ion PGM sequencing 200 kit v.2 (LifeTechnologies) » et d'un kit d'adaptateurs « Ion Xpress Barcode adapters 1-16 kit (LifeTechnologies) ». Les séquences ont été assemblées en utilisant les logiciels « CLC Genomics Workbench 6.5.1 **(**http://www.clcbio.com**) »** et « MIRA 4 packages ».

1.10. TRAITEMENT INFORMATIQUE DES SÉQUENCES D'ADN

L'annotation des ORF codés par les provirus et les ADNccc a été faite via la plateforme RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Aziz *et al.*,2008), en utilisant Glimmer comme logiciel de prédiction de séquences codantes. Les ORF putatives ainsi prédites ont ensuite été manuellement annotées à partir des algorithmes BLASTX, BlastN ou BlastP d'alignement de séquence dans les bases de données nr et Genebank de NCBI. La fonction biologique du meilleur alignement a été retenue en prenant l'e-value comme critère de BBH (Best Blast Hit). Des analyses des ORF ont été menées sur pfam (http://pfam.sanger.ac.uk/).
Des tentatives de prédiction des origines de réplication ont également été réalisées pour les ADNccc (http://bioinformatics.upmc.edu/SKEW/index.html ; http://tubic.tju.edu.cn/Ori-Finder/ ; http://tubic.tju.edu.cn/doric/blast1.php). Les comparaisons des séquences des ont été réalisées en utilisant GenoPlotR (Guy *et al.*, 2013). Les cartes des plasmides ont été réalisées avec (http://www.geneious.com/).

2. RESULTATS & DISCUSSIONS

2.1. LES EXTRACTIONS D'ADNccc

A l'issue des extractions en lyse alcaline, 21 souches, regroupées dans le tableau 1, sont apparues, semble-t-il, porteuses d'un élément extra chromosomique. Les éléments extraits, après contrôle sur gel d'agarose et utilisation du marqueur de taille Supercoiled, se sont révélés supérieurs à 10 kb. La figure 1, correspondant à l'un des gels de contrôle réalisés après certaines de ces extractions, est bien représentative des résultats obtenus au cours de ces 21 extractions.

Tableau 2 : Les 21 souches répertoriées comme porteuses d'un ADNccc.

[1] Souches de référence. [2] Commandée à la DSMZ. [3] Unique souche non hydrothermale fournie par Camilla Nesbø de l'Université d'Alberta au Canada. Les autres souches appartenant à la collection du LM2E

Souches	Genres si déterminés	Espèce si determinées	Sites d'isolement
BI429[1]	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Lau Basin
BI430	*Thermosipho*		Lau Basin
BI431	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Lau Basin
BI432	*Thermosipho*		Lau Basin
BI433	*Thermosipho*		Lau Basin
BI434	*Thermosipho*		Lau Basin
BI487	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Lau Basin
AM1112			EPR 13°N
AM1135			EPR 13°N
AM1137	*Marinitoga*		EPR 13°N
AM1138			EPR 13°N
KA3[1]	*Marinotoga*	*piezophila*	EPR 13°N
MV1063	*Thermosipho*		Menez-Gwen
MV1070	*Thermosipho*		Menez-Gwen
MV1074	*Thermosipho*		Menez-Gwen
DV1140[1]	*Thermosipho*	*atlanticus*	Menez Gwen
DV1154	*Marinitoga*		Menez-Gwen
AT1222-VC15	*Thermosipho*		Rainbow
AT1223-VC20	*Thermosipho*		Rainbow
TFS10-5^{T} [1,2]	*Marinitoga*	*okinawensis*	Yonaguni Knoll IV
H17ap60334[3]	*Thermosipho*	*africanus*	Hibernia

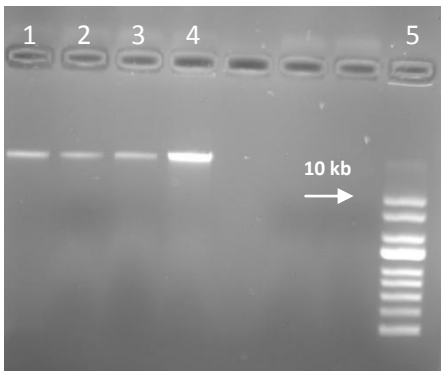


Figure 1: Quatre exemples d'ADNccc extraits à partir des souches de *Thermotogales* criblées

1 : l'ADNccc extrait de la souche *Marinitoga* AM1137

2 : l'ADNccc extrait de la souche *Thermosipho* MV1070

3 : l'ADNccc extrait de la souche *Thermosipho melanesiensis* BI487

4 : l'ADNccc extrait de la souche *Thermosipho melanesiensis* BI431

5 : 3 µL du marqueur de taille Supercoiled (1 X)

2.1.1. Les analyses en RFLP

Les analyses en RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) des 21 ADNccc, découverts au terme du criblage initial (tableau 1), ont presque toutes abouti aux mêmes résultats. Pour 19 de ces éléments, les digestions enzymatiques par différentes enzymes de restriction de type II ont en effet mené à l'obtention de smears après contrôle sur gel d'agarose. La photographie de la figure 2, illustrant les résultats obtenus à l'issue de l'une des tentatives de restrictions de l'élément extra chromosomique associé à la souche *Thermosipho melanesiensis* BI431, est bien représentative des résultats obtenus au cours des analyses en RFLP de ces 19 éléments.

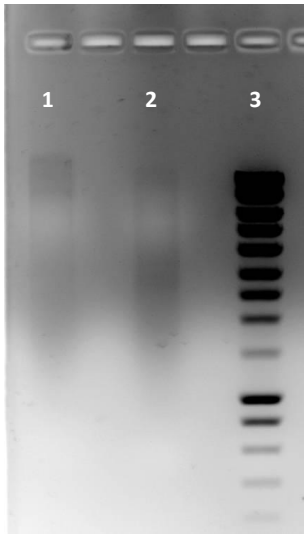


Figure 2 : Résultats, sur gel d'agarose 0,8%, des analyses en RFLP obtenues pour 19 des 21 ADNccc extraits en lyse alcaline à partir des différentes souches de *Thermotogales* criblées. Deux exemples représentatifs
1 : l'ADN ccc de la souche *Thermosipho melanesiensis* BI431 digéré par *Eco*RI.
2 : l'ADN ccc de la souche *Thermosipho melanesiensis* BI431 digéré par *Hind*III.
3 : 3 µL du marqueur de taille DNA Smart ladder (1 X)

L'obtention de ces smears a conduit à s'interroger sur la nature des éléments extraits à partir de 19 des 21 souches de *Thermotogales.* Elle laissait en effet envisager une nature chromosomique pour ces éléments. Des tentatives de séquençage ont été menées pour quelques-uns de ces ADN obtenus par lyse alcaline. Le séquençage, réalisé dans le cadre d'une collaboration avec Camilla Nesbø de l'Université d'Alberta au Canada, n'a pas abouti. Les ADN totaux de 17 des 19 souches concernées (l'ADN total de la souche DV1154 n'ayant pu être envoyé à séquencer et celui de *Thermosipho melanesiensis* BI429 était déjà disponible dans les bases de données) ont, alors, été extraits et envoyés à séquencer et à analyser toujours dans le cadre de la même collaboration. Celle-ci implique, en plus de Camilla Nesbø, Olga Zhaxybayaeva du Darmouth College aux Etats-Unis et Thomas Haverkamp de l'Université d'Oslo en Norvège. Les analyses des séquences des ADN totaux de ces 17 souches, bien que

toujours en cours, n'ont pas permis pour le moment d'identifier de contigs susceptibles de correspondre à ces éléments.

Afin d'essayer de mettre en évidence d'éventuelles méthylations sur ces éléments, des digestions enzymatiques par 2 couples d'enzymes de restriction de type II *Mbo*I/*Dpn*I et *Bst* NI/*Scr* FI permettant respectivement la détection de méthylations dam et dcm ont été réalisées. Celles-ci n'ont pas permis de prouver le caractère méthylé des éléments extra chromosomiques. Ces derniers se sont par ailleurs montrés insensibles au traitement à la RNAse effectué. Des traitements à la nucléase S1 afin de tester le caractère simple brin de ces ADN restent à réaliser. La nature précise de ces derniers demeure donc, à ce jour, non élucidée. Il ne peut être exclu que ceux-ci correspondent à des artéfacts chromosomiques obtenus à l'issue des extractions en lyse alcaline chez certaines souches de *Thermotogales*. Plusieurs raisons s'opposent néanmoins à considérer que ces résultats puissent uniquement s'expliquer par le fait que le protocole d'extraction par lyse alcaline n'était simplement pas adapté aux cultures de *Thermotogales*.

Tout d'abord, une cinquantaine de souches ont été soumises à ces extractions en lyse alcaline et seules 21 sont apparues, semblait-il, porteuses d'un ADNccc. Si le protocole d'extraction s'était avéré mal adapté aux cultures de *Thermotogales* en général, il demeure difficile d'expliquer que de tels « éléments extra chromosomiques » n'aient été obtenus que dans un peu moins de la moitié des cultures criblées. Ces souches qui sont en majorité du genre *Thermosipho* pourraient donc avoir une spécificité qui fasse que la lyse alcaline soit moins efficace chez elles et ne permette pas une élimination suffisante de leur ADN chromosomique.
Il reste à essayer de déterminer si les mêmes résultats peuvent être obtenus en utilisant différents kits d'extraction d'ADNccc ou en jouant sur les concentrations en SDS et NaOH qui entrent dans la composition de la solution de lyse.

Il s'est en plus avéré que 2 des 21 souches, considérées comme positives à l'issue des extractions en lyse alcaline, possédaient effectivement des ADNccc.
Au terme des analyses en RFLP, les souches de référence *Marinitoga piezophila* KA3 et *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^{T} se sont ainsi révélées, après contrôle sur gel d'agarose, posséder des éléments extra chromosomiques d'environ 13 et 24 kb respectivement comme en témoignent les photographies a et b de la figure 3.

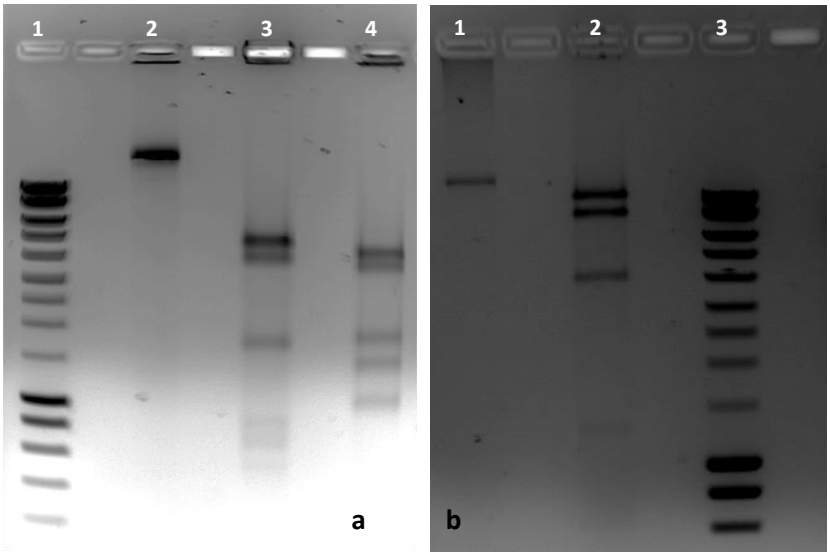


Figure 3 : Les produits des restrictions obtenus sur gel d'agarose à l'issue des analyses en RFLP des ADNccc des souches de référence *Marinitoga piezophila* et *Marinitoga okinawensis*

a : Restrictions de l'ADNccc associé à la souche *Marnitoga piezophila*. 1 : 3 µL du marqueur de taille DNA Smart ladder (1 X). 2 : l'ADN ccc natif non coupé. 3 : l'ADN ccc digéré par *Eco*RI. 4 : l'ADN ccc digéré par *Hind*III. b : Restriction de l'ADNccc associé à la souche *Marnitoga okinawensis*. 1 : l'ADN ccc natif non coupé. 2 : l'ADN ccc digéré par *Eco*RI. 3 : 3 µL du marqueur de taille DNA Smart ladder (1 X)

Tableau 3 : Résultats des restrictions enzymatiques réalisées sur les ADNccc découverts respectivement chez les souches de référence *Marinotoga piezophila* et *Marinitoga okinawensis*

Eléments digérés	Produits des restrictions enzymatiques	
	Par *Eco*RI :	Par *Hind*III :
ADNccc *Marinitoga piezophila* **KA3**	6 fragments visibles d'environ 5000 pb, 4000 pb, 2000 pb, 800 pb, 600 pb et 400 pb **Soit un total d'environ 12, 8 kb**	5 fragments visibles d'environ 4000 pb, 3500 pb, 2000 pb, 1500 et 1000 pb **Soit un total d'environ 12 kb**
ADNccc *Marinitoga okinawensis* **TFS10-5^T**	Par *Eco*RI : 4 fragments visibles d'environ 10 000 pb, 8000 pb, 4000 pb et 1250 pb **Soit un total d'environ 23 kb**	

2.1.2. *L'analyse preliminaire de l'ADNccc decouvert chez Marinitoga okinawensis*

Seuls 3 miniplasmides ont jusqu'ici été répertoriés chez les *Thermotogales*. Les 2 premiers cryptiques et très similaires, pRQ7 et pMC24 de 846 pb, ont été décrits chez 2 souches du genre *Thermotoga* (Harriot *et al.*,1994 ; Akimkina *et al.*,1999) tandis que le troisième de 1724 pb a été retrouvé chez *Mesotoga prima* (Zhaxybayeva *et al.*,2012).

Parallèlement et indépendamment de ces travaux de thèse, un projet de séquençage de l'ADN total de la souche *Marinitoga piezophila* KA3 a été entrepris (Lucas *et al.*,2012) et révélé la présence d'un contig isolé de 13,386 kb, lequel correspondait à l'ADNccc mis en évidence lors de ces travaux de thèse par lyse alcaline et RFLP (photographie a de la figure 7). Cet élément, portant le code PMARPI01 dans les bases de données, a été rebaptisé pMP1 et sera décrit dans le deuxième chapitre de cette thèse.

L'ADNccc extrait par lyse alcaline de *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^T a été séquencé par Camilla Nesbø. Les résultats de ce séquençage, qui viennent d'être obtenus, ont révélé qu'il s'agissait d'un ADNccc de 27, 985 kb. Une carte de cet ADNccc est représentée figure 4 et une analyse préliminaire des 23 ORFs (Open Reading Frames) ou cadres ouverts de lecture prédits, consistant en la recherche de similarités basée sur des BLASTP dans la base de données nr de NCBI, est présentée dans le tableau 4.

.

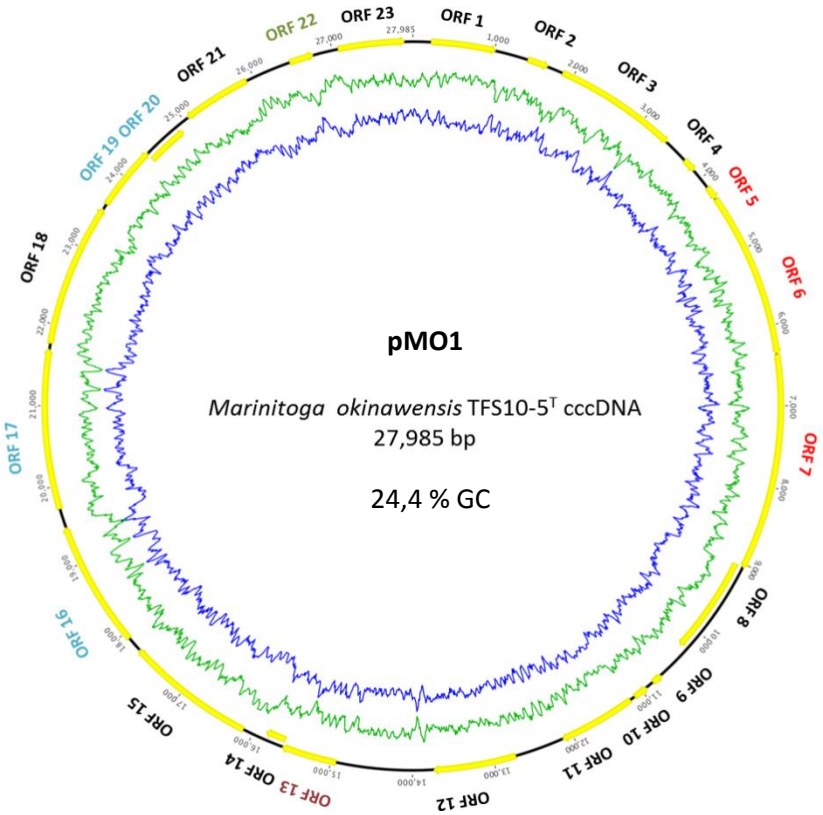


Figure 4 : Carte de l'ADNccc découvert chez la souche de référence *Marinitoga okinawensis*
Les graphes internes illustrent le pourcentage en GC (en bleu) et le pourcentage en AT (en vert)
Carte réalisée avec Geneious 7

Tableau 4 : Analyse préliminaire des 23 ORFs prédits sur RAST qui compose l'ADNccc découvert chez la souche de référence *Marinitoga okinawensis*

ORFs	Functions (predicted by RAST)	best BLASTP	Identity	E value
1	Hypothetical protein			
2	Hypothetical protein			
3	Conserved protein	*Marinitoga piezophila* KA3 ATPase	73 %	0.0
4	Hypothetical protein			
5	Type I restriction modification system, restriction subunit R	*Coprothermobacter proteolyticus* Type I restriction modification enzyme	64 %	7.0×10^{-18}
6	Type I restriction modification system, restriction subunit R	*Coprothermobacter proteolyticus* Type I restriction modification enzyme	73 %	0.0
7	Type I restriction modification system, DNA methyltransferase subunit M	*Coprothermobacter proteolyticus* Type I restriction modification enzyme	47 %	0.0
8	Hypothetical protein			
9	Hypothetical protein			
10	Hypothetical protein			
11	Hypothetical protein			
12	Hypothetical protein			
13	Phage DNA invertase	Synechococcus sp. PCC 7002 Site specific recombinase for excision and integration	52 %	2.0×10^{-69}
14	Hypothetical protein			
15	Diguanylate cyclase/ phosphodiesterase	*Fervidobacterium nodosum* Rt17-21 Same function	68 %	9.0×10^{-62}
16	Methyl-accepting chemotaxis protein	*Marinitoga piezophila* KA3 Same function	55 %	5.0×10^{-114}
17	Methyl-accepting chemotaxis protein	*Marinitoga piezophila* KA3 Same function	65 %	0.0
18	Response regulator	*Kosmotoga olearia* TBF 19. 5.1 Metal dependent phosphohydrolase	41 %	6.0×10^{-87}
19	Positive regulator of Che A protein activity (Che W)	*Caldicellulosiruptor owensensis* OL Che W protein	34 %	7.0×10^{-32}
20	Positive regulator of Che A protein activity (Che W)	*Brachispyra innocens* Chemotaxis protein	33 %	7.0×10^{-17}
21	Hypothetical protein			
22	Phage antirepressor protein	Firmicutes Hypothetical protein	62 %	2.0×10^{-33}
23	Chromosome (plasmid) partitioning protein ParA	*Bacteroides sp. CAG:770* Chromosome segregation ATPase	33 %	6.0×10^{-33}

Sur les 23 ORFs prédits et annotés via RAST (Aziz *et al.*, 2008), l'ADNccc en compte 9 codant pour des protéines hypothétiques et 14 qui se sont vus attribuer des fonctions putatives.

Les premières analyses menées n'ont pas permis de prédire formellement d'origine de réplication. L'absence apparente de protéines de structures virales (protéines capsidiales ou caudales) a conduit à envisager que l'élément considéré corresponde à un plasmide, baptisé pMO1.

Les ORFs 5, 6 et 7, colorés en rouge sur la carte de la figure 4, ont été annotés en tant que type I restriction modification system subunits R pour les 2 premiers et subunit M pour le dernier. Les similarités de séquences les plus fortes ont été obtenues avec des gènes impliqués dans des systèmes de restriction/modification retrouvés chez le *Firmicute* thermophile anaérobie *Coprothermobacter proteolyticus.* Ceci pourrait donc illustrer à nouveau l'existence de transferts latéraux entre *Firmicutes* et *Thermotogales*.

De manière générale, les systèmes de restriction/modification sont constitués de 2 enzymes. Une methyltransférase qui introduit des modifications de l'ADN génomique des procaryotes en méthylant des séquences spécifiques et une endonuclease responsable de la digestion des ADN ne présentant pas les modifications précédemment évoquées. Ils constituent ainsi notamment des systèmes de défense chez les procaryotes dirigés contre des ADN exogènes invasifs tels que les ADN viraux (Youell & Firman, 2008 ; Furuta & Kobayashi, 2013). Ces systèmes peuvent être portés par des éléments génétiques mobiles et notamment des plasmides, mais également des transposons, des îlots de pathogénicité et même des virus (Furuta & Kobayashi, 2013). Sur la base de leurs caractéristiques génétiques et biochimiques, les systèmes de restriction/modification sont classés en 4 types différents : I, II, III et IV. Les systèmes de restriction/modification de type I sont composés de 3 sous-unités ; S, M et R respectivement impliquées dans la reconnaissance de la séquence d'ADN spécifique, la méthylation de celle-ci et la restriction des séquences d'ADN identiques non méthylées (Furuta & Kobayashi, 2013). L'analyse de l'ORF 5 via la base de données pfam a révélé qu'il correspondait à l'extrémité N terminale d'une enzyme de restriction et celle de l'ORF 6 qu'il correspondait à la sous unité R d'un système de restriction/modification. Enfin l'ORF 7 correspond à une méthyltransférase et comprend le domaine N terminal de la sous-unité M d'un système de restriction/modification de type I, une N6 adénine méthylase et 2 domaines correspondant aux sous unités S d'un système de restriction/modification de type I.

Il aurait été intéressant de pouvoir analyser en parallèle la séquence chromosomique de la souche hôte *Marinitoga okinawensis* (génome non disponible dans les banques de données) afin

de déterminer si des systèmes de restriction/modification étaient détectés et si leurs gènes constituaient des copies de ceux présents sur le plasmide. Une autre hypothèse est que ces gènes présents sur l'élément extra chromosomique puissent constituer un système de restriction/ modification supplémentaire différent de ceux déjà présents sur le chromosome. Il ne peut être exclus qu'ils contribuent également à complémenter certains ORFs présents sur le chromosome pour constituer des systèmes de restriction/modification entiers et fonctionnels.

Au moins 4 ORFs codent, par ailleurs, pour des protéines intervenant dans la cascade de transduction du signal impliquée dans le chimiotactisme. Ces derniers sont indiqués en bleu sur la carte de la figure 4. Les ORFs 16 et 17 ont notamment été annotés en tant que methyl-accepting chemotaxis protein et les similarités de séquences les plus fortes ont été obtenues chez *Marinitoga piezophila* KA3. Ces gènes sont fréquemment retrouvés chez les *Thermotogales* les plus thermophiles mais leur nombre au sein des génomes apparaît très variable (Nesbø, communication personnelle). Ceci suggère qu'ils soient fréquemment transférés et perdus et il n'est donc pas surprenant les retrouver au sein d'un plasmide.

Deux ORFS de pMO1 pourraient enfin avoir une origine virale. L'ORF 22, coloré en vert sur la carte de la figure 4, a été annoté en tant que phage anti repressor protein. Les gènes codant pour de telles protéines sont présents au sein de nombreux génomes de bactériovirus mais pas au sein des génomes bactériens. Ces protéines codées par de nombreux bactériovirus sont produites continuellement et interagissent avec les protéines virales repressor correspondantes ; elles déterminent ensemble l'état du virus en régulant l'expression des gènes impliqués dans le déclenchement du cycle lytique (Makarova *et al*., 2009). Mis à part les virus, il a été démontré que ce type de protéine pouvait être codé par des plasmides satellites qui les utilisent pour déclencher l'entrée en cycle lytique de virus tempérés dont les capsides contribuent ensuite à la propagation des plasmides en question. Le plasmide P4 chez *Escherichia coli* et le plasmide RS1 chez *Vibrio cholerae* sont deux exemples qui l'illustrent (Liu *et al*., 1998 ; Davis *et al.*, 2002).

Les protéines anti repressor contiennent habituellement un domaine N terminal appartenant à la famille Bro et un domaine C terminal de la famille ANT ou Kill-AC, impliqués dans des liaisons à l'ADN (Makarova *et al.*, 2009). L'analyse de l'ORF 22 sur pfam n'a démontré uniquement que la présence d'un domaine N terminal du type Bro. Celui-ci, bien que répandu, au sein du monde viral n'a pas une fonction clairement identifiée. Il a été proposé qu'il puisse se lier à l'ADN et intervenir dans la régulation de la transcription ou de la réplication du virus et de l'hôte.

L'ORF 13, coloré en rose sur la carte de la figure 4, a été annoté en tant que phage DNA invertase. Son analyse sur pfam a démontré la présence d'un domaine resolvase à l'extrémité N terminal et suggère que l'élément extra chromosomique puisse être intégratif.

2.2. LES ANALYSES EN MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE

Les surnageants des cultures des 21 souches à priori porteuses d'un élément extra chromosomique ont été analysés en microscopie à épifluorescence. Ces analyses ont été effectuées sur des cultures en fin de phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance lorsque la production virale était supposée maximale. Les résultats obtenus ont été comparés au surnageant d'une culture de *Thermococcus prieurii*, porteuse du virus TPV1 et servant de contrôle positif. En fonction de la nature et de la quantité de points fluorescents observés, les différentes cultures de *Thermotogales* se sont révélées plus ou moins susceptibles de produire des VLPs. Les résultats de ces analyses sont résumés dans le tableau 2 et les photographies de la figure 2 illustrent la discrimination réalisée entre les 21 cultures.

Tableau 5 : Bilan des analyses menées en microscopie à épifluorescence sur les surnageants de cultures de *Thermotogales* pré sélectionnées car porteuses d'un ADNccc. [1] Souches de référence. [2] Commandée à la DSMZ. [3] Souche non hydrothermale fournie par Camilla Nesbø. Les autres souches appartenant à la collection du LM2E. * ADNccc supposés qui n'ont pu être digérés en RFLP. + Production de VLPs comparable à celle du contrôle positif. +/- Production de VLPs inférieure à celle du contrôle positif. - Non production de VLPs.
En rouge, les souches considérées comme les plus susceptibles de produire des VLPs à l'issue de ces analyses

Souches	Genres si déterminés	Espèces si determinées	Sites d'isolement	ADNccc	Analyses en épifluorescence de la production de VLPs
BI429[1]	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Lau Basin	*	+
BI430	*Thermosipho*		Lau Basin	*	-
BI431	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Lau Basin	*	+
BI432	*Thermosipho*		Lau Basin	*	-
BI433	*Thermosipho*		Lau Basin	*	+/-
BI434	*Thermosipho*		Lau Basin	*	-
BI487	*Thermosipho*	*melanesiensis*	Lau Basin	*	+
AM1112			EPR 13°N	*	-
AM1135			EPR 13°N	*	-
AM1137	*Marinitoga*		EPR 13°N	*	+
AM1138			EPR 13°N	*	-
KA3[1]	*Marinotoga*	*piezophila*	EPR 13°N	13,3 kb	+/-
MV1063	*Thermosipho*		Menez-Gwen	*	-
MV1070	*Thermosipho*		Menez-Gwen	*	+/-
MV1074	*Thermosipho*		Menez-Gwen	*	-
DV1140[1]	*Thermosipho*	*atlanticus*	Menez Gwen	*	+/-
DV1154	*Marinitoga*		Menez-Gwen	*	-
AT1222-VC15	*Thermosipho*		Rainbow	*	-
AT1223-VC20	*Thermosipho*		Rainbow	*	-
TFS10-5[T1,2]	*Marinitoga*	*okinawensis*	Yonaguni Knoll IV	27,9 kb	-
H17ap60334[3]	*Thermosipho*	*africanus*	Puit de pétrôle profond	*	+/-

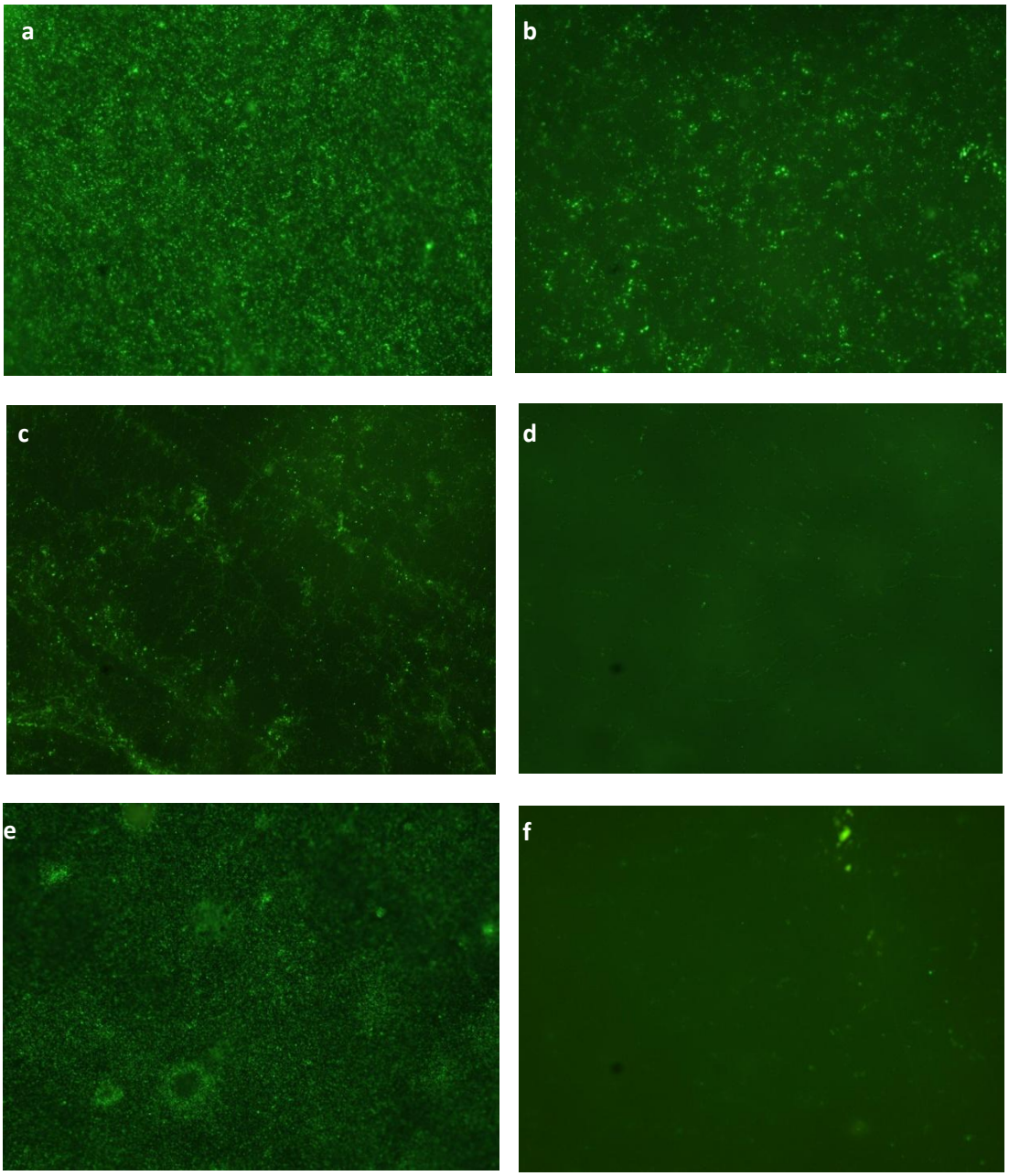


Figure 5 : Quelques résultats des analyses des surnageants de cultures de *Thermotogales* observés en microscopie à épifluorescence

Observations sous UV des surnageants de cultures après marquage au Sybr Green I 10 X. Grossissement 1000 X

a : Surnageant dilué 50 x de la culture Thermosipho melanesiensis BI431 illustrant une production de VLPs comparable à celle du contrôle positif. Exemple de surnageant noté + au sein du tableau 2

b : Surnageant dilué 50 x de la culture Thermosipho BI433 illustrant une production de VLPs inférieure à celle du contrôle positif. Exemple de surnageant noté +/- (+) au sein du tableau 2

c, d : Surnageants dilués 50 x des cultures Thermosipho BI432 et Thermosipho MV1063 illustrant une non production de VLPs. Exemple de surnageants notés - au sein du tableau 2. Le surnageant de la culture MV1063, en c, illustrant un seuil fixé à partir duquel il a été estimé que la production de VLPs était absente

e : Contrôle positif, surnageant dilué 50 x d'une culture de T. prieurii productrice de l'archeovirus TPV1

f : Contrôle négatif

Lorsqu'à partir de leurs surnageants, des tapis de petits points verts uniformes étaient observés sous UV, la probabilité pour que les cultures produisent des VLPs était considérée comme très forte. Ceci s'est avéré être le cas des cultures *Thermosipho melanesiensis* BI429, BI431, BI487, et *Marinitoga* AM1137 dont les analyses des surnageants en épifluorescence étaient très comparables à celle du surnageant de *Thermococcus prieurii* utilisé comme contrôle positif (photographies a et e de la figure 2). Quand un nombre plus faible mais tout de même conséquent de signaux fluorescents uniformes était observé, les cultures restaient considérées comme potentiellement productrices de VLPs. Les cultures *Thermosipho* BI433, *Marinitoga piezophila* KA3, *Thermosipho* MV1070 et *Thermosipho atlanticus* DV1140 se sont révélées être dans ce cas (photographie b de la figure 2). Enfin, lorsque les analyses de leurs surnageants sous UV n'avaient conduit qu'à l'observation d'un nombre plus restreint de signaux fluorescents et/ou peu uniformes, les probabilités pour que les cultures produisent des VLPs étaient estimées faibles (photographie c et d de la figure 2).

Des tests complémentaires d'induction de la production de VLPs ont par la suite été réalisés notamment sur *Marinitoga piezophila* KA3, une bactérie précédemment décrite dans notre laboratoire (Alain *et al*., 2002). La mitomycine C a été utilisée, préférentiellement aux ultraviolets, comme agent inducteur pour des raisons pratiques, mais aussi d'efficacité prouvée chez différents modèles bactériens. Il s'agit d'un antibiotique dont l'effet peut s'exercer sur des bactéries à gram positif ou gram négatif, en croissance ou non en causant des dommages à l'ADN. Cette molécule crée des liaisons entre les cytosines et les guanines de brins d'ADN différents ou entre deux guanines du même brin d'ADN (Bizanek *et al.*, 1994). La présence de ces liaisons, créées via des alkylations (Tomasz *et al.*, 1995), entraîne un arrêt de la synthèse d'ADN. Chez une souche d'*Escherichia coli* en croissance, lysogénisée par le bactériovirus lambda, Ce blocage de la réplication consécutif au traitement antibiotique déclenche le système SOS bactérien en vue de la réparation de l'ADN. Ce déclenchement passe notamment par l'activation de la protéine bactérienne RecA qui est également à l'origine d'une levée d'inhibition du cycle lytique du bactériovirus lambda (Gottesman et al., 1994).

Ces tests d'induction chez *Marinitoga piezophila* ont permis de définir que l'addition d'une concentration finale en mytomycine C de l'ordre de 5 µg/mL, en début de phase exponentielle de croissance, conduisait à une induction optimale de la production de VLPs. L'effet inducteur de l'antibiotique, constaté à l'issue d'analyses du surnageant de culture en épifluorescence, est illustré par les photographies a et b de la figure 3. Il a laissé supposer que la souche puisse être lysogénisée.

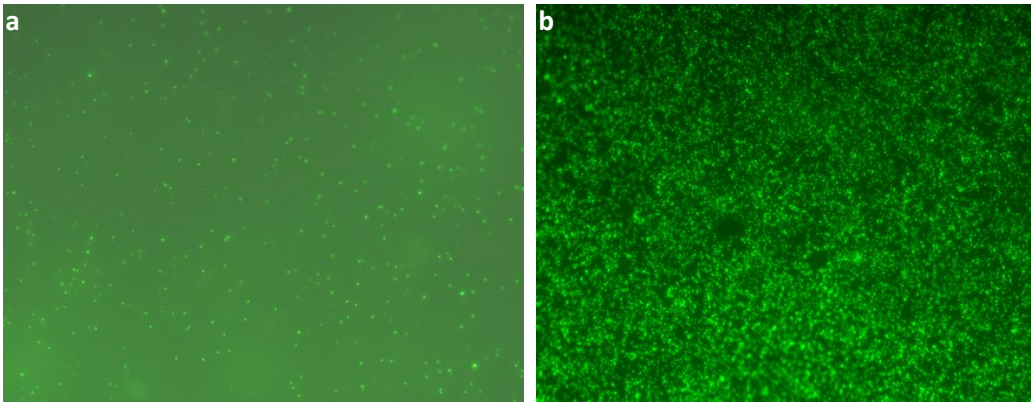


Figure 6 : Effet inducteur de la mytomicine C sur la production virale chez *Marinitoga piezophila*
Observations en microscopie à épifluorescence sous UV des surnageants de cultures après marquage au Sybr Green I 10 X. Grossissement 1000 X. a : Surnageant dilué 50 x d'une culture de 6h. b Surnageant dilué 50 x d'une culture de 6h après induction à la mitomycine C (cf : 5 µg/mL), l'addition de l'antibiotique ayant eu lieu 2h30 auparavant en début de phase exponentielle de croissance

Dans un deuxième temps, afin de privilégier la découverte potentielle d'autres virus tempérés, au sein du genre *Marinitoga*, les surnageants de cultures de quinze autres souches ont été analysés en microscopie à épifluorescence après addition ou non de mitomycine C (cf : 5 µg/mL) en début de phase exponentielle de croissance. Les résultats de ces analyses sont regroupés dans le tableau 5.

Tableau 6 : Bilan des analyses menées en microscopie en épifluorescence sur les surnageants de cultures de 15 souches du genre Marinitoga suivant qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance. [1] Souches de référence. [2] Commandée à la DSMZ. * Souche finalement réaffiliée sur la base de l'analyse du gène codant pour l'ARNr16S à l'issue de ces travaux. NA: Non Analysé car déjà très forte probabilité de production de VLPs en l'absence de l'antibiotique. Le code utilisé pour évaluer la probabilité qu'ont les cultures de produire des VLPs correspond à celui déjà utilisé dans le tableau 2 et illustré avec la figure 2. + Production de VLPs comparable à celle du contrôle positif. +/- Production de VLPs inférieure à celle du contrôle positif. - Non production de VLPs. En rouge, les souches apparues comme les plus susceptibles de produire des VLPs à l'issue de ces analyses

Souches	Genres si déterminés	Espèces si determinées	Sites d'isolement	Analyses en épifluorescence de la production de VLPs	
				Sans mitomycine C	Avec mitomycine C
MV1075[1]	*Marinitoga*	*camini*	Menez Gwen	-	+/-
DV1120	*Marinitoga*		Menez-Gwen	+/-	+
DV1142	*Marinitoga*		Menez-Gwen	-	-
DV1143	*Marinitoga*		Menez-Gwen	-	-
DV1150	*Marinitoga*		Menez-Gwen	+	NA
DV1153	*Marinitoga*		Menez-Gwen	+	NA
DV1155	*Marinitoga*	*camini*	Menez-Gwen	+/-	+
DV1197	*Marinitoga*	*camini*	Lucky-Strike	+/-	+
DV1199	*Marinitoga*		Lucky-Strike	-	+/-
DV1200	*Marinitoga*		Lucky-Strike	-	-
DV1201	*Marinitoga*		Lucky-Strike	+	NA
AT1244-VC14*	*Marinitoga* *	*camini**	Rainbow	-	-
AT1253-VC28	*Marinitoga*		Rainbow	-	-
AT1271[1]	*Marinitoga*	*hydrogenitolerans*	Rainbow	-	-
TFS10-5[T1,2]	*Marinitoga*	*okinawensis*	Yonaguni Knoll IV	-	-

Six nouvelles souches du genre *Marinitoga* très susceptibles de produire des VLPs ont ainsi pu être mises en évidence. Trois de ces souches DV1150, DV1153 et DV1201 sont apparues très susceptibles de produire des VLPs sans qu'il y ait besoin d'analyser l'effet de la mitomycine C sur cette production. Les productions de VLPs des 3 autres souches DV1120, DV1155 et DV1197 ont, quant à elles, semblé avoir nettement augmenté à la suite du stress provoqué par le traitement antibiotique comme chez *Marinitoga piezophila*.

Des tentatives d'induction de la production virale ont également été réalisées sur la souche *Thermosipho africanus* H17ap60334 ; une concentration comprise entre 5 et 10 µg/mL en mytomicine C a été nécessaire pour constater un effet inducteur moins net que celui observé chez la souche *Marinitoga piezophila* KA3.

2.3. LES ANALYSES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

Les surnageants des 14 cultures, notées en rouge dans les tableaux 2 et 3, pour lesquelles les productions de VLPs étaient considérées comme les plus probables à l'issue des analyses en épifluorescence ont été analysés en MET. Ces analyses ont majoritairement été menées sur des surnageants de culture en phase stationnaire de croissance. Les 5 exceptions ont concerné les souches pour lesquelles un effet inducteur de la mitomycine C avait été observé (en comptant la souche *Thermosipho africanus* H17ap60334) et dont les surnageants ont en conséquence été analysés en MET après addition de l'antibiotique.

Les analyses des surnageants des cultures des souches *Thermosipho atlanticus* DV1140, *Thermosipho* BI433 et MV1070, ainsi que celles des souches *Marinitoga* AM1137, DV1150, DV1153, DV1120 et DV1201 n'ont pas permis la découverte de virions. Il ne peut bien sûr être exclu que ces cultures soient réellement infectées mais que les particules virales produites n'aient pas été détectées en MET. L'analyse de ces surnageants et, notamment, celui de la culture MV1070 a néanmoins conduit à la visualisation de fragments de la toga et/ou d'entités faisant penser à des vésicules membranaires. Il a déjà été démontré que les vésicules membranaires produites par les euryarchées des genres *Thermococcus* et *Pyrococcus* pouvaient être associées à des acides nucléiques et de ce fait facilement génératrices de faux positifs au cours de la recherche de particules virales en épifluorescence (Soler et al., 2008, 2011; Forterre *et al.*,2012).

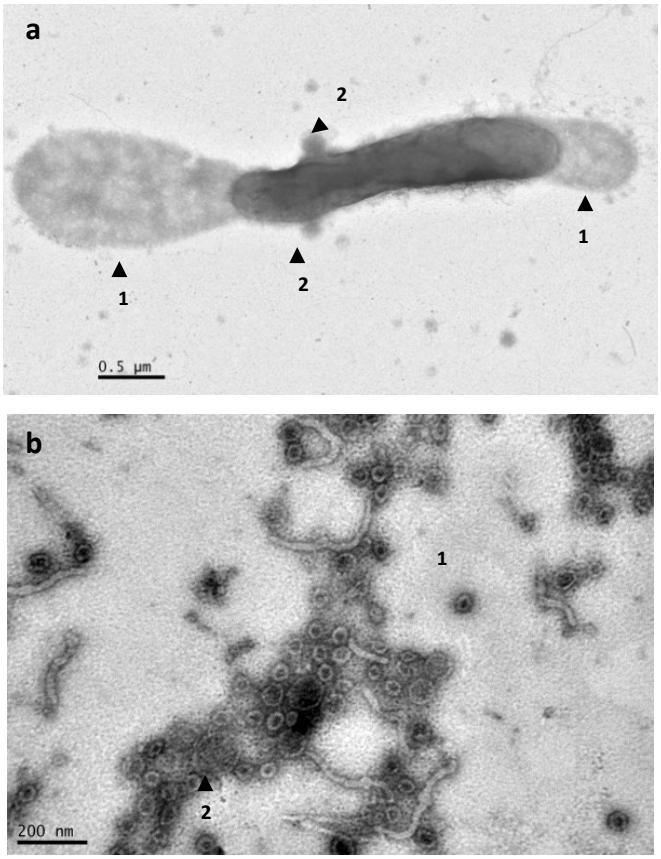


Figure 7 : Surnageant de la culture MV1070 observé en MET

a : Cellule résiduelle. [1] Toga caractéristique ballonnant à ces extrémités. [2] entités semblant bourgeonner de la cellule. b : [1] Entités du type vésicules membranaires et [2] fragments de la toga

Ces analyses en MET ont, par ailleurs, permis la découverte de 7 bactériovirus caudés associés à l'ordre des *Thermotogale*s. Ils ont respectivement été détectés au sein des surnageants des cultures des souches *Thermosipho africanus* H17ap60334, *Thermosipho melanesiensis* BI429 (Antoine *et al.*,1997), BI431 et BI487, *Marinitoga piezophila* KA3 (Alain *et al.*,2002), *Marinitoga* camini DV1155 et DV1197. Sur le plan morphologique, les 7 particules découvertes se révèlent être du type *Siphoviridae* en étant composées d'une capside icosaédrique de 50 à 55 nm de diamètre et d'une queue flexible de 150 à 200 nm de long et 10 nm de large comme en témoignent les photographies de MET de la figure 4.

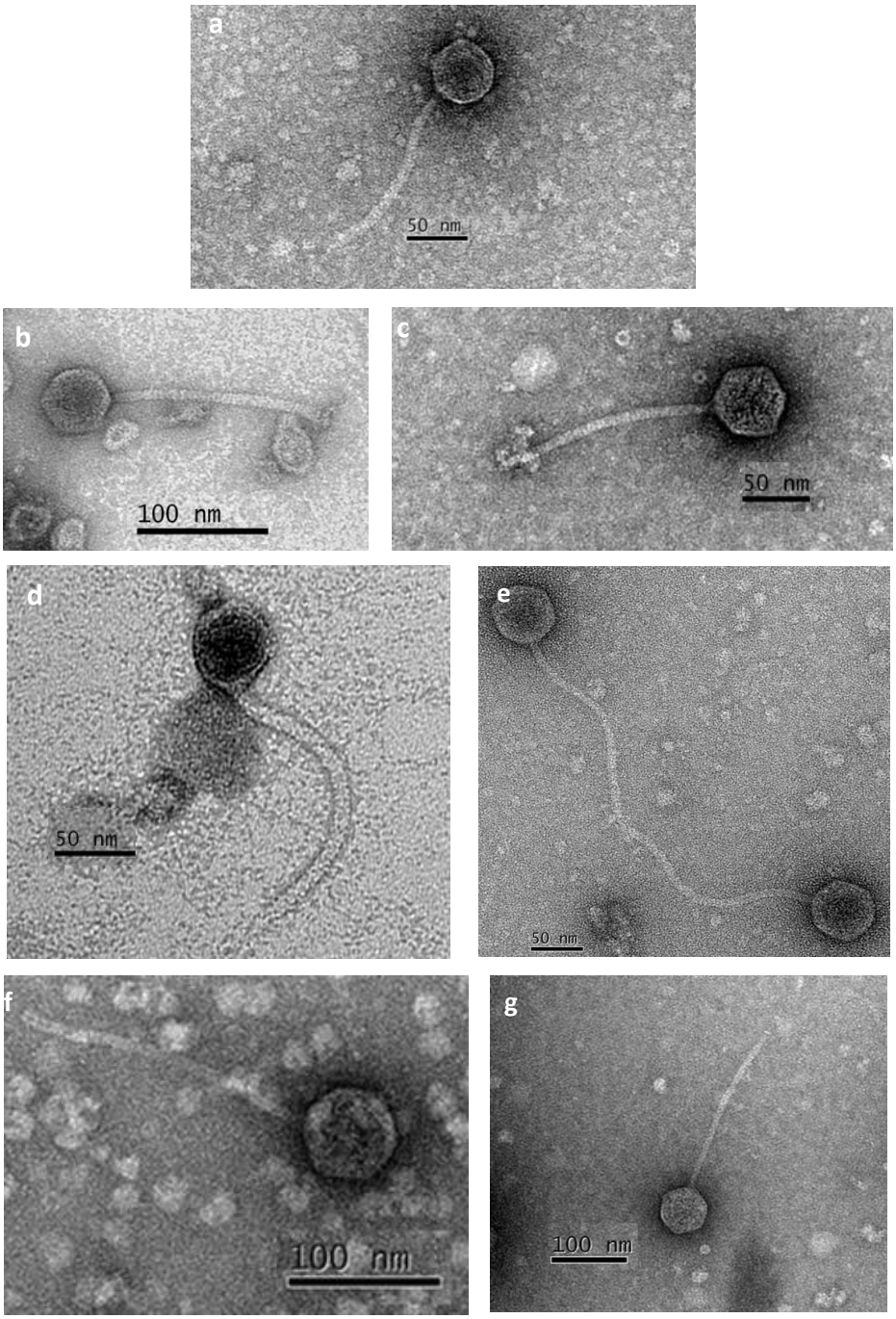


Figure 8 : Les 7 premiers bactériovirus associés à l'ordre des *Thermotogales* observés en MET

a : Siphovirus like associé à la souche *Thermosipho africanus* H17ap60334

b : Siphovirus like associé à la souche *Thermosipho melanesiensis* BI429

c : Siphovirus like associé à la souche *Thermosipho melanesiensis* BI431

d : Siphovirus like associé à la souche *Thermosipho melanesiensis* BI487

e : Siphovirus associé à la souche *Marinitoga piezophila* KA3

f: Siphovirus like associé à la souche *Marinitoga camini* DV1155

g : Siphovirus like associé à la souche *Marinitoga camini* DV1197

La caractérisation détaillée du siphovus issu de *Marinitoga piezophila* KA3 sera présentée dans le deuxième chapitre de cette thèse.

2.4. DECOUVERTE DE PROVIRUS AU SEIN DES SOUCHES INFECTEES

Trois des génomes des souches infectées (*Thermosipho melanesiensis* BI429, *Thermosipho africanus* H17ap60334 et *Marinitoga piezophila* KA3) s'avéraient déjà disponibles dans les bases de données au moment de cette recherche ; l'utilisation de Prophinder et des comparaisons de séquences permirent à Camilla Nesbø et Olga Zhaxhybayeva, avec qui nous collaborons, d'y détecter respectivement 3 provirus putatifs décrits figure 9.

Tous les ORFs colorés en vert au niveau de ces 3 provirus putatifs ont des homologues chez des bactériovirus et provirus dans Genebank. Une majorité de ces homologies sont retrouvées chez des Firmicutes et des bactériovirus les infectant. Plusieurs ORFs, indiqués au sein des 3 provirus par des étoiles, ont, par ailleurs, des homologues sur le génome de leur hôte en dehors de la région provirale ou au sein d'autres génomes de *Thermotogales.* Ceci laisse envisager des acquisitions par transferts latéraux entre bactériovirus chez les *Thermotogales*.

Les deux provirus retrouvés respectivement chez *Thermosipho africanus* H17ap60334 et *Thermosipho melanesiensis* BI429 sont apparus très similaires. Tous deux ont une taille supposée d'environ 35 kb et ont en commun 32 ORFs sur les 47 et 48 ORFs qu'ils comptent respectivement. En considérant que ces 2 provirus putatifs correspondent effectivement aux génomes viraux des particules virales observées en MET, il est intéressant de noter l'existence de ces similarités entre des bactériovirus qui ont pourtant, comme l'illustre la figure 11, des hôtes éloignés géographiquement. L'un infecte en effet une souche de *Thermosipho africanus* collectée à partir d'un puits de pétrole offshore dans l'Atlantique Nord tandis que l'autre infecte une souche de *Thermosipho melanesiensis* isolée au niveau d'une source hydrothermale océanique profonde du Pacifique Sud. Le troisième provirus, prédit chez *Marinitoga piezophila* KA3 fait environ 44 kb, compte 54 ORFs et partage 13 familles de gènes avec les provirus précédents.

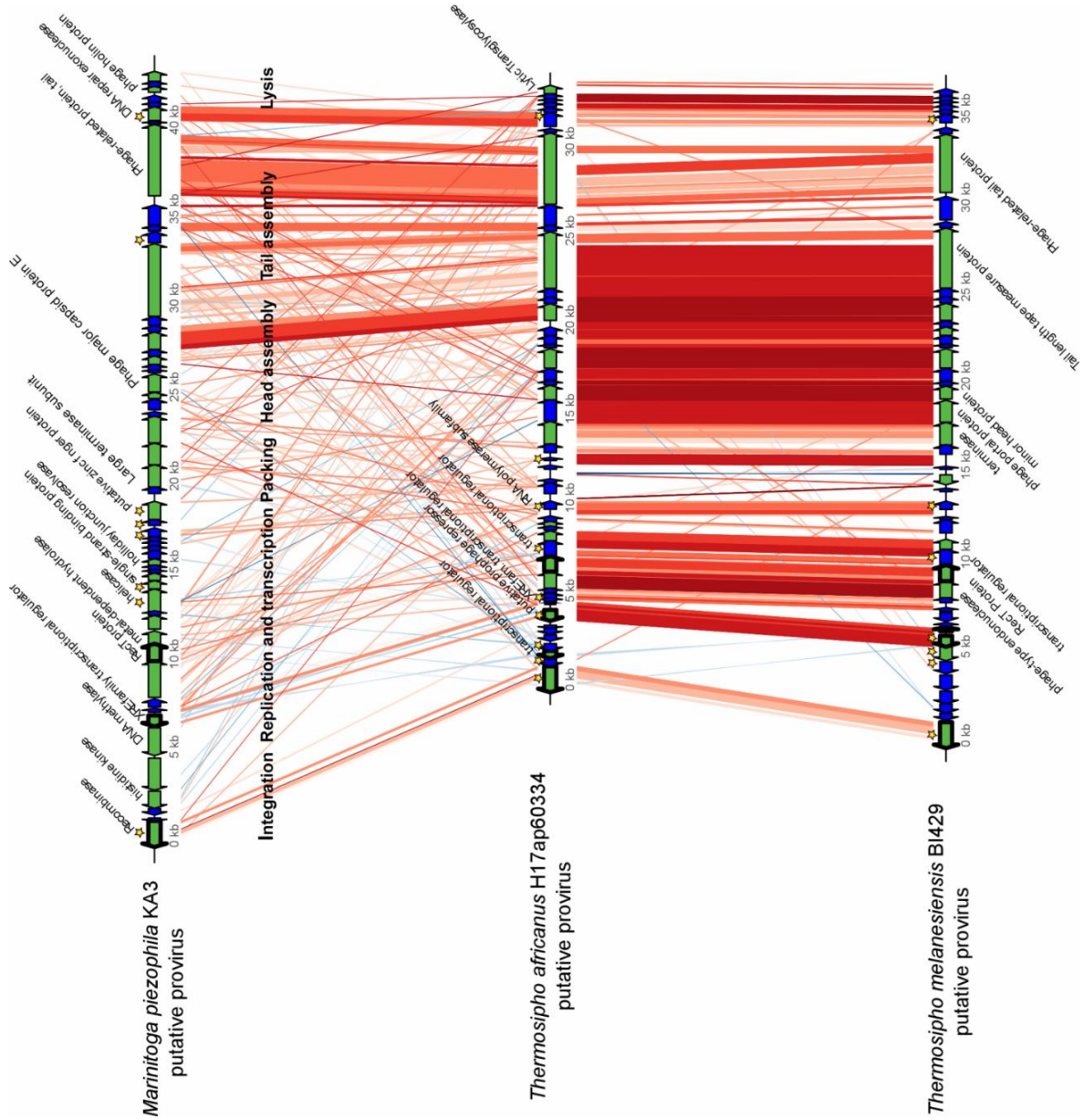


Figure 9: Comparaison des provirus putatifs découverts au sein des souches *Marinitoga piezophila* KA3, Thermosipho africanus H17ap60334 et Thermosipho melanesiensis BI429. Comparaison des régions génomiques provirales dessinées sur genoPlotR en se basant sur des BLASTX

L'organisation génomique des 3 provirus apparaît notamment similaire à celles des provirus détectés chez *Enterococcus faecalis* (Yasmin *et al.,* 2010). De manière très générale, différents modules fonctionnels semblent pouvoir être distingués, lesquels sont dévolus de 5' en 3' à l'intégration, la réplication, la transcription, l'encapsidation de l'ADN, l'assemblage de la tête, l'assemblage de la queue et la lyse.

L'analyse préliminaire de la séquence du provirus putatif découvert chez *Thermosipho melanesiensis* BI429 a permis par exemple l'identification d'ORFs codant pour une terminase et une protéine portale impliquées dans l'encapsidation du génome virale. Un ORF codant pour une protéine minoritaire de capside et 2 ORF protéines impliquées dans la structuration de la queue dont la tail tape protein measure définissant précisément la longueur de la queue ont également pu être mis en évidence.

La séquence du provirus putatif détecté chez *Marinitoga piezophila* sera présentée plus en détail dans le second chapitre de cette thèse. Deux ORFs codant pour une recombinase impliquées dans l'intégration du génome viral et un ORF codant pour une grande sous-unité de la terminase impliquée dans l'encapsidation du génome viral ont par exemple été identifiées. Des gènes codant pour des protéine de structure virale sont aussi présents avec un ORF codant pour la MCP (Major Protein Capsid) ou protéine majoritaire de capside et 2 ORFs impliqués dans la structuration de la queue. Citons enfin un ORF codant pour une holine impliquée dans la lyse virale en créant des pores dans la membrane plasmique.

Ces découvertes encouragèrent à chercher des provirus au sein des autres souches infectées (*Thermosipho melanesiensis* BI431, *Thermosipho melanesiensis* BI487, *Marinitoga* DV1155 et *Marinitoga* DV1197). Leurs ADN totaux ont, notamment dans ce but, d'abord été extraits puis envoyés à séquencer et à analyser dans le cadre de la collaboration avec Camilla Nesbø, Olga Zhaxybayeva et Thomas Haverkamp. Les résultats des séquençages et l'analyse des génomes bien que toujours en cours nous ont déjà permis de détecter également la présence de provirus dans ces différents génomes. Il est ressorti de l'analyse préliminaire que les souches *Thermosipho melanesiensis* BI429, BI431 et BI487 constituaient des souches très similaires avec des différences génomiques très limitées. Ce constat inclut les régions provirales supposées. Pour cette raison, seule l'organisation du provirus putatif de la souche BI429 est présentée figure 9.

Une annotation préliminaire des génomes des souches *Marinitoga camini* DV1155 et DV1197 a été effectuée sur RAST et une recherche de provirus entreprise par Camilla Nesbø via Prophinder a permis la détection de deux provirus putatifs. Ces derniers ont des tailles respectives d'environ 51 et 55 kb et possèdent respectivement 74 et 77 ORFs prédits par RAST. Une comparaison est présentée sur la figure 10 entre ces provirus putatifs et celui retrouvé chez *Marinitoga piezophila* KA3. Leur organisation en modules est comparable à celles des autres provirus analysés. Comme précédemment, les ORFs en verts sont ceux avec des homologues chez d'autres bactériovirus ou provirus dans Genebank, majoritairement chez les Firmicutes et leurs virus et ceux marqués d'une étoile ont des homologues en dehors de la région provirale ou sur d'autres génomes de *Thermotogales.* Les 2 provirus putatifs, détectés chez ces souches de *Marinitoga camini*, ont 37 ORFs en commun avec le provirus putatif de *Marinitoga piezophila*. Des ORFs codant pour la grande sous-unité de la terminase, la MCP, les protéines de queue et la holine ont notamment été retrouvés. L'analyse de ces 2 provirus et de celui de *Marinitoga piezophila* a enfin révélé qu'ils étaient tous 3 insérés à proximité d'un ORF codant pour un ARNt pour l'acide glutamique. Les gènes codant pour des ARNt constituent les sites d'intégration préférentiels des génomes de bactériovirus (Canchaya et al, 2004).

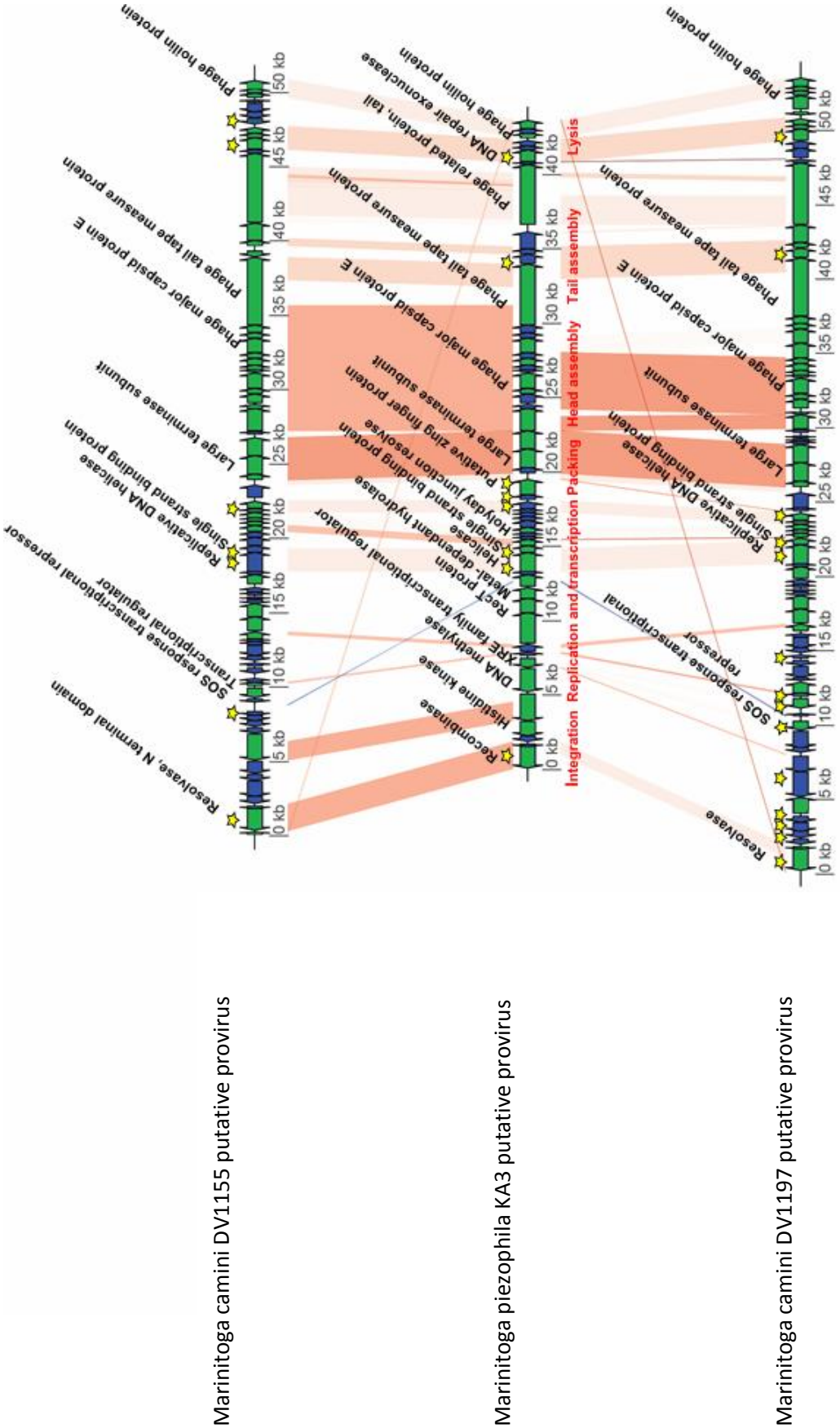


Figure 10 : Comparaison des provirus putatifs découverts au sein des souches Marinitoga DV1155, Marinitoga piezophila KA3 et Marinitoga DV1197. Comparaison des régions génomiques provirales dessinées sur genoPlotR en se basant sur des BLASTN

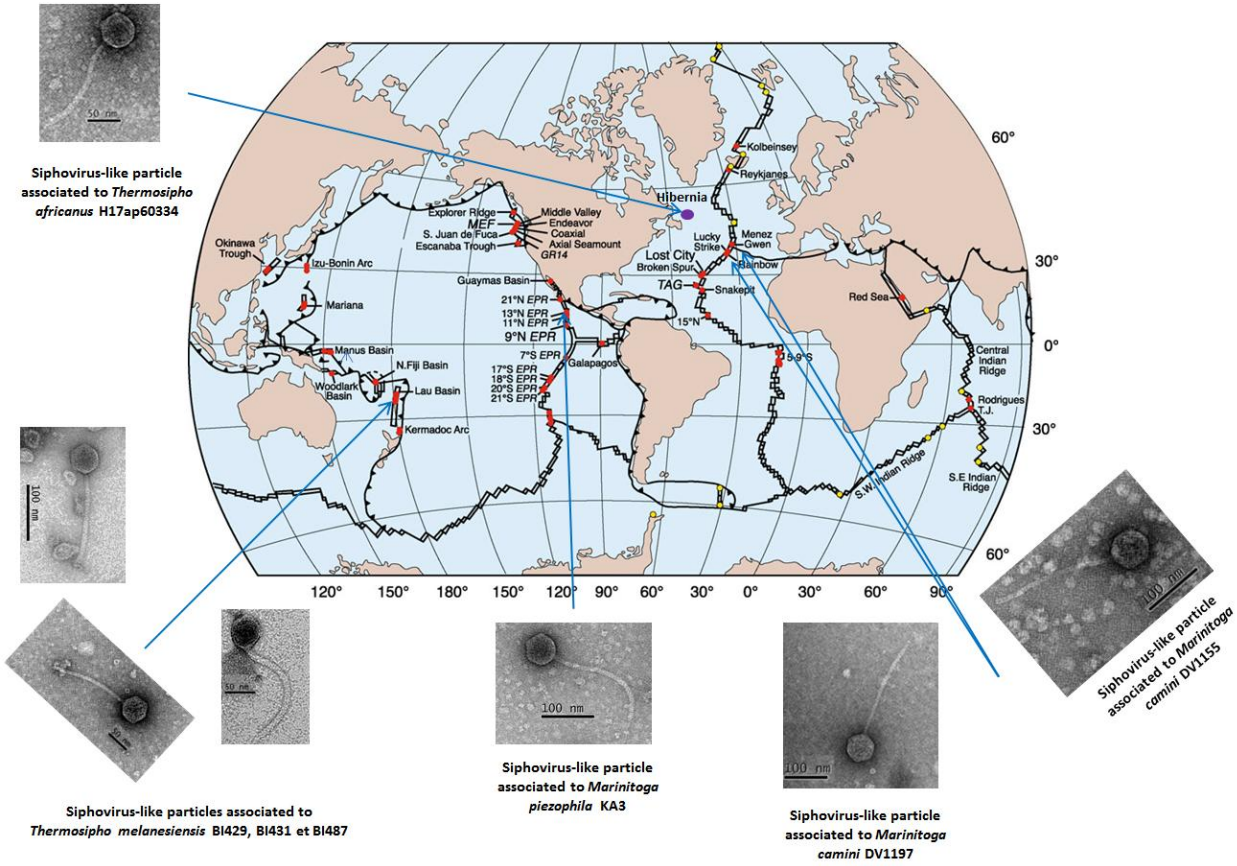


Figure 11 : La répartition biogéographique des particules virales de type *Siphoviridae* découvertes chez les *Thermotogales*. Les points rouges correspondent à des sources hydrothermales océaniques profondes.. Le point violet correspond à un puits de pétrole offshore (D'après Flores et Reysebach, 2013)

2.5. LE BILAN DE CE CRIBLAGE

Tableau 7 : Bilan des principaux résultats obtenus à l'issue du criblage consacré à la recherche de virus et plasmides chez 55 souches de *Thermotogales*. [1] Souches de référence. [2] Commandée par la DSMZ. [3] Souche non hydrothermale fournie par Camilla Nesbø. * ADNccc supposés qui n'ont pu être digérés en RFLP. AI : Après Induction à la mitomycine c

Souches	Genres et espèces si déterminés	Sites d'isolement	ADNccc	Analyses en épifluorescence Production de VLPs	Analyses en MET
BI429[1]	***Thermosipho melanesiensis***	**Lau Basin**	*	+	**Siphovirus like**
BI430	*Thermosipho*	Lau Basin	*	+/-	
BI431	***Thermosipho melanesiensis***	**Lau Basin**	*	+	**Siphovirus like**
BI432	*Thermosipho*	Lau Basin	*	+/-	
BI433	*Thermosipho*	Lau Basin	*	**+/- (+)**	
BI434	*Thermosipho*	Lau Basin	*	+/-	
BI487	***Thermosipho melanesiensis***	**Lau Basin**	*	+	**Siphovirus like**
AM1112		EPR 13°N	*	+/-	
AM1135		EPR 13°N	*	+/-	
AM1137		EPR 13°N	*	+	
AM1138		EPR 13°N	*	+/-	
KA3[1]	***Marinotoga piezophila***	**EPR 13°N**	**13,8 kb**	**+/- (+) et + AI**	**Siphovirus like**
MV1063	*Thermosipho*	Menez-Gwen	*	-	
MV1070	*Thermosipho*	Menez-Gwen	*	**+/- (+)**	**Vesicles**
MV1074	*Thermosipho*	Menez-Gwen	*	+/-	
DV1140[1]	*Thermosipho atlanticus*	Menez Gwen	*	**+/- (+)**	
DV1154	*Marinitoga*	Menez-Gwen	*	+/-	
AT1222 -VC15	*Thermosipho*	Rainbow	*	+/-	
AT1223 -VC20	*Thermosipho*	Rainbow	*	+/-	
TFS10-5[T1,2]	***Marinitoga okinawensis***	**Yonaguni Knoll IV**	**27,9 kb**	+/- et - AI	
DV1120	*Marinitoga*	Menez-Gwen	-	+/- (+) et +	
DV1150	*Marinitoga*	Menez-Gwen	-	+	
DV1153	*Marinitoga*	Menez-Gwen	-	+	
DV1155	***Marinitoga***	**Menez-Gwen**	-	**+/- (+) et + AI**	**Siphovirus like**
DV1197	***Marinitoga***	**Lucky-Strike**	-	**+/- (+) et + AI**	**Siphovirus like**
DV1201	*Marinitoga*	Lucky-Strike	-	+	
H17ap60334[2,3]	***Thermosipho africanus***	**Puits de pétrole pétrole profond Hibernia**	*	+	**+/- (+)**

CHAPITRE II

CARACTERISATION DE MPV1, LE PREMIER VIRUS ISOLE D'UNE BACTERIE THERMOPHILE ET PIEZOPHILE DE L'ORDRE DES THERMOTOGALES

PRESENTATION GENERALE DU TRAVAIL

MPV1 (*Marinitoga piezophila* virus 1) est le premier bactériovirus isolé de l'ordre des *Thermotogales*. L'hôte de ce virus, *Marinitoga piezophila* KA3, est piezophile mais est néanmoins susceptible d'être cultivé à pression atmosphérique à la suite de plusieurs repiquages. Si l'essentiel des analyses ont été menées à pression atmosphérique, la production virale s'avère tout à fait effective à pression hydrostatique. MPV1 est un virus tempéré, inductible à la mitomycine C, du type *Siphoviridae* ; les virions se caractérisent par une capside icosahédrique de 55 nm et une queue flexible de 200 nm de long et 10 nm de large.

Le génome viral, un ADN double brin de 43,7 kb peut s'intégrer au chromosome de son hôte bactérien au cours du cycle lysogénique. Sur les 54 ORFs qui composent ce génome viral, 23 codent pour des protéines sans similarités de séquences significatives avec celles répertoriées dans les bases de données. Parmi les 31 ORFs pour lesquels des homologies de séquences ont été retrouvées, 9 ont des homologies avec des séquences retrouvées chez les *Thermotogales* incluant notamment les séquences provirales détectées et présentées dans le premier chapitre de cette thèse. Ces résultats laissent supposer qu'au cours de son l'histoire évolutive, MPV1 ait donc déjà pu interagir avec d'autres *Thermotogales* ou leurs virus. Les 22 autres ORFs viraux présentent des homologies avec des séquences de *Firmicutes* ou avec celles de bactériovirus les infectant. Des analyses phylogénétiques ont par ailleurs été réalisées sur 19 ORFs viraux présentant plus de 3 homologues dans Genebank. Elles ont révélé que pour 11 des ORFs de MPV1, les gènes les plus proches étaient ceux de *Firmicutes* ou de leur virus. L'ensemble de ces résultats suggère donc une connexion évolutive entre MPV1 et les bactériovirus de *Firmicutes*.

Par ailleurs, MPV1 a la particularité de partager son hôte avec un ADNccc de 13,3 kb qui à l'issue du déclenchement d'un cycle lytique s'avère majoritairement encapsidé. Cet élément extra chromosomique, pMP1, ne porte aucun gène codant pour des protéines de structures virales et est préférentiellement empaqueté au sein des capsides virales. Sur les 13 ORFs que compte pMP1, seuls 7 ont présenté des homologies de séquence avec des familles de gènes impliqués dans des interactions à l'ADN suggérant leur implication dans la réplication et la propagation de cet élément.

Des analyses par qPCR ont d'autre part démontré que le niveau de réplication de pMP1 était multiplié par 20 à l'issue du déclenchement d'un cycle lytique chez *M. piezophila*, alors même que le niveau de réplication du bactériovirus MPV1 n'était seulement que multiplié par 6. L'ensemble de ces résultats nous a conduit à envisager que ce « ménage à 3 » décrit chez *M. piezophila* puisse correspondre à un nouvel exemple de piratage moléculaire.

Ces travaux seront prochainement soumis à la revue PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences)

Ménage à trois': a selfish genetic element uses a virus to propagate within a *Thermotogales* strain

J. Lossouarn[1,2,3], C. L. Nesbø[4,5], C. Mercier[1,2,3], O. Zhaxybayeva[6], M.S. Johnson[6], R. Charchuck[5], J. Farasin[1,2,3], N. Bienvenu[1,2,3], A.C. Baudoux[7,8], G. Michoud[1,2,3], M. Jebbar[1,2,3], and C. Geslin[1,2,3]

1. 1 Université de Bretagne Occidentale, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), rue Dumont d'Urville, 29 280 Plouzané, France
2. 2 CNRS, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM), rue Dumont d'Urville, 29 280 Plouzané, France
3. 3 Ifremer, UMR 6197-Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E), Technopôle Brest-Iroise, BP70, 29 280 Plouzané, France
4. CEES, Department of Biology, University of Oslo, 0316, Oslo, Norway
5. Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, AB, T6G2R3, Canada
6. Department of Biological Sciences, Dartmouth College, Hanover, NH, 03755, USA
7. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France
8. CNRS, UMR7144, Station biologique de Roscoff, 29682 Roscoff, France

ABSTRACT

Deep sea hydrothermal vents harbor a vast diversity of hyper/thermophilic *Archaea* and *Bacteria*, but the virosphere associated with these ecosystems remains largely unexplored. Nevertheless prokaryotic viruses are assumed to play a major role in the microbial ecology and evolution in these extreme ecosystems. The Thermotogales is a bacterial order broadly represented in the deep-sea biosphere and numerous instances of lateral gene transfers have contributed to the complex and incongruent evolutionary history of this group. The presence of CRISPRs has been reported in all Thermotogales genomes, suggesting that these bacteria have been exposed to viral infections that could have mediated gene transfer and exchange among this order. However, no virus infecting any Thermotogales species have been isolated yet. In this study we isolated and characterized the first bacterial virus infecting a piezophilic bacterium *Marinitoga piezophila* strain KA3, *M. piezophila* virus 1 (MPV1). MPV1 is a temperate Siphoviridae-like virus with 43.7 kb genome that is identical to the provirus present in the sequenced genome of *M. piezophila* KA3. Surprisingly, we find that most virions carry genetic material that does not correspond to the viral DNA. Instead, the viral particles preferentially packaged a 13.3 kb covalently closed circular DNA (pMP1) that contains 13 ORFs of mostly unknown function. This ‘ménage à trois’ highlights potential relevance of selfish genetic elements in facilitating lateral gene transfer in deep biosphere.

SIGNIFICANCE STATEMENT:

A new hydrothermal deep sea mobilome: a thermophilic bacteria, a virus and a pirate cccDNA which hijacks the viral capsid.

INTRODUCTION

Many hyper/thermophilic *Archaea* and *Bacteria* thriving in deep sea hydrothermal vents have been described. Several studies have started to address the genetic diversity, metabolic capacity and physiological adaptations of these extremophilic microorganisms (1) (2). However, the virosphere associated with these systems remains largely unexplored. To date, only seven viruses from deep-sea environments have been described: two archaeoviruses and five bacterioviruses.

Thermotogales is a bacterial order broadly represented in deep biosphere ecosystems, including species that are found in diverse hot environments, including deep-sea hydrothermal vents. This order consists mainly of hyper/thermophilic, anaerobic, chemo-organotrophic microorganisms (3). Phylogenetic studies, based on 16S rRNA gene and 29 concatenated ribosomal proteins, affiliate *Thermotogales* to *Aquificales*, and consequently place the *Thermotogales* as the second deepest branching order within domain *Bacteria* (4). However, numerous instances of lateral gene transfer have contributed to the evolutionary history of these bacteria. Phylogenomic analyses suggest that many genes of *Thermotogales* originate from other taxa, especially from *Firmicutes* and to a lesser, but significant, extent from *Archaea* and especially *Thermococcales* (5)(4)

CRISPRs are present in most, if not all, *Thermotogales* genomes, suggesting that *Thermotogales* have certainly been exposed to viral infections during the course of their evolutionary history. Prior to this study, no viruses infecting *Thermotogales* had been isolated. Up to date, the only extrachromosomal genetic elements that have been described in these lineages are two cryptic miniplasmids in the genus *Thermotoga* spp. (6) (7) and a 1,724 bp miniplasmid in *Mesotoga prima* (8).

Here we report the characterization of the first bacterial virus of the *Thermotogales* order. This virus infects *M. piezophila*, which was isolated from a deep-sea hydrothermal vent chimney

located at a depth of 2,630 m on the East-Pacific Rise (13S N) (9). *M. piezophila* virus 1 (MPV1) is a temperate *Siphoviridae*-like virus and is mitomycin C-inducible, its genome of 43.7 kb is identical to the provirus integrated in *M. piezophila* KA3's genome. This virus shares its host with a cccDNA of 13kb (pMP1). We demonstrate that pMP1 uses the MPV1 viral capsid to propagate, highlighting a complex evolutionary relationship between the bacterial host, an extrachromosomal element, and a virus.

MATERIALS AND METHODS

Screening of *Thermotogales* strains for virions

A total of 60 strains of *Thermotogales* were retrieved from the UBO culture collection "UBOCC" (www.univ-brest.fr/UBOCC). These strains were isolated from deep-sea vents in the Lau Basin (latitude, 22°32'S; longitude, 176"43'W; depth, 1832 to 1887 m), the East Pacific Rise (latitude, 12°48721'N; longitude, 103°56351'W; depth, 2630 m) and the Middle Atlantic Ridge (latitude, 36°139N; longitude, 33°549W; depth 2775 m). The 60 isolates were screened for mobile genetic elements as previously described (20). One of them, the reference strain *M. piezophila* KA3, was discovered to be the host of the virus MPV1.

Culture conditions

Thermotogales strains were cultured in a modified Ravot medium as previously described (9)(10) with minor modifications as described in *Supplemental Materiels and Methods*.

The medium, inoculated with 1% of late log-phase preculture, was incubated at 60°C, 65°C or 70°C according to the culture condition of the strains (11)(10). Most experiments were performed with the *M. piezophila KA3* cultured at 65°C and 0.1 MPa, with L-cystine added as electron acceptor. For the high hydrostatic pressure growth experiments, *M. piezophila KA3* cells

were grown at 40 MPa pressure in 5 ml gas-tight plastic syringes. The syringes were loaded anaerobically with 5 ml of reduced and modified Ravot medium inoculated with 1% of a preculture in exponential growth phase. The syringes were incubated at high pressure (40 MPa) and temperature (65°C) in HP/HT systems, custom-built by Top Industrie.

Viral induction assays by addition of mitomycin C

Viral production of MPV1 was tentatively induced using mitomycin C (12). Mitomycin C were added to cultures of *M. piezophila* at mid-log growth phase at final concentration of 0.1 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL and 10 µg/mL. After 3 hours of incubation with mitomycin C, aliquots were collected in duplicate to determine viral production by epifluorescence microscopy. A 'mitomycin C-free' culture was used as a control. Samples were fixed with 25% glutaraldehyde (0.5% final concentration, EM grade) for 15 min at 4°C, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. The viral counts were performed according to Noble and Fuhrman. Viral particles collected on anodisc 0.02 µm filters were counted in each of 20 random fields using a Olympus microscope BX60 (magnification x 100, WIB filter).

Monitoring of virus growth kinetics using flow cytometry"

Bacteria and virus abundances were monitored by flow cytometry using a FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience) equipped with a laser with an excitation wavelength of 488 nm (15 mW). Samples were fixed with 25% glutaraldehyde (0.5% final concentration, EM grade) for 15 min at 4°C, flash frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. The thawed samples were diluted 100 to 5,000-fold in autoclaved 0.2 µm filtered TE buffer (10:1 Tris–EDTA, pH 8.0) and stained with the nucleic acid-specific dye SYBR Green I (Invitrogen-Molecular Probes) for 15 min at room temperature and 10 min at 80°C for bacteria and viruses, respectively. The trigger was set

on the green fluorescence. The sample was delivered at a rate of 50 µl.min^{-1} and analyzed during at least 1 min. TE-buffer with autoclaved 0.2 µm filtered seawater was used as a control.

Concentration and purification of MPV1

300 mL of *M. piezophila* culture were induced by addition of mitomycin C (4 µg/mL, final concentration) at early exponential growth phase, 2 h later, debris and cells were pelleted by centrifugation at 7,500 x g, 4°C for 15 min and discarded. The supernatant was ultracentrifuged at 80, 000 g, 10°C for 2 h. The viral pellet was resuspended in 1 mL of buffer (10 mM Tris-HCL, 100 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 20 mM $MgCl_2$). The viral suspension was purified by ultracentrifugation in a linear Iodixanol gradient [OptiPrep, 30–45% diluted in a buffer (see above)] at 200, 000 *g* and 10°C for 5 h (Beckman Optima LE-80 K SW 55 rotor). Following ultracentrifugation, the opaque virus band was recovered and then dialysed by using nitrocellulose filters (MF Membrane Filter, 0.025 µm, Millipore) placed above a large volume of buffer given above. Viral solutions dialysed were recovered on the surface of the filter and stored at 4°C until use

To exclude the possibility of cellular nucleic acids contamination, the concentrated viral particles suspensions were treated with DNase and RNase. The viral particles were examined using a JEOL JEM 100 CX II transmission electron microscope as previously described (13, 14)

Extraction of host and viral DNA

Total DNA from *M. piezophila* cells and viral DNA from purified viral particles were prepared as previously described (13, 15). cccDNA (covalently closed circular DNA) was extracted from cells in exponential growth phase by alkaline lysis method (16). To confirm the nature of the DNA packaged in the viral capsids and to check potential chromosomal contamination, PCR amplifications were performed using forward (5′-GTGATGCCATTTTCCCAAGA-3′) and

reverse (5′-TGTTGGTTGAGGTCCTCCTT-3′) specific primers targeting 588 bp of the provirus, forward (5′ATTGGGCTGAACAAATGGAT-3′) and reverse (5′-CGCCAAAGACTTAAAGCATCA-3′) specific primers targeting 602 bp of the cccDNA (pMP1), and forward 8F and reverse 1492R primers targeting 1492 bp of the 16S rRNA gene sequence of *Bacteria*. The PCR reactions were carried out in a volume of 50 µL containing 100 ng template, 0.4 µM of each primer, 0.8 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl2, 1 x buffer and 0.024 U polymerase (Taq Core, Qiagen).

Attempts to infect a putative sensitive host

Strains belonging to *Marinitoga and Thermosipho* genera, obtained from our laboratory culture collection, were screened for the presence of genetic elements and strains scored negatively were selected as potential hosts. *Thermosipho sp.* (AT1244-VC14**)** and *Marinitoga camini* DV1142 strains were selected as putative hosts.

A purified MPV1 suspension was added in exponentially growing host (virus/host cells=30) cultured in 5 ml modified Ravot medium at 65°C. Non infected cultures were used as negative control. After 3 subcultures, total DNAs were extracted from each culture. PCR amplifications were performed as previously described by using specific primers targeting the bacteriovirus and the cccDNA (pMP1).

QPCR assays for quantifications *of Marinitoga piezophila*'s chromosome, cccDNA and provirus

A culture of *M. piezophila* KA3 was split into two aliquots. One aliquot was induced with mitomycin C (4 µg/mL) at early exponential growth phase whereas the second was not induced. The cultures were incubated for 80 min at 65°C and total DNA was extracted. The DNA concentration was estimated by Nanodrop and diluted to a concentration of 0.2 ng/µL.

Real-time PCR amplifications were performed in triplicate using Syber Green Supermix (Taq Core, Qiagen) according to the manufacturer's instructions with modifications. Three primer sets (in supporting information: materials and methods) were designed by using the Primer 3 program 2007 (17), 16S rRNA gene for chromosomal DNA, major capsid protein encoding gene for provirus and virus and hypothetical protein encoding gene for cccDNA (pMP1). The PCR protocol is described in supporting information: materials and methods.

Replication and basal rates were calculated, respectively, from mitomycin C treated and non treated cultures.

Sequencing and assembly of bacteriovirus and cccDNA

Purified virus and cccDNA were sequenced on Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) using the Ion PGM sequencing 200 kit v.2 (LifeTechnologies) and the Ion Xpress Barcode adapters 1-16 kit (LifeTechnologies). The sequences were assembled using the **CLC Genomics Workbench 6.5.1 (**http://www.clcbio.com**)** as well as the MIRA 4 packages (18).

Sequence analysis of protein-coding ORFs in the bacteriovirus and on the cccDNA.

The provirus was detected using Prophinder (19). To perform phylogenetic analyses of the predicted proteins in both bacteriovirus and cccDNA, the amino acid sequences of the ORFs were compared to RefSeq and viral RefSeq databases using BLASTP (20) with an E-value cutoff of 10^{-4}. Matches that produced at least 70% of identity were retained. For datasets with > 100 hits, only one representative per genus was kept. Homologs were aligned using ClustalW 2 (21) and phylogenetic trees were reconstructed under JTT+CAT model using the FastTree program (22). For ORFs with no or few matches in RefSeq, we also searched the *nr* database for homologs.

Trans-membrane helices, helix-turn-helix motifs, coiled coils and isoelectric point for each ORF were predicted using programs from the EMBOSS package (23).

Assignments of ORFs to large gene families were done using Superfamily HMMs (24) and Conserved Domains Database (25).

Predicted ORFs of the MPV1 genome were also screened for features of the genes involved in known lysis pathways of double-stranded DNA phages of Gram-negative bacteria (26)(27). Analysis of amino acid composition and predictions of protein charge and transmembrane helices were performed using the PEPSTATS, CHARGE and TMAP programs of the EMBOSS package (23). Protein secondary structure was predicted using JPred 3 (28)

RESULTS

Phage morphology

Particles of MPV1 exhibit a head with an hexagonal outline of approximately 55 nm in diameter and a flexible non- contractile tail of approximately 200 nm in length and 10 nm in width (Figure 1). Based on these morphological characteristics, MPV1 corresponds to a *siphovirus* of the order *Caudovirales*. Despite the piezophilic character of *M. piezophila*, which grows optimally at high hydrostatic pressure (40 MPa), this isolate can adapt to the growth at atmospheric pressure (0.1 MPa) after several subcultures. The phage morphology was identical under these two growth conditions (Fig. 1A, Fig. 1C).

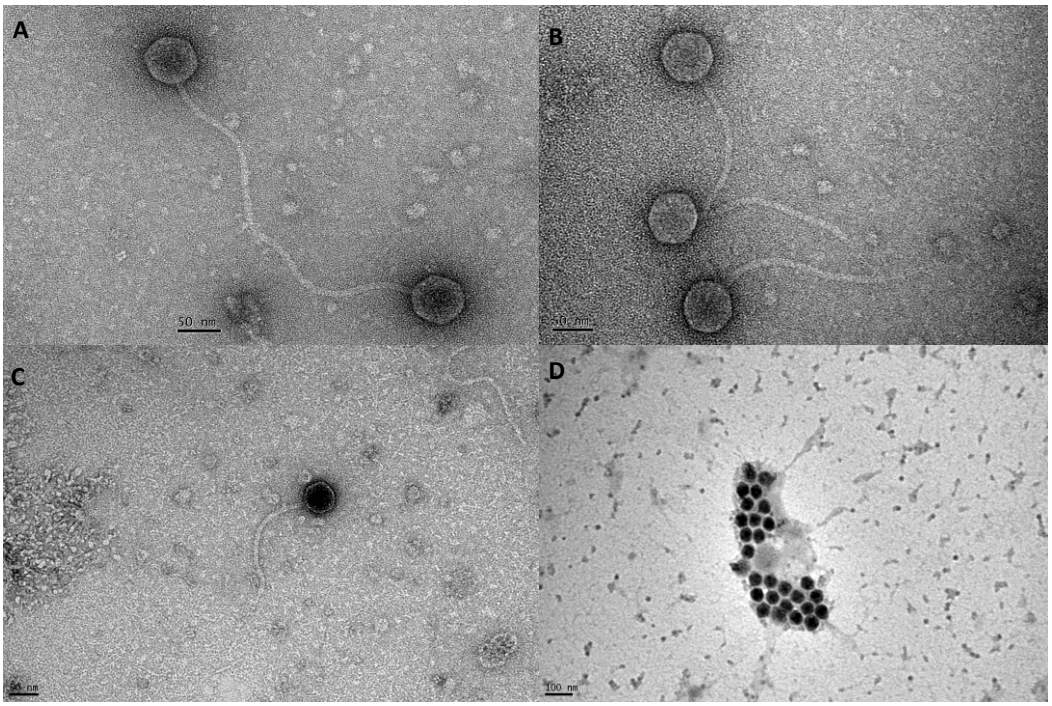


Figure 1. Electron micrographs of MPV1 negatively stained with 2% uranyl acetate. Panels A and B: MPV1 particles from *Marinitoga piezophila* KA3 cultivated at atmospheric pressure. Panel C: MPV1particle from *Marinitoga piezophila* KA3 cultivated at 40 MPa. Panel D: mature MPV1 virions in cellular debris of *Marinitoga piezophila* KA3 cultivated at 40 MPa.

Virus-host relationship

Preliminary assays were performed and indicated that the viral production is functional at both atmospheric and high hydrostatic pressures (40 MPa) (Supplemental Table 1). Thus, all subsequent experiments were carried out at atmospheric pressure.

MPV1 is a mitomycin C inducible temperate bacteriovirus causing host cells lysis upon induction (Fig. 2). A concentration of 5 µg/mL of mitomycin C was sufficient for optimal virus induction, as estimated by viral counts (Fig. 1S). The viral production significantly increased reaching ~3 x10^9 viral particles/mL 2 h after the induction (Fig. 2). A concomitant drastic drop in host cell counts, down to 2.19 x 10^6 cells mL^{-1}, was observed suggesting the lysis of host cells

(Fig. 2). Regrowth of bacteria was observed 5h after induction, suggesting that some cells withstood the mitomycin C effects. Untreated cells produced 30-fold less viral particles than mitomycin treated culture with a maximal virus abundance of 1.11 x 10^8 viral particles mL^{-1} after 9 h of incubation (Fig. 2). This viral particles production was not accompanied by host cells lysis.

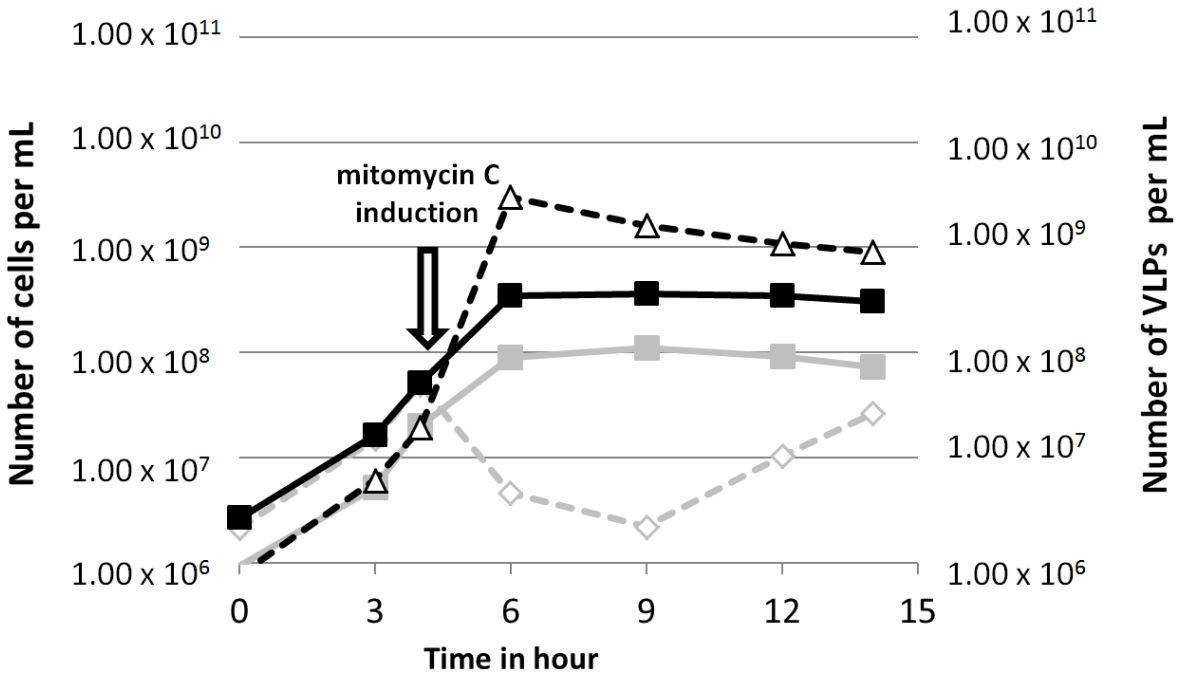


Figure 2. Virus-host kinetics at atmospheric pressure monitored by flow cytometry. Typical growth curve of the host *Marinitoga piezophila* (black squares) and spontaneous production of MPV1 particles (grey squares). Culture was grown with the addition of mitomycin C in exponential growth phase (white diamonds) and MPV1 viral production was estimated in parallel (white triangles)

DNA content of viral particles

The whole genome sequence of *M. piezophila* KA3 revealed the presence of a provirus sequence of ~40 kb integrated into the strain's chromosome and a cccDNA of 13,386 bp denoted as pMARPI01(29). The DNA extraction performed on the same strain using the alkaline lysis method confirmed the presence of an extra chromosomal cccDNA of 13 kb (Fig. 2S), with a

RFLP pattern corresponding to that of pMARPI01 (29) and thus renamed as pMP1. To test that the provirus might be the integrative form of the MPV1 genome, DNA was extracted from the purified MPV1 viral capsids and analyzed by RFLP using *Hha*I enzyme. The weaker bands likely correspond to the virus sequence, since several of them were identical to those obtained after a digestion *in silico* of the provirus of *M. piezophila*. Two thick bands were detected corresponding to the cccDNA restriction pattern (Fig. 3S), suggesting that the viral capsids mainly contained pMP1.The sequencing of the DNA from the viral particles confirmed these observations as it indicated the presence of a 43,715 bp sequence corresponding to the provirus inserted in *M. piezophila* genome (Fig. 3), in addition to 13,386 bp cccDNA, corresponding to pMP1 (Fig. 4). Interestingly, the sequencing also revealed a 20-fold higher coverage of the cccDNA reads compared to the "true viral" reads, confirming that the viral particles preferentially packed pMP1.

To rule out possible extracapsid DNA contamination, the purified viral suspensions were treated with DNase before DNA purification. Specific PCR amplifications targeting the provirus, the cccDNA and 16S rRNA gene were performed on the DNA extracted from the viral capsids. No PCR product was obtained by targeting the 16S rRNA gene (Fig. 4S). Hence, it seems that pMP1 and viral DNA co-occurred in MPV1 viral capsids.

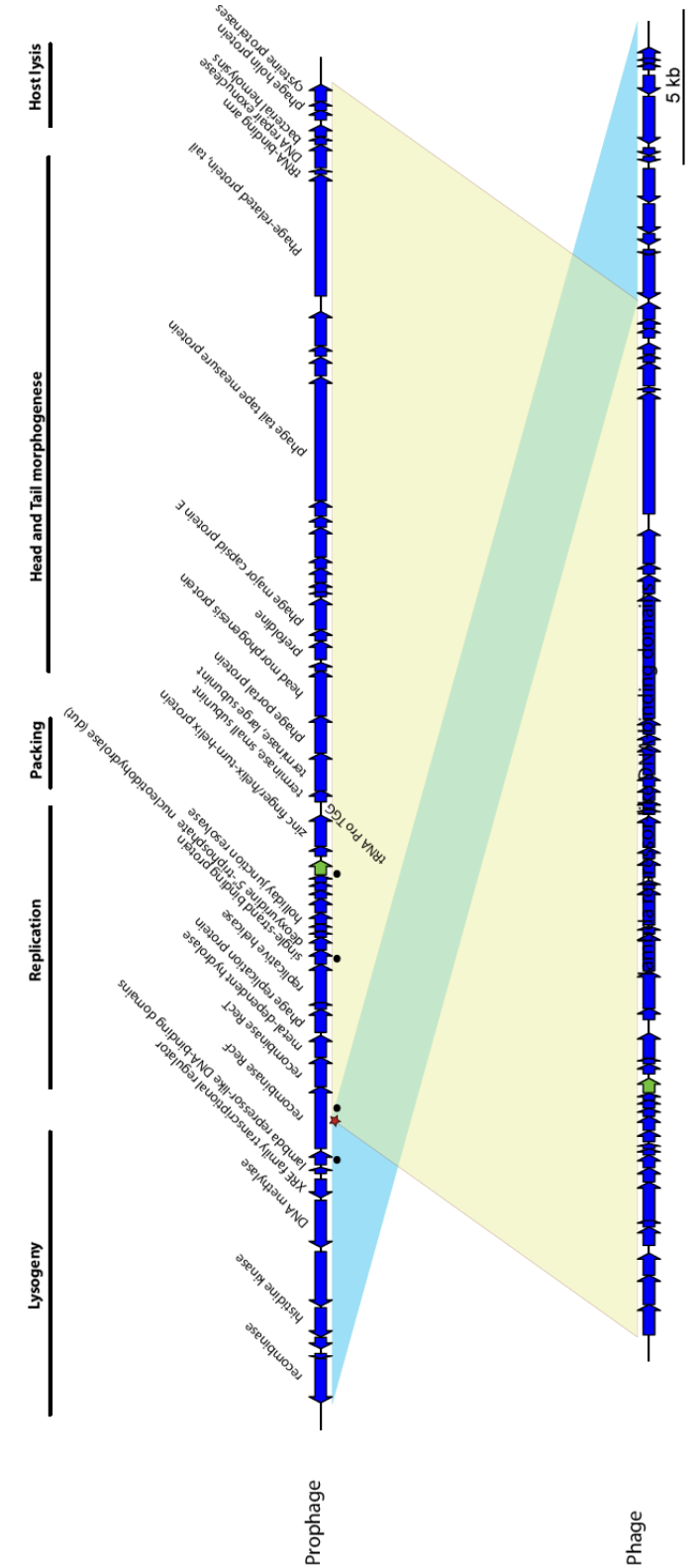


Figure 3. Comparison of the MPV1 prophage in *M. piezophila* and phage capsid DNA. The comparison is based on pairwise BLASTN similarity searches. Informative ORF annotations are shown. The ORF highlighted in green has a homolog in the pMP1 (Figure 4). The ORF marked with an asterisk is disrupted in the linearized genome packaged in the virions. The circles indicate the short sequences with significant sequence similarity to the regions of the pMP1 genome. The figure was produced using genoPlotR (Guy *et al*, 2013).

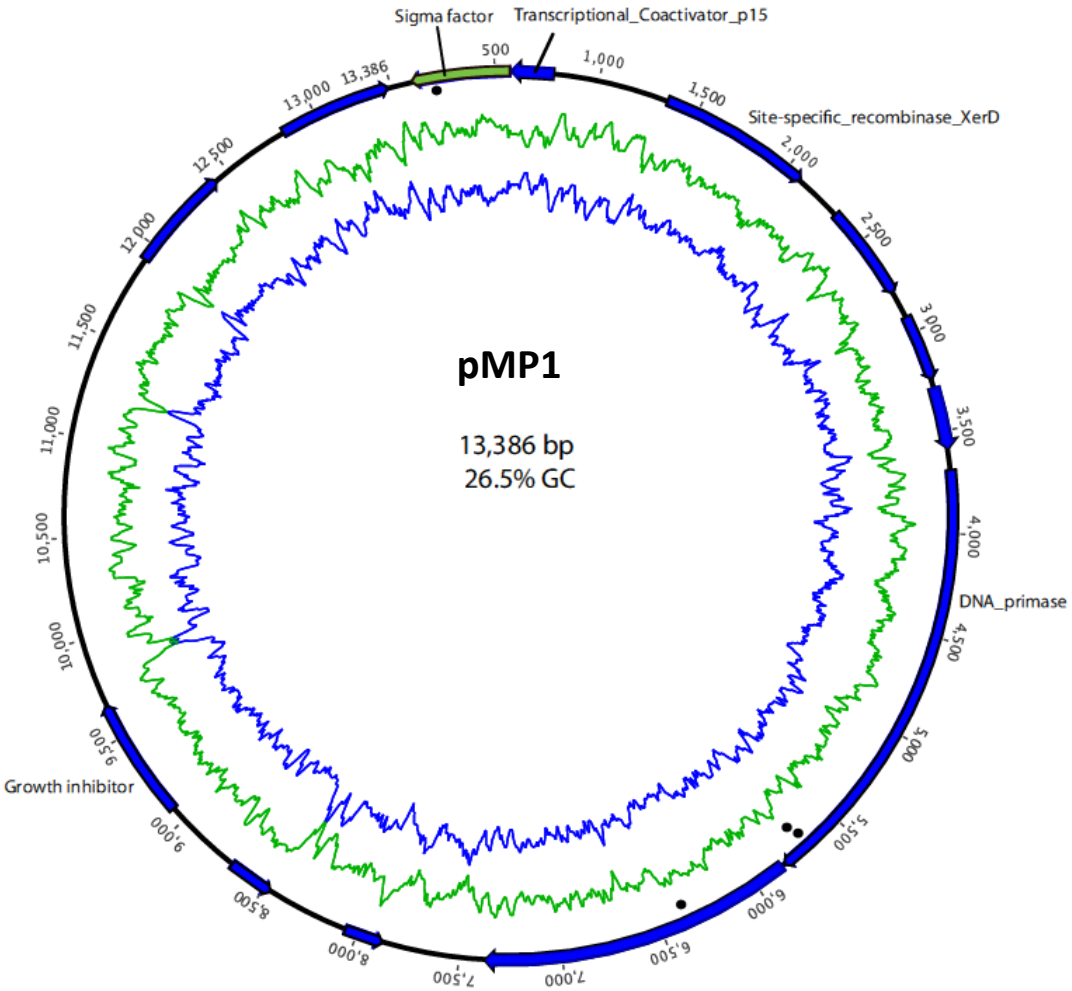


Figure 4. Map of the pMP1. Informative ORF annotations are shown. The ORF highlighted in green has a homolog in the MPV1 genome (Figure 3). The circles indicate the short sequences with significant similarity to the MPV1 genome. The inner graphs show the %GC (blue) and %AT (green). The figure was created in Geneious 7 (http://www.geneious.com/).

Attempts to infect a putative sensitive host

Despite several attempts, we never succeeded to cure *M. piezophila KA3* strain.

A purified viral suspension was added to growing cultures of potential host cells (*Thermosipho sp.* (AT1244-VC14**)** strain and *Marinitoga camini* strain DV1142). Growth was monitored by using a phase-contrast microscope (Olympus BX60) and no lysis was observed. After 3 subcultures, only a cccDNA fragment of 602 bp was amplified by PCR from the *Thermosipho*

sp. strain, no viral DNA was amplified. This result highlights the cccDNA (pMP1) propagation, inter genus, by using a viral capsid (Fig 5S).

Effect of the mitomycin C induction on the replication rates of the provirus and the cccDNA within the host

QPCR analyses were performed to assess the changes in the replication rates, after mitomycin C induction, of both cccDNA (by targeting a gene encoding a hypothetical protein specific to pMP1, Marpi_2124) and viral DNA (by targeting the gene encoding the major capsid protein, Marpi_0326). In the different experiments with or without induction, the replication rates of the chromosome (by targeting the 16S rRNA encoding gene) were also monitored as control. The relative quantity of the chromosome in *M. piezophila* KA3 induced with mitomycin C was twice lower than in the untreated culture (Fig. 6S). This might result from a chromosomal DNA damaging effect of mitomycin C, which induced the lytic phase of MPV1. On the other hand, the relative concentration of viral DNA was almost 6-fold higher in mitomycin C treated cells than in untreated ones. This increase of replication rate, after induction, of the viral DNA was consistent with the lysogenic relationship between MPV1 and its host *M. piezophila* KA3. Finally, the relative concentration of cccDNA was 20 fold higher in mitomycin C treated cells than in not induced cells. This increase of cccDNA was consistent with the results obtained both with RFLP and DNA sequencing analysis (Fig. 6).

Sequence analysis of the bacterioviral DNA and the cccDNA

The viral sequences obtained from the purified MPV1 capsids were identical to the provirus sequence identified in *M. piezophila* KA3's chromosome (Fig. 3). De-novo assembly of the viral sequences revealed that some of the packaged DNA molecules are circular, and some are linearized, such that ORF10 is disrupted (an asterisk in Fig. 3). The viral genome has 54

predicted ORFs that include all genes necessary for the viral particles production (Table S3). The gene synteny of the viral genome is similar to that seen in *Enterococcus* viruses (30). Based on BLAST searches, 23 of the 54 predicted viral ORFs had no detectable homologs in GenBank (Table S2). Among the 31 ORFs with homologs in GenBank, eight of the ORFs had homologs in proviruses identified by us in two *Thermosipho* spp. genomes (Geslin, Lossouarn, Zhaxybayeva, Nesbø, in prep.), with 3 ORFs which had also homologs in the genomes of other Thermotogales. 22 ORFs had genes from Firmicutes as their top-scoring BLAST hit (excluding the self-hit to *Marinitoga piezophila* and 8 hits to the two *Thermosipho* proviruses). Among ORFs with homologs, 12 were similar to genes in other bacterioviruses. Most of the top bacterioviruses hits were affiliated to *Siphoviruses*, but we also saw matches to bacterioviruses from the *Myoviridae* family (i.e. bacterioviruses with contractile tails (31) such as the thermophilic *Geobacillus bacteriovirus* GBSV1 (32) (Table 1).

Lysis in Gram-negative bacteria involves three types of proteins: (i) endolysins (to degrade murein); (ii) holins (to increase inner membrane permeability) and (iii) spannins (to disrupt the outer membrane) (26). We have identified candidate genes in the MPV1 genome for each of these protein classes. Marpi_340 is a putative endolysin, since similarity searches place it with phosphoesterases and metallophosphotase (MPP) superfamily. Two ORFs are predicted to be holins: Marpi_343 has significant similarity to holin homologs in GenBank, while Marpi_344's physicochemical features are compatible with those of known holins (102 amino acids in length, it is predicted to have a transmembrane helix, dual start motif and a charged C-terminal sequence). Similarity searches place Marpi_345 within the NlpC/P60 family proteins, which are secreted cysteine proteinases that degrade cell walls. This makes Marpi_345 gene a candidate for encoding a protein that disrupts the outer membrane. Marpi_341 possibly encodes another membrane-degrading enzyme, since it exhibits a weak similarity to type I phosphodiesterase/nucleotide pyrophosphatase superfamily in *Heliobacterium modesticaldum* Ice1 (a firmicute).

Phylogenetic analyses of 19 viral ORFs for which more than three homologs were present in GenBank (Table S3) revealed that in 11 phylogenetic trees, the sister taxon of an MPV1 gene was either a Firmicute or a Firmicute bacteriovirus. Combined with the observation that 22 of the viral ORFs had genes from Firmicutes as their top-scoring BLAST hit, these analyses suggest a close evolutionary relationship of MPV1 to Firmicute bacterioviruses.

MPV1 also contains genes with closest matches in other Thermotogales genomes: Marpi_305 is widely distributed among sequenced Thermotogales genomes, while Marpi_316 and Marpi_317 have matches in *Thermotoga naphthophophila and Petrotoga mobilis* genomes. This suggests that this viral lineage in the past has interacted with other Thermotogales or their bacterioviruses. However, examination of the CRISPR arrays of available Thermotogales genomes revealed DNA sequences with 100% identity to MPV1 DNA only in one of the draft of our unpublished *Marinitoga* genomes.

In the genome of pMP1, 13 ORFs were predicted and only six of them have GenBank homologs with a predicted function (Table S3) while seven could be assigned to the gene families in the Superfamily database. No known structural genes involved in virion formation were identified. However, 9 of the proteins encoded by the ORFs have a predicted pI above 9.0, suggesting that they might be involved in DNA binding (Table S4). Moreover, all seven protein-coding genes with homologs in the Superfamily database were assigned to gene families involved in DNA interactions (i.e. transcription, regulation, and DNA metabolic processes, Table S4). Screening cccDNA for the sequence motifs that match the viral genome and that could serve as recognition sequences during packing revealed three short regions with > 80% similarity and expected value > 0.05: one 28 bp region with 89% similarity, one 28 bp region with 85% similarity and 23 bp with 91% identity, as well as a 17 bp region with 100% identity and an expected value of 0.14 (see Fig. 3 and 4). Interestingly, one of the cccDNA ORFs (Marpi_2120, Sigma-70 family RNA

polymerase, region 4) has significant similarity to the Marpi_315 gene that is located in the provirus. Marpi_315 is located two ORFs upstream of a putative small terminase subunit, involved in packing of viral DNA (33). It has a DNA binding helix turn helix domain and shows similarity to sigma factor 70. Taken together this strongly suggests that this protein is somehow involved in binding the viral and cccDNA maytbe targeting it for packing into the viral particles. It is also notable that most of the ORFs in pMP1 appear to encode DNA binding proteins, suggesting that they are involved in replication and propagation of the cccDNA.

We also performed blast searches phylogenetic analyses of the ORFs in the cccDNA. This revealed that majority of the ORFs had no match in the databases and among six ORFs with matches three had best matches to other Thermotogales proteins, suggesting the plasmid has interacted with the genomes or plasmids from other Thermotogales bacteria.

DISCUSSION

Deep-sea hydrothermal vents are the harshest environments on Earth and they are characterized by broad physicochemical gradients such as temperature from 2°C to more than 350°C, lack of solar energy, prevalence of microbial chemosynthesis and high hydrostatic pressure. In this ecosystem, Thermotogales share the same ecological niche with a large diversity of prokaryotes such as Firmicutes, and Thermococcales which is the predominant group of hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hydrothermal vents. The comparison of *Thermotogales* genomes has revealed that their genes content may be significantly impacted by lateral gene exchange (4). As viruses endow great gene transfer capabilities, it is likely that they have been involved in the numerous lateral gene transfer events and have contributed to the complex evolutionary history of *Thermotogales*. In agreement with this, the genome of MPV1, the first bacteriovirus described among this order (this study), reveals a close connection to Firmicute lineages with 22 genes

having Firmicutes or their bacterioviruses as closest match in BLAST searches or sister taxon in phylogenetic trees (Table S2).

The viral production is functional at both atmospheric and high hydrostatic pressures (HHP) (40 MPa), but additional analyses are needed to assess the influence of HHP. Further analyses will be also necessary to better understand the MPV1 viral cycle and in particular to decipher the processes of MPV1 adsorption and extrusion through the “toga”, an unusual cell envelope forming a loose sheet envelope around cells. The toga is mainly composed of two proteins: the anchor protein OmpA1 and the porin OmpB; in, *E. coli*, for example, T4 viral particles uses the OmpC porin as a receptor (34)(35), and for MPV1, potential receptor is still unknown.

Peculiarly, MPV1 viral capsids mainly packed pMP1, a 13 kb cccDNA.

Although the interaction between MPV1 and pMP1 is not fully understood, the ratio of packed cccDNA/viral DNA, is high and strongly suggests that the "ménage à trois" reported in this study represents another example of a molecular piracy. This term has been coined to describe a biological phenomenon in which one replicon (the pirate) uses the structural proteins encoded by another replicon (the viral helper) to pack its own genome and thus allow its propagation.(36) The type of relationship between a virus and another mobile genetic element within a same prokaryotic host, as observed in MPV1/pMP1 system, have already been described for Sulfolobales, hyperthermophilic archaea (37)(38) but the two best-studied examples of molecular piracy are the *E.coli* P2/P4 system (39) and the *S. aureus* SaPI pathogenicity island/helper system (40). In both systems the pirate element is mobilized and packed into viral-like transducing particles assembled from proteins supplied by a helper bacteriovirus from the Caudovirales order. These particular relationships involve a complex web of interactions between the helper and the pirate that occur at several levels, from transcriptional control to macromolecular assembly (36).

The MPV1/pMP1 system shares many features with the *E.coli* and *S. aureus* pirates (Table 2). Both of pMP1 and P4 are cccDNA of similar sizes, and are able to persist in their respective host cells in a multicopy cccDNA state by self-replicating. pMP1 bears an integrase encoding gene, suggesting that similarly to P4 it might recombine within the host chromosome, although pMP1 was never found integrated into the sequenced *M. piezophila* chromosome. Similar to the SapIs pirates, pMP1 is induced by mitomycin C along with the provirus, and responds by replicating and escaping from the bacterial hosts by using helper viral capsids.

It has been demonstrated that pirates have evolved different mechanisms of interference with their helpers in order to favor the packing of their own pirate genomes into the helper capsids (40)(36). P4 and some SapIs redirected the helper capsids assembly pathway in order to produce small capsids which exclusively achieve the packing of the pirate genome. Small MPV1 capsids likely to contain single copy of 13.3 kb cccDNA were never observed. Another mechanism evolved by the pirates is the hijacking of the helper packing machinery in order to exclusively direct the pirate genome cleavage and packing. For this purpose, pirates precisely incorporate the same packing signals into their own genomes, block the helper small terminase subunit or encode their own small terminase subunit which combines with the helper large terminase subunit (40)(36). Specific DNA packing for the pMP1 element remains to be investigated. However, we detected three regions of significant sequence similarity between pMP1 and MPV1 genomes, the strongest candidate for a common packing signal is a 28 bp region found in the Maripi 299 protein that is disrupted in the linearized version of the MPV1 genome. The Maripi_2120 protein, one of the pMP1 proteins, is similar to one of the viral proteins, encoded by Maripi_315, and might be involved in the binding to this region.

Would there be any benefit for the host of this ménage à trois? To carry a provirus often confers resistance against related bacterioviruses (41), while carrying the pirate, which hijacks the viral

capsid, would increase the survival of the surrounding population, which will be less exposed to the bacterioviral DNA. It remains unresolved why the helper bacterioviruses have not evolved resistance against the pirate elements, which alter the propagation capacity of the bacteriovirus, thus the evolutionary "arms race" continues.

Mobile genetic elements (MGEs), such as viruses, plasmids, membrane vesicles and transposons (collectively referred as a mobilome) interact with cellular organisms from all three domains of life, including those thriving in most extreme environments. The MPV1/pMP1 system demonstrates the existence of an intricate network of interactions present in the deep-sea vent mobilome, and further studies are likely to unravel unknown mechanisms for host-MGEs interactions. The MGEs have a potential to be powerful agents that drive evolution and adaptation of their cellular hosts in the extreme marine environments, and comparative studies of these elements from hyper/thermophilic Archaea and Bacteria will help us to understand the dynamic and resilience of the microbial diversity of the deep biosphere.

Bibliographie

1. Prieur D et al. (2004) Genetic elements of Thermococcales. *Biochemical Society Transactions* 32:184–187.
2. Williamson SJ et al. (2008) Lysogenic virus-host interactions predominate at deep-sea diffuse-flow hydrothermal vents. *The ISME journal* 2:1112–1121.
3. Bonch-Osmolovskaya E (2008) Thermotogales. *eLS*.
4. Zhaxybayeva O et al. (2009) On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:5865–5870.
5. Nelson KE et al. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of Thermotoga maritima. *Nature* 399:323–329.
6. Harriott OT, Huber R, Stetter KO, Betts PW, Noll KM (1994) A cryptic miniplasmid from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga sp. strain RQ7. *Journal of bacteriology* 176:2759–2762.
7. Akimkina T et al. (1999) A Highly Conserved Plasmid from the Extreme Thermophile< i> Thermotoga maritima</i> MC24 Is a Member of a Family of Plasmids Distributed Worldwide.

Plasmid 42:236–240.

8. Zhaxybayeva O et al. (2012) Genome Sequence of the Mesophilic Thermotogales Bacterium Mesotoga prima MesG1. Ag. 4.2 Reveals the Largest Thermotogales Genome To Date. *Genome biology and evolution* 4:812–820.

9. Alain K et al. (2002) Marinitoga piezophila sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 52:1331–1339.

10. Geslin C, Le Romancer M, Gaillard M, Erauso G, Prieur D (2003) Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deep-sea hydrothermal vents. *Res Microbiol* 154:303–7.

11. Ravot G et al. (1995) Thermotoga elfii sp. nov., a novel thermophilic bacterium from an African oil-producing well. *International journal of systematic bacteriology* 45:308–314.

12. Yoshida-Takashima Y, Takaki Y, Shimamura S, Nunoura T, Takai K (2013) Genome sequence of a novel deep-sea vent epsilonproteobacterial phage provides new insight into the co-evolution of Epsilonproteobacteria and their phages. *Extremophiles*:1–15.

13. Geslin C et al. (2003) PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic euryarchaeote,"Pyrococcus abyssi." *Journal of bacteriology* 185:3888–3894.

14. Gorlas A, Koonin EV, Bienvenu N, Prieur D, Geslin C (2012) TPV1, the first virus isolated from the hyperthermophilic genus Thermococcus. *Environmental Microbiology* 14:503–516.

15. Charbonnier F, Erauso G, Barbeyron T, Prieur D, Forterre P (1992) Evidence that a plasmid from a hyperthermophilic archaebacterium is relaxed at physiological temperatures. *Journal of bacteriology* 174:6103–6108.

16. Bimboim H, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7:1513–1523.

17. Untergasser A et al. (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* 35:W71–W74.

18. Chevreux B, Wetter T, Suhai S (1999) in *German Conference on Bioinformatics*, pp 45–56.

19. Lima-Mendez G, Van Helden J, Toussaint A, Leplae R (2008) Prophinder: a computational tool for prophage prediction in prokaryotic genomes. *Bioinformatics* 24:863–865.

20. Altschul SF et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25:3389–3402.

21. Larkin M et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.

22. Price MN, Dehal PS, Arkin AP (2009) FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Molecular biology and evolution* 26:1641–1650.

23. Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends in genetics* 16:276–277.

24. Gough J, Karplus K, Hughey R, Chothia C (2001) Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden Markov models that represent all proteins of known structure. *Journal of*

molecular biology 313:903–919.

25. Marchler-Bauer A et al. (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic acids research* 37:D205–D210.

26. Wang I-N, Smith DL, Young R (2000) Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annual Reviews in Microbiology* 54:799–825.

27. Young R (2013) Phage lysis: do we have the hole story yet? *Current opinion in microbiology* 16:790–797.

28. Cole C, Barber JD, Barton GJ (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic acids research* 36:W197–W201.

29. Lucas S et al. (2012) Complete Genome Sequence of the Thermophilic, Piezophilic, Heterotrophic Bacterium Marinitoga piezophila KA3. *Journal of bacteriology* 194:5974–5975.

30. Yasmin A et al. (2010) Comparative genomics and transduction potential of Enterococcus faecalis temperate bacteriophages. *Journal of bacteriology* 192:1122–1130.

31. Krupovic M, Prangishvili D, Hendrix RW, Bamford DH (2011) Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75:610–635.

32. Liu B, Zhou F, Wu S, Xu Y, Zhang X (2009) Genomic and proteomic characterization of a thermophilic< i> Geobacillus</i> bacteriophage GBSV1. *Research in microbiology* 160:166–171.

33. Feiss M, Rao VB (2012) in *Viral Molecular Machines* (Springer), pp 489–509.

34. Hashemolhosseini S, Montag D, Krämer L, Henning U (1994) Determinants of receptor specificity of coliphages of the T4 family: a chaperone alters the host range. *Journal of molecular biology* 241:524–533.

35. Marti R et al. (2013) Long tail fibres of the novel broad-host-range T-even bacteriophage S16 specifically recognize Salmonella OmpC. *Molecular microbiology* 87:818–834.

36. Christie G, Dokland T, others (2012) Pirates of the Caudovirales. *Virology* 434:210–221.

37. Arnold HP et al. (1999) The genetic element pSSVx of the extremely thermophilic crenarchaeon Sulfolobus is a hybrid between a plasmid and a virus. *Molecular microbiology* 34:217–226.

38. Wang Y et al. (2007) A novel< i> Sulfolobus</i> non-conjugative extrachromosomal genetic element capable of integration into the host genome and spreading in the presence of a fusellovirus. *Virology* 363:124–133.

39. Six EW (1975) The helper dependence of satellite bacteriophage P4: which gene functions of bacteriophage P2 are needed by P4? *Virology* 67:249–263.

40. Ram G et al. (2012) Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:16300–16305.

41. Lemire S, Figueroa-Bossi N, Bossi L (2011) Bacteriophage crosstalk: coordination of prophage induction by trans-acting antirepressors. *PLoS genetics* 7:e1002149.

Additional supporting informations

SUPPLEMENTARY MATERIALS & METHODS

Cultural methods

Thermotogales strains were cultured in a modified Ravot medium which contained (per liter of distilled water) 0.2 g of NH_4Cl, 0.5 g of MgCl2.6H_2O, 0.1 g of $CaCl_2$.2H2O, 0.5 g of KCl, 0.83 g of $NaCH_3COO.3H_20$, 2 g of yeast extract, 2 g of tryptone, 30 g of sea salt, 3.3 g of piperazine-*N*,*N*_-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), 2 g de maltose and 0.001 g of resazurin. The pH was adjusted to 6 and the medium was sterilized by autoclaving. The medium cooled down, the following solutions, separately sterilized by autoclaving, were added: 5 ml of a 7 % (wt/vol) KH_2PO_4 solution and 5 ml of 7 % (wt/vol) K_2HPO_4 solution. The medium was dispensed (50 ml) into 100-ml sterile vials and completed by adding 1% (wt/vol) elemental sulfur previously sterilized by steaming at 100°C for 1 h on three successive days. Anaerobiosis was obtained by applying vacuum to the medium and saturating it with N2. Finally, the medium was reduced by adding a sterile solution of $Na_2S.9H_2O$ (final concentration, 0.05% [wt/vol]). The medium inoculated to a final concentration of 1% was incubated at 60°C, 65°C and 70°C according to the strains.We disposed to the reference strain *Marinitoga piezophila* KA3 adapted to atmospheric pressure after several transfer at 0.1 Mpa. Most of experiments were consequently performed with *Marinitoga piezophila* KA3 cultured at atmospheric pressure and 65°C in the same way than the other *Thermotogales* strains except that L-cystine was preferentially added instead of elemental sulphur as electron acceptor. For the high hydrostatic pressure experiments, we disposed to the reference strain *Marinitoga piezophila* KA3 only cultured at high hydrostatic pressure; The experiments were performed in 5 ml syringes loaded anaerobically with 5 ml of reduced and modified Ravot medium inoculated at a final concentration of 1% with a culture in late exponential phase grown under 40 MPa pressure at 65 °C.

QPCR assays

- Construction of standard curves for *Marinitoga piezophila* KA3 chromosome, cccDNA and prophage quantifications

Three primer sets were designed by using the Primer 3 software (Untergrasser*et al*., 2012). The first was specific to *Marinitoga piezophila* KA3: 16S rRNA gene (forward : 5'-ACACATGCAAGTCGAACGAG-3' and reverse : 5'- CACTGGAAACGGTGGCTAAT-3'), the second specific to *Marinitoga piezophila* KA3 prophage: major capsid protein gene (forward : 5'- AGGAGGACCTCAACCAACAA-3' and reverse : 5'-CAAGCACGAGATTTGAGTGG-3') and the last was specific to *Marinitoga piezophila* KA3 cccDNA: hypothetical protein gene (forward : 5'-TATCTCGGGAACAGCTCCAA-3' and reverse : 5'-TGACAAAATGGAACATGTTTTTG- 3').

The PCR products were obtained by conventional PCR and the products sizes were 118 bp for *Marinitoga piezophila* KA316S rRNA gene, 198 bp for *Marinitoga piezophila* KA3 prophage major capsid protein gene and 198 bp for *Marinitoga piezophila KA3*cccDNA hypothetical protein gene. The reactions were performed at 60°C in a volume of 50µL containing 100ng of *Marinitoga piezophila* KA3 total DNA, 0,4 µM of each primer, 0,8 µM dNTPs, 1,5Mm MgCl2, 1 x buffer and 2 U Pfu polymerase. The PCR products were deposited on agarose gel, purified by "GeneJet Gel Extraction Kit" (ThermoScientific) kit and cloned in pUD plasmid used to transform recombinant *E. coli* DH5α strains which were cultivated in LB medium at 37°C with addition of 100 µg/mL of ampicillin. The cloned plasmids were extracted using "GeneJET Plasmid Midiprep"(ThermoScientific) kit and purified as previously described. The concentration of the three different plasmids were measured using a Nanodrop and the corresponding copies numbers were calculated by using the following equation: DNA copy = 6,02 x 10^{23} x DNA concentrations / 660 x DNA length (pUD + insert).

10-fold serial dilutions were performed for the 3 types of cloned plasmids pUD, ranging from 2 x 10^4 to 2 x 10^{10} copies/µL to construct the standard curves of genes targeting the chromosome and the prophage and ranging from 2 x 10^5 to 2 x 10^{11} copies/µL, for the gene targeting the cccDNA.

- Preparation of template DNA for QPCR analysis

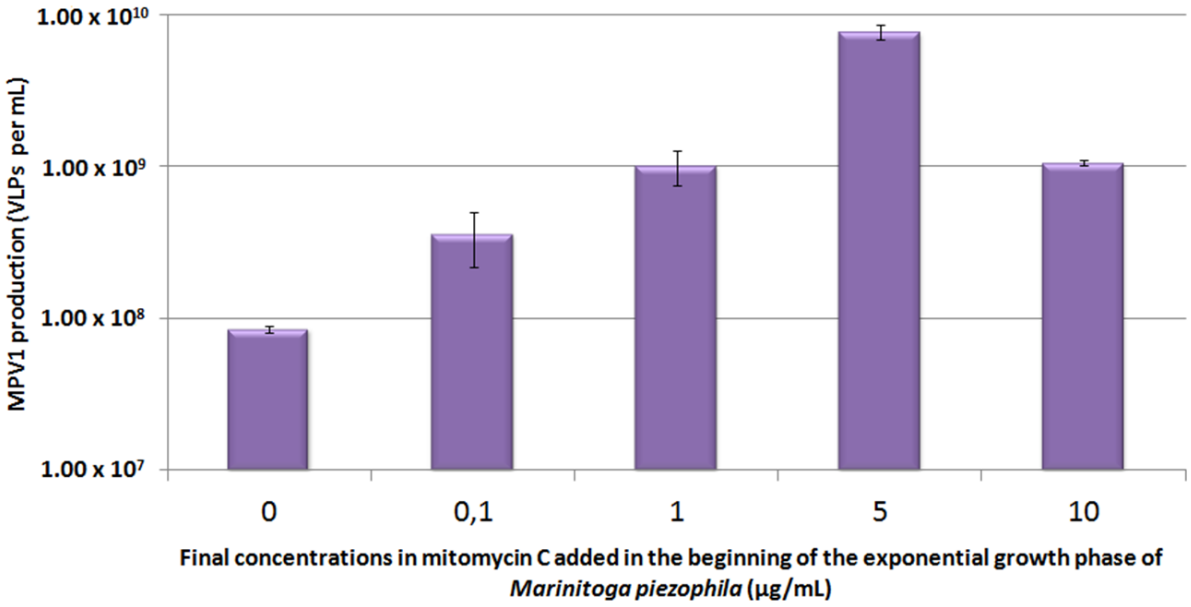
Two cultures of *Marinitoga piezophila* KA3 was performed by using the same inoculum. The first one was induced by addition of mitomycin C (4 µg/mL) in the early exponential growth phase whereas the second was not induced. The two cultures were incubated during 80 minutes after induction and then two total DNAs extractions were performed as previously described. The concentration of the two extracted DNAs was measured by using a Nanodrop and diluted in order to reach 0.2 ng/µL.

- QPCR assays by using Sybr Green I dye

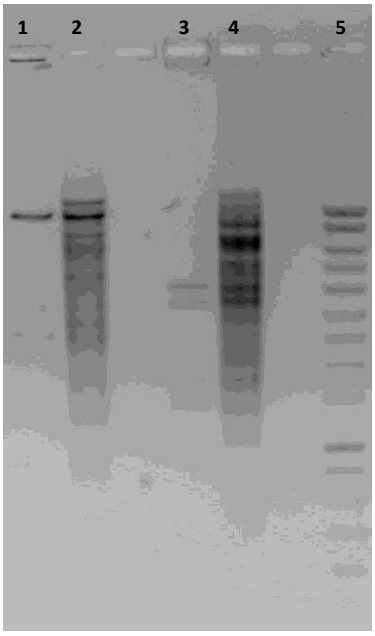
The analyses were performed by using a Applied BiosystemStepOnePlus Instrument. The QPCR reactions were performed in a volume of 25µL containing 1ng template, 12, 5 µL of SybrGreen Supermix (Taq Core, Qiagen) and 0,9 µM of each primers The thermal cycling protocols was as follows : 10 min at 95°C then 40 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C and 10 s at 72°C.

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplemental Figure 1. Induction assays of MPV1 production by addition of several mitomycin C concentrations



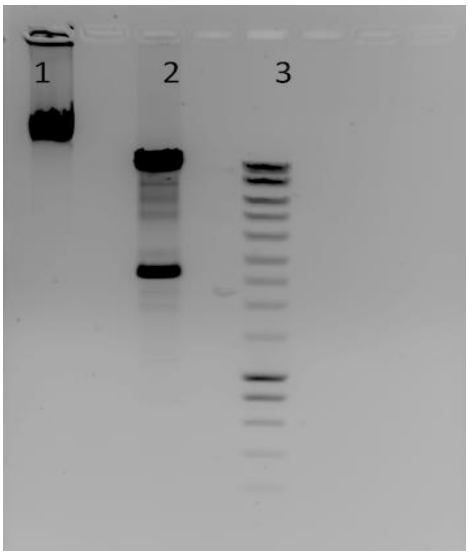
Supplemental Figure 2.



RFLP analysis of both *Marinitoga piezophila* KA3 total DNA and cccDNA

1 : ccc DNA KA3 restricted by *Hha*I
2 : total DNA KA3 restricted by *Hha*I
3 : ccc DNA KA3 restricted by *Hind*III
4 : total DNA KA3 restricted by *Hind*III
5 : DNA Smart Ladder

Supplemental Figure 3.

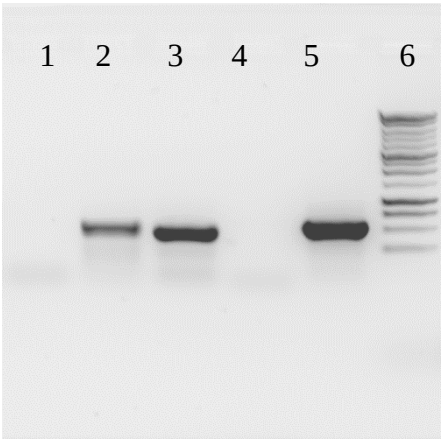


RFLP analysis of the total DNA extracted from the purified viral capsids

1 : Packaged DNA uncut
2 : Packaged DNA restricted by *Hha*I
3 : DNA Smart Ladder

Restriction bands pattern corresponding to the cccDNA is represented by the two thickest bands

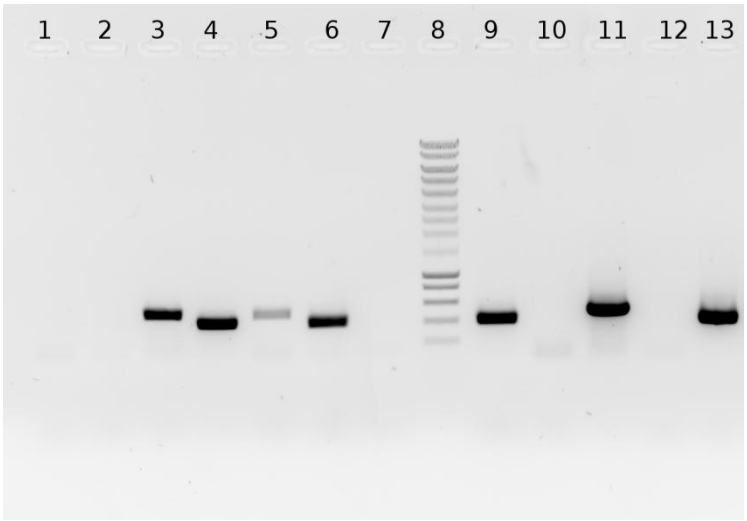
Supplemental Figure 4.



PCR analysis of the total DNA extracted from the MPV1 purified viral capsids

1 : Packaged DNA amplified by 16S primers
2 : Packaged DNA amplified by pMP1 primers
3 : Packaged DNA amplified by MPV1 provirus primers
4 : 16S negative control
5 : 16S positive control
6 : DNA Smart Ladder

Supplemental Figure 5 : MPV1 infectivity assays performed on *Thermosipho* sp. AT1244-VC14^{T} checked by PCR experiments



1,3,5,7 : PCR targeting viral MPV1 DNA.

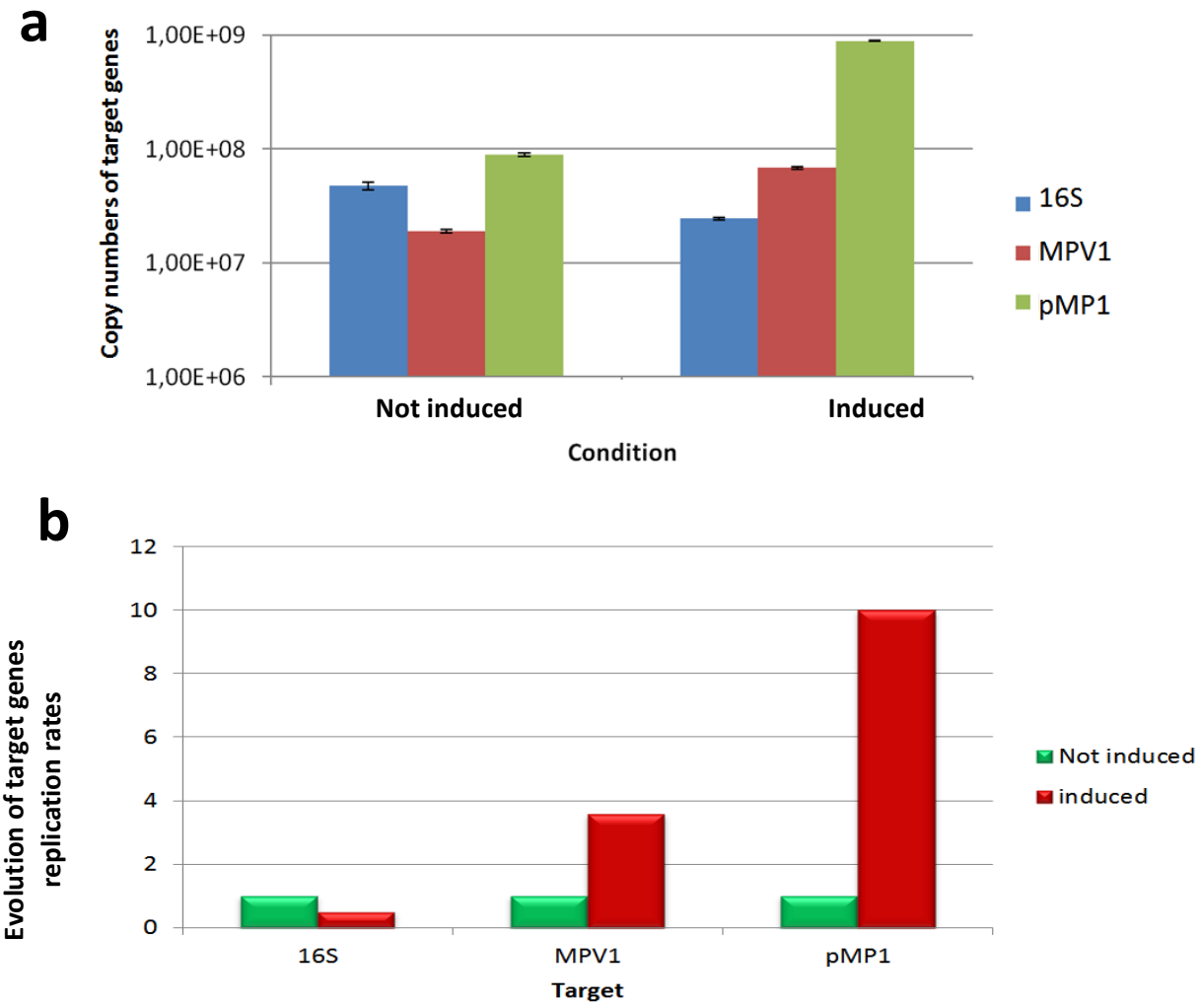
1: Total DNA of the strain. 3 : total DNA of the strain just after addition of MPV1 purified capsids. 5 : Total DNA of the potentially infected strain 12 hours after addition of MPV1 purified capsids. 7 : Total DNA of the potentially infected strain after 3 subcultures.

2,4,6,9 : PCR targeting plasmidic pMP1 DNA.

2: Total DNA of the strain. 4 : total DNA of the strain just after addition of MPV1 purified capsids. 6 : Total DNA of the potentially infected strain 12 hours after addition of MPV1 purified capsids. 8 : Total DNA of the potentially infected strain after 3 subcultures.

10,12 : Negative controls targeting (10) viral or (12) plasmidic DNA.
11,13 : Positive controls targeting (11) viral or (13) plasmidic DNA.
8 : Smart Ladder 1 kb (Eurogentec)

Supplemental Figure 6 : QPCR assays. a: Copy numbers of target genes, depending on the presence or absence of mitomycin C induction. The blue bars represent the number of copies of 16S chromosomal gene without and with induction. The red bars represent the number of copies of MPV1 viral gene without and with induction. The green bars represent the number of copies of pMP1 cccDNA without and with induction. b: Evolution of replication rates of target genes, depending on the presence or absence of mitomycin C induction. The green bars represent the basal replication rate of each target gene, without induction, set to a value of 1. The red bars represent the respective evolutions of these replication rates after induction, compared to baseline.



SUPPLEMENTARY TABLES

Supplemental Table 1. Comparison of viral production at 0.1 and 40 MPa

Time	Bacterial counts (cells per mL)		Viral counts (VLPs per mL)	
	0.1 MPa	40 MPa	0.1 MPa	40 MPa
t = 0h	2.63×10^6	1.41×10^6	9.22×10^5	5.79×10^5
t = 4h	5.13×10^7	4.31×10^7	2.01×10^7	9.14×10^6
t = 9h	3.63×10^8	3.74×10^8	1.10×10^8	3.39×10^7

Supplemental Table 2 : Annotation of MPV1 genome Cf. annexe 1

Supplemental Table 3 : Annotation of pMP1 genome Cf. annexe 2

ETUDE SUPPLEMENTAIRE

MISE EN EVIDENCE PAR ATPMETRIE DU DETOURNEMENT DU METABOLISME D'UN HOTE PAR UN VIRUS

MISE EN ÉVIDENCE PAR ATPMÉTRIE DU DÉTOURNEMENT DU MÉTABOLISME D'UN HÔTE PAR UN VIRUS

L'ATP ou Adenosine TriPhosphate est une molécule universellement dévolue au stockage et à la distribution de l'énergie au sein de toutes les cellules vivantes (Adhikari & Kallmeyer, 2010). Le recours au dosage de cette molécule, ou ATPmétrie, est fréquent dans les domaines environnementaux, médicaux ou agro-alimentaires afin de mesurer la biomasse microbienne viable (Pridmore *et al.,* 1984 ; Eydal & Pedersen, 2007 ; Hammes *et al.,* 2010). Une des méthodes classiques pour la mesure d'ATP consiste en un dosage par bioluminescence de l'ATP intracellulaire préalablement extrait par la lyse des cellules.

Le principe du dosage de l'ATP par bioluminescence repose sur la mise en présence d'ATP avec le complexe luciférine-luciférase. Celle-ci entraîne une production de luminescence, mesurée en RLU (Relative Luminescence Unit) ou unité de luminescence relative, proportionnelle à la quantité d'ATP présente à condition que l'ATP constitue le réactif limitant de la réaction (McElroy., 1947). Il a été démontré que le dénombrement de la biomasse microbienne par mesure de l'ATP intracellulaire par bioluminescence était parfaitement corrélé aux autres techniques employées à ces fins telles que la cytométrie en flux ou la microscopie à épifluorescence. Ceci a même été vérifié dans le cas de mesures effectuées en milieux aquatiques oligotrophes (Eydal & Pedersen, 2007 ; Hammes *et al.,* 2010). La biomasse viable est déduite de la mesure de la concentration en ATP intracellulaire en utilisant une valeur moyenne d'ATP par cellule (Hammes *et al.,* 2010). La mise en œuvre de méthodes complémentaires demeure malgré tout importante puisque la teneur en ATP intracellulaire moyenne par cellule est susceptible d'être affectée par la nature des espèces en présence (Eydal & Pedersen, 2007) et par l'état physiologique des cellules selon les espèces (Eydal & Pedersen, 2007 ; Hammes *et al.,* 2010 ; Adhikari & Kallmeyer, 2010).

Dès la fin des années 1960, il a été proposé que le dosage de l'ATP puisse servir à détecter et quantifier la présence de vie au sein d'environnements extrêmes (McLeod *et al.*,1969) mais il n'a finalement encore que très rarement été utilisé. Le développement de l'ATPmétrie pour mesurer l'abondance et la viabilité cellulaire au sein des environnements marins extrêmes constitue l'une des thématiques de recherche d'Odile Vandenabeele-Trambouze (CR1) depuis son arrivée au laboratoire en octobre 2011. Le dosage de l'ATP intracellulaire par bioluminescence pourrait à terme constituer une méthode hautement sensible pour détecter la présence de vie au sein d'environnements tels que ceux étudiés au laboratoire.

Ainsi, des premières mesures d'ATP intracellulaire, extracellulaire (ATP potentiellement libéré dans le milieu) et total ont notamment été effectuées sur des cultures pures d'archées hyperthermophiles modèles telles que *Pyrococcus abyssi, Thermococcus kodakarensis et Methanocaldococcus jannaschii.* Le contenu en ATP intracellulaire de cellules appartenant au troisième domaine du vivant n'avait jusqu'alors jamais été mesuré et s'est révélé, pour ce qui est des modèles étudiés, comparable à celui mesuré chez les bactéries mésophiles et compris entre 2,0 et 4,0 x 10^{-18} moles d'ATP intracellulaire/cellules (Odile Vandenabeele-Trambouze, communication personnelle). Par ailleurs, la libération d'ATP dans le milieu extracellulaire a pu être détectée en réponse à des stress thermiques ou oxiques chez certaines de ces archées (Odile Vandenabeele-Trambouze, communication personnelle). Ces études ont démontré d'une part que l'ATPmétrie est parfaitement adaptée à l'étude des extrêmophiles marins. D'autre part, ces résultats indiquent que, pour les micro-organismes extrêmophiles, la mesure de l'ATP extracellulaire doit compléter la mesure de l'ATP total (ou de l'ATP intracellulaire) pour détecter l'existence éventuelle de stress pouvant affecter le contenu en ATP intracellulaire des souches étudiées.

En interagissant avec Odile Vandenabeele-Trambouze, nous avons eu la curiosité d'essayer d'étudier par ATPmétrie l'effet potentiel du déclenchement du cycle lytique sur l'activité métabolique de *Marinitoga piezophila* KA3 porteuse d'un virus et d'un ADNcc pirate. L'entrée en cycle lytique du virus tempéré MPV1 (*Marinitoga piezophila* virus 1), qui infecte la souche, est la conséquence d'un stress cellulaire provoqué en laboratoire par l'addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance. Cette addition d'antibiotique a un effet inducteur sur la production des particules virales dont la libération s'accompagne par la lyse des cellules hôtes.

Cette étude par ATPmétrie a été effectuée en réalisant des mesures d'ATP total (ATPt) et d'ATP extracellulaire (ATPe) au cours de la croissance de la souche *Marinitoga piezophila* KA3 qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C (à une concentration finale de l'ordre de 5 µg/mL) en début de phase exponentielle de croissance. Ces conditions de travail nous permettaient de s'assurer que les variations d'ATP liées à l'état métabolique des cultures seraient limitées (Eydal & Pedersen, 2007). Le fait que nous ne disposions pas d'une souche *Marinitoga piezophila* non infectée nous empêchait notamment d'évaluer directement l'effet potentiel que pouvait avoir la simple addition de mitomycine C sur l'activité métabolique de la souche. Pour évaluer cet effet de l'addition de la mitomycine C, des mesures d'ATP ont par contre été réalisées dans les mêmes conditions chez les souches de référence *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^T et *Marinitoga camini* DV1075, les plus proches phylogénétiquement de *Marinitoga piezophila*. Celles-ci étaient apparues non virosées à l'issue du criblage initial décrit dans le premier chapitre de cette thèse et constituaient donc les meilleurs modèles disponibles pour essayer de prendre en compte l'effet potentiel du seul traitement antibiotique sur l'activité métabolique des souches. S'il existe un caractère souche dépendant pour les dosages d'ATP, les travaux déjà réalisés au laboratoire démontrent que lorsque des micro-organismes, occupant la même niche écologique avec une physiologie et un métabolisme proches, sont comparés, les mêmes tendances en contenu en ATP et effet du stress sont observées.

Ces travaux ne constituent qu'une première approche expérimentale. Les résultats obtenus pour chacune des souches sont présentés et discutés l'un après l'autre.

1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

1.1. LES 3 SOUCHES UTILISÉES

La souche *Marinitoga piezophila* KA3 est un isolat issu d'un fragment de cheminée hydrothermale récolté sur la Ride Est-Pacifique (latitude, 12°48721'N; longitude, 103°56351'O; profondeur, 2630 m).

La souche *Marinitoga camini* MV1075 est un isolat provenant d'un fragment de cheminée hydrothermale collecté sur la Dorsale Médio-Atlantique (latitude, 37°51'N; longitude, 31°31'O; profondeur, 800-1000 m).

La souche *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^{T} est enfin un isolat issu d'un fragment de cheminée récolté sur le champ hydrothermal Yonaguni Knoll IV au sud de la fosse d'Okinawa (latitude, 24°50,938'N; longitude, 122°40,020'E; profondeur, 1365 m).

1.2. MISE EN CULTURE

Les 3 souches ont été mises en culture de la même manière que celle précédemment décrite dans le premier chapitre de cette thèse. Elles ont été ensemencées à 1 % à partir de précultures fraîches et ont été cultivées en duplicat à leurs températures optimales de croissance, à savoir 65°C pour *Marinitoga piezophila* KA3 et 55°C pour les 2 autres. Pour chacune des souches, l'un des duplicats de culture a fait l'objet d'un traitement à la mitomycine C (cf : 5 µg/mL) 3 à 4h après la mise en culture des souches avant d'être incubé à nouveau pendant 1 h.

1.3. LES MESURES D'ATPMÉTRIE

Les mesures d'ATP total ont été effectuées en triplicats avec le kit ATP Biomass Kit HS (Biothema) selon les recommandations du fournisseur (50µl de culture cellulaire lysée par ajout de 50µL de solution de lyse Extractant B/S puis ajout de 400 µL de solution enzymatique ATP Reagent HS). Pour chaque mesure, un étalonnage interne a été effectué à partir de 10 µL d'une solution d'ATP standard à 100 nM d'ATP (Biothema). La luminescence a été mesurée avec un luminomètre Kikkoman Lumitetser C-110 dans des tubes à hémolyse de 55x12 mm (Gosselin).

Des mesures ont été effectuées au moment de l'inoculation (T0), après 3h à 4 h de culture juste avant et juste après qu'il y ait eu ou non addition de mytomycine C puis 1h après que le traitement antibiotique ait eu lieu ou non.

Seulement 2 réplicats de mesure ont été réalisés pour l'ATP extracellulaire. Concernant les dosages d'ATP extracellulaire, 2 séries de mesure ont été réalisées. Les échantillons de cultures fraîchement prélevés ont été filtrés sur 0,22 µm (filtre PES), afin d'éliminer les cellules, puis 50µL de filtrat ont été introduits dans les tubes contenant la solution de lyse cellulaire avant que les dosages au luminomètre ne soient effectués.

1.4. LE DÉNOMBREMENT DES CELLULES AU COURS DE LA CROISSANCE

Les comptages ont été effectués en cellule de Thoma, en duplicat, à partir d'échantillons de cultures de 2 mL prélevés au même moment que les échantillons servant à l'ATPmétrie et fixés au glutaraldéhyde (cf : 0,5 %). Les comptages ont été effectués sur 5 champs (5 x 16 petits carrés) de la cellule de Thoma sélectionnés au hasard. Des dilutions des cultures ont été réalisées dans du milieu de culture pour certains points afin de faciliter le dénombrement.

Le nombre de micro-organismes par millilitre a été obtenu avec la relation suivante :

$$n/SxPxN$$

Où : n : nombre moyen de cellules par champ

S : surface d'un petit carré 0.0025 mm^2

P : profondeur d'un petit carré 0.1 mm

N : nombre de carrés dans un champ 16

1.5. ANALYSE DES CULTURES EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Des échantillons des différentes cultures ont été observés et photographiés 1h après que le traitement antibiotique ait eu lieu ou non en utilisant un microscope Olympus BX60 (Grossissement 1000 X).

2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

2.1. DOSAGES ATPMETRIQUES EFFECTUES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MARINITOGA CAMINI MV1075

Ces dosages ont été réalisés en duplicats de culture et les résultats obtenus se sont révélés très similaires à l'issue des deux expériences. Les résultats de l'une d'entre elles sont résumés dans le tableau 1. Aucune présence d'ATPe significative n'a été détectée à l'issue des mesures effectuées au cours de la croissance de la souche. Après l'addition de la mitomycine C, le rapport ATPe/ATPt ne dépasse en effet jamais les 2,5 %. Les mesures d'ATP total réalisées ont, en conséquence, été jugées représentatives de la teneur en ATP intracellulaire par millilitre de culture au cours du temps. La figure 1 représente l'évolution de la concentration en ATP total par millilitre de culture qu'il ait eu ou non addition de mytomycine C en début de phase exponentielle de croissance.

Il ressort de cette analyse que l'addition de mitomycine C est sans effet (Test de Student à 95% sur les moyennes des valeurs en ATPt avec et sans addition de mytomicine C) sur la concentration en ATP total par millilitre de culture chez *Marinitoga camini* MV1075.

La mitomycine C est un antibiotique qui agit sur des bactéries à gram positif ou négatif, en croissance ou non, en causant des dommages à l'ADN. La molécule est précisément à l'origine de la formation de liaisons entre les cytosines et les guanines de brins d'ADN différents ou de celle de liaisons entre deux guanines d'un même brin (Bizanek *et al.*, 1992). La présence de ces liaisons, créées *via* des alkylations, bloque l'ADN polymérase et entraîne consécutivement un arrêt de la réplication (Thomasz, 1995). Les bactéries sensibles à l'antibiotique, comme *Escherichia coli*, soumises en phase exponentielle de croissance à une concentration efficace de mitomycine C, continuent de croître mais ne se divisent plus et s'allongent pour former de longs filaments (Reich., 1961). Une concentration efficace en mitomycine C pour observer un tel effet

est fonction de la souche, de la densité cellulaire, du temps de génération, de la composition du milieu de culture et du fait que la souche en question puisse être lysogénisée (Reich *et al.*, 1961).

Tableau 1 : Résultats des dosages d'ATP au cours de la croissance *de la souche Marinitoga camini* MV1075
A : culture non exposée à la mitomycine C. B : culture avant l'exposition à la mitomycine C à t=4h. B' : culture après l'exposition à la mitomycine C à t=4h. Non Déterminé. CV% : coefficient de variations sur *n*=3 mesures pour l'ATPt et *n*=2 mesures pour l'ATPe

Temps	Cultures	[ATPt] moyen (pmole/mL)	CV(%)	[ATPe] moyen (pmole/mL)	ATPe/ATPt	Comptages cellulaires (cellule/mL)
t=0h Inoculation	A	28,9	13	0,85	2,9 %	ND
	B	21,8	7	0,96	4,4 %	ND
t=4h avant le traitement à la mitomycine C	A	ND	ND	ND	ND	ND
	B	474,3	5	9,99	2,1%	$1,96 \times 10^7$
t=4h après le traitement à la mitomycine C	A	471,0	5	8,26	1,8 %	$1,8 \times 10^7$
	B'	493,4	25	12	2,5 %	$1,64 \times 10^7$
t=4h45	A	459,3	5	4,88	1,1 %	$2,7 \times 10^7$
	B'	421	5	7,57	1,6 %	$2,48 \times 10^7$
t=6h	A	562,2	11	4,14	0,7 %	$3,5 \times 10^7$
	B'	518,4	7	3,20	0,6 %	$2,52 \times 10^7$

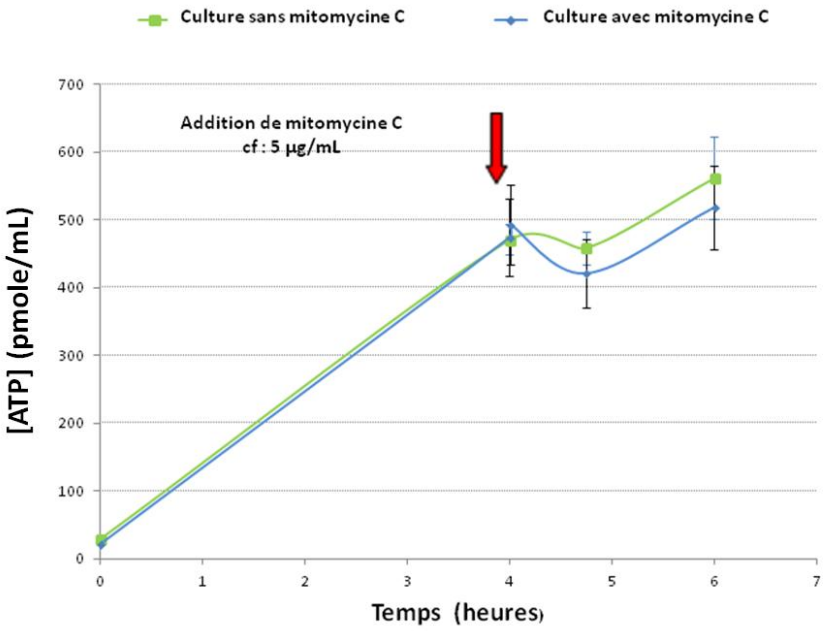


Figure 1 : Concentration en ATP total par millilitre de culture de la souche *Marinitoga Camini* MV1075, qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance. La flèche rouge indique le moment de l'addition de l'antibiotique

La croissance de la souche *Marinitoga camini* MV1075 ne semble pas affectée par la présence de mitomycine C comme le suggère le contenu en ATPt qui demeure similaire chez *Marinitoga camini* DV1075 après addition ou non de l'antibiotique (figure 1). Ce résultat a été confirmé par des comptages réalisés en cellules de Thoma (Tableau 1) et des observations réalisées en microscopie optique (Fig. 2). L'ensemble de ces premiers résultats conduit à envisager que la souche *Marinitoga camini* MV1075 non virosée soit insensible à la mitomycine C. Ce résultat ne peut pas être extrapolé à toutes les souches non virosées mais indique néanmoins que la mitomycine C n'est pas toujours source de stress avec une influence sur le contenu en ATP.

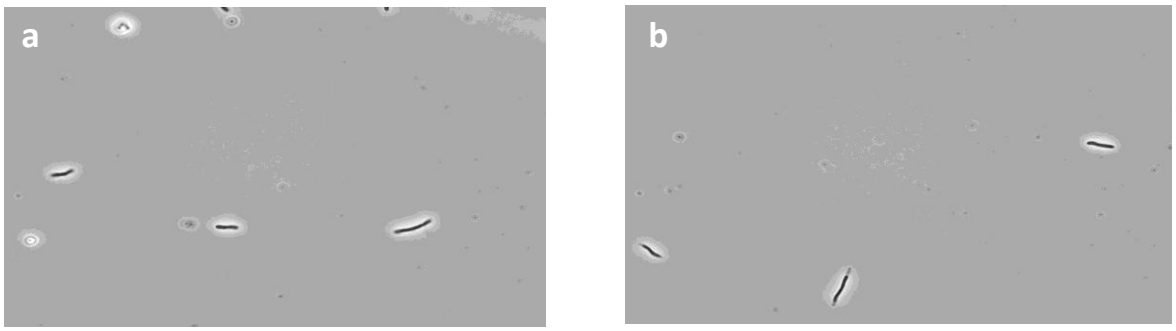


Figure 2 : La souche *Marinitoga camini* MV1075 observée en microscopie optique
a : La souche à t=4h, juste avant l'addition de mitomycine C. b : La souche à t=6h, 2 h après l'addition de mitomycine C

2.2. DOSAGES ATPMETRIQUES EFFECTUES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MARINITOGA OKINAWENSIS TFS10-5T

Deux expériences identiques ont également été entreprises sur cette souche mais lors de la première d'entre elles, l'addition de mitomycine C a vraisemblablement eu lieu en phase de latence et aucun effet de l'antibiotique sur l'activité métabolique n'a pu être constaté. Au cours de la seconde expérience, le traitement à la mitomycine C a bien eu lieu en phase exponentielle de croissance et un effet potentiel de l'antibiotique a pu être observé. Ceci tend à souligner l'existence d'une fenêtre optimale d'addition de la mitomycine C. Cette fenêtre correspond à un laps de temps au cours de la croissance de souches sensibles, où, en fonction du temps de génération et de la densité cellulaire, la concentration en antibiotique ajoutée se révèle particulièrement efficace.

Les résultats de cette deuxième expérience, dont nous aurons à vérifier la reproductibilité, sont regroupés dans le tableau 2. Les mesures d'ATP extracellulaires réalisées chez *Marinitoga*

okinawensis se sont révélées supérieures à celles obtenues chez *Marinitoga camini.* Il a néanmoins été estimé que les mesures d'ATP total effectuées au cours de la croissance de la souche *M. okinawensis* TFS10-5^T restaient représentatives de la teneur en ATP intracellulaire par millilitre de culture en fonction du temps. La figure 3 représente l'évolution de la concentration en ATP total par millilitre de culture, qu'il ait eu ou non, addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance.

Tableau 2: Résultats des dosages d'ATP au cours de la croissance de la souche *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^T.
A : culture non exposée à la mitomycine C. B : culture avant l'exposition à la mitomycine C à t=3h.
B' : culture après l'exposition à la mitomycine C à t=3h. ND : Non Déterminé. CV% : coefficient de variations sur *n*=3 mesures pour l'ATPt et *n*=2 mesures pour l'ATPe

Temps	Cultures	[ATPt] moyen (pmole/mL)	CV(%)	[ATPe] moyen (pmole/mL)	ATPe/ATPt	Comptages cellulaires (cellules/mL)
t=0h Inoculation	A	19,8	6	1,5	7 %	ND
	B	21,1	18	1,27	6 %	ND
t=3h avant induction	A	ND	ND	ND	ND	ND
	B	147,3	20	25	16%	$1,72 \times 10^7$
t=3h après induction	A	183,6	4	27	14 %	$1,76 \times 10^7$
	B'	178,5	12	28.5	16 %	1.56×10^7
t=3h45	A	297,6	13	27	9 %	$2,12 \times 10^7$
	B'	185,9	15	17,58	9 %	$1,88 \times 10^7$
t=5h	A	499,4	10	27,2	5 %	$5,00 \times 10^7$
	B'	327,5	12	51	15 %	1.80×10^7

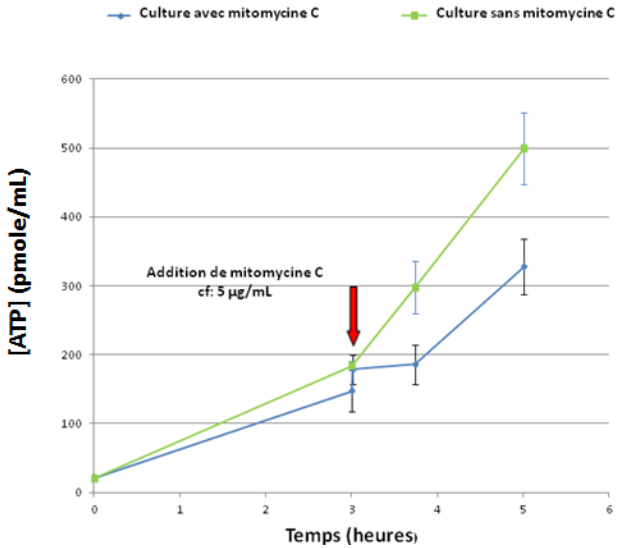


Figure 3 : Concentration en ATP total par millilitre de culture de la souche *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^T, qu'il y ait eu ou non addition de mytomycine C en début de phase exponentielle de croissance. La flèche rouge indique le moment de l'addition de l'antibiotique

La concentration en ATP total par millilitre de culture apparaît plus faible après qu'il y ait eu addition de mitomycine C chez *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^T. Parallèlement, les comptages en cellules de Thoma tendent à démontrer l'apparition d'un retard de croissance 2h après le traitement antibiotique. Les photographies de la figure 4, réalisées en microscopie optique à cet instant, témoigne quant à elles de l'allongement des cellules qui ont été exposées à la mitomycine C. Sur la base de ces résultats, la souche a donc été considérée comme sensible à cet antibiotique et la diminution de la concentration d'ATP total par millilitre de culture comme une signature potentielle du retard de croissance induit par la mitomycine C. Etant donné que l'abondance en ATP dépend habituellement du volume cellulaire, il est intéressant de noter, ici, une diminution de la teneur en ATPt et ce malgré l'allongement des cellules et donc leur augmentation de volume. Ceci traduit donc bien encore le retard de croissance constaté chez *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^T.

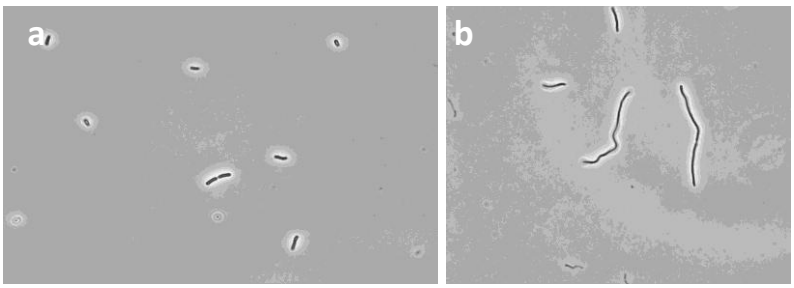


Figure 4: La souche *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^T observée en microscopie optique
a : La souche à t=3h, juste avant l'addition de mitomycine C. b : La souche à t=5h, 2 h après l'addition de mitomycine C qui provoque un retard de croissance du à l'allongement des cellules qui ne se divisent plus

2.3. DOSAGES ATPMETRIQUES EFFECTUES AU COURS DE LA CROISSANCE DE LA SOUCHE MARINITOGA PIEZOPHILA KA3

Ces dosages ont également été réalisés en duplicats de culture et les résultats obtenus se sont avérés très similaires à l'issue des deux expériences. Les résultats de l'une d'entre elles sont résumés dans le tableau 3. Les teneurs en ATP extracellulaire sont apparues faibles voire nulles au cours de la croissance de la souche. Ainsi, les mesures d'ATP total par millilitre de culture sont représentatives des concentrations en ATP intracellulaire au cours du temps. L'évolution de la concentration en ATP total par millilitre de culture, qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance, est représentée sur la figure 4.

Tableau 3 : Résultats des dosages d'ATP au cours de la croissance de la souche *Marinitoga piezophila* KA3
A : culture non exposée à la mitomycine C. B : culture avant l'exposition à la mitomycine C à t=3h. B' : culture après l'exposition à la mitomycine C à t=3h. ND : Non Déterminé. CV% : coefficient de variations sur *n*=3 mesures pour l'ATPt et *n*=2 mesures pour l'ATPe

Temps	Cultures	[ATPt] moyen (pmole/mL)	CV(%)	[ATPe] moyen (pmole/mL)	ATPe/ATPt	Comptages cellulaires (cellules/mL)
t=0h Inoculation	A	9,9	15	0,27	2,7 %	ND
	B	7,7	3	0,11	1,4 %	ND
t=3h avant induction	A	ND	ND	ND	ND	ND
	B	326,4	11	5,16	1,6 %	$3,76 \times 10^7$
t=3h après induction	A	399,2	10	0,24	0,1 %	$3,16 \times 10^7$
	B'	458,0	12	2	0,4 %	$3,53 \times 10^7$
t=3h45	A	624,1	10	0,00	0,0 %	$9,24 \times 10^7$
	B'	878	2	0,00	0.0 %	$4,80 \times 10^7$
t=5h	A	282,3	2	0,05	0,0 %	$3,00 \times 10^8$
	B'	1,3	33	0,24	18 %	$2,80 \times 10^6$

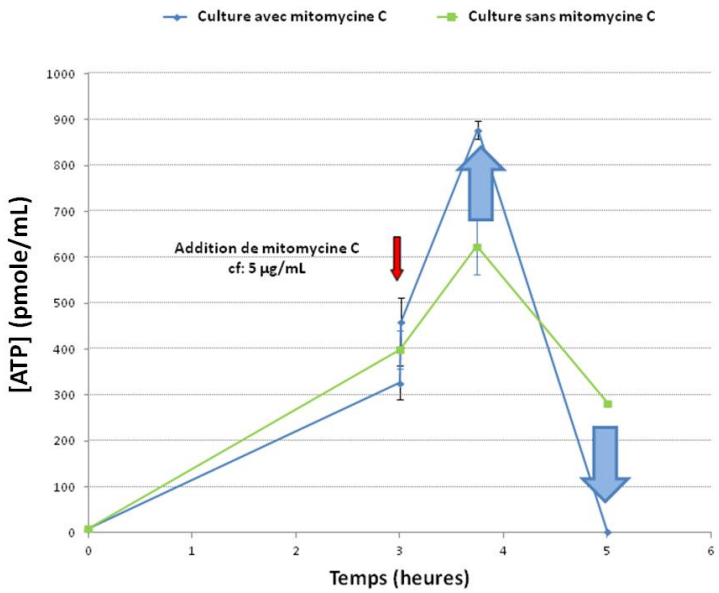


Figure 5 : Concentration en ATP total par millilitre de culture de la souche *Marinitoga piezophila* KA3, qu'il y ait eu ou non addition de mitomycine C en début de phase exponentielle de croissance. La flèche rouge indique le moment de l'addition de l'antibiotique. Les flèches bleues soulignent les différences significatives en ATPt entre les 2 cultures

La souche *Marinitoga piezophila* KA3 est nécessairement sensible à la mitomycine C dans la mesure où il a été démontré que l'antibiotique constituait un agent inducteur de la production virale. Pour autant, en considérant que l'expérience réalisée chez *Marinitoga okinawensis* TFS10-5^{T} illustre l'effet de l'antibiotique sur l'activité métabolique d'une souche sensible à la mitomycine C, ce même effet n'est pas observé chez *Marinitoga piezophila* KA3.

Au contraire, dans les 45 min qui ont suivi l'induction de la production virale par l'antibiotique, une augmentation significative de la concentration en ATP total par millilitre de culture a été mesurée (Test de Student à 95% de confiance). Dans le même temps, les comptages en cellules de Thoma ont démontré que le nombre de cellules dans la culture induite n'avait guère augmenté. En rapportant cette augmentation d'ATP total au nombre de cellules, il est estimé que, durant cette période, l'activité métabolique des cellules induites a augmenté de 37 %. Jusqu'à ce jour, au laboratoire, aucune expérience n'avait conduit à observer une augmentation significative de l'ATP intracellulaire de souches en phase exponentielle de croissance soumises à un stress.

Il est en fait supposé que cette période d'au moins 45 min, qui s'accompagne d'une franche augmentation du métabolisme chez *Marinitoga piezophila* KA3, illustre la réorientation, par le virus MPV1 entré dans un cycle lytique, du métabolisme de l'hôte à son profit. Cette phase du

cycle viral qui se caractérise par l'expression des gènes viraux, la réplication du génome viral qui s'est excisé et la morphogénèse des virions est connue sous le nom de phase d'éclipse. Celle-ci précède l'encapsidation des génomes viraux au sein des particules matures avant que ces dernières ne soient libérées dans le milieu extracellulaire suite à la lyse provoquée des cellules hôtes (Weibauer, 2004). Il est logique d'imaginer que cette phase d'éclipse, soit coûteuse en énergie pour *Marinitoga piezophila* KA3 et expliquerait l'augmentation d'ATP intracellulaire détectée. Cette observation est renforcée par le fait que les analyses en qPCR effectuées durant les 40 min qui suivent l'induction à l'antibiotique ont démontré, lors d'une autre expérience, une réplication accrue du provirus et de l'ADNccc ensuite encapsidé.

Les comptages en cellules de Thoma ont démontré la lyse effective d'une partie des cellules 2 h après l'induction à la mitomycine C, une lyse qui coïncide, d'après les cinétiques hôte/virus réalisées par ailleurs, avec la libération des virions. Les concentrations en ATP total mesurées au même instant ont brutalement chuté pour ce qui est de la culture induite. Ceci s'explique par la lyse virale qui a provoqué la libération du contenu en ATP cellulaire dans le milieu extracellulaire. Aucune augmentation significative de l'ATP extracellulaire n'est cependant constatée sans doute en raison de la libération simultanée par les cellules lysées de nombreuses phosphatases.

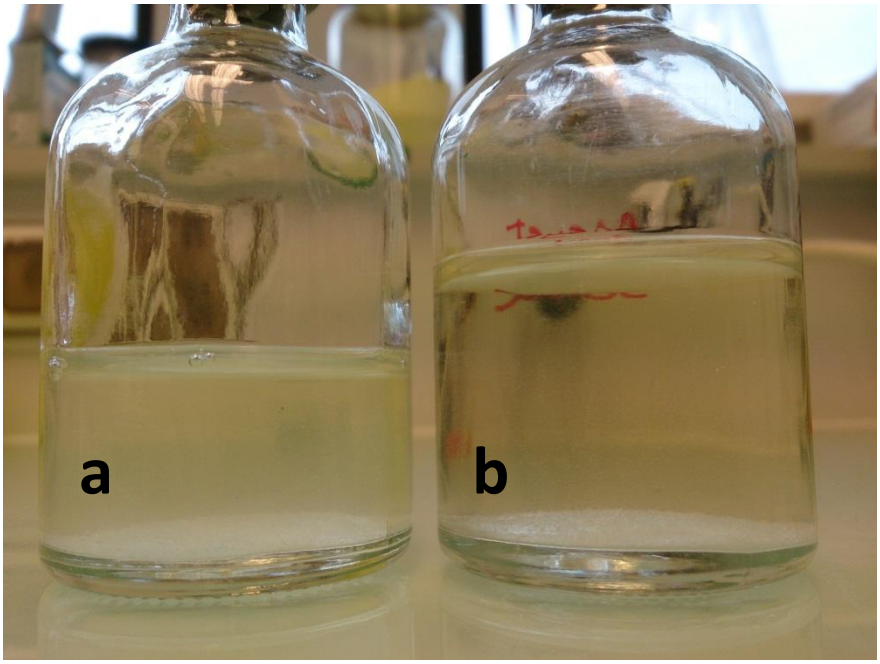


Figure 6 : Illustration de la lyse virale chez *Marinitoga piezophila.* a : culture bactérienne de 5 heures non traitée à la mitomycine C, avec son trouble caractéristique du à la croissance ; b : culture bactérienne de 5 heures, 2 heures après qu'il y ait eu addition de mitomycine C et déclenchement du cycle lytique

La chute moins prononcée de la concentration en ATP total mesurée à t=5h pour la culture non induite ne traduirait quant à elle pas une lyse virale mais soulignerait plutôt le fait que la culture entre progressivement en phase stationnaire de croissance, comme le confirment les comptages cellulaires. Une diminution de la concentration en ATP total est en conséquence déjà perceptible et ce bien que les cellules continuent encore à croître légèrement. Il avait déjà été démontré que l'entrée en phase stationnaire était visible en ATP avant que cela ne le soit en comptage (je ne sais plus la ref je te l'ai donné, Eydal et pederson non ?)

Pour conclure, il ne s'agit ici que de résultats préliminaires d'ATPmétrie qu'il sera nécessaire de confirmer mais qui déjà interpellent quant à l'impact de la production virale sur le métabolisme détourné de l'hôte. A ce jour, nous ne disposons pas d'une souche de M. piezophila non virosée, ce qui aurait été très utile comme contrôle. Néanmoins, dans la première partie de cette thèse, le criblage effectué sur de nombreuses souches de Thermotogales a permis de mettre en évidence deux autres souches lysogénisées *Marinitoga camini* DV1155 et *Marinitoga camini* DV1197. Nous avons déjà démontré que les provirus de ces deux souches étaient inductibles à la mitomycine C, ce qui en fait des modèles intéressants pour poursuivre ces expériences. De plus, même si nous ne disposons pas à ce jour des souches M. camini DV1155 et DV1197 non virosées, nous avons *Marinitoga camini* MV1075 non virosée décrite dans cette étude. Ainsi, le même type d'étude par ATPmétrie doit être réalisé sur ces deux nouveaux systèmes hôtes virus et pourra peut-être nous permettre de confirmer que le déclenchement d'un cycle lytique et la phase d'éclipse qui précède la libération des virions ont bien une signature caractéristique en ATPmétrie.

De plus, ces 2 nouvelles souches sont intéressantes, car uniquement porteuses d'un virus, par rapport au système tripartite faisant intervenir un ADNccc "pirate" chez *Marinitoga piezophila* KA3. Quant à l'impact d'un élément type ADNccc sur le contenu en ATP, après induction, nous avons une amorce de réponse via l'exemple de *M. okinawensis* qui porte un ADNccc de 27kb. Dans ce système, le contenu en ATP, après induction, n'a pas été augmenté. Néanmoins, il est vrai que ce système n'est pas comparable à ce que nous avons décrit chez *M. piezophila KA 3* dans lequel l'ADNccc est inductible et encapsidé.

CONCLUSION GENERALE

LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES

LA VIROSPHERE DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES

MIEUX CONNAITRE CETTE VIROSPHERE : POURQUOI AVOIR CIBLE LES *THERMOTOGALES* ?

LA DECOUVERTE DE MPV1

LE CONCEPT DE VIROCELL : L'UTILITE DE L'ATPMETRIE POUR DEFINIR UNE SIGNATURE DE « L'ACTIVITE METABOLIQUE VIRALE »?

POURSUIVRE L'ETUDE DE LA VIROSPHERE DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES

LES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES

Des méthodes culturales et non culturales ont permis de découvrir une riche diversité bactérienne et archéenne, notamment associées aux sites hydrothermaux actifs (Flores & Reisenbach, 2011).

- Le domaine *Bacteria* est en général le mieux représenté au niveau des cheminées actives. En fonction des méthodes de mesure d'abondance, des caractéristiques du site hydrothermal et de l'échantillon considéré, les bactéries représentent entre 35 et 99 % de la population microbienne hydrothermale (Flores & Reisenbach, 2011). Les epsilonprotéobactéries, mésophiles ou thermophiles modérées, sont prédominantes et plusieurs de leurs représentantes ont récemment été obtenues en culture pure. Elles peuvent être aérobies, microaérophiles ou anaérobies et apparaissent essentielles dans le cycle du soufre au sein des sources hydrothermales océaniques profondes (Campbell *et al.,* 2006). Les communautés microbiennes hydrothermales comprennent également d'autres bactéries thermophiles appartenant aux ordres des *Aquificales* et des *Thermotogales*, moins abondantes mais communément identifiées. Les premières sont chimiolithotrophes ou organotrophes en conditions anaérobie ou aérobie et les secondes fermentaires hétérotrophes strictement anaérobies (Flores & Reisenbach, 2011; Miroshnichenko & Bonch Osmolovskaia, 2006). Des bactéries chimioorganohétérotrophes thermophiles et aérobies sont aussi retrouvées avec notamment les genres *Bacillus*, *Geobacillus* et *Thermus*.

- Le domaine *Archaea*, si il est moins représenté au niveau de cheminées actives, joue un rôle biogéochimique clef et particulièrement aux plus hautes températures (Flores & Reisenbach, 2011). Les études de diversité consacrées uniquement à ce domaine ont révélé une grande diversité phylogénétique et métabolique au niveau des sources hydrothermales (Nercessian *et al.,* 2003 ; McCliment *et al*., 2006). La plupart des archées sont thermophiles ou hyperthermophiles et logiquement retrouvées dans les zones où l'influence du fluide hydrothermal et le plus grand. Les crénarchées communément détectées au niveau des sites actifs incluent des représentants cultivés de l'ordre des

Desulfurococcales (Reysenbach, 2002) et plusieurs groupes d'incultivés (Takai *et al.*, 2006) .

Parmi les euryarchées, communément retrouvées, citons les méthanogènes hyperthermophiles de l'ordre des *Methanocaldococcales,* les hyperthermophiles sulfatoréductrices de l'ordre des *Archaeoglobales* et une variété de *Thermococcales* fermentaires hyper/thermophiles (Flores & Reisenbach, 2011).

LA VIROSPHERE DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES

Si beaucoup d'efforts sont aujourd'hui encore menés dans le but de mieux comprendre l'écologie microbienne de ces écosystèmes marins extrêmes, notre connaissance de la virosphère associée aux microorganismes hydrothermaux marins demeure encore limitée.

Quelques études, très peu, ont permis d'estimer l'abondance virale des sources hydrothermales océaniques profondes. Elles attestent toutes plus ou moins d'une plus grande abondance et production virale au sein des sources hydrothermales actives (1,45 x 10^5 à 9,9 x 107 VLPs/mL) que dans l'océan profond environnant (de l'ordre de 3,0 x 10^6 VLPs/mL) (Jupiner *et al.*, 1998 ; Wommack *et al.*, 2004 ; Ortmann & Suttle, 2005 ; Williamson *et al.*,2008 , Yoshida-Takashima *et al.*,2012).

En plus de ces quelques données d'abondance virale, deux analyses de métagénomique virale sur des échantillons des sources hydrothermales océaniques profondes ont également été publiées. La plus complète, portant sur des échantillons de flux hydrothermaux diffus, révèlent que les virus hydrothermaux tempérés seraient moins diversifiés que ceux composant la communauté virioplanctonique globale mais qu'ils présenteraient, par ailleurs, un très grand nombre de gènes nouveaux (Williamson *et al.*, 2008).

Le nombre de systèmes hôte/virus caractérisés à partir de ce type d'environnement demeure enfin extrêmement faible. A ce jour, seuls 2 archéovirus associés à des *Thermococcales* et 5 bactériovirus, parmi lesquels 4 virus de *Bacillales* et un virus associé à une

epsilonproteobactérie, ont été isolés et caractérisés. Ces 7 systèmes hôtes/virus sont présentés plus en détail dans le tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques des archéovirus et des bactériovirus issus des sources hydrothermales océaniques profondes

Archéovirus (Références)	Souches hôtes (température de croissance)	Familles	Morphologies des Virions Cycles viraux	Génomes
PAV1 (Geslin *et al.*, 2003a)	*Pyrococcus abyssi* GE23 (85°C)	Non classé	Citron 120 nm de long and 80 nm de large Etat porteur	ADN double brin circulaire de 18. 5 kb
TPV1 (Gorlas *et al.*, 2012)	*Thermococcus prieuri* (80°C)	Non classé	Citron 140 nm de long and 80 nm de large Etat porteur	ADN double brin circulaire de 21. 5 kb
Bactériovirus (Références)	**Souches hôtes (température de croissance)**	**Familles**	**Virions Cycles viraux**	**Génomes**
BVW1 (Liu *et al.*, 2006)	*Bacillus sp.* w13 (65°C)	Non classé	Longue queue flexible de 300 nm de long Tête héxagonale de 70 nm de diamètre Lytique	ADN double brin linéaire de 18 kb
GVE1 (Liu *et al.*, 2006)	*Geobacillus sp.* E26323 (65°C)	*Siphoviridae*	Queue flexible de180 nm de long Tête héxagonale de 130 nm de diamètre Lytique	ADN double brin linéaire de 41 kb
GVE2 (Liu & Zhang, 2008)	*Geobacillus sp.* E263 (65°C)	*Siphoviridae*	Non décrite Probablement similaire à GVE1 Lytique, capacité lysogénique potentielle	ADN double brin linéaire de 41 kb
D6E (Wang & Zhang, 2008)	*Geobacillus sp.* E263 (65°C)	*Myoviridae*	Queue contractile de 60 nm de long Tête héxagonale de 60 nm de diamètre Lytique	ADN double brin linéaire de 49 kb
Nsr-1 (Yoshida-Takashima., 2013)	*Nitratiruptor sp.* (55°C°)	*Siphoviridae*	Queue flexible de 210 nm Tête héxagonale de 64 nm de diamètre Lysogénique	ADN double brin linéaire de 37 kb

PAV1 (*Pyrococcus abyssi* virus 1) et TPV1 (*Thermococcus prieuri* virus 1) constituent les deux seuls virus d'archées hyperthermophiles marines qui aient été décrits pour le moment (Geslin *et al.*,2003 ; Gorlas et al.,2012). Sur le plan morphologique, leurs virions en forme de citron s'avèrent tout à fait comparables à ceux des *Fuselloviridae* qui infectent des crenarchées hyperthermophiles peuplant les sources chaudes terrestres à partir desquelles une majorité d'archéovirus a été isolé (Pina *et al.*, 2011). Les 5 bactériovirus issus des sources hydrothermales océaniques profondes sont quant à eux associés à des hôtes thermophiles dont les températures optimales de croissance n'excèdent pas les 65°C. Quatre de ces bactériovirus ont été isolés de souches aérobies chimioorganohétérotrophes appartenant aux genres *Bacillus* ou *Geobacillus* et un cinquième à partir d'une epsilonprotéobactérie chimiolithoautotrophe anaérobie et micro aérophile cultivée à 55°C, c'est-à-dire thermophile modérée. Il s'agit de bactériovirus caudés

comme la grande majorité de ceux décrits au sein des sources chaudes terrestres également associés à des hôtes thermophiles (Tableau annexe 3 ; Uldahl & Peng, 2013).

Ainsi, l'ordre des *Caudovirales*, prépondérant chez les bactériovirus (Ackermann, 2007) se trouve également bien représenté dans les environnements les plus chauds de notre planète.

Les différences constatées au niveau des sources hydrothermales terrestres et marines entre bactériovirus caudés et archéovirus pléomorphes à l'instar de PAV1 ou SSV1 en forme de citron (Geslin *et al.,* 2003), ne s'arrêtent cependant pas à la seule morphologie de leurs virions. Une distinction assez nette est également rapportée sur le plan des génomes viraux. Chez les bactériovirus, sont retrouvés de manière générale différents modules fonctionnels impliqués dans les différentes étapes du cycle viral (à savoir l'intégration, la réplication, la transcription, l'encapsidation de l'ADN, l'assemblage de la tête, l'assemblage de la queue et la lyse) alors que chez les archéovirus parfois plus de 80% des gènes prédits n'ont pas d'homologues dans les banques de données.

L'ensemble de ces distinctions constatées entre archéovirus et bactériovirus pourrait s'expliquer par l'hypothèse selon laquelle différents groupes de virus, issus d'une virosphère ancienne, aient en fait pu, plus spécifiquement, être inféodés à l'un des 3 domaines du vivant. Ces fractions virales auraient par la suite co-évolué au sein de leur domaine cellulaire respectif pour aboutir à la diversité virale moderne que nous connaissons aujourd'hui (Forterre & Prangishvili, 2009 ; Prangishvili *et al.,* 2006 ; Koonin *et al*., 2006).

Il reste néanmoins nécessaire de raisonner avec prudence quant à la virosphère de ces environnements hydrothermaux. La diversité virale n'est encore que peu connues dans ces écosystèmes et ce encore plus particulièrement au sein des sources hydrothermales océaniques profondes.

De manière générale, il est absolument nécessaire de poursuivre la recherche de virus associé à des groupes de microorganismes inféodés aux sources hydrothermales océaniques profondes. Ceci devrait nous permettre de mieux appréhender leur diversité mais aussi leurs impacts sur leurs hôtes et plus globalement sur cet écosystème marin extrême.

MIEUX CONNAITRE CETTE VIROSPHERE : POURQUOI AVOIR CIBLE LES THERMOTOGALES ?

Cette décision de cibler les *Thermotogales* pour la recherche de virus (et plasmides) ne s'est pas uniquement justifiée par le fait que ces bactéries thermophiles soient communément retrouvées au sein des communautés microbiennes hydrothermales (Flores & Reysenbach, 2011). Ces bactéries présentent également un intérêt « phylogénétique et génomique ». Les études phylogénétiques, basées sur les séquences codant pour l'ARNr 16S et celles codant pour vingt-neuf protéines ribosomiques concaténées, font des *Thermotogales* le groupe sœur de celui des *Aquificales* et contribuent au fait que les *Thermotogales* occupent l'une des branches les plus profondes dans l'arbre phylogénétique bactérien (Bonch-Osmolovskaya, 2008 ; Zhaxybayeva *et al.*, 2009).

Les analyses phylogénétiques menées sur plusieurs gènes individuels, autres que ceux codant pour l'ARNr 16S et les protéines ribosomiques, révèlent pourtant une proximité beaucoup plus immédiate des *Thermotogales* avec le phylum des *Firmicutes* (Zhaxybayeva *et al.*, 2009). Les analyses suggèrent en fait que de très nombreux transferts latéraux de gènes aient contribué à l'histoire évolutive des *Thermotogales*. Plusieurs de leurs gènes proviendraient ainsi d'autres taxons, en particulier de *Firmicutes* thermophiles et en moindre mesure d'*Archaea* appartenant à l'ordre des *Thermococcales* (Zhaxybayeva *et al.*, 2009, Nelson *et al.*,1999).

Compte tenu du fait que la transduction représente l'un des principaux mécanismes contribuant aux transferts latéraux de gènes, il est envisagé que des virus aient joué un rôle majeur au cours de cette histoire évolutive complexe et incongrue. La description de séquences CRISPR au sein de plusieurs génomes de *Thermotogales* pourrait témoigner de la mise en place d'immunité vis-à-vis d'infections virales passées. (Zhaxybayeva *et al.*, 2009). Pour autant, jusqu'à ce travail de thèse, aucun bactériovirus n'avait encore été décrit chez les *Thermotogales*. Trois mini-plasmides constituaient les seuls éléments génétiques mobiles décrits au sein de cet ordre bactérien. Les deux premiers, PRQ7 et PMC24, cryptiques et très similaires sont associés à 2 souches du genre *Thermotoga* (Harriot *et al.*, 1994 ; Akimkina *et al.*,1999) et le troisième de 1724 pb est associé à *Mesotoga prima* (Zhaxybayeva *et al.*, 2012).

LA DECOUVERTE DE MPV1

MPV1 (*Marinitoga piezophila* Virus 1) constitue à ce jour le premier bactériovirus isolé de l'ordre des *Thermotogales*. Il s'agit d'un virus tempéré du type *Siphoviridae* dont le génome de 43,7 kb est composé de 54 ORFs. L'analyse des 31 ORFs pour lesquels des similarités de séquences ont été obtenues, a révélé des homologies au sein des génomes d'autres *Thermotogales*. Ceci laisse envisager que ce virus ait pu interagir avec d'autres bactéries de cet ordre et leur virus. Les homologies de séquence les plus nombreuses ont néanmoins été retrouvées chez des *Firmicutes* ou leurs bactériovirus. L'ensemble des analyses contribue en fait à souligner la connexion évolutive qui existe entre MPV1 et des bactériovirus infectant des *Firmicutes*.

Ce virus entretient avec son hôte *Marinitoga piezophila*, thermophile et piezophile, une relation du type lysogénique. Une production basale de virions existe mais celle-ci est induite à l'issue d'un traitement à la mitomycine C et du déclenchement d'un cycle lytique. Les virions produits se composent d'une capside icosahédrique d'environ 55 nm de diamètre et d'une queue flexible d'environ 200 nm de long et 10 nm de large.

MPV1 qui représente le premier bactériovirus isolé d'une bactérie thermophile et anaérobie stricte, soumis de plus à des conditions extrêmes de pressions hydrostatiques, est un virus caudé. Ce siphovirus doit se révéler capable de s'adsorber à la toga de *Thermotogales*, et vraisemblablement d'utiliser sa queue comme une seringue afin d'injecter le contenu de sa capside. La toga est une enveloppe cellulaire externe caractéristique qui forme une gaine ample autour des *Thermotogales.* Sa composition est encore très peu documentée, 2 protéines la composeraient principalement : la protéine OmpA1 permettant l'ancrage de la toga à la cellule, probablement au niveau du peptidoglycane et la porine OmpB (Petrus *et al.*, 2012). Il serait notamment intéressant d'essayer d'étudier plus en détails le processus d'adsorption de MPV1 afin de déterminer si l'une ou l'autre des protéines de toge sont impliquées dans la reconnaissance hôte/virus et le processus d'infection viral. Chez *E. coli*, il a par exemple été démontré que la porine OmpC est utilisée en tant que récepteur par le bactériovirus T4 (Hashemolhosseini, 1994). Sur la base de l'analyse bioinformatique de plusieurs génomes de *Thermotogales*, la séquence relative à la porine OmpB est apparue moins conservée que la protéine d'ancrage OmpA1. Cette dernière pourrait donc être une meilleure cible pour étudier la liaison hôte/virus

La majorité des expérimentations sur MPV1 a pour le moment été menée à pression atmosphérique dans la mesure où *M. piezophila* s'y adapte très bien au terme de plusieurs repiquages. Les tests préliminaires entrepris à 40 MPa, qui correspond à la pression optimale de croissance de la souche hôte, ont démontré l'existence d'une production virale basale qui semble assez comparable à celles observé à 0,1 MPa. L'impact de la pression hydrostatique ne sera cependant pas à négliger si l'on veut essayer de mieux comprendre les différents mécanismes mis en place lors de ce cycle viral. MPV1 constitue en effet un modèle très intéressant pour étudier l'effet combiné de la température et de la pression hydrostatique sur la production des virions et leur morphogénèse en se rapprochant un peu plus des conditions in situ.

MPV1 ne constitue à ce jour que le second bactériovirus tempéré décrit au sein des sources hydrothermales océaniques profondes. La majorité des bactériovirus décrits sont en effet lytiques ; les deux archéovirus décrits sont eux dans une relation du type chronique. Des études ont pourtant permis de souligner le fait qu'il pourrait y avoir une plus grande fréquence d'hôtes lysogénisés et logiquement un nombre plus important de virus tempérés au sein des flux hydrothermaux diffus que dans d'autres types d'environnements marins non hydrothermaux pour lesquels ces données sont disponibles (Williamson *et al.*, 2008). La nature des interactions hôte/virus au sein des sources hydrothermales océaniques profondes n'a été que très peu explorée pour le moment.

Le fait que la lysogénie puisse être plus fréquente au niveau des sources hydrothermales, qu'ailleurs dans les océans, tend à démontrer que ce type d'interaction puisse jouer un rôle majeur au sein des communautés microbiennes hydrothermales (Williamson *et al.*, 2008). L'une des raisons pour expliquer que la lysogénie puisse prévaloir dans ces environnements résiderait dans le fait qu'il existerait un bénéfice mutuel à l'établissement d'un cycle lysogénique. Celui constitue, pour les virus, un moyen de s'affranchir des conditions extrêmes, potentiellement hostiles, propres aux environnements hydrothermaux tout en contribuant, par ailleurs, à la conversion lysogénique des microorganismes procaryotes extrêmophiles susceptibles d'améliorer ainsi leur potentiel génétique (Williamson *et al.*, 2008). Lors du criblage réalisé dans le cadre de cette thèse, 6 autres systèmes hôtes/virus ont été mis en évidence chez 3 souches de *Thermosipho melanesiensis*, une souche de *Thermosipho africanus* et 2 souches de *Marinitoga camini*. Des provirus ont aussi été détectés dans chacune de ces souches témoignant très certainement du fait que l'on ait affaire à d'autres exemples de bactériovirus tempérés.

MPV1 a enfin la particularité de partager son hôte avec un deuxième élément génétique mobile, l'ADNccc pMP1 de 13,3 kb. L'analyse du contenu des capsides virales, produites à l'issue du déclenchement d'un cycle lytique chez *M. piezophila*, a démontré que cet ADNccc s'avérait en fait être l'élément majoritairement encapsidé par les virions et non l'ADN viral de 43,7 kb.

L'analyse de pMP1 n'a révélé la présence d'aucun gène codant pour des protéines de structure virale sur les 13 ORF qui composent ce génome. Seuls 7 ORFs ont révélé des homologies avec des familles de gènes codant pour des protéines impliquées dans des interactions avec l'ADN (transcription, régulation, processus métabolique lié à l'ADN). Il est également apparu que dans les 45 min qui font suite au déclenchement d'un cycle lytique et qui précèdent la libération des virions, le niveau de réplication de pMP1 augmentait bien davantage que celui du virus MPV1. L'ensemble de ces résultats nous a amené à envisager que ce "ménage à 3" décrit chez *M. piezophila* pouvait constituer un nouvel exemple de piratage moléculaire. Ce concept de piratage moléculaire traduit l'utilisation par un réplicon ou pirate, des protéines de structure virale d'un autre réplicon ou helper afin de se propager (Christie & Dockland, 2012). Le tableau 2 regroupe les caractéristiques de 3 exemples de piratage moléculaire décrits dans la littérature en les comparant au système découvert chez *M. piezophila*.

Les piratages moléculaires décrits chez *E. coli* et *S. aureus* ont été les plus étudiés. Il ressort de leurs études l'existence d'un complexe réseau d'interactions entre les pirates et leurs bactériovirus helper. Ce réseau d'interaction s'exerce à plusieurs niveaux : du contrôle transcriptionnel à l'assemblage macromoléculaire des virions (Christie & Dockland, 2012). L'existence de telles interactions entre pMP1 et MPV1 n'ont pas encore été démontrées.

Chez *E. coli* et *S. aureus*, l'un des niveaux d'interaction ou d'interférence fréquent mais non obligatoire, consiste pour les pirates à réduire la taille des capsides virales, au moment de l'assemblage de celles-ci, qui ne font plus alors qu'un tiers de leur taille normale.
Ce processus, qui fait intervenir des protéines d'échafaudage internes ou externes codées par les pirates, leur permet de disposer de capsides n'assurant plus uniquement que l'empaquetage en entier de leurs génomes, plus petits que ceux des bactériovirus helper (Christie & Dockland, 2012).

Tableau 2 : Caractéristiques communes partagées par les pirates moléculaires caractérisés chez *S. solfataricus, E. coli*, *S. aureus* et le pirate supposé décrit chez *M.piezophila*

Hôtes	Souches du genre *Sulfolobus* comme *S.solfataricus* P1	*Escherichia coli*	*Staphylococcus aureus*	*Marinitoga piezophila*
Bactériovirus helper	Fusellovirus SSV1 or SSV2 environ 15 kb	Myovirus P2 33,6 kb	Plusieurs siphovirus comme 80α 39,6-45,9 kb	Siphovirus MPV1 43,7 kb
Pirates	plasmides pSSVx and pSSVi 5,7 kb	11,6 kb plasmid P4	Ilôts de pathogénicité SaPIs 17-24 kb	ADNccc pMP1 13,3 kb
Capacité de réplication du pirate independante de l'helper	Multiple copies	Multiple copies		Multiple copies
Capacité d'excision et d'intégration du pirate	Seulement pour pSSVi	Potentiellement intégré aussi au sein du chromosome de son hôte	Normalement intégré stablement au sein du chromosome de son hôte	Non démontrée Possession d'une intégrase
Capacité du pirate à répondre à l'entréé en cycle lytique de l'helper		Réplication et utilisation des capsides du bactériovirus helper pour se propager	Réplication et utilisation des capsides du bactériovirus helper pour se propager	Réplication et utilisation des capsides du bactériovirus helper pour se propager
Capacité du pirate à modifier la taille des procapsides du bactériovirus helper	Non démontrée ADN du pirate empaqueté dans des capsides qui font la moitié de la taille de celles normalement produites par le bactériovirus helper	Démontrée ADN du pirate empaqueté dans des capsides qui le tiers moitié de la taille de celles normalement produites par le bactériovirus helper	Démontrée ADN du pirate empaqueté dans des capsides qui le tiers moitié de la taille de celles normalement produites par le bactériovirus helper	Absente

Aucune capside de plus petite taille n'a pu être détectée en microscopie électronique à transmission (MET), à partir du surnageant de culture de *M. piezophila*. Ceci amène à donc à penser que le pirate supposé pMP1 ne dispose pas de ce niveau d'interférence lié à l'assemblage des capsides. Aucun ORF codant pour une protéine d'échafaudage susceptible d'intervenir au cours de l'assemblage des capsides de MPV1, n'a d'ailleurs pour le moment pu être identifié.

Les pirates développent un autre niveau d'interférence au moment de l'encapsidation du génome du virus helper. Chez *E. coli*, le pirate a incorporé à son génome la séquence signal de l'ADN viral helper. Ceci lui permet donc d'être également reconnu par la petite sous unité de la terminase virale et au final d'être encapsidé. Chez *S. aureus*, les choses sont différentes. Selon les cas, les pirates peuvent coder leurs propres petites sous-unités de la terminase. Celles-ci en s'associant à la grande sous unité de la terminase virale va permettre aux ADN pirates d'être encapsidés. D'autres pirates codent pour des protéines qui vont spécifiquement bloquer la petite

sous unité de la terminase virale et en conséquence empêcher l'encapsidation de l'ADN du virus helper (Christie & Dockland, 2012).

Les analyses du génome du pirate supposé pMP1 ont révélé l'existence de 3 courtes séquences présentant de grandes similarités avec certaines séquences retrouvées sur le génome du bactériovirus MPV1. Ces séquences constituent des candidates hypothétiques qui pourraient correspondre à la séquence signal reconnue par la petite sous-unité de la terminase virale et donc permettre l'encapsidation des ADN pMP1 et MPV1. L'un des ORFs de pMP1 (Maripi 2120) présente par ailleurs de grandes similarités avec un ORF viral (Maripi 315) situé légèrement en amont de celui codant pour une petite sous-unité de la terminase putative (Maripi 319) (Annotation des ORFs d'après Lucas *et al.,* 2012). Une hypothèse est que cet ORF, retrouvé sur pMP1, soit impliqué dans l'encapsidation. Pour aller plus loin, il serait nécessaire d'envisager de modifier génétiquement pMP1 et MPV1.

L'inactivation du gène codant pour la petite sous-unité de la terminase putative chez MPV1, ou encore la mutation des séquences signales hypothétiques portées par pMP1 pourrait nous permettre de déterminer si l'encapsidation du pirate supposé implique la petite sous-unité de la terminase virale ou l'une ou l'autre des séquences signal supposées de pMP1. L'inactivation sur cet ADNccc de l'ORF Maripi 2120 potentiellement impliqué dans l'encapsidation est une autre piste pour tenter d'avoir une incidence sur le niveau d'encapsidation de pMP1 et donc d'en apprendre un peu plus sur le fonctionnement de ce ménage à 3.
Il serait également intéressant d'étudier la régulation transcriptionnelle de l'ensemble de ce système en suivant l'évolution des transcrits de pMP1 et MPV1 en fonction du temps avec et sans induction à la mitomycine C. Ceci nous permettrait d'avoir une idée du niveau de régulation de pMP1 et MPV1 et peut être de mettre en lumière l'emprise du pirate pMP1.

Chez *E. coli* et *S. aureus,* il n'est pas clairement rapporté que les pirates interfèrent au niveau de la réplication du bacteriovirus helper. Par contre, dans les 45 min qui suivent le déclenchement d'un cycle lytique et qui précédent la libération des virions, le niveau de réplication de pMP1 est multiplié par 20 alors que celui de MPV1 n'est multiplié que par 6. L'étude du niveau de réplication des bactériovirus tempérés découverts chez 2 autres souches du genre *Marinitoga* à l'occasion de ces travaux de thèse sera donc, par ailleurs, intéressante. Elle permettra de déterminer si celui constaté chez MPV1 est proche de celui d'autres virus de *Thermotogales* ou si au contraire il paraît faible. Dans ce cas précis, il faudra tenter de

déterminer si le "pirate" profite simplement de cet état de fait ou si au contraire il est responsable de la faible réplication virale.

Dans les cas de piratage moléculaire en général, la question du bénéfice mutuel se pose. L'avantage des pirates (ici pMP1) est évident et consiste en la possibilité de pouvoir se propager à l'issue du déclenchement d'un cycle lytique du virus helper (ici MPV1). Ce système tripartite présenterait par ailleurs, un double avantage pour les hôtes cellulaires (ici *M. piezophila*). Etre lysogénisés par un bactériovirus helper pourrait d'abord leur offrir l'opportunité d'améliorer leurs potentiels génétiques (ce qui reste à démontrer chez *M. piezophila*). Porter un pirate augmenterait ensuite les chances de survie de la population cellulaire environnante non infectée ; le pirate étant préférentiellement encapsidé, ceci diminue nettement les probabilités d'infection par l'ADN viral porté par le bactériovirus.

Si les avantages pour les hôtes et les pirates sont perceptibles, le bénéfice de cette situation pour les virus helper apparaît beaucoup moins évident. La relation finement modulée qui unit les pirates et leurs helper au sein des 2 systèmes qui ont été les mieux étudiés laisse présager d'une longue co-évolution qui impliquerait pourtant un bénéfice mutuel (Christie & Dockland, 2012). En ce qui concerne précisément MPV1 et pMP1, les preuves de l'existence d'interactions et d'une coévolution entre les 2 éléments restent encore à apporter.

LE CONCEPT DE VIROCELL : L'UTILITE DE L'ATPMETRIE POUR DEFINIR UNE SIGNATURE DE « L'ACTIVITE METABOLIQUE VIRALE »?

Débattre autour de la question de savoir si la phase d'existence intracellulaire des virus peut être considérée comme une forme de vie à part entière semble aujourd'hui beaucoup plus judicieux pour certains scientifiques plutôt que de s'appuyer sur le caractère acellulaire des virions pour exclure le fait que les virus puissent être vivants.

Dès les années 1980, l'assimilation des virus à leurs virions avait déjà fait l'objet de critiques et l'hypothèse selon laquelle la phase intracellulaire d'existence du virus corresponde à la forme vivante de celui-ci avait été formulée par Claudiu Bandea (Forterre, 2010).

La découverte de la formation d'une usine virale, particulièrement impressionnante, chez l'amibe infectée par le virus géant Mimivirus a permis de faire récemment resurgir l'opinion selon laquelle il y aurait scientifiquement à distinguer virus et virions. L'usine virale est mise en place par la majorité des virus infectant les cellules eucaryotes, elle est particulièrement complexe chez les virus de la superfamille des NCLDVs. Localisée dans le cytoplasme, l'usine virale est délimitée par une membrane souvent issue du recrutement du réticulum endoplasmique granuleux, contient les ribosomes et recrute les mitochondries à sa périphérie ; il s'y opère la réplication du génome viral et l'assemblage des virions. Il a été proposé que l'usine virale intracellulaire représente le véritable organisme viral comparable à un organisme cellulaire parasitaire et que les virions ne constituent que le mécanisme utilisé par le virus pour se propager d'une cellule à l'autre (Claverie, 2006).

L'infection d'une bactérie ou d'une archée par leurs virus respectifs ne s'accompagne pas de la formation d'une usine virale. Le concept de virocell a été proposé, il permet notamment de généraliser la distinction à opérer entre virus et virions aux trois domaines du vivant. Dans ce modèle, l'infection virale d'une cellule, qu'elle soit bactérienne, archéenne ou eucaryote, la transforme ; ses fonctions ne sont plus de produire deux cellules filles mais des virions dans la perspective de propager les gènes viraux. Il ne s'agit donc plus d'une cellule régulière (appelée ribocell) mais d'une virocell, un organisme cellulaire correspondant à la forme métaboliquement active donc vivante du virus (Forterre, 2010 ; Forterre, 2012).

Au cours de ces travaux de thèse, une nette augmentation de l'activité métabolique a été constatée par ATPmétrie, consécutivement à l'induction de la production virale chez *M. piezophila*. Cette augmentation du métabolisme de l'hôte se produit justement dans l'intervalle de temps où des augmentations des niveaux de réplication du provirus MPV1 et de l'ADNccc pMP1 (pirate moléculaire) ont été démontrées par qPCR. Cette période, « de boost métabolique », chez *M. piezophila*, précède la libération de particules virales nouvellement formées au terme d'un cycle lytique.

Cette modification de l'activité métabolique chez *M. piezophila* concomitante à la réplication de ses 2 éléments génétiques mobiles pourrait servir à illustrer la transformation cellulaire, imputable à une infection virale, proposée dans le concept de virocell. Les résultats d'ATPmétrie

demeurent malgré tout encore préliminaires. Des expériences similaires devront notamment être menées avec les autres systèmes hôte/virus tempérés découverts chez les *Thermotogales* et briévement présentés dans cette thèse. Il serait en effet intéressant de déterminer si des augmentations de l'activité métabolique, comparables à celle mesurée chez *M. piezophila*, peuvent être détectées suite à l'induction de la production virale. Si tel était le cas, il serait ainsi peut être possible de définir par ATPmétrie « une signature de l'activité métabolique virale ». En menant des travaux similaires sur des bactériovirus tempérés associés à des souches mésophiles, il serait même peut-être possible de définir une signature métabolique générale, caractéristique de ce type d'infection virale.

POURSUIVRE L'ETUDE DE LA VIROSPHERE DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES

Afin d'accroître encore nos connaissances sur la virosphère associée aux sources hydrothermales océaniques profondes, il pourrait être judicieux de se focaliser également sur la composante microbienne autotrophe, anaérobie thermophile et hyperthermophile.

L'ordre des *Methanocaldococcales* qui regroupent des euryarchées méthanogènes hyperthermophiles se révèleraient particulièrement intéressant à cibler. Ces méthanogènes sont des micro-organismes clefs de la composante microbienne hydrothermale océanique en tant que producteurs chimiosynthétiques primaires. De plus, peu de choses sont encore connues sur les virus associés aux méthanogènes thermophiles et hyperthermophiles. Seuls 2 archéovirus caudés isolés du genre thermophile *Methanobacterium*, ont à ce jour été décrits (Meile *et a.l*, 1989). Ces derniers ont été isolés de digesteurs de boue et non d'environnements hydrothermaux.

A partir d'un criblage réalisé sur une trentaine de souches de *Methanocaldoccales*, des résultats préliminaires ont déjà été obtenus dans le cadre de cette thèse et du post doctorat tout juste débuté par Samuel Dupont. Ainsi, plusieurs de ces souches se sont déjà avérées produire des entités du type vésicules membranaires. A l'instar des vésicules récemment identifiées chez les *Thermococcales*, ces dernières pourraient transporter de l'ADN. Des signaux ont en effet été observés en microscopie à épifluorescence.

Les génomes de certaines de ces souches de *Methanocaldoccales* sont par ailleurs déjà disponibles dans les bases de données. L'analyse préliminaire de certains de ces génomes a révélé la présence de provirus putatifs qui laisse envisager, comme chez *Methanocaldococcus vulcanius* M7, des possibilités d'infections virales. *Methanocaldococcus vulcanius* M7 pourrait s'avérer être un modèle particulièrement intéressant dans la mesure où ce dernier porte également 2 ADNccc de 10 et 4 kb respectivement.

Ces travaux chez les *Methanocaldococcales* seront poursuivis au LM2E tout en continuant d'étudier les éléments génétiques mobiles associés aux *Thermotogales* et *Thermococcales*. A terme, ces études devraient nous permettre d'avoir une idée un peu plus précise du mobilome associé aux sources hydrothermales océaniques profondes.

Pour espérer en apprendre davantage sur les interactions entre ces virus, vésicules membranaires et leurs hôtes au sein de ces écosystèmes extrêmes, il pourrait s'avérer intéressant de maintenir ces différents partenaires en co-cultures. Nous disposons au laboratoire de bioreacteurs permettant des cultures en continue à haute température et en condition anaérobie, et bientôt sous pression hydrostatique, qui reproduisent au mieux les conditions in situ d'une source hydrothermale océanique profonde. Ces cultures en bioréacteurs pourraient nous permettre d'étudier nos systèmes hôtes/virus/vésicules à l'échelle plus globale d'une communauté microbienne composée de *Thermococcales*, *Methanocaldococcales* et *Thermotogales*. Ceci nous permettra notamment d'évaluer les possibilités d'interactions entre virus et vésicules et les possibilités d'infections inter genres et inter domaines.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Ackermann, Hans-W. 2003. “Bacteriophage observations and evolution.” Research in Microbiology 154 (4): 245–251.

Ackermann, Hans-W. 2007. “5500 Phages examined in the electron microscope.” Archives of virology 152 (2): 227–243.

Ackermann, Hans-W. 2009. Phage classification and characterization. In Bacteriophages, 127–140. Springer.

Ackermann, Hans-W. 2011a. “The first phage electron micrographs.” Bacteriophage 1 (4): 225–227.

Ackermann, Hans-W. 2011b. “Ruska H. Visualization of bacteriophage lysis in the hypermicroscope. Naturwissenschaften1940; 28: 45-6.” Bacteriophage 1 (4): 183–185.

Adhikari, Rishi Ram, and Jens Kallmeyer. 2010. “Detection and quantification of microbial activity in the subsurface.” Chemie der Erde-Geochemistry 70: 135–143.

Akimkina, T, P Ivanov, S Kostrov, T Sokolova, E Bonch-Osmolovskaya, K Firman, CF Dutta, and JA McClellan. 1999. “A Highly Conserved Plasmid from the Extreme Thermophile Thermotoga maritima MC24 Is a Member of a Family of Plasmids Distributed Worldwide.” Plasmid 42 (3): 236–240.

Alain, Karine, Viggó Thór Marteinsson, Margarita L Miroshnichenko, Elisaveta A Bonch-Osmolovskaya, Daniel Prieur, and Jean-Louis Birrien. 2002. “Marinitoga piezophila sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 52 (4): 1331–1339.

Deyter (2011). “Hydrovolcanologie appliquée à la phase hydrothermale : fumerolles, solfatares, geysers, lacs acides, mofettes, sources chaudes….” http://planet-terre.ens-lyon.fr/article/hydrovolcanologie.xml.

Antoine, E, V Cilia, JR Meunier, J Guezennec, F Lesongeur, and G Barbier. 1997. “Thermosipho melanesiensis sp. nov., a new thermophilic anaerobic bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from deep-sea hydrothermal vents in the southwestern Pacific Ocean.” International journal of systematic bacteriology 47 (4): 1118–1123.

Arnold, Hans Peter, Qunxin She, Hien Phan, Kenneth Stedman, David Prangishvili, Ingelore Holz, Jakob K Kristjansson, Roger Garrett, and Wolfram Zillig. 1999. “The genetic element pSSVx of the extremely thermophilic crenarchaeon Sulfolobus is a hybrid between a plasmid and a virus.” Molecular microbiology 34 (2): 217–226.

Arnold, Hans Peter, Ulrike Ziese, and Wolfram Zillig. 2000. “SNDV, a Novel Virus of the Extremely Thermophilic and Acidophilic Archaeon Sulfolobus.” Virology 272 (2): 409–416.

Arnold, Hans Peter, Wolfram Zillig, Ulrike Ziese, Ingelore Holz, Marie Crosby, Terry Utterback, Jan F Weidmann, et al. 2000. “A Novel Lipothrixvirus, SIFV, of the Extremely Thermophilic Crenarchaeon Sulfolobus.” Virology 267 (2): 252–266.

Aziz, Ramy K, Daniela Bartels, Aaron A Best, Matthew DeJongh, Terrence Disz, Robert A Edwards, Kevin Formsma, et al. 2008. “The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology.” BMC genomics 9 (1): 75.

B

Baker, Matthew L, Wen Jiang, Frazer J Rixon, and Wah Chiu. 2005. “Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages.” Journal of virology 79 (23): 14967–14970.

Barton, N, D Briggs, J Eisen, D Goldstein, and N, Patel. “Evolution.” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Beatty, J Thomas, Jörg Overmann, Michael T Lince, Ann K Manske, Andrew S Lang, Robert E Blankenship, Cindy L Van Dover, Tracey A Martinson, and F Gerald Plumley. 2005. “An obligately photosynthetic bacterial anaerobe from a deep-sea hydrothermal vent.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (26): 9306–9310.

Bergh, Oivind, Knut Yngve Børsheim, Gunnar Bratbak, and Mikal Heldal. 1989. “High abundance of viruses found in aquatic environments.” Nature 340 (6233): 467–468.

Bertani, Giuseppe. 1999. “Transduction-Like Gene Transfer in the MethanogenMethanococcus voltae.” Journal of bacteriology 181 (10): 2992–3002.

Bimboim, HC, and J2 Doly. 1979. “A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.” Nucleic acids research 7 (6): 1513–1523.

Bizanek, Roland, Brian F McGuinness, Koji Nakanishi, and Maria Tomasz. 1992. “Isolation and structure of an intrastrand cross-link adduct of mitomycin C and DNA.” Biochemistry 31 (12): 3084–3091.

Bize, Ariane, Erik A Karlsson, Karin Ekefjärd, Tessa EF Quax, Mery Pina, Marie-Christine Prevost, Patrick Forterre, Olivier Tenaillon, Rolf Bernander, and David Prangishvili. 2009. “A unique virus release mechanism in the Archaea.” Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (27): 11306–11311.

Blondal, Thorarinn, Sigridur Hjorleifsdottir, Arnthor Aevarsson, Olafur H Fridjonsson, Sigurlaug Skirnisdottir, Jon Oskar Wheat, Anna Gudny Hermannsdottir, Gudmundur O Hreggvidsson, Albert Vernon Smith, and Jakob K Kristjansson. 2005. “Characterization of a 5’-polynucleotide kinase/3’-phosphatase from bacteriophage RM378.” Journal of Biological Chemistry 280 (7): 5188–5194.

Blondal, Thorarinn, Audur Thorisdottir, Unnur Unnsteinsdottir, Sigridur Hjorleifsdottir, Arnthor Ævarsson, Sveinn Ernstsson, Olafur H Fridjonsson, et al. 2005. “Isolation and characterization of a thermostable RNA ligase 1 from a Thermus scotoductus bacteriophage TS2126 with good single-stranded DNA ligation properties.” Nucleic acids research 33 (1): 135–142.

Bonch-Osmolovskaya, Elizaveta. 2008. “Thermotogales.” eLS.

Børsheim, KY, G Bratbak, and M Heldal. 1990. “Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy.” Applied and Environmental Microbiology 56 (2): 352–356.

Boyer, Mickaël, Natalya Yutin, Isabelle Pagnier, Lina Barrassi, Ghislain Fournous, Leon Espinosa, Catherine Robert, et al. 2009. “Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms.” Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (51): 21848–21853.

Breitbart, Mya. 2012. “Marine viruses: truth or dare.” Marine Science 4.

Breitbart, Mya, LUKE R Thompson, Curtis A Suttle, MATTHEW B Sullivan, and others. 2007. “Exploring the vast diversity of marine viruses.” OCEANOGRAPHY-WASHINGTON DC-OCEANOGRAPHY SOCIETY- 20 (2): 135.

Brochier-Armanet, Celine, Patrick Forterre, and Simonetta Gribaldo. 2011. “Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later.” Current opinion in microbiology 14 (3): 274–281.

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.” Archiv für Mikrobiologie 84 (1): 54–68.

Brock, T, MT Madigan, J Martinko, and J Parker. 2009. “Brock’s Biology of Microorganisms.”

Brock, Thomas D. 1994. Life at high temperatures. Yellostone Association for Natural Science, History education.

Brock, Thomas D, and Hudson Freeze. 1969. “Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile.” Journal of Bacteriology 98 (1): 289–297.

Brüssow, Harald, and Frank Desiere. 2001. “Comparative phage genomics and the evolution of Siphoviridae: insights from dairy phages.” Molecular microbiology 39 (2): 213–223.

C

Campbell, Barbara J, Annette Summers Engel, Megan L Porter, and Ken Takai. 2006. “The versatile epsilon-proteobacteria: key players in sulphidic habitats.” Nature reviews. Microbiology 4 (6): 458–68. doi:10.1038/nrmicro1414.

Canchaya, Carlos, Ghislain Fournous, and Harald Brüssow. 2004. “The impact of prophages on bacterial chromosomes.” Molecular microbiology 53 (1): 9–18.

Carini, Paul, Laura Steindler, Sara Beszteri, and Stephen J Giovannoni. 2012. “Nutrient requirements for growth of the extreme oligotroph ‘Candidatus Pelagibacter ubique’HTCC1062 on a defined medium.” The ISME journal 7 (3): 592–602.

Casjens, Sherwood R, and Pamela A Thuman-Commike. 2011. “Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly.” Virology 411 (2): 393–415.

Chiron, Jean-Paul. 1998. “Virus herpès: 2000 ans d’histoire: François Chast,...[et al], Virus Herpes et pensée médicale de l’empirisme au prix Nobel.” Revue d’histoire de la pharmacie 86 (318): 218–222.

Christie, GE, T Dokland, and others. 2012. “Pirates of the Caudovirales.” Virology 434 (2): 210–221.

Claverie, Jean-Michel, and Hiroyuki Ogata. 2009. “Ten good reasons not to exclude giruses from the evolutionary picture.” Nature Reviews Microbiology 7 (8): 615–615.

Claverie, Jean-Michel, and others. 2006. “Viruses take center stage in cellular evolution.” Genome Biol 7 (6): 110.

Corliss, John B, and Robert D Ballard. 1977. “Oases of life in cold abyss.” National Geographic 152 (4): 441–453.

Corliss, John B, Jack Dymond, Louis I Gordon, John M Edmond, Richard P von Herzen, Robert D Ballard, Kenneth Green, et al. 1979. “Submarine thermal springs on the Galapagos Rift.” Science 203 (4385): 1073–1083.

D

Davis, Brigid M, Harvey H Kimsey, Anne V Kane, and Matthew K Waldor. 2002. “A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer.” The EMBO journal 21 (16): 4240–9.

Dorward, David W, Claude F Garon, and Ralph C Judd. 1989. “Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae.” Journal of bacteriology 171 (5): 2499–2505.

Duckworth, Donna H. 1976. “‘ Who discovered bacteriophage?’.” Bacteriological reviews 40 (4): 793.

E

Eiserling, F, A Pushkin, M Gingery, and G Bertani. 1999. “Bacteriophage-like particles associated with the gene transfer agent of Methanococcus voltae PS.” Journal of General Virology 80 (12): 3305–3308.

Ellen, Albert F, Sonja-Verena Albers, and Arnold JM Driessen. 2010. “Comparative study of the extracellular proteome of Sulfolobus species reveals limited secretion.” Extremophiles 14 (1): 87–98.

Ellen, Albert F, Olha V Rohulya, Fabrizia Fusetti, Michaela Wagner, Sonja-Verena Albers, and Arnold JM Driessen. 2011. “The Sulfolobicin Genes of Sulfolobus acidocaldariusEncode Novel Antimicrobial Proteins.” Journal of bacteriology 193 (17): 4380–4387.

Erauso, Gaël, Anna-Louise Reysenbach, Anne Godfroy, Jean-Roch Meunier, Byron Crump, Frédéric Partensky, John A Baross, et al. 1993. “Pyrococcus abyssi sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent.” Archives of microbiology 160 (5): 338–349.

Eydal, HSC, and Karsten Pedersen. 2007. “Use of an ATP assay to determine viable microbial biomass in Fennoscandian Shield groundwater from depths of 3-1000 m.” Journal of microbiological methods 70 (2): 363–373.

F

Fiers, Walter, Roland Contreras, Fred Duerinck, Guy Haegeman, Dirk Iserentant, Jozef Merregaert, W Min Jou, et al. 1976. “Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene.”

Fildes, Paul. 1951. “Frederick William Twort. 1877-1950.” Obituary Notices of Fellows of the Royal Society: 505–517.

Fischer, Matthias G. 2011. “Sputnik and Mavirus: more than just satellite viruses.” Nature Reviews Microbiology 10 (1): 78–78.

Flores, Gilberto E, and Anna-Louise Reysenbach. “Hydrothermal Environments, Marine.”

Forterre, Patrick. 2006. “The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions.” Virus research 117 (1): 5–16.

Forterre, Patrick. 2010. “Giant viruses: conflicts in revisiting the virus concept.” Intervirology 53 (5): 362–378.

Forterre, Patrick. 2012. “The virocell concept and environmental microbiology.” The ISME Journal.

Forterre, Patrick, and David Prangishvili. 2009. “The Great Billion-year War between Ribosome-and Capsid-encoding Organisms (Cells and Viruses) as the Major Source of Evolutionary Novelties.” Annals of the New York Academy of Sciences 1178 (1): 65–77.

Forterre, Patrick, Nicolas Soler, Mart Krupovic, Evelyne Marguet, and Hans-W Ackermann. 2012. “Fake virus particles generated by fluorescence microscopy.” Trends in microbiology.

Fu, Chi-yu, and Johnson E Johnson. 2012. “Structure and cell biology of archaeal virus STIV.” Current opinion in virology 2 (2): 122–127.

Furuta, Yoshikazu, and Ichizo Kobayashi. 2012. “Restriction-modification systems as mobile epigenetic elements.” Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements: 85–103.

G

Gaudin, Marie, Emilie Gauliard, Stefan Schouten, Ludivine Houel-Renault, Pascal Lenormand, Evelyne Marguet, and Patrick Forterre. 2012. “Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA.” Environmental microbiology reports.

Gaudin, Marie, Mart Krupovic, Evelyne Marguet, Emilie Gauliard, Virginija Cvirkaite-Krupovic, Eric Le Cam, Jacques Oberto, and Patrick Forterre. 2013. “Extracellular membrane vesicles harbouring viral genomes.” Environmental microbiology.

Geslin, Claire, Marc Le Romancer, Mélusine Gaillard, Gael Erauso, and Daniel Prieur. 2003a. “Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deep-sea hydrothermal vents.” Research in microbiology 154 (4): 303–7. doi:10.1016/S0923-2508(03)00075-5.

Geslin, C, M Le Romancer, G Erauso, M Gaillard, G Perrot, and D Prieur. 2003b. “PAV1, the first virus-like particle isolated from a hyperthermophilic euryarchaeote,‘Pyrococcus abyssi’.” Journal of bacteriology 185 (13): 3888–3894.

Geslin, Claire, Mélusine Gaillard, Didier Flament, Karen Rouault, Marc Le Romancer, Daniel Prieur, and Gael Erauso. 2007. “Analysis of the first genome of a hyperthermophilic marine virus-like particle, PAV1, isolated from Pyrococcus abyssi.” Journal of bacteriology 189 (12): 4510–4519.

Gorlas, Aurore, and Claire Geslin. 2013. “A simple procedure to determine the infectivity and host range of viruses infecting anaerobic and hyperthermophilic microorganisms.” Extremophiles: 1–7.

Gorlas, Aurore, Eugene V Koonin, Nadège Bienvenu, Daniel Prieur, and Claire Geslin. 2012. “TPV1, the first virus isolated from the hyperthermophilic genus Thermococcus.” Environmental Microbiology 14 (2): 503–516.

Gottesman, M, and A Oppenheim. 1994. “Lysogeny and prophage.” Encyclopedia of virology. Academic Press, London: 814–823.

Gupta, Radhey S, and Vaibhav Bhandari. 2011. “Phylogeny and molecular signatures for the phylum Thermotogae and its subgroups.” Antonie Van Leeuwenhoek 100 (1): 1–34.

Guy, Lionel, Jens Roat Kultima, and Siv GE Andersson. 2010. “genoPlotR: comparative gene and genome visualization in R.” Bioinformatics 26 (18): 2334–2335.

H

Hammes, Frederik, Felix Goldschmidt, Marius Vital, Yingying Wang, and Thomas Egli. 2010. “Measurement and interpretation of microbial adenosine tri-phosphate (ATP) in aquatic environments.” Water Research 44 (13): 3915–3923.

Hania, Wajdi Ben, Anne Postec, Thomas Aüllo, Anthony Ranchou-Peyruse, Gaël Erauso, Céline Brochier-Armanet, Moktar Hamdi, et al. 2013. “Mesotoga infera sp. nov., a mesophilic member of the order Thermotogales, isolated from an underground gas storage aquifer.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 63 (Pt 8): 3003–3008.

Haouari, Olfa, Marie-Laure Fardeau, Jean-Luc Cayol, Guy Fauque, Corinne Casiot, Françoise Elbaz-Poulichet, Moktar Hamdi, and Bernard Ollivier. 2008. “Thermodesulfovibrio hydrogeniphilus sp. nov., a new thermophilic sulphate-reducing bacterium isolated from a Tunisian hot spring.” Systematic and applied microbiology 31 (1): 38–42. doi:10.1016/j.syapm.2007.12.002.

Häring, Monika, Xu Peng, Kim Brügger, Reinhard Rachel, Karl O Stetter, Roger A Garrett, and David 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.

Häring, Monika, Reinhard Rachel, Xu Peng, Roger A Garrett, and David Prangishvili. 2005. “Viral diversity in hot springs of Pozzuoli, Italy, and characterization of a unique archaeal virus, Acidianus bottle-shaped virus, from a new family, the Ampullaviridae.” Journal of virology 79 (15): 9904–9911.

Harriott, Olivia T, Robert Huber, Karl O Stetter, Paul W Betts, and Kenneth M Noll. 1994. “A cryptic miniplasmid from the hyperthermophilic bacterium Thermotoga sp. strain RQ7.” Journal of bacteriology 176 (9): 2759–2762.

Hashemolhosseini, Said, Dirk Montag, Lisa Krämer, and Ulf Henning. 1994. “Determinants of receptor specificity of coliphages of the T4 family: a chaperone alters the host range.” Journal of molecular biology 241 (4): 524–533.

Hatfull, Graham F. 2008. “Bacteriophage genomics.” Current opinion in microbiology 11 (5): 447–453.

Hendrix, Roger W. 2002. “Bacteriophages: evolution of the majority.” Theoretical population biology 61 (4): 471–480.

d’Herelle, Felix. 1917. “Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.” CR Acad. Sci. Paris 165: 373–375.

Horikoshi, K, G Antranikian, AT Bull, FT Robb, and KO Stetter. 2011. “Extremophiles Handbook.”

Horvath, Philippe, and Rodolphe Barrangou. 2010. “CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.” Science 327 (5962): 167–170.

Huber, Robert, Carl R Woese, Thomas A Langworthy, Jakob K Kristjansson, and Karl O Stetter. 1990. “Fervidobacterium islandicum sp. nov., a new extremely thermophilic eubacterium belonging to the ‘Thermotogales’.” Archives of Microbiology 154 (2): 105–111.

Humphrey, Sam B, Thad B Stanton, Neil S Jensen, and Richard L Zuerner. 1997. “Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of Serpulina hyodysenteriae.” Journal of bacteriology 179 (2): 323–329.

Hurst, Christon J. 2000. Viral ecology. Academic press.

I-J

Iyer, Lakshminarayan M, L Aravind, and Eugene V Koonin. 2001. “Common origin of four diverse families of large eukaryotic DNA viruses.” Journal of Virology 75 (23): 11720–11734.

Jiang, Sunny C, and John H Paul. 1998. “Gene transfer by transduction in the marine environment.” Applied and Environmental Microbiology 64 (8): 2780–2787.

Juhala, Robert J, Michael E Ford, Robert L Duda, Anthony Youlton, Graham F Hatfull, and Roger W Hendrix. 2000. “Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages.” Journal of molecular biology 299 (1): 27–51.

Juniper, Kim S, David F Bird, Melanie Summit, Maria Pong Vong, and Edward T Baker. 1998. “Bacterial and viral abundances in hydrothermal event plumes over northern Gorda Ridge.” Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography 45 (12): 2739–2749.

K

Kelley, Deborah S, John A Baross, and John R Delaney. 2002. “Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers.” Annual Review of Earth and Planetary Sciences 30 (1): 385–491.

Koonin, Eugene V, Tatiana G Senkevich, Valerian V Dolja, and others. 2006. “The ancient Virus World and evolution of cells.” Biol Direct 1 (1): 29.

Kristjánsson, Jakob K, Sigridur Hjörleifsdóttir, Viggó Th Marteinsson, and Gudni A Alfredsson. 1994. “ Thermus scotoductus, sp. nov., a Pigment-Producing Thermophilic Bacterium from Hot Tap Water in Iceland and Including Thermus sp. X-1.” Systematic and applied microbiology 17 (1): 44–50.

Kruger, DH, Peter Schneck, and HR Gelderblom. 2000. “Helmut Ruska and the visualisation of viruses.” The Lancet 355 (9216): 1713–1717.

Krupovic, Mart, and Virginija Cvirkaite-Krupovic. 2011. “Sputnik and Mavirus: not more than satellite viruses.” Nature Reviews Microbiology 10 (1): 78–78.

Krupovic, Mart, David Prangishvili, Roger W Hendrix, and Dennis H Bamford. 2011. “Genomics of bacterial and archaeal viruses: dynamics within the prokaryotic virosphere.” Microbiology and Molecular Biology Reviews 75 (4): 610–635.

Kuwabara, Tomohiko, Akitomo Kawasaki, Ikuko Uda, and Akihiko Sugai. 2011. “Thermosipho globiformans sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium that transforms into multicellular spheroids with a defect in peptidoglycan formation.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 61 (7): 1622–1627.

L

L’Haridon, S, A-L Reysenbach, A Banta, P Messner, P Schumann, E Stackebrandt, and C Jeanthon. 2003. “Methanocaldococcus indicus sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from the Central Indian Ridge.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 53 (6): 1931–1935.

Lang, Andrew S, and J Thomas Beatty. 2007. “Importance of widespread gene transfer agent genes in α-proteobacteria.” Trends in microbiology 15 (2): 54–62.

Lang, Andrew S, Matthew L Rise, Alexander I Culley, and Grieg F Steward. 2009. “RNA viruses in the sea.” FEMS microbiology reviews 33 (2): 295–323.

Lang, Andrew S, Olga Zhaxybayeva, and J Thomas Beatty. 2012. “Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange.” Nature Reviews Microbiology 10 (7): 472–482.

Legendre, Matthieu, Defne Arslan, Chantal Abergel, and Jean-Michel Claverie. 2012. “Genomics of megavirus and the elusive fourth domain of life.” Communicative & integrative biology 5 (1): 102–106.

Lin, Lianbing, Jian Han, Xiuling Ji, Wei Hong, Li Huang, and Yunlin Wei. 2011. “Isolation and characterization of a new bacteriophage MMP17 from Meiothermus.” Extremophiles 15 (2): 253–258.

Lin, Lianbing, Wei Hong, Xiuling Ji, Jian Han, Li Huang, and Yunlin Wei. 2010. “Isolation and characterization of an extremely long tail Thermus bacteriophage from Tengchong hot springs in China.” Journal of Basic Microbiology 50 (5): 452–456.

Liu, Bin, Suijie Wu, Qing Song, Xiaobo Zhang, and Lianhui Xie. 2006. “Two novel bacteriophages of thermophilic bacteria isolated from deep-sea hydrothermal fields.” Current microbiology 53 (2): 163–166.

Liu, Bin, Suijie Wu, and Lianhui Xie. 2010. “Complete genome sequence and proteomic analysis of a thermophilic bacteriophage BV1.” Acta Oceanologica Sinica 29 (3): 84–89.

Liu, Bin, and Xiaobo Zhang. 2008. “Deep-sea thermophilic Geobacillus bacteriophage GVE2 transcriptional profile and proteomic characterization of virions.” Applied microbiology and biotechnology 80 (4): 697–707.

Liu, Bin, Fengfeng Zhou, Suijie Wu, Ying Xu, and Xiaobo Zhang. 2009. “Genomic and proteomic characterization of a thermophilic Geobacillus bacteriophage GBSV1.” Research in microbiology 160 (2): 166–171.

Liu, Tao, Sara K Renberg, and Elisabeth Haggård-Ljungquist. 1997. “Derepression of prophage P2 by satellite phage P4: cloning of the P4 epsilon gene and identification of its product.” Journal of virology 71 (6): 4502–4508.

Lucas, Susan, James Han, Alla Lapidus, Jan-Fang Cheng, Lynne A Goodwin, Sam Pitluck, Lin Peters, et al. 2012. “Complete Genome Sequence of the Thermophilic, Piezophilic, Heterotrophic Bacterium Marinitoga piezophila KA3.” Journal of bacteriology 194 (21): 5974–5975.

Luria, Salvador E, and Thomas F Anderson. 1942. “The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 28 (4): 127.

Lwoff, Andre. 1957. “The concept of virus.” Journal of General Microbiology 17 (2): 239–253.

M

Maaty, Walid SA, Alice C Ortmann, Mensur Dlaki’c, Katie Schulstad, Jonathan K Hilmer, Lars Liepold, Blake Weidenheft, et al. 2006. “Characterization of the archaeal thermophile Sulfolobus turreted icosahedral virus validates an evolutionary link among double-stranded DNA viruses from all domains of life.” Journal of virology 80 (15): 7625–7635.

MacLeod, NH, EW Chappelle, and AM Crawford. 1969. “ATP assay of terrestrial soils: a test of an exobiological experiment.” Nature 223: 267–268.

Makarova, Kira S, Yuri I Wolf, and Eugene V Koonin. 2009. “Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes.” Biology Direct 4 (1): 19.

Manning, Andrew, and Meta Kuehn. 2011. “Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense.” BMC microbiology 11 (1): 258.

Marguet, Evelyne, Marie Gaudin, Emilie Gauliard, Isabelle Fourquaux, Stephane Le Blond Du Plouy, Ikuo Matsui, Patrick Forterre, and others. 2013. “Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic archaea of the genus Thermococcus.” Biochem Soc Trans 41: 436–442.

Marie, Dominique, Corina PD Brussaard, Runar Thyrhaug, Gunnar Bratbak, and Daniel Vaulot. 1999. “Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry.” Applied and Environmental Microbiology 65 (1): 45–52.

Marraffini, Luciano A, and Erik J Sontheimer. 2010. “CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea.” Nature Reviews Genetics 11 (3): 181–190.

Marrs, Barry. 1974. “Genetic recombination in Rhodopseudomonas capsulata.” Proceedings of the National Academy of Sciences 71 (3): 971–973.

Martin, Andrea, Siobhan Yeats, Davorin Janekovic, Wolf-Dieter Reiter, Wilhelm Aicher, and Wolfram Zillig. 1984. “SAV 1, a temperate uv-inducible DNA virus-like particle from the archaebacterium Sulfolobus acidocaldarius isolate B12.” The EMBO journal 3 (9): 2165.

Martin, William, John Baross, Deborah Kelley, and Michael J Russell. 2008. “Hydrothermal vents and the origin of life.” Nature Reviews Microbiology 6 (11): 805–814.

Matson, Eric G, M Greg Thompson, Samuel B Humphrey, Richard L Zuerner, and Thad B Stanton. 2005. “Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of Brachyspira hyodysenteriae.” Journal of bacteriology 187 (17): 5885–5892.

Matsushita, Isao, and Hideshi Yanase. 2009. “The genomic structure of Thermus bacteriophage IN93.” Journal of biochemistry 146 (6): 775–785.

McCliment, Elizabeth A, Kenneth M Voglesonger, Peggy A O’Day, Eileen E Dunn, John R Holloway, and S Craig Cary. 2006. “Colonization of nascent, deep-sea hydrothermal vents by a novel Archaeal and Nanoarchaeal assemblage.” Environmental microbiology 8 (1): 114–125.

McDaniel, Lauren D, Elizabeth Young, Jennifer Delaney, Fabian Ruhnau, Kim B Ritchie, and John H Paul. 2010. “High frequency of horizontal gene transfer in the oceans.” Science 330 (6000): 50–50.

Meile, Leo, Urs Jenal, Daniel Studer, Martin Jordan, and Thomas Leisinger. 1989. “Characterization of ΨM1, a virulent phage of Methanobacterium thermoautotrophicum Marburg.” Archives of microbiology 152 (2): 105–110.

Minakhin, Leonid, Manisha Goel, Zhanna Berdygulova, Erlan Ramanculov, Laurence Florens, Galina Glazko, Valeri N Karamychev, et al. 2008. “Genome Comparison and Proteomic Characterization of Thermus thermophilus Bacteriophages P23-45 and P74-26: Siphoviruses with Triplex-forming Sequences and the Longest Known Tails.” Journal of molecular biology 378 (2): 468–480.

Miroshnichenko, Margarita L, and Elizaveta A Bonch-Osmolovskaya. 2006. “Recent developments in the thermophilic microbiology of deep-sea hydrothermal vents.” Extremophiles 10 (2): 85–96.

Mochizuki, Tomohiro, Mart Krupovic, Gérard Pehau-Arnaudet, Yoshihiko Sako, Patrick Forterre, and David Prangishvili. 2012. “Archaeal virus with exceptional virion architecture and the largest single-stranded DNA genome.” Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (33): 13386–13391.

Mochizuki, Tomohiro, Takashi Yoshida, Reiji Tanaka, Patrick Forterre, Yoshihiko Sako, and David Prangishvili. 2010. “Diversity of viruses of the hyperthermophilic archaeal genus Aeropyrum, and isolation of the Aeropyrum pernix bacilliform virus 1, APBV1, the first representative of the family Clavaviridae.” Virology 402 (2): 347–354.

Morange, Michel. 2013. Histoire de la biologie moléculaire. La Découverte.

Moreira, David, and Purificación López-Garcia. 2009. “Ten reasons to exclude viruses from the tree of life.” Nature Reviews Microbiology 7 (4): 306–311.

Morris, Robert M, Michael S Rappé, Stephanie A Connon, Kevin L Vergin, William A Siebold, Craig A Carlson, and Stephen J Giovannoni. 2002. “SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities.” Nature 420 (6917): 806–810.

N

Nakagawa, Satoshi, Ken Takai, Koki Horikoshi, and Yoshihiko Sako. 2003. “Persephonella hydrogeniphila sp. nov., a novel thermophilic, hydrogen-oxidizing bacterium from a deep-sea hydrothermal vent chimney.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 53 (3): 863–869.

Naryshkina, Tatyana, Jing Liu, Laurence Florens, Selene K Swanson, Andrey R Pavlov, Nadejda V Pavlova, Ross Inman, et al. 2006. “Thermus thermophilus Bacteriophage ϕYS40 Genome and Proteomic Characterization of Virions.” Journal of molecular biology 364 (4): 667–677.

Nazina, Tamara N, Elena V Lebedeva, Andrei B Poltaraus, Tatyana P Tourova, Alexandre A Grigoryan, Diyana Sh Sokolova, Anatoliy M Lysenko, and George A Osipov. 2004. “Geobacillus gargensis sp. nov., a novel thermophile from a hot spring, and the reclassification of Bacillus vulcani as Geobacillus vulcani comb. nov.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 54 (6): 2019–2024.

Nelson, Karen E, Rebecca A Clayton, Steven R Gill, Michelle L Gwinn, Robert J Dodson, Daniel H Haft, Erin K Hickey, et al. 1999. “Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of Thermotoga maritima.” Nature 399 (6734): 323–329.

Nercessian, Olivier, Anna-Louise Reysenbach, Daniel Prieur, and Christian Jeanthon. 2003. “Archaeal diversity associated with in situ samplers deployed on hydrothermal vents on the East Pacific Rise (13 N).” Environmental microbiology 5 (6): 492–502.

Nesbø, Camilla L, Danielle M Bradnan, Abigail Adebusuyi, Marlena Dlutek, Amanda K Petrus, Julia Foght, W Ford Doolittle, and Kenneth M Noll. 2012. “Mesotoga prima gen. nov., sp. nov., the first described mesophilic species of the Thermotogales.” Extremophiles 16 (3): 387–393.

Noble, Rachel T, and Jed A Fuhrman. 1998. “Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria.” Aquatic Microbial Ecology 14 (2): 113–118.

Nunoura, Takuro, Hanako Oida, Masayuki Miyazaki, Yohey Suzuki, Ken Takai, and Koki Horikoshi. 2007. “Marinitoga okinawensis sp. nov., a novel thermophilic and anaerobic heterotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field, Southern Okinawa Trough.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 57 (3): 467–471.

O-P

Ortmann, Alice C, and Curtis A Suttle. 2005. “High abundances of viruses in a deep-sea hydrothermal vent system indicates viral mediated microbial mortality.” Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 52 (8): 1515–1527.

Patel, Anand, Rachel T Noble, Joshua A Steele, Michael S Schwalbach, Ian Hewson, and Jed A Fuhrman. 2007. “Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I.” Nature protocols 2 (2): 269–276.

Paul, John H. 2008. “Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas?” The ISME Journal 2 (6): 579–589.

Paul, John H, and Markus Weinbauer. 2010. “Detection of lysogeny in marine environments.” Manual of aquatic viral ecology. ASLO: 30–33.

Pechman, Kenneth J, and Carl R Woese. 1972. “Characterization of the primary structural homology between the 16 S ribosomal RNAs ofEscherichia coli andBacillus megaterium by oligomer cataloging.” Journal of molecular evolution 1 (3): 230–240.

Pederson, Dennis M, Liam C Welsh, Donald A Marvin, Matthew Sampson, Richard N Perham, Maoxiao Yu, and Michael R Slater. 2001. “The protein capsid of filamentous bacteriophage PH75 from Thermus thermophilus.” Journal of molecular biology 309 (2): 401–421.

Pedulla, Marisa L, Michael E Ford, Jennifer M Houtz, Tharun Karthikeyan, Curtis Wadsworth, John A Lewis, Debbie Jacobs-Sera, et al. 2003. “Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes.” Cell 113 (2): 171–182.

Perevalova, Anna A, Salima Kh Bidzhieva, Ilya V Kublanov, Kai-Uwe Hinrichs, Xiaolei L Liu, Andrey V Mardanov, Alexander V Lebedinsky, and Elizaveta A Bonch-Osmolovskaya. 2010. “Fervidicoccus fontis gen. nov., sp. nov., an anaerobic, thermophilic crenarchaeote from terrestrial hot springs, and proposal of Fervidicoccaceae fam. nov. and Fervidicoccales ord. nov.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 60 (9): 2082–2088.

Petrus, Amanda K, Kristen S Swithers, Chaman Ranjit, Si Wu, Heather M Brewer, J Peter Gogarten, Ljiljana Pasa-Tolic, and Kenneth M Noll. 2012. “Genes for the major structural components of Thermotogales species’ togas revealed by proteomic and evolutionary analyses of OmpA and OmpB homologs.” PloS one 7 (6): e40236.

Pfeifer, Felicitas. 2005. “Wolfram Zillig (1925-2005).” Extremophiles 9 (5): 343–344.

Pfister, Peter, Alain Wasserfallen, Rolf Stettler, and Thomas Leisinger. 1998. “Molecular analysis of Methanobacterium phage ΨM2.” Molecular microbiology 30 (2): 233–244.

Philippe, Nadège, Matthieu Legendre, Gabriel Doutre, Yohann Couté, Olivier Poirot, Magali Lescot, Defne Arslan, et al. 2013. “Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes.” Science 341 (6143): 281–286.

Pina, Mery, Ariane Bize, Patrick Forterre, and David Prangishvili. 2011. “The archeoviruses.” FEMS microbiology reviews 35 (6): 1035–1054.

Podosokorskaya, Olga A, Ilya V Kublanov, A-L Reysenbach, Tatyana V Kolganova, and Elizaveta A Bonch-Osmolovskaya. 2011. “Thermosipho affectus sp. nov., a thermophilic, anaerobic, cellulolytic bacterium isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 61 (5): 1160–1164.

Poranen, Minna M, Rimantas Daugelavicius, and Dennis H Bamford. 2002. “Common principles in viral entry.” Annual Reviews in Microbiology 56 (1): 521–538.

Postec, Anne, Claire Le Breton, Marie-Laure Fardeau, Françoise Lesongeur, Patricia Pignet, Joël Querellou, Bernard Ollivier, and Anne Godfroy. 2005. “Marinitoga hydrogenitolerans sp. nov., a novel member of the order Thermotogales isolated from a black smoker chimney on the Mid-Atlantic Ridge.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 55 (3): 1217–1221.

Prangishvili, David. 2007. “Editorial: the 90th anniversary of ‘bacteriophage’.” Research in Microbiology 158 (7): 551–552.

Prangishvili, David, Hans Peter Arnold, Dorothee Götz, Ulrike Ziese, Ingelore Holz, Jakob K Kristjansson, and Wolfram 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, David, and Roger A Garrett. 2005. “Viruses of hyperthermophilic Crenarchaea.” Trends in microbiology 13 (11): 535–542.

Prangishvili, David, and Tessa EF Quax. 2011. “Exceptional virion release mechanism: one more surprise from archaeal viruses.” Current opinion in microbiology 14 (3): 315–320.

Prangishvili, David, and Mart Krupovic. 2012. “A new proposed taxon for double-stranded DNA viruses, the order ‘Ligamenvirales’.” Archives of virology 157 (4): 791–795.

Prangishvili, David, Gisle Vestergaard, Monika Häring, Ricardo Aramayo, Tamara Basta, Reinhard Rachel, and Roger A Garrett. 2006. “Structural and genomic properties of the hyperthermophilic archaeal virus ATV with an extracellular stage of the reproductive cycle.” Journal of molecular biology 359 (5): 1203–1216.

Pridmore, RD, AB Cooper, and JE Hewitt. 1984. “ATP as a biomass indicator in eight North Island Lakes, New Zealand.” Freshwater Biology 14 (1): 73–78.

Prieur, D, G Erauso, C Geslin, S Lucas, M Gaillard, A Bidault, AC Mattenet, et al. 2004. “Genetic elements of Thermococcales.” Biochemical Society Transactions 32 (2): 184–187.

Prieur, Daniel. 1997. “Microbiology of deep-sea hydrothermal vents.” Trends in Biotechnology 15 (7): 242–244.

Prokofeva, Maria I, Nadezhda A Kostrikina, Tatyana V Kolganova, Tatyana P Tourova, Anatoly M Lysenko, Alexander V Lebedinsky, and Elizaveta A Bonch-Osmolovskaya. 2009. “Isolation of the anaerobic thermoacidophilic crenarchaeote Acidilobus saccharovorans sp. nov. and proposal of Acidilobales ord. nov., including Acidilobaceae fam. nov. and Caldisphaeraceae fam. nov.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 59 (12): 3116–3122.

Proux, Caroline, Douwe van Sinderen, Juan Suarez, Pilar Garcia, Victor Ladero, Gerald F Fitzgerald, Frank Desiere, and Harald Brüssow. 2002. “The dilemma of phage taxonomy illustrated by comparative genomics of Sfi21-like Siphoviridae in lactic acid bacteria.” Journal of bacteriology 184 (21): 6026–6036.

Quax, Tessa EF, Soizick Lucas, Julia Reimann, Gerard Pehau-Arnaudet, Marie-Christine Prevost, Patrick Forterre, Sonja-Verena Albers, and David Prangishvili. 2011. “Simple and elegant design of a virion egress structure in Archaea.” Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (8): 3354–3359.

Rao, Venigalla B, and Michael Feiss. 2008. “The bacteriophage DNA packaging motor.” Annual review of genetics 42: 647–681.

Raoult, Didier, and Patrick Forterre. 2008. “Redefining viruses: lessons from Mimivirus.” Nature Reviews Microbiology 6 (4): 315–319.

Raoult, Didier, Bernard La Scola, and Richard Birtles. 2007. “The discovery and characterization of Mimivirus, the largest known virus and putative pneumonia agent.” Clinical infectious diseases 45 (1): 95–102.

Raposo, Graça, and Willem Stoorvogel. 2013. “Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends.” The Journal of cell biology 200 (4): 373–383.

Rapp, Barbara J, and Judy D Wall. 1987. “Genetic transfer in Desulfovibrio desulfuricans.” Proceedings of the National Academy of Sciences 84 (24): 9128–9130.

Redder, Peter, Xu Peng, Kim Brügger, Shiraz A Shah, Ferdinand Roesch, Bo Greve, Qunxin She, et al. 2009. “Four newly isolated fuselloviruses from extreme geothermal environments reveal unusual morphologies and a possible interviral recombination mechanism.” Environmental microbiology 11 (11): 2849–2862.

Reich, E, AJ Shatkin, and EL Tatum. 1961. “Bacteriocidal action of mitomycin C.” Biochimica et biophysica acta 53 (1): 132–149.

Renaut, Robin W, and Brian Jones. “Hydrothermal Environments, Terrestrial.”

Reysenbach, Anna-Louise, Dorothee Gotz, and Dinesh Yernool. 2002. “Microbial diversity of marine and terrestrial thermal springs.” Biodiversity of microbial life: 345–421.

Reysenbach, Anna-Louise, Yitai Liu, Annie R Lindgren, Isaac D Wagner, Christine D Sislak, Anchelique Mets, and Stefan Schouten. 2013. “Mesoaciditoga lauensis gen. nov., sp. nov., a moderately thermoacidophilic member of the order Thermotogales from a deep-sea hydrothermal vent.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 63 (Pt 12): 4724–4729.

Richter, Corinna, James T Chang, and Peter C Fineran. 2012. “Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated (Cas) systems.” Viruses 4 (10): 2291–2311.

Richter, Hagen, Lennart Randau, and André Plagens. 2013. “Exploiting CRISPR/Cas: Interference mechanisms and applications.” International journal of molecular sciences 14 (7): 14518–14531.

Rohwer, Forest, and Rebecca Vega Thurber. 2009. “Viruses manipulate the marine environment.” Nature 459 (7244): 207–212.

Ronsin, Christophe. 2005. L’histoire de la biologie moléculaire: pionniers \& héros. De Boeck.

Sanger, F, AR Coulson, T Friedmann, GM Air, BG Barrell, NL Brown, JC Fiddes, CA Hutchison III, PM Slocombe, and M Smith. 1978. “The nucleotide sequence of bacteriophage φX174.” Journal of molecular biology 125 (2): 225–246.

Sanger, F, Ar R Coulson, GF Hong, DF Hill, and GB d Petersen. 1982. “Nucleotide sequence of bacteriophage λ DNA.” Journal of molecular biology 162 (4): 729–773.

Satyanarayana, Tulasi, Jennifer Littlechild, and Yutaka Kawarabayasi. 2013. Diversity of hot environments and thermophilic microbes. In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. Springer.

la Scola, Bernard, Stéphane Audic, Catherine Robert, Liang Jungang, Xavier de Lamballerie, Michel Drancourt, Richard Birtles, Jean-Michel Claverie, and Didier Raoult. 2003. “A giant virus in amoebae.” Science 299 (5615): 2033–2033.

la Scola, Bernard, Christelle Desnues, Isabelle Pagnier, Catherine Robert, Lina Barrassi, Ghislain Fournous, Michele Merchat, et al. 2008. “The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus.” Nature 455 (7209): 100–104.

Segerer, Andreas, Annemarie Neuner, Jakob K Kristjansson, and Karl O Stetter. 1986. “Acidianus infernus gen. nov., sp. nov., and Acidianus brierleyi comb. nov.: facultatively aerobic, extremely acidophilic thermophilic sulfur-metabolizing archaebacteria.” International Journal of Systematic Bacteriology 36 (4): 559–564.

Shelford, Emma J, Mathias Middelboe, Eva F Møller, and Curtis A Suttle. 2012. “Virus-driven nitrogen cycling enhances phytoplankton growth.” Aquatic Microbial Ecology 66 (1): 41–46.

Sime-Ngando, Telesphore, and Jonathan Colombet. 2009. “Virus et prophages dans les écosystèmes aquatiques.” Canadian Journal of Microbiology 55 (2): 95–109.

Snyder, Jamie C, Susan K Brumfield, Keshia M Kerchner, Tessa EF Quax, David Prangishvili, and Mark J Young. 2013. “Insights into a viral lytic pathway from an archaeal virus-host system.” Journal of virology 87 (4): 2186–2192.

Soler, Nicolas, Marie Gaudin, Evelyne Marguet, Patrick Forterre, and others. 2011. “Plasmids, viruses and virus-like membrane vesicles from Thermococcales.” Biochemical Society Transactions 39 (1): 36.

Soler, Nicolas, Evelyne Marguet, Jean-Marc Verbavatz, and Patrick Forterre. 2008. “Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order Thermococcales.” Research in microbiology 159 (5): 390–399.

Stanton, Thad B. 2007. “Prophage-like gene transfer agents—Novel mechanisms of gene exchange for Methanococcus, Desulfovibrio, Brachyspira, and Rhodobacter species.” Anaerobe 13 (2): 43–49.

Stent, Gunther S. 2000. “A picaresque genius.”

Suttle, Curtis A. 2005. “Viruses in the sea.” Nature 437 (7057): 356–361.

Suttle, Curtis A. 2007. “Marine viruses—major players in the global ecosystem.” Nature Reviews Microbiology 5 (10): 801–812.

Suttle, Curtis A, and Jed A Fuhrman. 2010. “Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy.” Manual of Aquatic Viral Ecology. ASLO: 145–153.

T

Takai, Ken, and Koki Horikoshi. 2000. “Thermosipho japonicus sp. nov., an extremely thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent in Japan.” Extremophiles 4 (1): 9–17.

Takai, Ken, Satoshi Nakagawa, A-L Reysenbach, and Joost Hoek. 2006. “Microbial ecology of mid-ocean ridges and back-arc basins.” Geophysical Monograph Series 166: 185–213.

Tamakoshi, Masatada, Aya Murakami, Motoki Sugisawa, Kenji Tsuneizumi, Shigeki Takeda, Toshihiko Saheki, Takashi Izumi, et al. 2011. “Genomic and proteomic characterization of the large Myoviridae bacteriophage ΦTMA of the extreme thermophile Thermus thermophilus.” Bacteriophage 1 (3): 152–164.

Tashiro, Yosuke, Hiroo Uchiyama, and Nobuhiko Nomura. 2012. “Multifunctional membrane vesicles in Pseudomonas aeruginosa.” Environmental Microbiology 14 (6): 1349–1362.

Thingstad, T Frede. 2000. “Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems.” Limnology and Oceanography 45 (6): 1320–1328.

Thingstad, TF, and R Lignell. 1997. “Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand.” Aquatic Microbial Ecology 13 (1): 19–27.

Tomasz, Maria. 1995. “Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective).” Chemistry \& biology 2 (9): 575–579.

Torsvik, Terje, and Ian D Dundas. 1974. “Bacteriophage of Halobacterium salinarium.” Nature 248: 680–681.

Tsuboi, Masamichi, James M Benevides, Priya Bondre, and George J Thomas. 2005. “Structural details of the thermophilic filamentous bacteriophage PH75 determined by polarized Raman microspectroscopy.” Biochemistry 44 (12): 4861–4869.

Tsubota, Jun, Bulat Ts Eshinimaev, Valentina N Khmelenina, and Yuri A Trotsenko. 2005. “Methylothermus thermalis gen. nov., sp. nov., a novel moderately thermophilic obligate methanotroph from a hot spring in Japan.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 55 (5): 1877–1884.

Twort, Frederick William. 1915. “An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses.” The Lancet 186 (4814): 1241–1243.

U-V

Uldahl, Kristine, and Xu Peng. 2013. Biology, Biodiversity and Application of Thermophilic Viruses. In Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology, 271–304. Springer.

Urios, Laurent, Valérie Cueff-Gauchard, Patricia Pignet, Anne Postec, Marie-Laure Fardeau, Bernard Ollivier, and Georges Barbier. 2004. “Thermosipho atlanticus sp. nov., a novel member of the Thermotogales isolated from a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 54 (6): 1953–1957.

Velimirov, Branko, and Sylvia Hagemann. 2011. “Mobilizable bacterial DNA packaged into membrane vesicles induces serial transduction.” Mobile genetic elements 1 (1): 80–81.

Vésteinsdóttir, Hildur, Dagn\`y B Reynisdóttir, and Jóhann Örlygsson. 2011. “Hydrogenophilus islandicus sp. nov., a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium isolated from an Icelandic hot spring.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 61 (2): 290–294.

Vestergaard, Gisle, Monika Häring, Xu Peng, Reinhard Rachel, Roger A Garrett, and David Prangishvili. 2005. “A novel rudivirus, ARV1, of the hyperthermophilic archaeal genus Acidianus.” Virology 336 (1): 83–92.

Vestergaard, Gisle, Shiraz A Shah, Ariane Bize, Werner Reitberger, Monika Reuter, Hien Phan, Ariane Briegel, Reinhard Rachel, Roger A Garrett, and David Prangishvili. 2008. “Stygiolobus rod-shaped virus and the interplay of crenarchaeal rudiviruses with the CRISPR antiviral system.” Journal of bacteriology 190 (20): 6837–6845.

Völkl, P, Robert Huber, Elisabeth Drobner, Reinhard Rachel, Siegfried Burggraf, Antonio Trincone, and Karl Otto Stetter. 1993. “Pyrobaculum aerophilum sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum.” Applied and Environmental Microbiology 59 (9): 2918–2926.

W

Wagner, Isaac D, Weidong Zhao, Chuanlun L Zhang, Christopher S Romanek, Manfred Rohde, and Juergen Wiegel. 2008. “Thermoanaerobacter uzonensis sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a hot spring within the Uzon Caldera, Kamchatka, Far East Russia.” International journal of systematic and evolutionary microbiology 58 (11): 2565–2573.

Waldor, Matthew K, and John J Mekalanos. 1996. “Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin.” Science 272 (5270): 1910–1914.

Wang, Yiqian, and Xiaobo Zhang. 2008. “Characterization of a novel portal protein from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2.” Gene 421 (1): 61–66.

Wang, Yiqian, and Xiaobo Zhang. 2010. “Genome analysis of deep-sea thermophilic phage D6E.” Applied and environmental microbiology 76 (23): 7861–7866.

Weinbauer, Markus G. 2004. “Ecology of prokaryotic viruses.” FEMS microbiology reviews 28 (2): 127–181.

Weinbauer, Markus G, and Fereidoun Rassoulzadegan. 2004. “Are viruses driving microbial diversification and diversity?” Environmental Microbiology 6 (1): 1–11.

Wery, Nathalie, Francoise Lesongeur, Patricia Pignet, Veronique Derennes, Marie-Anne Cambon-Bonavita, Anne Godfroy, and Georges Barbier. 2001. “Marinitoga camini gen. nov., sp. nov., a rod-

shaped bacterium belonging to the order Thermotogales, isolated from a deep-sea hydrothermal vent." International journal of systematic and evolutionary microbiology 51 (2): 495–504.

Wilhelm, Steven W, and Curtis A Suttle. 1999. "Viruses and nutrient cycles in the sea viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs." Bioscience 49 (10): 781–788.

Williamson, Shannon J, S Craig Cary, Kurt E Williamson, Rebekah R Helton, Shellie R Bench, Danielle Winget, and K Eric Wommack. 2008. "Lysogenic virus-host interactions predominate at deep-sea diffuse-flow hydrothermal vents." The ISME journal 2 (11): 1112–1121.

Woese, Carl R, Otto Kandler, and Mark L Wheelis. 1990. "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." Proceedings of the National Academy of Sciences 87 (12): 4576–4579.

Wommack, K Eric, and Rita R Colwell. 2000. "Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems." Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 (1): 69–114.

Wommack, K Eric, Shannon J Williamson, Arthur Sundbergh, Rebekah R Helton, Brian T Glazer, Kevin Portune, and S Craig Cary. 2004. "An instrument for collecting discrete large-volume water samples suitable for ecological studies of microorganisms." Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers 51 (11): 1781–1792.

Y

Yaron, Sima, Glynis L Kolling, Lee Simon, and Karl R Matthews. 2000. "Vesicle-Mediated Transfer of Virulence Genes fromEscherichia coli O157: H7 to Other Enteric Bacteria." Applied and environmental microbiology 66 (10): 4414–4420.

Yasmin, Azra, John G Kenny, Jayendra Shankar, Alistair C Darby, Neil Hall, Clive Edwards, and Malcolm J Horsburgh. 2010. "Comparative genomics and transduction potential of Enterococcus faecalis temperate bacteriophages." Journal of bacteriology 192 (4): 1122–1130.

Ye, Ting, and Xiaobo Zhang. 2008. "Characterization of a lysin from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2." Applied microbiology and biotechnology 78 (4): 635–641.

Yoshida-Takashima, Yukari, Takuro Nunoura, Hiromi Kazama, Takuroh Noguchi, Kazuhiro Inoue, Hironori Akashi, Toshiro Yamanaka, et al. 2012. "Spatial distribution of viruses associated with planktonic and attached microbial communities in hydrothermal environments." Applied and environmental microbiology 78 (5): 1311–1320.

Yoshida-Takashima, Yukari, Yoshihiro Takaki, Shigeru Shimamura, Takuro Nunoura, and Ken Takai. 2013. "Genome sequence of a novel deep-sea vent epsilonproteobacterial phage provides new insight into the co-evolution of Epsilonproteobacteria and their phages." Extremophiles: 1–15.

Youell, James, and Keith Firman. 2008. "EcoR124I: From plasmid-encoded restriction-modification system to nanodevice." Microbiology and molecular biology reviews 72 (2): 365–377.

Yu, MX, MR Slater, and H-W Ackermann. 2006. "Isolation and characterization of Thermus bacteriophages." Archives of virology 151 (4): 663–679.

Z

Zaitlin, Milton, SD Kung, and SF Yang. 1998. “The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease.” Discoveries in Plant Biology: 105–110.

Zhao, Yanlin, Ben Temperton, J Cameron Thrash, Michael S Schwalbach, Kevin L Vergin, Zachary C Landry, Mark Ellisman, Tom Deerinck, Matthew B Sullivan, and Stephen J Giovannoni. 2013. “Abundant SAR11 viruses in the ocean.” Nature 494 (7437): 357–360.

Zhaxybayeva, Olga, Kristen S Swithers, Julia Foght, Anna G Green, David Bruce, Chris Detter, Shunsheng Han, et al. 2012. “Genome Sequence of the Mesophilic Thermotogales Bacterium Mesotoga prima MesG1. Ag. 4.2 Reveals the Largest Thermotogales Genome To Date.” Genome biology and evolution 4 (8): 812–820.

Zhaxybayeva, Olga, Kristen S Swithers, Pascal Lapierre, Gregory P Fournier, Derek M Bickhart, Robert T DeBoy, Karen E Nelson, et al. 2009. “On the chimeric nature, thermophilic origin, and phylogenetic placement of the Thermotogales.” Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (14): 5865–5870.

ANNEXES

Annexe 1 : Annotation of MPV1 genome

			Blast Analyses
Maripi ID #	length (bp)	genome annoation	Best BlastP match in nr (outside the Thermotogales)
291	1 470	Site-specific recombinases, DNA invertase Pin homologs	WP 006569700 site-specific recombinase, DNA invertase Pin *Thermoanaerobacter siderophilus*
292	162	hypothetical protein	No match
293	372	hypothetical protein	YP 002728383 hypothetical protein SULAZ 0390 *Sulfurihydrogenibium azorense* Az-Fu1
294	966	Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase./STAS domain.	YP 004027214 ATP-binding region ATPase domain-containing protein Caldicellulo siruptor kristjanssonii 177R1B
295	1 800	T5orf172 domain.	YP 065302 hypothetical protein DP1566 Desulfotalea psychrophila LSv54]
296	1 557	Adenine specific DNA methylase Mod	WP 008474462 DNA methylase N-4/N-6 domain protein Nitrolancetus hollandicus
297	621	SOS-response transcriptional repressors (RecA-mediated autopeptidas	WP 006874092 hypothetical protein Anaerotruncus colihominis
298	210	Predicted transcriptional regulators	WP 008783175 DNA-binding protein Bifidobacterium sp. 12 1 47BFAA
299	450	hypothetical protein, contains possible packing site	No match
300	2 046	hypothetical protein	WP 003364581 recombinase RecF Clostridium botulinum
301	369	Recombinational DNA repair protein (RecE pathway)	WP 003407752 recombinase RecT Clostridium butyricum
302	729	Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily I	YP 003781312 phage-like hydrolase Clostridium ljungdahlii DSM 13528
303	768	phage conserved hypothetical protein, C-terminal domain	ADA79920 putative phage replication protein *Lactobacillus* phage phiPYB5
304	255	hypothetical protein	No match
305	1 275	Replicative DNA helicase	YP 001568017 replicative DNA helicase Petrotoga mobilis SJ95
306	468	single stranded DNA-binding protein (ssb)	WP 016288767 single-stranded DNA-binding protein Lachnospiraceae bacterium 3-1
307	420	deoxyuridine 5"-triphosphate nucleotidohydrolase (dut)	XP 005142568: deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase, mito chondrial Melopsittacus undulatus
308	201	hypothetical protein	No match
309	249	hypothetical protein	No match
310	366	Holliday junction resolvase	YP 003183942 endodeoxyribonuclease RusA Alicyclobacillus acidocaldarius subsp. acidocaldarius DSM 446
311	465	hypothetical protein	No match
312	273	hypothetical protein	No match
313	276	hypothetical protein	No match
314	231	hypothetical protein	No match
315	483	hypothetical protein	YP 005093729 sigma-70 family RNA polymerase sigma factor Marinitoga piezophila KA3 Marpi 2120 (Plasmid)
316	327	hypothetical protein	No match
317	1 029	putative zinc finger/helix-turn-helix protein, YgiT family	YP 003841324 helix-turn-helix domain-containing protein Caldicellulosiruptor obsidiansis OB47
318	75	tRNA Pro TGG	
319	381	hypothetical protein	WP 004096102 hypothetical protein Acetonema longum, Among Phi blast matches: WP 016077038.1 phage terminase small subunit Lactobacillus phage AQ113
320	1 248	phage terminase, large subunit, PBSX family	YP 002804814 phage terminase large subunit, pbsx family Clostridium botulinum A2 str. Kyoto
321	1 251	hypothetical protein	WP 021769687 hypothetical protein Leptotrichia sp. oral taxon 22 second hit : WP 006773947 phage portal protein Clostridium hathewayi
322	1 506	hypothetical protein	WP 003432484 hypothetical protein Clostridium butyricum, putative head morphogenesis protein
323	282	hypothetical protein	No match
324	603	hypothetical protein	No match
325	354	hypothetical protein	WP 017687985 hypothetical protein Paenibacillus sp. PAMC 26794
326	1 020	Phage major capsid protein E.	WP 004445976 capsid protein Clostridium botulinum
327	183	hypothetical protein	No match
328	321	hypothetical protein	YP 001320641 hypothetical protein Amet 2832 Alkaliphilus metalliredigens
329	474	hypothetical protein	WP 006306523 hypothetical protein Centipeda periodontii
330	387	hypothetical protein	No match
331	966	hypothetical protein	WP 002670872 hypothetical protein Treponema denticola
332	351	hypothetical protein	No match
333	498	hypothetical protein	No match
334	4 080	phage tail tape measure protein, TP901 family, core region	YP 001285821 putative tail tape measure protein Geobacillus virus E2
335	615	hypothetical protein	No match
336	339	hypothetical protein	No match
337	1 131	hypothetical protein	No match
338	4 011	hypothetical protein	WP 016610917 phage minor structural protein Enterococcus casseliflavus
339	162	hypothetical protein	No match
340	768	DNA repair exonuclease	WP 018671617 hypothetical protein Brevibacillus laterosporus
341	261	hypothetical protein	No match
342	378	hypothetical protein	No match
343	330	Phage holin protein (Holin LLH).	WP 016226830 LL-H family phage holin Lachnospiraceae bacterium 10-1
344	300	hypothetical protein	No match
345	564	Orthopoxvirus protein of unknown function (DUF830).	YP 002454578 hypothetical protein BCG9842 A0016 Bacillus cereus G9842

Annexe 2 : Annotation of pMP1 genome

			Blast Analyses
Maripi_ID #	length (bp)	genome annoation	Best BlastP match in nr
2120	480	Sigma-70,_region_4.	YP_005096064 hypothetical protein Marpi_0315 *Marinitoga piezophila* KA3 (Prophage)
2121	204	Transcriptional_Coactivator_p15_(PC4)	YP_008403878 hypothetical protein JCM7686_1010 *Paracoccus aminophilus* JCM 76
2122	750	Site-specific_recombinase_XerD	YP_001739834 integrase family protein *Thermotoga* sp. RQ2
2124	480	hypothetical_protein	No match
2125	330	hypothetical_protein	No match
2126	294	hypothetical_protein	No match
2127	2148	DNA_primase_(bacterial_type)	YP_004026647 DnaB domain-containing protein helicase domain-containing protein *Caldicell*
2128	1527	hypothetical_protein	No match
2129	198	hypothetical_protein	No match
2130	231	hypothetical_protein	No match
2131	603	Growth_inhibitor	YP_002335318 hypothetical protein THA_1536 *Thermosipho africanus* TCF52B
2132	522	hypothetical_protein	No match
2133	552	hypothetical_protein	YP_001410905 hypothetical protein Fnod_1402 *Fervidobacterium nodosum* Rt17-B1

Annexe 3a : Morphologie, classification taxonomique et caractéristiques des archéovirus hyper/thermophiles.

Morphology	Family/genus	Virus	Host	Temp. host (°C)	Genome size	Lytic	Isolation site	References
Bacilliform	*Clavaviridae*[a]	APBV1	*Aeropyrum*	90	5.2	–	Japan, coastal hot spring	Mochizuki et al. (2010)
Bottle	*Ampullaviridae*	ABV	*Acidianus*	75	24	–	Italy, acidic hot spring	Haring et al. (2005)
Droplet	*Guttaviridae*	SNDV	*Sulfolobus*	80	20		New Zealand	Arnold et al. (2000a)
Head-tail	*Siphoviridae*	ψM1	*Methanobacterium*	65	30.4	–	From culture	Meile et al. (1989)
		ψM2		65	26.1	–		Pfister et al. (1998)
Linear	*Lipothrixviridae*	AFV1	*Acidianus*	75	21	–	Yellowstone hot spring	Bettstetter et al. (2003)
		AFV2		75	31.7	–	Italy, acidic hot spring	Prangishvili et al. (2006)
		AFV3		75	40.4	–		Vestergaard et al. (2008a
		AFV6		75	39.5	–	Italy	
		AFV7		75	36.8	–		
		AFV8		75	38.1			
		AFV9		75	41.1		Russia, acidic hot spring	Bize et al. (2008)
		SIFV	*Sulfolobus*	80	40.8	–	Iceland, solfataric field	Arnold et al. (2000b)
		TTV1	*Thermoproteus*	85	15.9	+	Iceland, hot mud hole	Janekovic et al. (1983)
		TTV2		85	–		Iceland	
		TTV3		85	–			
	Rudiviridae	SIRV1	*Sulfolobus*	80	32.3	+	Iceland, solfataric field	Zillig et al. (1994)
		SIRV2		80	35.4	+		Prangishvili et al. (1999)
		SRV	*Stygiolobus*	80–90	28	–	Azores, hot spring	Vestergaard et al. (2008b
		ARV1	*Acidianus*	75	24.6	–	Italy, acidic hot spring	Vestergaard et al. (2005)
Spherical	*Globulaviridae*	PSV1	*Pyrobaculum*	100	28.3	–	Yellowstone hot spring	Haring et al. (2004)
		TTSV1	*Thermoproteus*	85	21.6	–	Indonesia, hot spring	Ahn et al. (2006)
	Unclassified	STIV	*Sulfolobus*	80	16.6	+	Yellowstone hot spring	Rice et al. (2004)
		STIV2		80	17.6	+	Iceland, hot spring	Happonen et al. (2010)

Annexe 3a (suite) :

Morphology	Family/genus	Virus	Host	Temp. host (°C)	Genome size	Lytic	Isolation site	References
Spindle	*Fuselloviridae*	SSV1	*Sulfolobus*	80	15.4	–	Japan	Palm et al. (1991)
		SSV2		80	14.7	–	Iceland, hot spring	Stedman et al. (2003)
		SSV4		80	15.1	–	Iceland, hot spring	Peng (2008)
		SSV5		80	15.3	–	Iceland, hot spring	Redder et al. (2009)
		SSV6		80	15.6	–	Iceland, hot spring	
		SSV7		80	17.6	–	Iceland, hot spring	
		SSVk1		80	17.3		Russia, acidic hot spring	Wiedenheft et al. (2004)
		SSVrh		80	16.4		Yellowstone hot spring	
		ASV1	*Acidianus*	75	24.1	–	USA	Redder et al. (2009)
	Bicaudaviridae	ATV		75	62.7	+	Italy, acidic hot spring	Prangishvili et al. (2006
	Unclassified	STSV1	*Sulfolobus*	80	75.2	–	China, acidic hot spring	Xiang et al. (2005)
		PAV1	*Pyrococcus*	95–100	18	–	Deep sea hot vent	Geslin et al. (2003)
		TPV1	*Thermococcus*	85	21.5	–	Deep sea hot vent	Gorlas et al. (2012)

The temperature of the host refers to the optimum growth temperature of the Bacterium from which the virus was isolated from
Genome size shows the viral genome size in kb. A lytic life cycle state is identified with a (+) and a lysogenic life cycle without apparent lysis of host c
during any stage is identified with a (–)
[a]The approval of the family *'Clavaviridae'* is pending at the ITV

Annexe 3c : Morphologie, classification taxonomique et caractéristiques des bactériovirus thermophiles.

Morphology	Family/genus	Virus	Host	Temp. host (°C)	Genome size	Lytic	Isolation site	References
Linear	*Inoviridae*	PH75	*Thermus*	70–75	6.5	–	New Zealand, hot spring	Pederson et al. (2001)
Head-tail	*Myoviridae*	φTMA	*Thermus*	70–75	151.5	+	Japan, hot spring	Tamakoshi et al. (2011)
		φYS40		65	152.4	+	Japan, hot spring soil	Matsushita and Yanase (2009)
		TS2126		70–75	90		Iceland, hot tap water	Blondal et al. (2005b)
		RM378	*Rhodothermus*	65	130		Iceland	Blondal et al. (2003)
		MMP17	*Meiothermus*	50–65	33.5–39.5	+	China, hot spring	Lin et al. (2010)
		D6E	*Geobacillus*	65	34.7	+	Deep sea hot vent	Wang and Zhang (2010)
		GBSV1		65			China, offshore hot spring	Liu et al. (2009)
		BV1		65	35	+[a]	China, inshore hot spring	Liu et al. (2010)
	Siphoviridae	GVE2		65–70	40.9	+	Deep sea hot vent	Liu and Zhang (2008)
		TSP4	*Thermus*	70–75	80	+	China, hot spring	Lin et al. (2010)
		P23-45		70–75	84.2	+	Russia, acidic hot spring	Minakhin et al. (2008)
		P74-26		70–75	83.3	+		
	Unclassified	BVW1	*Bacillus*	65–70	18	+	Deep sea hot vents	Liu et al. (2006)
		Tb1	*Thermomonospora*	45	43	+	Compost, self-heated organic material	Lawrence et al. (1986)
		Tf2		55	35	+		
		Tf3		55	45	+		
		Tf4		55	36	+		
Head, no tail	*Tectiviridae*	φIN93	*Thermus*	65	19.6	+	Japan, hot spring soil	Matsushita and Yanase (2009)
		P23-77		70–75	17	+	New Zealand, hot spring	Jaatinen et al. (2008)

The temperature of the host refers to the optimal growth temperature of the bacterium from which the virus was isolated from
Genome size shows the viral genome size in kb. A lytic life cycle state is identified with a (+) and a lysogenic life cycle without apparent lysis of host cells during any stage is identified with a (–)
[a]Evidence suggests the bacteriophage is lytic

Résumé

Notre connaissance de la diversité virale associée aux microorganismes procaryotiques issus des sources hydrothermales océaniques profondes demeure encore limitée. Peu d'études se sont intéressées à l'abondance virale ou à l'impact des virus sur la mortalité microbienne au sein de ces écosystèmes. Le nombre de virus caractérisés, issus de ces environnements, reste faible. Deux virus, PAV1 et TPV1, associés à des archées hyperthermophiles anaérobies appartenant à l'ordre des *Thermococcales* ont été décrits dans notre laboratoire. Afin de poursuivre nos recherches sur la diversité virale infectant les microorganismes hydrothermaux marins, l'ordre bactérien des *Thermotogales* a été ciblé. Cet ordre est composé de bactéries chimioorganotrophes anaérobies pour la plupart hyper/thermophiles. Elles partagent la même niche écologique que les *Thermococcales* et sont métaboliquement proches. De nombreux transferts latéraux de gènes ont, par ailleurs, contribué à l'histoire évolutive des *Thermotogales*, subodorant l'implication potentielle de virus. Pour autant, à ce jour, les seuls éléments génétiques mobiles à avoir réellement été décrits chez les *Thermotogales* sont trois miniplasmides. La présence de séquences CRISPR a également été rapportée au sein de plusieurs génomes de *Thermotogales*, suggérant que les *Thermotogales* sont ou ont certainement déjà été exposées à des infections virales. Pour autant, à ce jour, les seuls éléments génétiques mobiles à avoir réellement été décrits chez les *Thermotogales* sont trois miniplasmides et aucun virus. Une cinquantaine de souches de *Thermotogales* provenant majoritairement de la collection de notre laboratoire (Souchothèque de Bretagne et Collection Ifremer) a été passée au crible quant à la présence d'éventuels bactériovirus associés. A l'issue de ce criblage, des éléments à ADN extra-chromosomiques, incluant deux plasmides et sept bactériovirus (du type *Syphoviridae*) ont été découverts au sein de souches appartenant aux genres *Thermosipho* et *Marnitoga*. Des analyses préliminaires ont été réalisées sur ces différents éléments et l'un des nouveaux systèmes hôte/virus a été caractérisé en détail. MPV1 (*Marinitoga piezophila* virus 1) est un syphovirus-like tempéré isolé d'une bactérie piezophile, il constitue le premier bactériovirus associé à l'ordre des *Thermotogales*. La souche hôte est piezophile mais aisément cultivable à pression atmosphérique au terme de plusieurs repiquages. Si l'essentiel des analyses a été mené à pression atmosphérique, la production virale s'est avérée tout à fait effective à pression hydrostatique. Nous avons réalisé les analyses de la séquence complète du génome MPV1 (43,7 kb, extrait des capsides virales purifiées) et sa comparaison avec le provirus présent au sein du génome séquencé de *Marinitoga piezophila* KA3. Les analyses de ce génome viral ont suggéré une proximité évolutive de MPV1 avec les bactériovirus de *Firmicutes*. Nous avons également mis en évidence que le bactériovirus partage son hôte avec un élément génétique extra chromosomique circulaire de 13 ,3 kb (pMP1). Ce « ménage à 3 » est surprenant dans le sens où l'élément de 13,3 kb, contenant 13 ORF de fonctions majoritairement inconnues, utilise les capsides virales afin de se propager. Ceci pourrait, ainsi, illustrer un nouvel exemple de piratage moléculaire.

Abstract

Our knowledge of the viral diversity associated to procaryotic microorganisms inhabiting the deep sea hydrothermal vents is still limited. Only few studies have focused on viral abundance and impact on microbial mortality within these ecosystems. A limited number of viruses from these environments were isolated and characterized. Two viruses, PAV1 and TPV1, associated to hyperthermophilic anaerobic *Archaea*, *Thermococcales* order, have ever been described in our laboratory. The topic of this phD thesis was to extend our investigation to other deep sea vent microorganisms in order to deepen our knowledge on the marine hydrothermal virosphere. We decided to focus more precisely on the bacterial order of *Thermotogales*. This order is composed of anaerobic chemoorganotrophic bacteria that are, for almost, hyper/thermophilic. They share the same ecological niche as the *Thermococcales* and are metabolically close. Numerous lateral gene transfers have contributed to the evolutionary history of the *Thermotogales*, implying the potential involvement of viruses. The presence of CRISPRs has also been reported in many genomes, suggesting that *Thermotogales* certainly are or have been exposed to viral infections. However, up till now, only 3 miniplasmids have been described within *Thermotogales* and no viruses. Fifty strains of *Thermotogales*, mostly from the LM2E culture collection (Ifremer and "UBOCC"), were screened for the presence of potential bacteriovirus. Extrachromosomal DNA elements, including two plasmids and seven bacterioviruses (*Siphovirus*-like), were discovered amongst strains belonging to both *Thermosipho* and *Marinitoga* genus. Preliminary studies were performed on these elements and one of the new virus-host systems was characterized in details. MPV1 (*Marinitoga piezophila* virus 1) is a temperate Siphovirus-like isolated from a piezophilic bacterium, it is the first bacteriovirus associated to the *Thermotogales* order. This host strain is piezophilic but easily cultivable at atmospheric pressure after several subcultures. Whether most experiments were performed at atmospheric pressure, the viral production appeared to be effective at hydrostatic pressure. We reported the analyses of the complete sequence of the MPV1 genome (43.7 kb, extracted from purified virions) and its comparison to the provirus present in the sequenced genome of *Marinitoga piezophila* KA3. Analyses of the viral genome suggested a close evolutionary relationship of MPV1 to *Firmicutes* bacterioviruses .We also reported that this bacteriovirus shares its host with a circular extrachromosomal genetic element of 13.3 kb (pMP1). This 'ménage à trois' is surprising in the sense where the 13kb element, that contains 13 ORFs of mostly unknown function, uses the viral capsid to propagate. Therefore, it would likely correspond to a new example of molecular piracy.