



HAL
open science

Etudes des interactions entre virus et hôtes archéens hydrothermaux hyperthermophiles

Sarah Thiroux

► **To cite this version:**

Sarah Thiroux. Etudes des interactions entre virus et hôtes archéens hydrothermaux hyperthermophiles. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0096 . tel-03078935

HAL Id: tel-03078935

<https://theses.hal.science/tel-03078935>

Submitted on 17 Dec 2020

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

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

Par

Sarah THIROUX

Etudes des interactions entre virus et hôtes archéens hydrothermaux hyperthermophiles

Thèse présentée et soutenue à Plouzané, le 16 décembre 2019

Unité de recherche : Institut Universitaire Européen de la Mer au sein du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LM2E - UMR6197)

Rapporteurs avant soutenance :

Paulo TAVARES
Directeur de recherche, CNRS,
Université Paris-Sud

Jacques OBERTO
Directeur de recherche, CNRS,
Université Paris-Sud

Composition du Jury :

Paulo TAVARES (Rapporteur)
Directeur de recherche, CNRS, Université Paris-Sud

Jacques OBERTO (Rapporteur)
Directeur de recherche, CNRS, Université Paris-Sud

Patrick FORTERRE (Examinateur)
Professeur, Université Paris-Sud

Ariane BIZE (Examinatrice)
Chercheur, Irstea Anthony

Aurore GORLAS (Examinatrice)
Maître de conférence, Université Paris-Sud

Christopher PAYAN (Président du jury)
Professeur, Université de Bretagne Occidentale

Claire GESLIN (Directrice de thèse)
Maître de conférence, Université de Bretagne Occidentale

Anne GODFROY (Invitée)
Chercheur, IFREMER (LM2E)

Remerciements

Mes remerciements s'adressent, dans un premier temps aux membres du jury :

Merci à ma directrice de thèse, le Dr Claire Geslin, de m'avoir fait confiance pour mener cette thèse durant ces trois ans. Je ne saurai jamais assez te remercier pour ton investissement, tes conseils et la passion que tu as donné jusqu'au bout. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi sur ce beau projet. J'ai aimé raconter l'histoire de nos virus pendant trois ans et j'espère pouvoir continuer à le faire aussi bien. Merci d'avoir été plus qu'une encadrante pendant ce long périple qu'est la thèse.

Je remercie tout particulièrement le Dr Jacques Oberto et le Dr Paulo Tavares pour avoir accepté de prendre le temps d'être les rapporteurs de ces travaux.

Mes remerciements s'adressent au Dr Patrick Forterre, au Dr Christopher Payan, au Dr Ariane Bize et au Dr Aurore Gorlas pour avoir accepté d'être les examinateurs de ces travaux et de contribuer à la discussion autour de ceux-ci.

Un grand merci au Dr Anne Godfroy qui a suivi ces travaux de thèse et qui a participé au bon déroulement de ceux-ci avec ses conseils précieux.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Dr Anne-Claire Baudoux et au Dr Julien Lossouarn pour avoir participé aux comités de thèse et pour m'avoir apporté de précieux conseils. Votre investissement et les discussions toujours pertinentes ont été grandement appréciées. Merci Anne-Claire pour m'avoir initié aux joies de la cytométrie en flux en compagnie de monsieur Dominique Marie, l'expert de cet appareil capricieux. Merci Julien de m'avoir fait bénéficier de ton expérience, notamment pour ce manuscrit, et d'avoir toujours proposé ton aide.

Un très grand merci au Dr Samuel Dupont qui m'a passé le relais après m'avoir formé avec toute la patience, la gentillesse et la bonne humeur possible. Tu m'as initiée aux soirées cinétiques accompagnées de pizza au labo en compagnie de Charlotte, ton adorable femme et j'ai fait perdurer cette tradition tout au long de ma thèse. Tes blagues « ça rappelle » de très bons souvenirs ! j'espère avoir repris le flambeau avec brio !

Un merci tout particulier à Nadège Quintin (Bienvenu) qui n'a pas seulement été une source de connaissances techniques mais qui a été là pour proposer son aide et ses conseils à la pailasse et également dans la vie. Nos virées à Roscoff me manqueront. Aucun binôme ne pourra battre nos records immortalisés dans Snapchat, avec ou sans filtre. Les fous rires et les « Nature » ne sont plus à compter !

Merci aux collaborateurs avec qui j'ai pu interagir durant ces trois années de thèse. Notamment un grand merci au Dr Camilla Nesbo et au Dr Mart Krupovic pour faire partie de l'aventure et pour votre contribution à mes travaux de thèse en tant qu'experts et co-auteurs de l'article. Une mention spéciale pour le Dr Violette Da Cunha qui collabore à plusieurs de nos projets en cours.

Merci à l'équipe du Pr Patrick Forterre, Evelyne Marguet, Dr Aurore Gorlas pour avoir toujours répondu à nos questionnements et pour avoir apporté votre aide depuis le stage, il y a plus de trois ans.

Merci à monsieur Gérard Siquin et monsieur Philippe Elies pour les séances de microscopie électronique, pour votre accueil et votre disponibilité.

Je tiens à remercier les collègues de l'ANSES, notamment Joëlle Cambon et Laurent Bigarre, qui nous ont accueilli lors de nos petits soucis techniques.

Je souhaite remercier toute l'équipes du Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (IUEM / IFREMER) avec en premier lieu le Dr Mohamed Jebbar et le Dr Didier Flament pour m'avoir

accueillie au sein du laboratoire. Merci pour le pied à l'étrier et l'expérience incroyable au Japon pour le congrès Thermophiles.

Un merci très spécial à Stéphanie, notre secrétaire, qui gère avec douceur et gentillesse tous ses « enfants ». Merci à Isabelle qui a rejoint Stéphanie en renfort et qui s'est montrée tout aussi investie !

Un merci tout particulier à Valérie Cueff-Gauchard pour l'initiation à la Q-PCR et sa disponibilité. Plein de bonnes choses pour la suite de ta thèse notamment, en espérant qu'il n'y ait plus de Turballe à venir !

Merci au grand manitou de la méthanogène, le Dr Stéphane L'Haridon pour son expertise, sa bonne humeur et ses chansons. Ah oui, et surtout merci pour ce stock de fioles très précieux.

Mes remerciements vont aux membres de la composante IUEM pour avoir partagé mon quotidien pendant ses trois ans de thèse. Merci à mon tout premier maître de stage, Yann Moalic, pour m'avoir appris les bases et pour ses punchlines qui tombent toujours à point nommé. Merci Karine pour ton professionnalisme au labo et ta détente en dehors. Merci à Lois Maignien, Frédérique Duthoit, Sophie Vallet, Erwann Vince pour les discussions scientifiques mais pas que ! Merci à la composante IFREMER, même si on se voit moins au quotidien, ça a toujours été un plaisir de venir pour manipuler, discuter science ou même prendre un bout de gâteau de l'autre côté de la barrière.

Une mention spéciale pour tous les ITAs du laboratoire qui fournissent un travail plus que primordial au laboratoire pour que tout le monde puisse travailler dans de bonnes conditions.

Merci aux anciens de labo pour m'avoir initiée à la vie en tant que doctorante avec une note spéciale pour : Matthieu et sa pyramide de fin de thèse (« t'as une tâche là ») ; Simon la grande classe ; Kevin, sa bienveillance, sa détente légendaire et sa participation au films de thèse depuis 1872 ; Morgane, la maman au franc parler allié à la poésie de ses jolies créations ; Coraline, membre incontournable de la viroteam, merci pour ton soutien et tes conseils, je te souhaite de vivre une expérience incroyable en Allemagne avec l'étude au combien passionnante des virus d'archées. Merci de tout cœur à Aline pour sa joie de vivre, sa douceur et son amitié. Un grand merci aux copains de galère, les doc' IUEM : Florian qui gère à peu près tout et ses dad jokes qui auront déclenché certains de mes plus beaux fou-rires ; Clarisse et sa gentillesse incroyable (« un tout petit cidre ») ; Blandine qui pense toujours aux autres avant elle ; Marc et la minute Marc (« bien le bonjour ») ; Jie petite dernière de la viroteam et Maxime et sa méditation à toute épreuve. Je n'oublie pas, bien sûr, les doc' côté IFREMER qui ne manquaient jamais de nous rejoindre pour les « after work ». Une mention toute spéciale pour Yang et Francis pour avoir pris soin de moi dans les moments difficiles. Yang, tu as été une petite maman pour moi et je ne l'oublierais jamais.

Jordan, te remercier n'est tout simplement pas suffisant pour tout le soutien et l'aide que tu m'as apporté pendant ces trois ans de thèse. Mon co-bureau, mon collègue, mon coach, mon correcteur d'orthographe. Je sais que quoi qu'il arrive, je pourrais compter sur toi (« tu viens m'aider à corriger 200 pages de manuscrit de thèse ce week-end ? »). Tu auras vécu tout ça avec moi bien malgré toi, encore merci.

Un merci infini au gang : Gwennou, Tiphaine, Claire, Pauline, Jeanne, Marine, Laetitia et Morgane et pour leur amitié sincère et sans faille depuis tant d'années et pour m'avoir aidé à relâcher la pression quand c'était nécessaire.

A mes parents, je ne pourrai jamais assez vous remercier pour tous les sacrifices que vous avez pu faire pour moi et tout le soutien que vous m'avez apporté. Vous m'avez toujours encouragé à faire de mon mieux pour réaliser mes rêves. C'est grâce à vous si je peux vivre mes passions, aussi folles soient elles. Merci d'être les parents les plus incroyables.

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Liste des figures.....	8
Liste des tableaux.....	12
Liste des abréviations	14
Introduction générale.....	15
I. Les virus.....	16
A. Généralités	16
1. Définition et historique	16
2. Classification.....	22
3. Interactions hôte-virus	23
B. L'ubiquité des virus de procaryotes et leurs impacts	42
1. Abondance	42
2. Impacts	47
II. Les hôtes : les archées	53
A. Généralités sur les archées.....	53
1. Découverte et caractéristiques des archées	53
2. Classification des archées.....	54
3. Des microorganismes extrêmophiles.....	57
B. Les hyperthermophiles	59
1. Généralités sur les hyperthermophiles	59
2. Caractéristiques physiologiques des archées hyperthermophiles	60
3. Les habitats des micro-organismes thermophiles.....	64
C. Quelques représentants de la diversité archéenne.....	70
1. Les halophiles extrêmes	71
2. Les <i>Thermococcales</i>	72
3. Les méthanogènes	73
III. Les virus d'archées	85

A.	La diversité des virus d'archées	85
1.	Généralités et historique.....	85
2.	Diversité morphologique et génétique des virus d'archées.....	86
B.	Les virus des environnements chauds : le cas des sources hydrothermales océaniques profondes 106	
1.	Généralités	106
2.	Les virus de bactéries isolées de sources hydrothermales océaniques profondes.....	109
3.	Les archaeovirus isolés de sources hydrothermales océaniques profondes	113
C.	Les virus de méthanogènes	116
1.	Les virus de méthanogènes décrits	118
2.	Des particules de type viral détectées chez les méthanogènes.....	122
3.	Des indices de l'existence de virus de méthanogènes hyperthermophiles	124
4.	Les éléments génétiques mobiles des méthanogènes.....	126
	Présentation générale des travaux de thèse.....	131
	Matériels et Méthodes.....	135
I.	Techniques de culture	136
A.	Culture des <i>Methanococcales</i>	136
B.	Culture des <i>Thermococcales</i>	137
II.	Techniques de virologie.....	138
A.	Préparation de solutions virales concentrées et purifiées.....	138
1.	Solution virale concentrée	138
2.	Solution virale purifiée	139
B.	Microscopie électronique en transmission	140
C.	Estimation de l'abondance de l'hôte et son virus.....	140
1.	Microscopie à épifluorescence.....	140
2.	Cytométrie en flux.....	141
III.	Techniques de biologie moléculaire.....	142
A.	Extractions d'acide nucléiques (hôte, virus et plasmide).....	142
1.	Extraction d'ADN total.....	142
2.	Extraction d'ADN viral	143
3.	Extraction d'ADNccc.....	143
B.	Réactions d'amplifications par PCR et QPCR	144

1.	Réactions d'amplifications par PCR (« Polymerase Chain Reaction »).....	144
2.	Essais d'infection suivis en PCR quantitative avec la technologie SYBR Green	145
Chapitre I.....		147
I.	Présentation générale des travaux	148
	The first head and tail virus, MFV1, produced by a hyperthermophilic deep sea methanogen	150
Chapitre II.....		189
I.	Présentation des travaux.....	190
II.	Matériels et méthodes	193
A.	Tests d'induction	193
B.	Identification des souches de <i>Methanococcales</i>	194
1.	Analyses en RFLP	194
2.	Séquençage 16S par la société Genewiz	194
III.	Résultats.....	195
A.	Recherche de virus chez des archées méthanogènes hyperthermophiles	195
1.	Criblage d'éléments génétiques mobiles chez des souches de méthanogènes hyperthermophiles 195	
B.	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> JAL-1	207
1.	Culture de la souche et comptage en cellule de Thoma	207
2.	Purification de particules de type viral en gradient d'iodixanol.....	208
3.	Relation hôte-virus : cytométrie en flux.....	211
C.	<i>Methanocaldococcus vulcanius</i> M7 ^T	215
1.	Culture de la souche et comptage en cellule de Thoma	215
2.	Purification de particules de type viral en gradient iodixanol.....	216
3.	Relation hôte-virus : cytométrie en flux.....	219
IV.	Discussion et conclusions	221
A.	Un réservoir de nouvelles espèces et de nouveaux éléments génétiques mobiles	221
B.	De nouveaux couples méthanogènes hyperthermophiles-virus.....	222
Chapitre III.....		225
I.	Présentation des travaux.....	226
II.	Matériels et méthodes	228

A.	Les souches des <i>Thermococcales</i> étudiées.....	228
1.	Culture des <i>Thermococcales</i> en condition optimale	229
2.	Culture des <i>Thermococcales</i> en condition de stress	229
B.	Suivi PCR et Q-PCR.....	230
1.	Infection de <i>Methanocaldococcus</i>	230
2.	Infection de <i>Thermococcus</i>	231
C.	Analyse génétique du Thiovirus	231
1.	Extraction et analyse de l'ADNccc	231
2.	Détermination de la séquence nucléotidique du Thiovirus	231
III.	Résultats.....	232
A.	Morphologie du virus de <i>Thermococcus thio-reducens</i> UBOCC-M-2423	232
1.	Purification des virions	232
2.	Observation de particules virales en microscopie électronique en transmission	232
A.	Relations hôte-virus : cytométrie en flux	234
B.	Caractère infectieux	236
1.	Infection de <i>Thermococcales</i>	236
2.	Infection de <i>Methanocaldococcus</i>	238
C.	Génome viral	240
1.	Comparaison profil ADNccc.....	240
2.	Analyse du génome viral	241
IV.	Discussion et conclusion.....	243
A.	Un nouveau virus de <i>Thermococcales</i>	243
B.	Le Thiovirus et ses hôtes.....	244
	Discussion et Perspectives.....	247
I.	Découverte d'archaeovirus hydrothermaux	248
A.	De nouveaux virus hyperthermophiles	248
1.	Des nouveaux virus de méthanogènes hyperthermophiles	248
2.	MFV1, premier siphovirus hyperthermophile	249
3.	Thiovirus, un nouveau virus de <i>Thermococcales</i>	250
B.	Diversité morphologique et stabilité des virus hyperthermophiles	252
II.	Les cycles viraux au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes	255

III.	Transferts d'éléments génétiques mobiles entre archées hydrothermales.....	259
A.	Le mobilome de <i>M. fervens</i>	259
B.	La gamme d'hôte de <i>T. thioeducens</i>	261
IV.	Le mobilome abyssal : point de vue écologique.....	263
A.	Poursuivre l'étude du mobilome associé aux méthanogènes hydrothermales.....	263
B.	Interactions entre divers partenaires.....	265
	Bibliographie	267
	Annexes.....	295
I.	Publications et Communications.....	295
	Publication	295
	Communications	297
II.	Enseignement.....	300
III.	Formations	300
IV.	Vulgarisation scientifique	301

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE

FIGURE 1: PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DU VIRUS DE LA RAGE	16
FIGURE 2: PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU TABAC.....	17
FIGURE 3: PHOTOGRAPHIES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE MIMIVIRUS.....	18
FIGURE 4: PHOTOGRAPHIES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DU VIRUS ATV ET DE SON HOTE.	19
FIGURE 5: PROPOSITION DE CLASSIFICATION DU VIVANT INCLUANT LES VIRUS.....	20
FIGURE 6: RIBOCELLS ET VIROCELLS.	21
FIGURE 7: RIBOVIROCELLS.	21
FIGURE 8: CYCLES LYTIQUE ET LYSOGENIQUE	23
FIGURE 9: DESCRIPTION DES CYCLES VIRAUX CLASSIQUES INCLUANT LA PSEUDOLYSOGENIE.....	25
FIGURE 10: MODELE DE DECISION DE LYSE-LYSOGENIE BASE SUR LA COMMUNICATION ENTRE VIRUS.....	28
FIGURE 11: DIFFERENTS MODES D'INFECTIONS DE TYPE LYSOGENIQUE ET LEURS EFFETS SUR LA POPULATION MICROBIENNE INFECTEE.	29
FIGURE 12: UN EXEMPLE D'INDUCTION SPONTANEE DEPENDANT DU SYSTEME SOS DE L'HOTE..	30
FIGURE 13: DIFFERENTS IMPACTS POSSIBLES D'UNE INDUCTION VIRALE SPONTANEE SUR LA PHYSIOLOGIE DE SON HOTE.....	30
FIGURE 14: SCHEMA REPRESENTATIF DU DEROULEMENT DE LA LYSOGENIE ACTIVE REVERSIBLE OU NON	32
FIGURE 15: DIFFERENTS SYSTEMES DE DEFENSE CONTRE LES ATTAQUES VIRALES ET PLASMIDIQUES.	33
FIGURE 16: LE MECANISME PGL: LES CELLULES DE <i>S. COELICOLOR</i>	34
FIGURE 17: MODE DE FONCTIONNEMENT DU SYSTEME BREX.	35
FIGURE 18: MODES D'ACTION DE PROTEINES ARGONAUTES GUIDES PAR DES PETITES MOLECULES ARN	36
FIGURE 19: MODELE PUTATIF DU FONCTIONNEMENT DE MJAGO GUIDE-DEPENDANTE ET GUIDE-INDEPENDANTE	37
FIGURE 20: LES TROIS PHASES DU SYSTEME D'IMMUNITE CRISPR	39
FIGURE 21: LE SYSTEME CRISPR-CAS.....	41
FIGURE 22: LE SYSTEME ABI.....	41
FIGURE 23: BACTERIES ET PARTICULES DE TYPE VIRAL OBSERVEES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION	43
FIGURE 24: PHOTOGRAPHIE DE MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE D'ECHANTILLON D'EAU DE MER MARQUE AU SYBR GREEN	44
FIGURE 25: CYTOGRAMMES.....	44
FIGURE 26: RESULTATS OBTENUS EN INTERFEROMETRIE	45
FIGURE 27 : SCHEMA SIMPLIFIE DE LA CHAINE ALIMENTAIRE MARINE ET L'IMPLICATION DES VIRUS SUR CELLE-CI.....	48
FIGURE 28 : IMPLICATIONS DES VIRUS DANS L'EVOLUTION ET LA PATHOGENICITE DE LEURS HOTES PAR DIVERS MECANISMES	49
FIGURE 29 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE GTA.	51
FIGURE 30 : DIFFERENTS ROLES DES VESICULES MEMBRANAIRES PRODUITES PAR <i>PROCHLOROCOCCUS</i>	52
FIGURE 31 : PHYLOGENIE DES ARCHEES	54
FIGURE 32 : EVOLUTION DE LA CLASSIFICATION DES ARCHEES AU COURS DES TRENTE DERNIERES ANNEES.....	55
FIGURE 33 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PHYLOGENIE OBTENUE SUITE A L'ANALYSE DE SPANG ET SES COLLABORATEURS..	56

FIGURE 34 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA PHYLOGENIE OBTENUE SUITE A L'ANALYSE DE DA CUNHA <i>ET AL</i>	56
FIGURE 35 : EXEMPLES D'ENVIRONNEMENTS EXTREMES	57
FIGURE 36 : PREDOMINANCES DES ARCHEES DANS LES MILIEUX EXTREMOPHILES.....	58
FIGURE 37 : STRATEGIES UTILISEES PAR LES THERMOPHILES POUR FAIRE FACE AUX HAUTES TEMPERATURES.....	61
FIGURE 38 : SCHEMA DU DEROULEMENT DE LA REPONSE A UN STRESS A LA CHALEUR CHEZ UNE ARCHEE HYPERTHERMOPHILE.....	62
FIGURE 39 : PHOTOGRAPHIES DE FUMEROLLES ET SOLFATARE EN ISLANDE.....	65
FIGURE 40 : PHOTOGRAPHIE ET CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES D'UNE SOURCE HYDROTHERMALE OCEANIQUE PROFONDE .	67
FIGURE 41 : DIVERSITE MICROBIENNE RETROUVEE AU NIVEAU DES SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES.....	68
FIGURE 42 : REPARTITION GLOBALE DES SITES HYDROTHERMAUX.....	68
FIGURE 43 : SCHEMA DU FONCTIONNEMENT D'UNE CHEMINEE HYDROTHERMALE PROFONDE.....	69
FIGURE 44 : ARBRE PHYLOGENETIQUE BASE SUR LA COMPARAISON DE SEQUENCES PRESQUE COMPLETES DE L'ARNr 16S.	75
FIGURE 45 : LES TROIS VOIES DE LA METHANOGENESE.	80
FIGURE 46 : COENZYMES TRANSPORTEURS DU CARBONE 1 ET LE COENZYME F430 IMPLIQUES DANS LA METHANOGENESE.....	81
FIGURE 47 : LES COENZYMES F420 ET CoB ONT LA FONCTION DE DONNEURS D'ELECTRON DANS LA REACTION DE METHANOGENESE	82
FIGURE 48 : PHOTOGRAPHIES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE PM2, PREMIER VIRUS D'ARCHEE DECRIT.	85
FIGURE 49 : DIVERSITE MORPHOLOGIQUE DES VIRUS D'ARCHEES ET DISTRIBUTION DE LA TAILLE DES GENOMES.....	86
FIGURE 50 : PHOTOGRAPHIES DES DIFFERENTS MORPHOTYPES OBSERVES CHEZ LES VIRUS D'ARCHEES EN MET.....	87
FIGURE 51 : STRUCTURE DU VIRUS SSV1 ETUDIEE EN CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.	94
FIGURE 52 : OBSERVATION EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES VIRIONS D'ACV.....	95
FIGURE 53 : CYCLE DE VIE DE DEUX VIRUS DE <i>SULFOLOBALES</i>	97
FIGURE 54 : CRYO-ELECTROMICROSCOPIE D'UNE CELLULE DE <i>SULFOLOBUS</i> INFECTEE PAR STIV.....	102
FIGURE 55 : PHOTOGRAPHIE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DU VIRUS Φ H.	103
FIGURE 56 : ARBRE PHYLOGENETIQUE OBTENU A PARTIR DE LA COMPARAISON DE LA MCP (MAJOR CAPSID PROTEIN) DE Φ H.....	104
FIGURE 57 : ALIGNEMENT GENOMIQUE DU PROVIRUS PUTATIF NVIE-PRO1 AVEC LE MYOVIRUS DE BACTERIE MU	105
FIGURE 58 : LE MOBILOME ABYSSAL ET SES IMPLICATIONS.....	107
FIGURE 59 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE PARTICULES VIRALES DE BVW1.....	109
FIGURE 60 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE PARTICULES VIRALES DE GVE2	109
FIGURE 61 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION DE PARTICULES VIRALES DE D6E	110
FIGURE 62 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION D'UNE PARTICULE VIRALE DE NRS-1	110
FIGURE 63 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE MPV1	111
FIGURE 64 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION DE MCV1 ET MCV2	112
FIGURE 65 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE PARTICULES VIRALES DE PAV1.	113
FIGURE 66 : ORGANISATION GENETIQUE DU GENOME DE PAV1 ET DES PLASMIDES DE <i>THERMOCOCCALES</i> PCIR10 ET PIRI48	114
FIGURE 67 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION DE TPV1	115
FIGURE 68 : Ψ M1 OBSERVE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION..	118
FIGURE 69 : OBSERVATION AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE DE PARTICULES DE TYPE VIRAL PRODUITE PAR <i>M. VOLTAE</i> A3.	119
FIGURE 70 : LES VIRUS Φ F1 ET Φ F3 OBSERVES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION.	119
FIGURE 71 : METSV EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION.....	121

FIGURE 72 : PARTICULES DE TYPE VIRAL BOURGEONNANT DE CELLULES DE <i>METHANOFOLLIS AQUAEMARIS</i> OBSERVEES EN MET	122
FIGURE 73 : VIRUS PLEOMORPHES DE FORME ELLIPSOÏDE INFECTANT UN PROCARYOTE FILAMENTEUX PROVENANT DU LAC PAVIN. ..	122
FIGURE 74 : DES VLPs ISOLEES DE BIOREACTEURS OBSERVEES EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION.	123
FIGURE 75 : LA SOUCHE CYW4T EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION.....	124
FIGURE 76 : ARBRE PHYLOGENETIQUE SITUANT LES METHANOGENES HYPERTHERMOPHILES TERRESTRES ET OCEANIQUES.....	125
FIGURE 77 : REPRESENTATION COMPARATIVE DE L'ORGANISATION DE DIFFERENTS GENOMES PROVIRAUX DE <i>METHANOCOCCALES</i> . ..	126
FIGURE 78 : ELEMENTS GENETIQUES INTEGRES ET PLASMIDES LIBRES HOMOLOGUES CHEZ LES <i>THERMOCOCCALES</i> ET LES <i>METHANOCOCCALES</i>	128
FIGURE 79 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES GENOMES DES PLASMIDES PT26-2 ET DE PMEFER01.	128

CHAPITRE I

FIGURE 1: ELECTRON MICROGRAPHS OF MFV1 PARTICLES NEGATIVELY STAINED WITH 2% URANYL ACETATE	160
FIGURE 2: VIRUS-HOST KINETICS MONITORED BY FLOW CYTOMETRY.....	161
FIGURE 3: ELECTRON MICROGRAPHS OF MEMBRANE VESICLES PRODUCED BY <i>M. FERVENS</i> EXPOSED TO COPPER.....	163
FIGURE 4: QPCR ASSAYS TO ASSESS CHANGES IN COPY NUMBER OF CHROMOSOMAL, VIRAL AND PLASMID DNA TARGET GENES	165
FIGURE 5: GENOME ORGANIZATION OF MFV1 GENOME..	169

CHAPITRE II

FIGURE 1 : A : <i>METHANOCALDOCOCCLUS JANNASCHII</i> JAL-1 ET <i>METHANOCALDOCOCCLUS VULCANIUS</i> M7 ^T EN MET	191
FIGURE 2 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES SITES D'ÉCHANTILLONNAGES DE DIFFERENTES SOUCHES	192
FIGURE 3 : EXEMPLE D'ADN TOTAUX EXTRAITS A PARTIR DES SOUCHES DE METHANOGENES HYPERTHERMOPHILES CRIBLEES.	197
FIGURE 4 : RESULTATS PCR OBTENUS POUR LA SOUCHE DE REFERENCE <i>M. JANNASCHII</i> JAL-1.	197
FIGURE 5 : EXEMPLES DE RESULTATS PCR POUR LA TMP	197
FIGURE 6 : PROFILS RFLP OBTENUS APRES DIGESTION AVEC HHA1	200
FIGURE 7 : OBSERVATION EN MET D'UNE FRACTION CONCENTREE OBTENUE A PARTIR DE CULTURES DE LA SOUCHE 3517R1.....	204
FIGURE 8 : CYTOGRAMME OBTENU EN CYTOMETRIE EN FLUX A PARTIR D'ÉCHANTILLON DE CULTURE DE 3517R1.....	204
FIGURE 9 : CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS EN CONDITION CLASSIQUE DE CULTURE DE LA SOUCHE 3517R1	205
FIGURE 10 : CYTOGRAMME OBTENU EN CYTOMETRIE EN FLUX A PARTIR D'ÉCHANTILLON DE CULTURE DE PH11.....	205
FIGURE 11 : CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS EN CONDITION CLASSIQUE DE CULTURE DE LA SOUCHE PH11.....	206
FIGURE 12 : CINETIQUE DE CROISSANCE EN CONDITION OPTIMALE DE CULTURE DE LA SOUCHE <i>M. JANNASCHII</i> JAL-1	208
FIGURE 13 : GRADIENT DE PURIFICATION OBTENU SUITE AU DEPOT D'UNE SOLUTION VIRALE CONCENTREE (<i>M. JANNASCHII</i>).....	208
FIGURE 14 : OBSERVATIONS EN MET DE SOLUTIONS PURIFIEES DE PARTICULES DE TYPE VIRAL OBTENUES (<i>M. JANNASCHII</i>)	209
FIGURE 15 : PFV1 EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION.	209
FIGURE 16 : OBSERVATION D'UNE SOLUTION VIRALE CONCENTREE DE VLPs OBTENUE A PARTIR DE CULTURES DE <i>M. JANNASCHII</i> ...	210
FIGURE 17 : CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS EN CONDITIONS OPTIMALES DE CULTURE DE <i>M. JANNASCHII</i> JAL-1.....	211
FIGURE 18 : COMPARAISON DE CINETIQUES DE CROISSANCE HOTE-VIRUS (<i>M. JANNASCHII</i>)	212
FIGURE 19 : COMPARAISON DE CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS (<i>M. JANNASCHII</i>).....	213
FIGURE 20 : CINETIQUE DE CROISSANCE EN CONDITION CLASSIQUE DE CULTURE DE LA SOUCHE <i>M. VULCANIUS</i> M7 ^T	215
FIGURE 21 : GRADIENT DE PURIFICATION OBTENU SUITE AU DEPOT D'UNE SOLUTION VIRALE CONCENTREE (<i>M. VULCANIUS</i> M7 ^T ...)	216
FIGURE 22 : OBSERVATION EN MET D'UNE FRACTION PURIFIEE DE PARTICULES DE TYPES VIRALES (<i>M. VULCANIUS</i> M7 ^T)	216

FIGURE 23 : OBSERVATION D'UNE SOLUTION CONCENTREE DE VLPs OBTENU A PARTIR DE CULTURES DE <i>M. FERVENS</i> AG86.	218
FIGURE 24 : OBSERVATION D'UNE SOLUTION CONCENTREE DE VLPs OBTENUS A PARTIR DE CULTURES DE <i>M. VULCANIUS</i> M7 ^T	218
FIGURE 25 : OBSERVATION D'UNE SOLUTION CONCENTREE DE VLPs OBTENU A PARTIR DE DE <i>M. INFERNUS</i> ET <i>M. VILLOSUS</i>	218
FIGURE 26 : CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS EN CONDITION OPTIMALE DE CULTURE (<i>M. VULCANIUS</i> M7 ^T).....	219
FIGURE 27 : COMPARAISON DE CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS (<i>M. VULCANIUS</i> M7 ^T).....	220

CHAPITRE III

FIGURE 1 : GRADIENT DE PURIFICATION OBTENU SUITE AU DEPOT D'UNE FRACTION VIRALE CONCENTREE (<i>T. THIOREDUCENS</i> UBOCC-M-2423)	232
FIGURE 2 : OBSERVATION EN MET DE PARTICULES DE TYPE VIRAL OBTENUES A PARTIR DE <i>T. THIOREDUCENS</i> UBOCC-M-2423. ..	233
FIGURE 3 : CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS EN CONDITIONS OPTIMALES (<i>T. THIOREDUCENS</i> UBOCC-M-2423).....	234
FIGURE 4 : CINETIQUE DE CROISSANCE HOTE-VIRUS (<i>T. THIOREDUCENS</i> UBOCC-M-2423)	235
FIGURE 5 : EXEMPLES DE RESULTATS PCR POUR LES COUPLES D'AMORCES CIBLANT LA MCP DU THIOVIRUS	238
FIGURE 6 : RESULTATS PCR OBTENUS POUR LES <i>METHANOCALDOCOCCLUS</i> INFECTEES AVEC LES AMORCES MCP DU THIOVIRUS	239
FIGURE 7 : SUIVI Q-PCR DU NOMBRE DE COPIES DU GENE 16S CIBLANT LES <i>METHANOCALDOCOCCLUS</i> ET LE GENE VIRAL.....	240
FIGURE 8 : COMPARAISON DES PROFILS DE RESTRICTION OBTENUS A PARTIR DE L'ADNCCC ISOLE DE <i>T. THIOREDUCENS</i> UBOCC-M-2423	241
FIGURE 9 : ORFS PARTAGES PAR LES VIRUS PAV1, TPV1 ET LE THIOVIRUS	241

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

FIGURE 1: LES VIRIONS DE NSV1 OBSERVES EN MET	251
FIGURE 2: EXEMPLES D'UTILISATION DE LA CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN TRANSMISSION POUR ETUDIER LA STRUCTURE DE VIRUS TETE-QUEUES.	253
FIGURE 3: OBSERVATION EN MET DES VIRIONS DU THIOVIRUS.	253
FIGURE 4: ANALYSES TOMOGRAPHIQUES DU VIRION HIS1	254

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE

TABLEAU 1 : QUELQUES CARACTERISTIQUES DES TROIS DOMAINES DU VIVANT.....	53
TABLEAU 2 : POSITIONNEMENT DES EXTREMOPHILES EN FONCTION DES PARAMETRES DE LEUR ENVIRONNEMENT	58
TABLEAU 3 : EXEMPLE D'ARCHEES HYPERTHERMOPHILES.....	60
TABLEAU 4 : EXEMPLE DE BACTERIES HYPERTHERMOPHILES.....	60
TABLEAU 5 : QUELQUES CARACTERISTIQUES REPRESENTATIVES DE CHAQUE ORDRE DE METHANOGENES	75
TABLEAU 6 : ESPECES DE METHANOGENES D'INTERET POUR CHAQUE ORDRE	76
TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES DES METHANOGENES HYPERTHERMOPHILES (<i>METHANOCALDOCOCCLUS</i> ET DES <i>METHANOTORRIS</i>)..	77
TABLEAU 8 : PRODUCTION DE BIOGAZ A PARTIR DE DECHETS ORGANIQUES	83
TABLEAU 9 : LES VIRUS SPECIFIQUES D'ARCHEES	88
TABLEAU 10 : LES VIRUS COSMOPOLITES D'ARCHEES	98
TABLEAU 11 : VIRUS ASSOCIES AUX SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES.	108
TABLEAU 12 : VIRUS ET PARTICULES DE TYPE VIRAL PRODUITES PAR DES METHANOGENES ET PROVIRUS INTEGRES AUX GENOMES DE METHANOGENES.....	117
TABLEAU 13 : PLASMIDES PORTES PAR DES METHANOGENES ISSUES DE SOURCES HYDROTHERMALES OCEANIQUES PROFONDES.	127

MATERIELS ET METHODES

TABLEAU 1: MILIEU POUR AUTOTROPHE "DSMZ 141" MODIFIE.	136
TABLEAU 2: MILIEU POUR HETEROTROPHE "TRM".	137
TABLEAU 3 : LISTE DES COUPLES D'AMORCES UTILISES DANS CES TRAVAUX DE THESE POUR LES REACTIONS DE PCR.....	144
TABLEAU 4 : MELANGE REACTIONNEL UTILISE POUR LES REACTIONS DE PCR.	144
TABLEAU 5 : PROGRAMME UTILISE POUR LES REACTIONS DE PCR.	145
TABLEAU 6 : LISTE DES COUPLES D'AMORCES UTILISES DANS CES TRAVAUX DE THESE POUR LES REACTIONS DE QPCR.	145
TABLEAU 7 : MELANGE REACTIONNEL UTILISE POUR LES REACTIONS DE Q-PCR.	146
TABLEAU 8 : PROGRAMME UTILISE POUR LES REACTIONS DE Q-PCR.	146

CHAPITRE I

TABLE 1: LIST OF METHANOCOCCALES STRAINS USED IN THIS STUDY.....	155
TABLE 2: ANNOTATION OF MFV1 GENOME	170

CHAPITRE II

TABLEAU 1 : LISTES DES SOUCHES UTILISEES POUR LE CRIBLAGE PCR.	196
TABLEAU 2 : SOUCHES NEGATIVES POUR LA MCP ET LA TMP REGROUPEES DANS LE LOT N° 1.....	198
TABLEAU 3 : SOUCHES NEGATIVES POUR LA MCP ET LA TMP REGROUPEES DANS LE LOT N° 2.....	198
TABLEAU 4 : SOUCHES TRANSMISES A GENEWIZ POUR UN SEQUENÇAGE 16S.....	201
TABLEAU 5 : SOUCHES ENVOYEEES A SEQUENCER AU GENOSCOPE.	203

CHAPITRE III

TABLEAU 1 : LISTE DES SOUCHES UTILISEES DANS CETTE ETUDE.....	228
TABLEAU 2 : LISTE DES <i>METHANOCALDOCOCUS</i> UTILISEES DANS CETTE ETUDE	230
TABLEAU 3 : LISTE DES SOUCHES UTILISEES POUR LE CRIBLAGE PCR.....	237
TABLEAU 4 : TABLEAU RECAPITULATIF DES ORFs DU THIOVIRUS ET LEURS FONCTIONS PREDITES.....	242

Liste des abréviations

Abi : « Abortive infection »
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNr : Acide désoxyribonucléique ribosomal
ADNccc : « covalently closed circular DNA », ADN circulaire clos de façon covalente
Ago : Argonaute
AMG : « Auxiliary Metabolic Genes », Gènes auxiliaires du métabolisme
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
BREX : « Bacteriophage Exclusion »
Cryo-EM : Cryo-microscopie électronique
CRISPR-Cas : « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated with cas genes »
DO : Densité Optique
ERC : « European Research Council »
GTA : « Gene Transfer Agents », agents de transferts génétiques
HGT : « Horizontal Gene Transfers », transferts horizontaux de gènes
HSP : « Heat Shock Protein », protéine de choc thermique
IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
MCP : Protéine majeure de la capsid virale
MET : Microscopie Electronique en Transmission
NCBI : « National Center for Biotechnology Information »
ORF : « Open Reading Frame », Cadre ouvert de lecture
PCR : « Polymerase Chain Reaction », réaction de polymérisation en chaîne
PF : « prefoldin »
PICIs : « Phage Inducible Chromosomal Islands », îlots chromosomiques phage-inductible
PRG : Potentiel de Réchauffement Global
Q-PCR : PCR Quantitative
RLFP : « Restriction Fragment Length Polymorphism », polymorphisme de longueur des fragments de restriction
RM : Restriction-Modification
RPM : Rotation Par Minute
TA : Toxine-Antitoxine
TMP : Protéine majeure de la queue du virus
TRM : « *Thermococcales* Rich Medium », milieu riche pour *Thermococcales*
UBO : Université de Bretagne Occidentale
UBOCC : « UBO Culture Collection »
VAP : « Virus Associated Pyramid »
VLP : « Virus Like Particle », particule de type viral
VM : Vésicules Membranaires
VTA : « *Voltae* Transfer Agents », agents de transferts de *Methanococcus voltae*.

Introduction générale

I. Les virus

A. Généralités

B. L'ubiquité des virus de procaryotes et leurs impacts

II. Les hôtes : les archées

A. Généralités sur les archées

B. Les hyperthermophiles

C. Quelques représentants de la diversité archéenne

III. Les virus d'archées

A. La diversité des virus d'archées

B. Les virus des environnements chauds : le cas des sources hydrothermales océaniques profondes

C. Les virus de méthanogènes

I. Les virus

A. Généralités

1. Définition et historique

La virosphère est ancienne, avec des hypothèses d'une origine antérieure à celle de LUCA (« Last Universal Common Ancestor »). Les virus auraient joué un rôle majeur dans l'organisation des cellules actuelles. En effet, les transferts de gènes entre virus et cellules sont des événements fréquents qui ont notamment permis l'intégration de nouveaux gènes par ces cellules et donc l'évolution de ces dernières (Forterre and Prangishvili 2013).

Les virus sont connus des hommes depuis des millénaires de par leurs manifestations pathologiques. Les premières études concernant les virus datent d'il y a plus de 100 ans, bien que le terme virus ne soit, alors, pas encore défini. **En 1883**, Louis Pasteur cultive le virus rabique (virus de la rage) dans le tissu nerveux de lapin; ses expériences feront de lui le père de la vaccination (Figure 1). Pourtant à l'époque, le virus est considéré comme un pathogène quelconque et le terme virus n'a pas de sens précis. En effet, bien que la microbiologie soit en plein essor avec les travaux de Pasteur et de Koch, l'étude des virus se révèle alors impossible du fait des contraintes techniques de l'époque, avec notamment l'incapacité d'observer ces agents particuliers en microscopie.

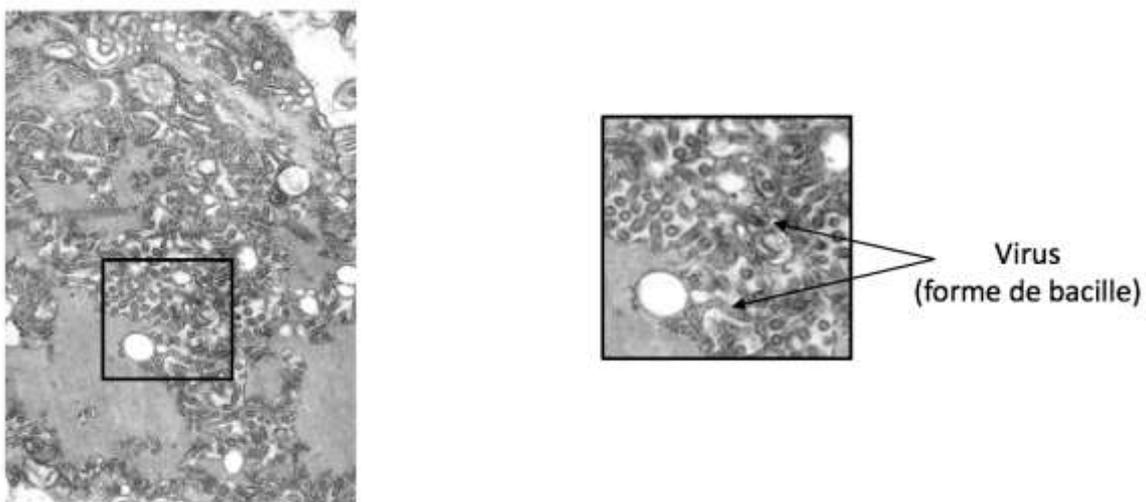


Figure 1: Photographie en microscopie électronique en transmission du virus de la rage (à partir d'une image libre de droit).

Introduction générale

Si la volonté de guérir les maladies infectieuses humaines a stimulé l'intérêt des scientifiques pour les microorganismes, c'est une maladie de plante qui a permis la découverte du premier virus : le virus de la mosaïque du tabac (TMV : Tobacco mosaic virus - Figure 2). Adolph Mayer est le premier à s'intéresser à cette maladie. Il démontrera le caractère infectieux de la mosaïque du tabac grâce à l'obtention d'un jus de plante (broyat de feuilles malades dans de l'eau) qui se révélera être une substance infectieuse pour les plantes saines. Malgré des observations intéressantes, il conclut que l'agent responsable de la maladie est dû à une bactérie qu'il n'a pas réussi à identifier par microscopie ou culture. C'est **en 1892** que Dimitri Ivanovski fait la démonstration que l'extrait de feuilles malades conserve ses qualités infectieuses après filtration sur des filtres de porcelaine poreuse de Chamberland. Ces filtres étaient couramment utilisés pour retenir les bactéries. Ce constat permettait ainsi de distinguer les deux catégories : bactérie et virus. Cependant, Dimitri Ivanovski ne conclut pas à une nouvelle catégorie de pathogène. C'est Martinus Beijerinck qui va introduire le nom de « *Contagium vivum fluidum* », et laisser entrevoir le concept de virus **en 1898**. Ceci grâce à des expériences de diffusion en gel d'agar qu'un virus peut traverser tandis qu'une bactérie non, étant un « *Contagium fixum* ». Cette découverte marque les prémices de la virologie (Lecoq 2001, Zaitlin 1998).

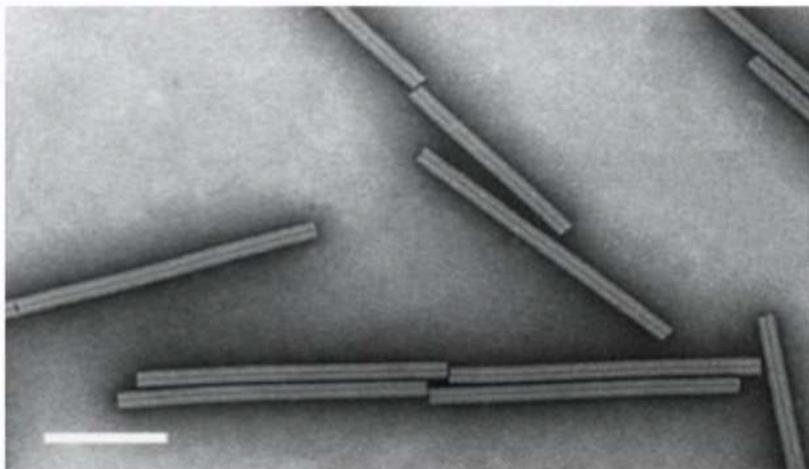


Figure 2: Photographie en microscopie électronique en transmission du virus de la mosaïque du tabac, barre d'échelle = 100 nm (Source ICTV).

La découverte des virus de procaryotes, d'abord par Frederick William Twort **en 1915** avec la description d'un phénomène de lyse chez des microcoques puis par Félix d'Hérelle **en 1917** avec la description d'un phénomène de lyse chez les shigelles, donnera naissance au terme de bactériophage.

Introduction générale

Il n'y aucune définition précise du virus avant celle de Lwoff **en 1957** : les virus sont « des entités nucléoprotéiques infectieuses de moins de 200 nm strictement intracellulaires potentiellement pathogènes, elles possèdent un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN), se multiplient à partir de leur matériel génétique (dans leur hôte), sont incapables de croissance ou de division et sont dépourvues de système de Lipmann » (Lwoff 1957). Cette définition a longtemps été admise mais a beaucoup évolué au cours du siècle dernier. C'est notamment grâce à des découvertes comme celle du virus géant Mimivirus, **en 2004**, qui infecte une amibe (APMV - *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus) et qui contient à la fois de l'ADN et de l'ARN et dont le génome fait 1,2 Mégabases. De plus, la taille de ses virions est comparable à celle de microorganismes tels que les mycoplasmes (Forterre 2010b, Forterre 2017, Raoult *et al* 2004, Raoult and Forterre 2008). Ce virus particulier peut être lui-même infecté par le virophage Sputnik, décrit **en 2008**, qui ne peut produire de virions qu'en collaboration avec l'amibe (La Scola *et al* 2008). Ces deux virus remettent en cause la plupart des caractéristiques décrites dans la définition de Lwoff (Figure 3).

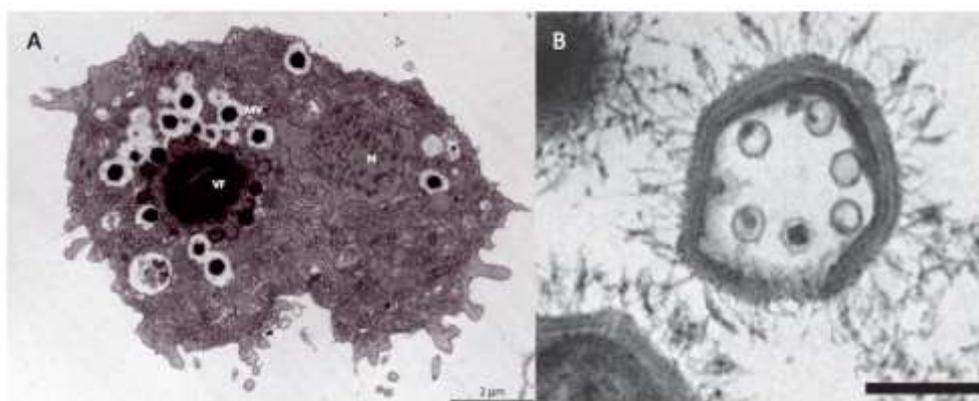


Figure 3: Photographies en microscopie électronique en transmission de A: Mimivirus au sein de son hôte *Acanthamoeba polyphaga* et B: Sputnik dans une capsid virale de Mimivirus (barre d'échelle = 200 nm) (La Scola *et al* 2008, Raoult and Forterre 2008).

Un autre exemple particulier qui élargit la définition donnée par Lwoff (Häring *et al* 2005c) est la description du virus ATV (*Acidianus* two-tailed virus) qui infecte l'archée hyperthermophile *Acidianus convivator*. Les particules virales d'ATV sont en forme de citron. Les virions sont capables de changer de morphologie indépendamment de l'hôte. En effet, les virions d'ATV développent deux queues, une à chaque extrémité du fuseau central, une fois libérés dans leur environnement chaud et acide. En fonction de la température d'incubation des virions purifiés, ce phénomène peut prendre plusieurs jours (incubation à 75 °C) ou à peine une heure (incubation à 85-90 °C = optimum de température de croissance de l'hôte) (Figure 4).

Introduction générale

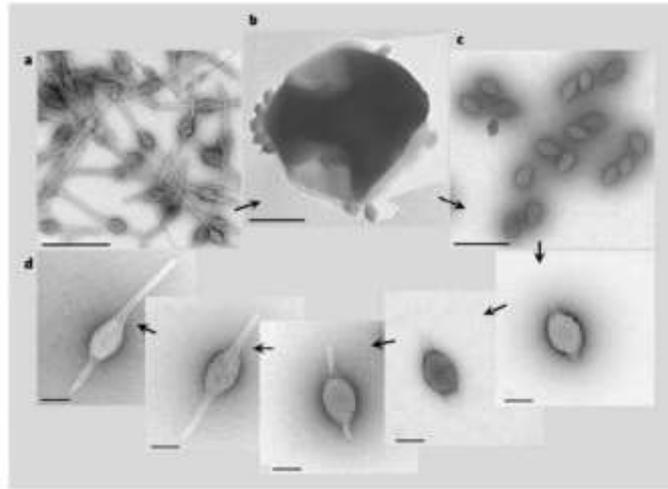


Figure 4: Photographies en microscopie électronique en transmission du virus ATV et de son hôte *Acidianus convivator*. a : Virions d'un échantillon prélevé d'une source chaude acide en Italie (Pozzuoli) b et c : Virions produits par *A. convivator* d : Virions après purification et incubation à 75 °C pendant 0, 2, 5, 6 et 7 jours (de droite à gauche). Barre d'échelle de a - c : 0,5 µm et d : 0,1 µm (Häring *et al* 2005c).

Les virus sont encore actuellement communément décrits comme de petites particules constituées d'un acide nucléique, support de l'information génétique virale, protégé par une structure protéique, exclusive aux virus, appelée capsid. Une enveloppe lipidique issue de la cellule hôte entoure parfois le virus. Ce sont des parasites intracellulaires qui détournent la machinerie de leur hôte pour se répliquer, se multiplier et se propager dans l'environnement. L'absence de ribosomes parmi leurs constituants est la raison pour laquelle les virus ne sont pas considérés comme des organismes vivants. Cependant, cette définition est en perpétuelle mutation et fortement sujette à débat.

L'arbre du vivant se compose actuellement de trois domaines : les archées, les bactéries et les eucaryotes. Les virus ne font pas partie de cette classification du vivant. Cet arbre découle des découvertes de Carl Woese et de ses travaux sur les ARN ribosomiques qui ont permis cette ramification à trois branches à partir d'un ancêtre commun. Didier Raoult et Patrick Forterre proposent, en 2008, une classification qui prendrait en compte les virus comme organismes vivants. Pour cela, les organismes vivants seraient divisés en deux grands groupes: les organismes codant pour des ribosomes (REOs = ribosome-encoding organisms) et les organismes codant pour des capsides (CEOs = Capsid-encoding organisms) (Figure 5). Une nouvelle définition du virus serait donc : un virus est un organisme codant pour une capsid (CEO) qui est composée de protéines et protège l'acide nucléique, et qui utilise un organisme codant pour des ribosomes (REO) pour accomplir son cycle de vie (Raoult and Forterre 2008).

Introduction générale

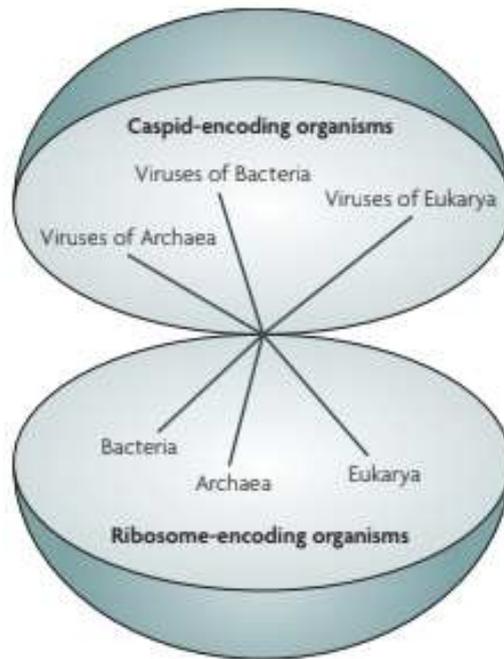


Figure 5: Proposition de classification du vivant incluant les virus et divisant les organismes vivants en deux catégories: organismes codant pour des ribosomes et organismes codant pour des capsides (Raoult and Forterre 2008).

Au-delà de la définition du virus, c'est la définition de la vie qui est discutée. Patrick Forterre donne un point de vue scientifique et philosophique à cette question (Forterre 2010a). Arguant que les virions (ou particules virales) sont confondus avec les virus (le terme générique), il propose notamment le concept de virocell. Les virus pourraient être de stricts parasites de leur hôte, la ribocell qui deviendrait, une fois infectée, une virocell produisant des virions. Les virions représentent alors les particules protectrices du génome viral pendant la phase extracellulaire, permettant l'infection de nouveaux hôtes (Figure 6). Les virus pourraient également développer une sorte de symbiose plus ou moins longue avec leur hôte qui serait alors une ribovirocell produisant des virions et pouvant également se diviser (Figure 7) (Forterre 2011, Forterre 2016, Forterre and Raoult 2017). Ce concept de virocell a également servi à la proposition, par Rosenwasser et son équipe en 2016, d'un état métabolique propre à cette virocell. Les virus, en codant pour des gènes auxiliaires du métabolisme, confèrent de nouvelles capacités métaboliques à l'hôte ou encore sont capable de détourner le métabolisme de l'hôte (Rosenwasser *et al* 2016).

Introduction générale

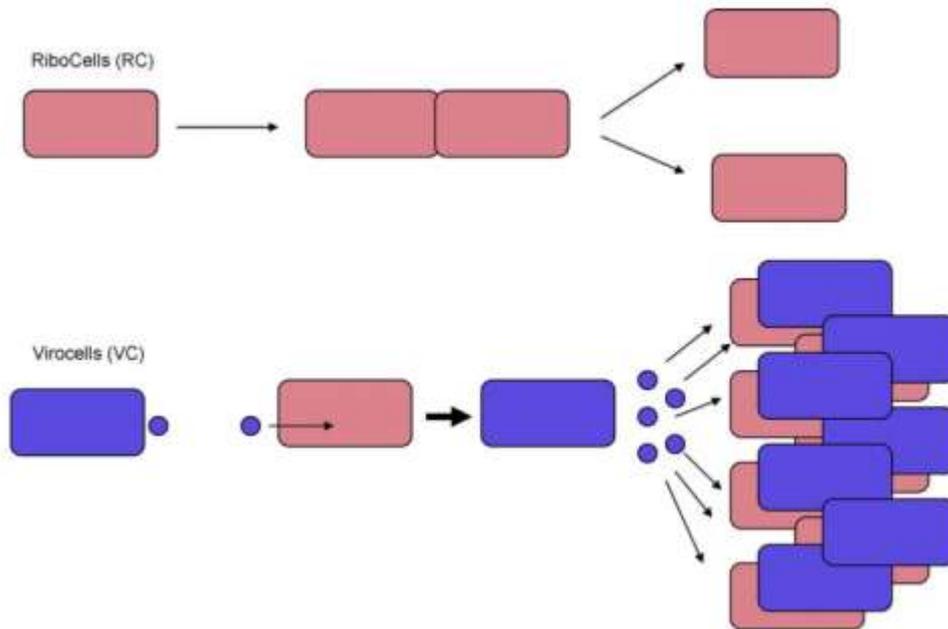


Figure 6: Ribocells et virocells: les ribocells sont des organismes codant pour des ribosomes et qui se reproduisent par divisions cellulaires. Les virocells sont des organismes codant pour des capsides et qui sont des parasites obligatoires des ribocells. Les virocells produisent des virions qui transportent leur matériel génétique et qui infectent de nouvelles ribocells (Forterre 2011).

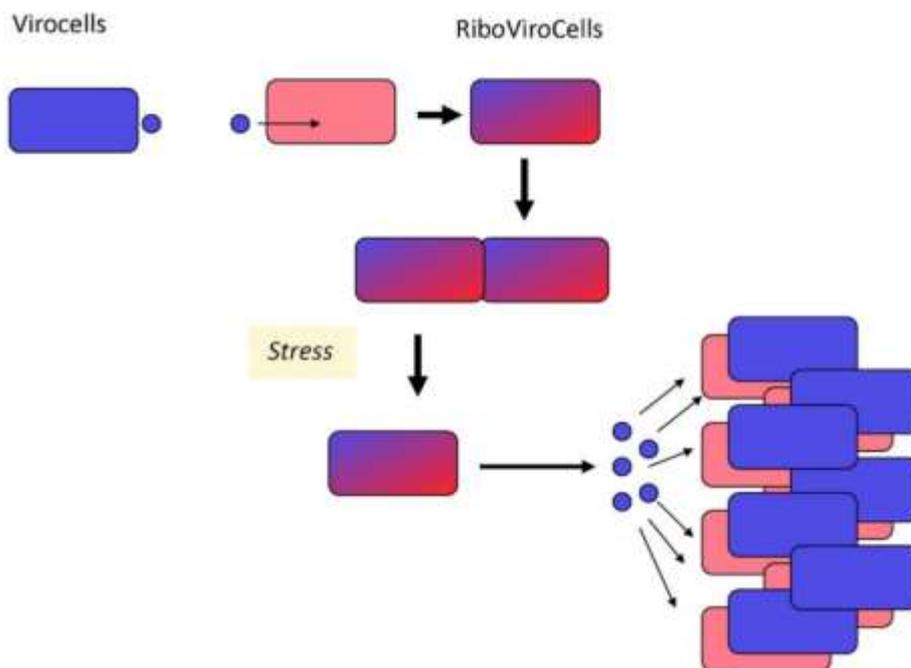


Figure 7: Ribovirocells: Une virocell qui infecte une ribocell peut entraîner un état de lysogénie où les génomes de la cellule et du virus cohabitent dans la même cellule qui est la ribovirocell. En cas de stress, le virus active son cycle de reproduction et induit la lyse de la ribocell pour repasser en phase virocell (Forterre 2011).

2. Classification

L'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), fondée en 1966, est en charge de la classification des virus (Adams et al 2017a). A noter que cette classification inclut les virus satellites, les viroïdes et les prions. L'ICTV introduit le concept d'espèce virale comme étant « une classe polythétique de virus qui constitue une lignée qui se réplique et qui occupe une niche écologique particulière ». Le rang d'espèce est le niveau taxonomique le plus bas dans la hiérarchie approuvée par l'ICTV. « Une espèce est un groupe monophylétique de virus dont les propriétés peuvent être distinguées de celles d'autres espèces par plusieurs critères » (Adams et al 2017b).

Cette classification au rang d'espèce repose donc sur le partage de propriétés communes entre différents membres et non sur la base d'une propriété particulière partagée par tous les membres de l'espèce. Ces propriétés doivent différer de celles d'autres espèces. Elles regroupent la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN), le nombre de brin de celui-ci (simple ou double brin), la taille du virus, la symétrie de la capsidie et la présence d'une enveloppe entourant la capsidie virale. La classification des virus est un challenge et l'ICTV a dû, en 50 ans, s'adapter et tenter d'uniformiser la taxonomie et la nomenclature des virus. L'addition récente du premier phylum viral des *Negarnaviricota* pour les virus à ARN simple brin à enroulement négatif est un grand pas pour la classification des virus (Kuhn et al 2019).

L'ICTV regroupe 5560 virus classés (selon la liste téléchargeable depuis juin 2019 ; (Walker et al 2019)) et parmi ces virus, environ 80 sont des virus d'archées. La très grande majorité des virus recensés présentent une morphologie binaire tête-queue et appartiennent à l'ordre *Caudovirales* qui regroupe 5 familles de virus : *Siphoviridae*, *Myoviridae* et *Podoviridae*, *Ackermannviridae* et *Herelleviridae* (Ackermann and Prangishvili 2012). Les virus d'archées présentent des morphologies souvent originales et plus diverses que celles retrouvées chez les virus de bactéries (Ackermann 2007, Prangishvili 2003). C'est aussi le cas de leur contenu génétique avec environ 75 % de leurs gènes codant pour des protéines qui ne trouvent pas de correspondance dans les banques de données publiques (Krupovic et al 2018).

3. Interactions hôte-virus

Entre l'hôte et le virus, c'est souvent la course à l'armement. Chacun doit se maintenir et adopter des stratégies de survie. Parfois cette bataille se transforme en coopération lorsque la stratégie de survie se révèle bénéfique pour les deux acteurs.

a. Les cycles viraux

i. Généralités

Il existe, classiquement, trois types de cycles viraux : **cycle lytique**, **cycle lysogénique** et **chronique**. Ces différents cycles comportent un certains nombres d'étapes caractéristiques (Figure 8). Le cycle viral va avoir un effet important sur la croissance de l'hôte infecté, et être ainsi impliqué dans la régulation des populations microbiennes.

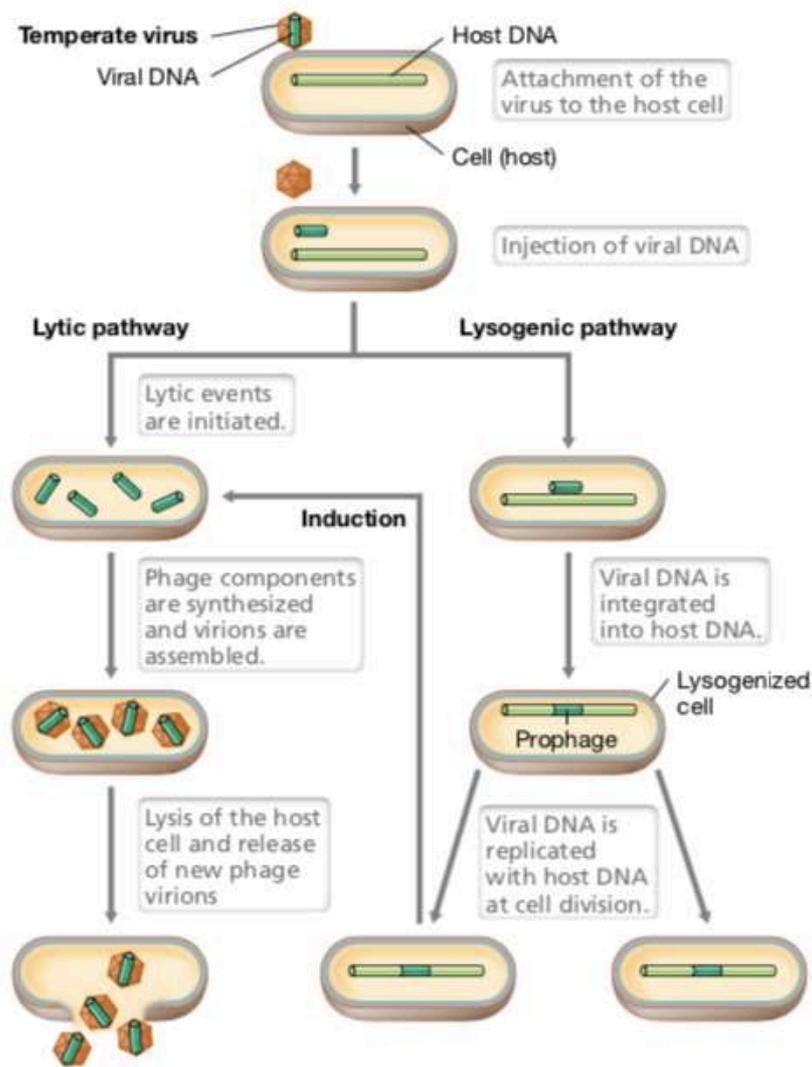


Figure 8: Cycles lytique et lysogénique (Madigan et al 2010).

Introduction générale

Lors d'un **cycle lytique**, le virus qui se multiplie pour se propager est dit virulent. La première étape est l'adsorption du virus, le virus s'attache à un récepteur cellulaire et l'ADN viral est injecté dans cette cellule. Puis, en détournant la machinerie cellulaire, les gènes viraux sont exprimés, l'ADN viral est répliqué et les composants viraux synthétisés. Les virions sont assemblés et la lyse de l'hôte est déclenchée. Les virions sont libérés dans l'environnement et vont infecter d'autres cellules pour reproduire ce même cycle.

Lors d'un **cycle lysogénique**, le virus qui se maintient au sein de son hôte pour se répliquer de cellule mère en cellule fille est dit tempéré. Le génome viral est intégré au chromosome de la cellule hôte en des sites spécifiques ou plus rarement libre sous une forme linéaire ou circulaire. Ainsi, l'ADN viral est répliqué lorsque la cellule se divise et réplique son propre ADN. Le virus se propage de cellule mère en cellule fille sous forme de provirus intégré. Un virus en cycle lysogénique peut entrer en cycle lytique par induction. La plupart du temps, lorsque son hôte subit un stress (carence nutritive, exposition à des antibiotiques, changements des propriétés de l'environnement de l'hôte), le provirus est excisé du chromosome et le virus va entrer en phase lytique. Les virions ainsi libérés vont pouvoir chercher un nouvel hôte à infecter pour se maintenir (Erez *et al* 2017).

L'état chronique est un état d'équilibre entre la production virale et la croissance cellulaire sans provirus intégré et sans lyse de l'hôte. La production virale ne peut être induite. Les virions produits sont libérés continuellement par bourgeonnement de la cellule (Weinbauer 2004).

La **pseudolysogénie** (Figure 9) est une relation hôte-virus plus particulière qui peut être définie comme un état latent et stable du génome viral. Celui-ci n'est pas intégré au génome de son hôte et n'est donc pas répliqué lors des divisions cellulaires. Il n'est pas non plus multiplié au sein de l'hôte à la manière d'un cycle lytique. Ce phénomène peut être observé lorsque les conditions environnementales ne sont pas favorables pour l'hôte. Une véritable lysogénie ou un cycle lytique peuvent être initiés lorsque les conditions s'améliorent (Feiner *et al* 2015, Los and Wegrzyn 2012). La pseudolysogénie laisse entrevoir des relations hôte-virus moins classiques que les cycles généralement décrits. Les relations hôte-virus dans la nature semblent répondre à des stratégies de survie qui peuvent être variées.

Introduction générale

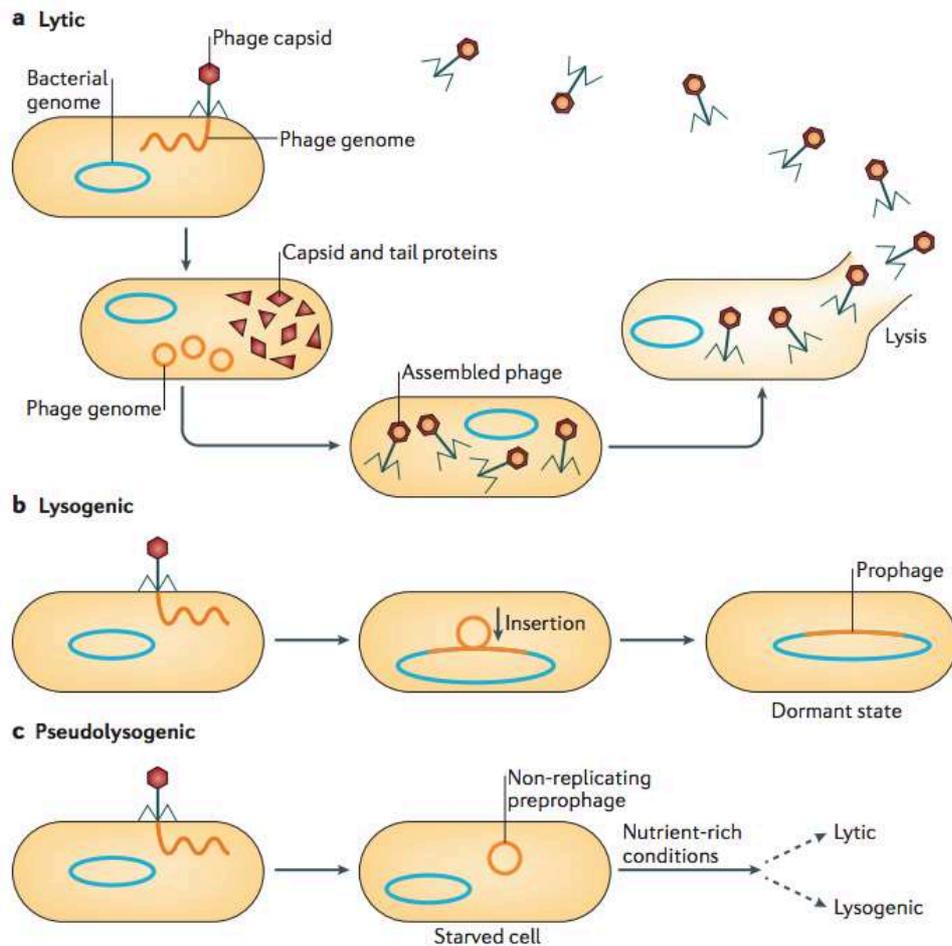


Figure 9: Description des cycles viraux classiques incluant la pseudolysogénie (Feiner *et al* 2015).

ii. Stratégies d'infection et régulation du cycle viral

Lyse ou lysogénie ?

Le choix du mode d'infection (**lytique** ou **lysogénique**) des virus tempérés dépend de plusieurs facteurs. Un des facteurs majeurs qui dirige le mode d'infection des virus est la densité cellulaire.

Ce constat est très souvent observé pour ce qui est des virus en **cycle lytique**. Le modèle « **Killing the winner** » qui s'applique à des infections de type lytique prédit que l'infection virale est dépendante de la densité cellulaire et de la fréquence de rencontres entre le virus et son hôte. Ainsi, les virus virulents vont s'attaquer préférentiellement à des hôtes prédominants, à croissance rapide, et bien adaptés à leur environnement. Le résultat de cette stratégie est l'augmentation de la diversité cellulaire puisque les microorganismes

Introduction générale

prédominants sont régulés par les infections virulentes. Ainsi, d'autres populations microbiennes moins compétitives peuvent se développer et occuper la niche écologique (Sime-Ngando 2014, Thingstad and Lignell 1997).

Si certains virus semblent être des tueurs efficaces, un équilibre doit cependant être respecté. Ils ont besoin de leurs hôtes pour se maintenir, donc une efficacité trop forte dans l'infection peut entraîner la disparition de l'hôte et le virus sera condamné à disparaître (Knowles *et al* 2016, Thingstad and Bratbak 2016). De plus, les interactions entre l'hôte et son virus dans le cas d'un cycle lytique semblent également influencées par d'autres facteurs que la densité cellulaire, comme par exemple les conditions physico-chimiques de l'environnement. En étudiant le genre *Micromonas* et les virus associés, il a été observé que la température de l'environnement de l'hôte conduisait les virus à modifier leur stratégie d'infection (Demory *et al* 2017). Ainsi, il a été montré que pour ces virus d'algues, une augmentation de température de l'ordre du degré, conduit à un changement de stratégie de réplication virale : de lytique à chronique, voire même au développement d'une résistance de l'hôte à l'infection virale.

De nombreuses études d'induction tendent à montrer que **la lysogénie** est plus fréquente lorsque l'hôte se trouve en faible densité. Ainsi, le passage de la lysogénie au cycle lytique peut s'observer lors d'un stress de l'hôte ou lorsque la population d'hôtes augmente. Cependant le cycle lysogénique ne répond pas de façon aussi claire à la densité de son hôte et plusieurs stratégies d'infection peuvent être observées.

Knowles *et al* en 2016, proposent la stratégie « **Piggyback the winner** » (traduit par « sur les épaules du gagnant ») pour les infections de type lysogénique. Dans leur étude, ils observent un ratio virus par cellule plus bas lorsque l'hôte est en très forte densité. Au niveau des récifs coralliens étudiés, lors de l'augmentation de la population microbienne, c'est le passage du cycle lytique à lysogénique qui s'observe au niveau de la population virale contrairement à ce qui pouvait être attendu. Une des observations attestant ce constat est l'augmentation de la présence de gènes marqueurs de la lysogénie en corrélation avec l'augmentation de l'abondance des microorganismes. Ainsi, si la théorie « Killing the winner » n'est pas exclue jusqu'à une certaine densité, cette nouvelle théorie « Piggyback the winner » prendrait le relais lorsque la population microbienne atteint une densité très élevée. La lysogénie deviendrait alors un avantage pour les cellules. Le provirus intégré à son hôte

Introduction générale

permet l'acquisition d'une immunité face à ce type de virus et peut apporter de nouvelles fonctions et capacités améliorant l'adaptation de l'hôte. Weitz et son équipe ont cependant remis en cause cette théorie rapidement. Selon eux, plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour comprendre les relations hôte-virus et pas seulement les densités cellulaire et virale. Ces paramètres sont : la stabilité du virion dans le milieu (« viral decay »), la quantité de virions relargués (« burst size ») et le taux d'adsorption des virions. S'ils sont d'accord sur l'observation selon laquelle le ratio virus par cellule décline avec une augmentation de la population microbienne, ils ne sont pas d'accord avec la conclusion selon laquelle cette observation est due à une augmentation systématique de la lysogénie (Weitz *et al* 2016).

Les virus peuvent adopter des stratégies basées sur la communication pour décider entre **lysogénie et lyse**. En effet, des phages du groupe SPbeta (genre viral au sein des *caudovirus* classé dans la famille *Siphoviridae*) utilisent des peptides de communication pour entrer soit en cycle lytique, soit en cycle lysogénique. Notamment, Le phage phiT3 qui infecte un *Bacillus* produit un peptide nommé arbitrium qui permet aux autres virus de déterminer la stratégie d'infection à adopter (Figure 10). Le but premier d'un virion est d'infecter un hôte potentiel. Lorsque le virion rencontre son hôte et que l'hôte est abondant, un cycle lytique est préférable pour le virus qui peut se propager abondamment et infecter de nombreuses cellules. Plus tard, la dynamique d'infection n'est plus la même. La lyse cellulaire a réduit la population d'hôtes et il est donc préférable à ce stade de l'infection que le virus entre en lysogénie pour se maintenir. La population de cellules se renouvelle et ainsi le nombre d'hôtes potentiels aussi. Phi3T, en produisant la molécule « *arbitrium* », permet aux virions libres de déterminer le nombre d'infections qui ont déjà eu lieu au sein de la population cellulaire. Les virions peuvent ainsi déterminer dans quelle phase de l'infection la population cellulaire se trouve et décider d'infecter une cellule de façon lytique ou lysogénique. Cette communication basée sur des peptides est déjà connue pour les plasmides conjugatifs pour réguler les transferts horizontaux de plasmides chez les bacilles et entérocoques (Erez *et al* 2017).

Introduction générale

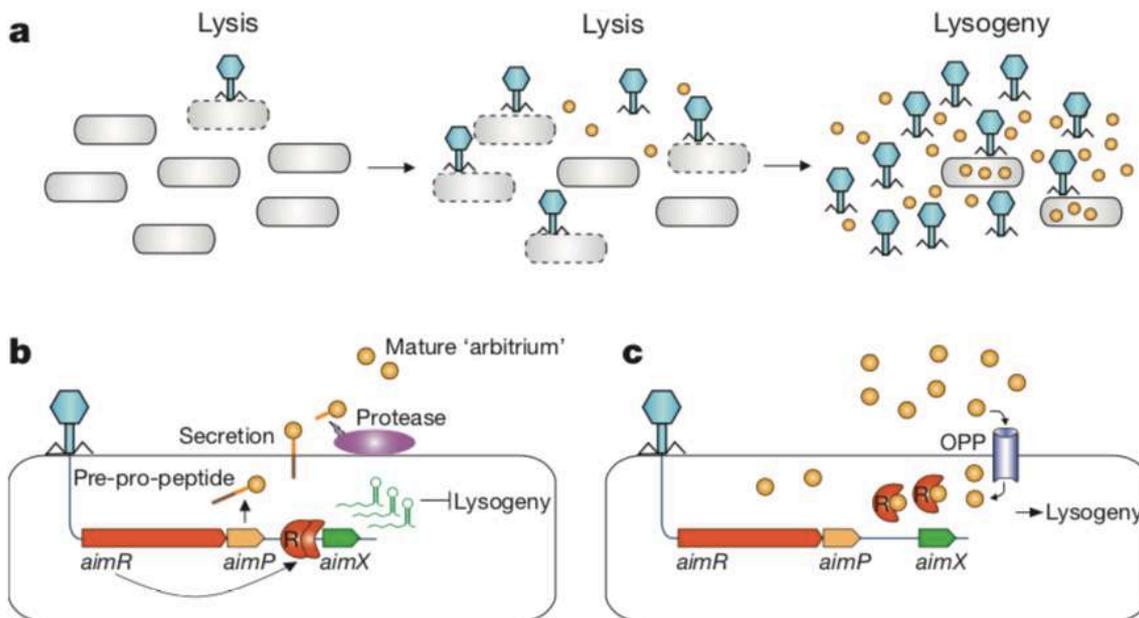


Figure 10: Modèle de décision de lyse-lysogénie basé sur la communication entre virus. a : Dynamique de l'accumulation d'arbitrium lors de l'infection d'une culture bactérienne par un phage. b : Première rencontre du phage avec une population bactérienne, les gènes *aimR* et *aimP* sont exprimés suite à l'infection. AimR, en tant que dimère, active l'expression de AimX qui est un inhibiteur de la lysogénie (éventuellement sous la forme d'un ARN régulateur non-codant) dirigeant le phage vers un cycle lytique. AimP est également exprimé, sécrété et traité de manière extracellulaire pour produire le peptide mature « arbitrium ». c : Plus tard durant l'infection, le peptide arbitrium s'accumule dans le milieu et est internalisé dans la bactérie par le transporteur OPP. Lorsque le phage infecte la bactérie, le récepteur AimR exprimé se lie aux molécules d'arbitrium et ne peut pas activer l'expression de AimX, ce qui permet l'entrée en cycle lysogénique (Erez *et al* 2017).

Différents modes d'infection et impacts de la lysogénie

Si le choix entre **lysogénie** et **cycle lytique** semble résulter de divers facteurs, le déroulement du cycle lysogénique peut s'avérer tout aussi complexe. La lysogénie la plus couramment décrite implique l'intégration d'un provirus au sein de génome de l'hôte et la possibilité que le virus entre en cycle lytique, sous l'effet d'un stress, entraînant une mortalité cellulaire. D'autres modes d'infection lysogénique sont possibles avec des effets divers sur la population d'hôtes infectés. La Figure 11 regroupe différents types de lysogénie tels que l'induction spontanée, la conversion lysogénique, la polylysogénie (*Cf. Implications des virus dans les transferts horizontaux de gènes p. 50*). Des phénomènes de lysogénie active ont également été rapportés. Ces différents modes d'infection laissent entrevoir la diversité des relations hôte-virus dans la nature (Feiner *et al* 2015, Howard-Varona *et al* 2017).

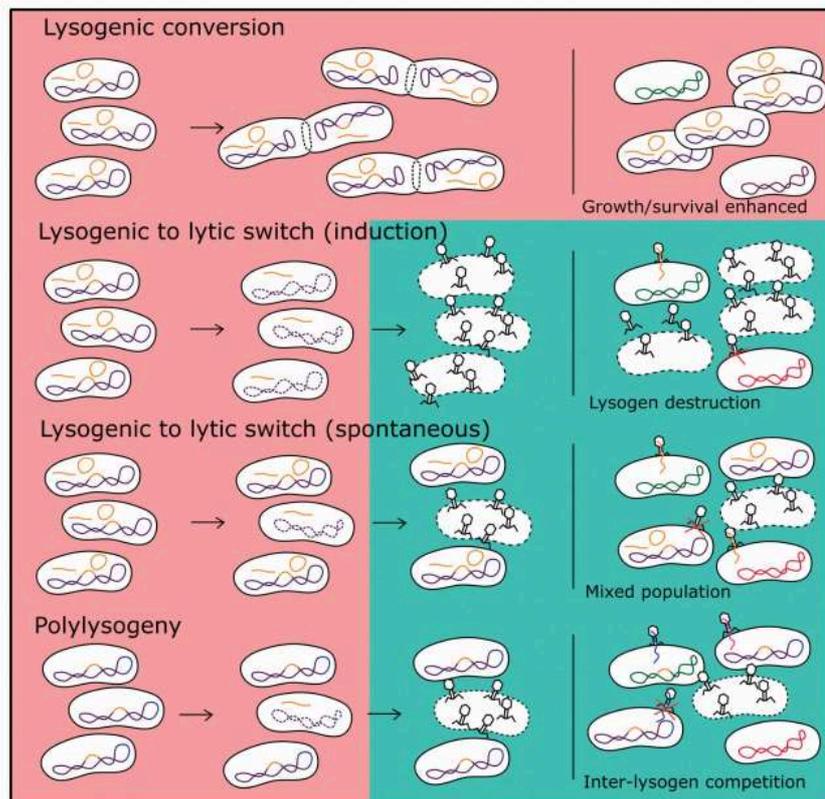


Figure 11: Différents modes d'infections de type lysogénique et leurs effets sur la population microbienne infectée. La conversion lysogénique est caractérisée par des effets sur le phénotype de l'hôte qui porte un provirus. Le passage du cycle lysogénique au cycle lytique modifie la structure de la communauté microbienne en créant une population cellulaire mixte dans laquelle certains lysogènes sont éliminés par lyse tandis que les virions libérés peuvent infecter de nouvelles cellules. La polylysogénie se produit lorsqu'une cellule possède plusieurs provirus (Howard-Varona *et al* 2017).

L'induction spontanée est l'excision du provirus intégré au chromosome de l'hôte qui n'a pas été déclenchée par un élément extérieur stressant. Cette induction spontanée est souvent accompagnée d'une lyse cellulaire d'une partie de la population microbienne infectée. Ainsi, un petit pourcentage de cellules est perdu dans la population microbienne, ce qui semble être un désavantage pour l'hôte. Ces événements conduisent à un état non homogène de la population cellulaire avec des cellules lysogènes portant un provirus et des cellules produisant des virions qui vont être lysées (Figure 11).

Une induction spontanée pourrait être le résultat d'une activation du système SOS de l'hôte. La levée de la répression du système SOS de l'hôte peut être due à des événements cellulaires classiques comme par exemple lors de la réplication de l'ADN qui ne se fait pas toujours correctement. Ces événements cellulaires s'ajoutent aux facteurs externes de stress. Une autre hypothèse serait la différence d'expression de gènes entre individus d'une même population microbienne notamment via l'expression ou non de répresseurs viraux (Figure 12). L'induction spontanée qui semble délétère pour l'hôte, puisqu'elle induit une mortalité

Introduction générale

cellulaire, peut se révéler bénéfique pour l'adaptation d'une partie de la population microbienne (Bondy-Denomy and Davidson 2014). En effet, des effets possibles de l'induction spontanée de provirus sont : la formation de biofilm favorisée, l'augmentation de la pathogénicité ou encore les transferts horizontaux de gènes (Figure 13). Ce phénomène, de population mixte, peut être bénéfique pour le virus également en favorisant la dispersion de virions et la survie d'hôtes lysogènes (Nanda *et al* 2015).

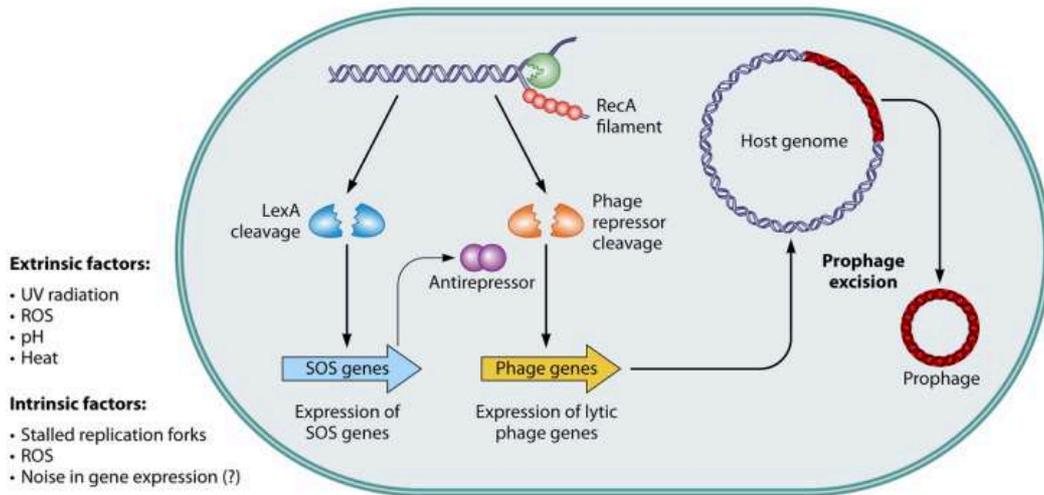


Figure 12: Un exemple d'induction spontanée dépendant du système SOS de l'hôte. Des facteurs intrinsèques et extrinsèques jouent un rôle sur l'état de l'ADN en induisant des dommages ou des blocages des polymérase laissant apparaître de l'ADN simple brin lié à des protéines RecA. Ce filament de nucléoprotéine déclenche le clivage de LexA ce qui conduit à l'expression des gènes SOS. Ainsi, la croissance cellulaire est inhibée et la réparation de l'ADN débute. Une autre voie consiste en l'inactivation de répresseurs des gènes viraux qui permet l'expression de gènes lytiques qui engendrent l'excision du prophage du génome de l'hôte, son empaquetage et sa libération de la cellule par lyse de celle-ci sous forme de virion (Nanda *et al* 2015).

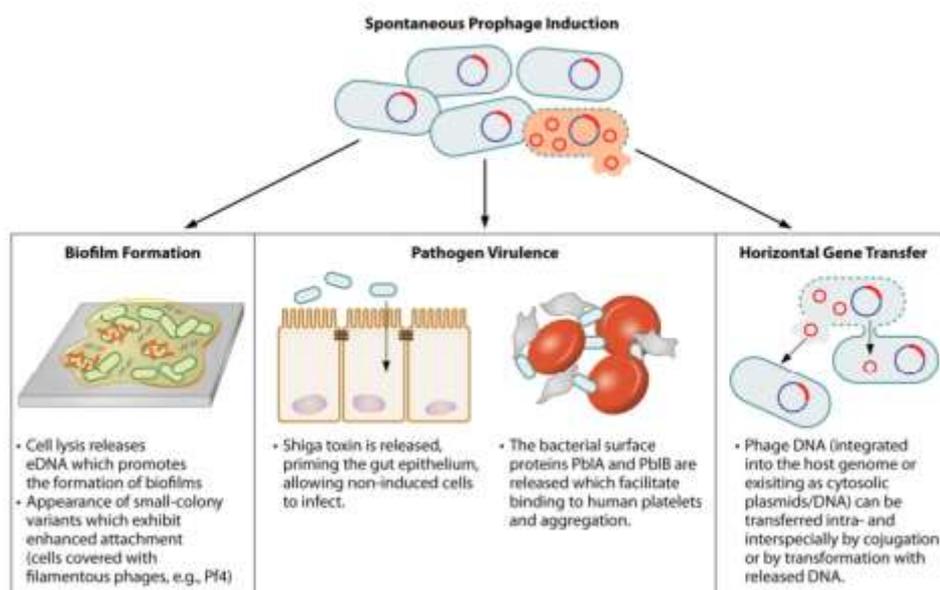


Figure 13: Différents impacts possibles d'une induction virale spontanée sur la physiologie de son hôte (Nanda *et al* 2015).

Introduction générale

La relation entre l'hôte et son virus se révèle parfois être une **coopération positive**. Lors de relations de type lysogénie, les étapes d'intégration et d'excision du génome viral sont des étapes clés. Lors de cette excision, des gènes de l'hôte peuvent être emportés (transduction spécialisée) ou des gènes viraux peuvent rester dans le génome de l'hôte. En infectant de nouvelles cellules, le virus transducteur peut transmettre de nouveaux gènes et de nouvelles capacités à son hôte. Lors d'une lysogénie classique, ce constat résulte le plus souvent d'événements spontanés. Dans le cas de la lysogénie active, l'intégration et l'excision du génome viral sont des événements cruciaux et qui se déroulent de façon très précise.

En effet, dans une relation hôte-virus de type **lysogénie active**, le provirus intégré sert de régulateur de l'expression de gènes de l'hôte. Le provirus est inséré au niveau d'un cadre de lecture ouvert (ORF) ou dans une région régulatrice adjacente de cet ORF qui possède une fonction cruciale pour la cellule. Placé à cet endroit précis du chromosome de l'hôte, le provirus désactive l'expression du gène concerné. Son excision, précise, restaure l'expression du gène. Cette excision peut être induite dans des conditions où l'expression du gène est nécessaire. Dans ce cas, il est question d'une lysogénie active réversible équivalente à un mécanisme « on-off » complet de régulation de gènes où le provirus peut être alternativement excisé et réintégré. Le virus est maintenu dans la cellule comme un épisome et ne peut pas être soumis à une production lytique même lorsqu'il est excisé. Lors d'une lysogénie active non réversible, le provirus excisé est perdu par la cellule et donc le gène n'est plus régulé de cette manière (Figure 14). La lysogénie active réversible est notamment observée chez *Listeria monocytogenes* qui est rendue plus pathogène avec ce système puisqu'elle peut échapper au phagosome de son hôte. Autre exemple, chez *Streptococcus pyogenes* dont le virus SpyCIM1 régule le système de réparation des mésappariements lors de la réplication du chromosome bactérien (Feiner *et al* 2015).

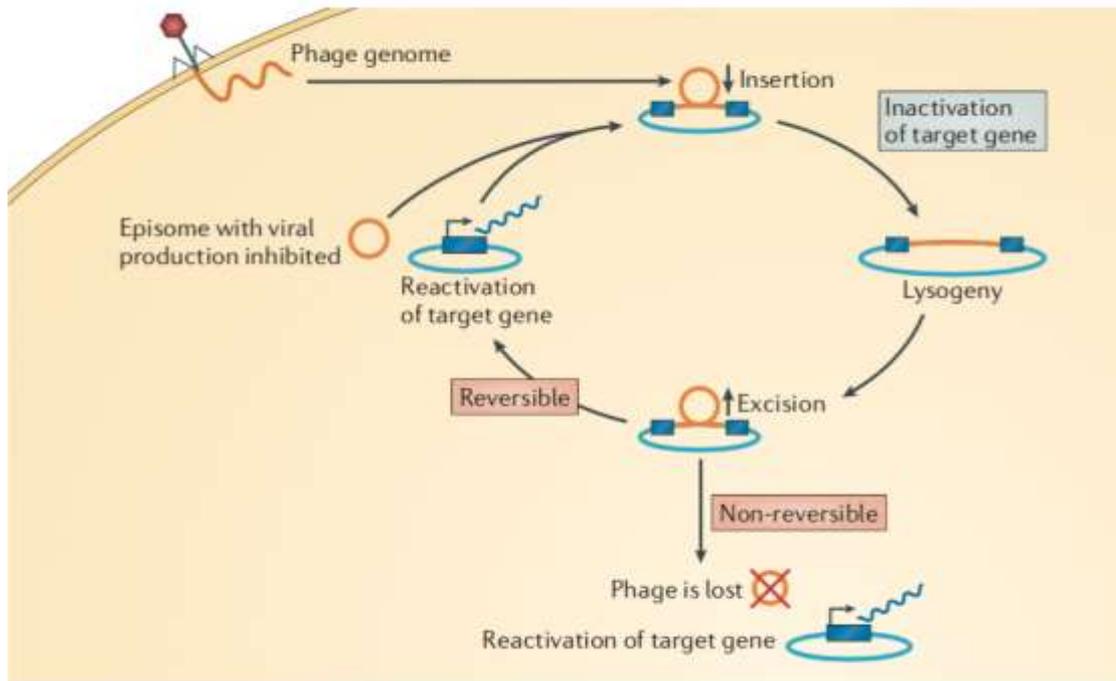


Figure 14: Schéma représentatif du déroulement de la lysogénie active réversible ou non (Feiner *et al* 2015).

b. Les systèmes de défense de l'hôte

L'hypothèse de la reine rouge proposée par Van Valen (Van Valen 1977) est basée sur cette citation du livre de Lewis Carroll (« *Through the looking-glass* »), lorsque la reine rouge dit à Alice : « Ici il faut courir pour rester à la même place. Pour aller quelque part, il faudrait courir deux fois plus vite. ». En effet, dans le cadre d'une coévolution et plus particulièrement dans les relations proies-prédateurs, cette hypothèse montre parfaitement l'importance pour chacun de se maintenir en s'adaptant rapidement tout en faisant face à l'évolution de l'autre encore plus rapidement. La métaphore de la course à l'armement est plus communément adoptée dans les relations hôte-virus car les mécanismes mis en place reposent sur des systèmes d'attaque et de défense.

La mise en place de divers systèmes de défense par l'hôte résulte donc d'une constante évolution des cellules et des virus. Ces systèmes de défense complexes sont l'immunité innée (avec les protéines argonautes par exemple) ou adaptative (CRISPR-Cas), l'induction de l'état de dormance des cellules infectées ou encore la mort programmée des cellules (Figure 15) (Koonin *et al* 2017a, van Houte *et al* 2016). Les trois grandes catégories de mécanismes de défense utilisés par l'hôte pour résister aux infections sont :

Introduction générale

- La résistance à l'infection *via* la variation des récepteurs viraux,
- L'immunité de l'hôte (innée ou acquise) : basée sur la reconnaissance de l'ADN exogène,
- L'état de dormance et la mort programmée des cellules.

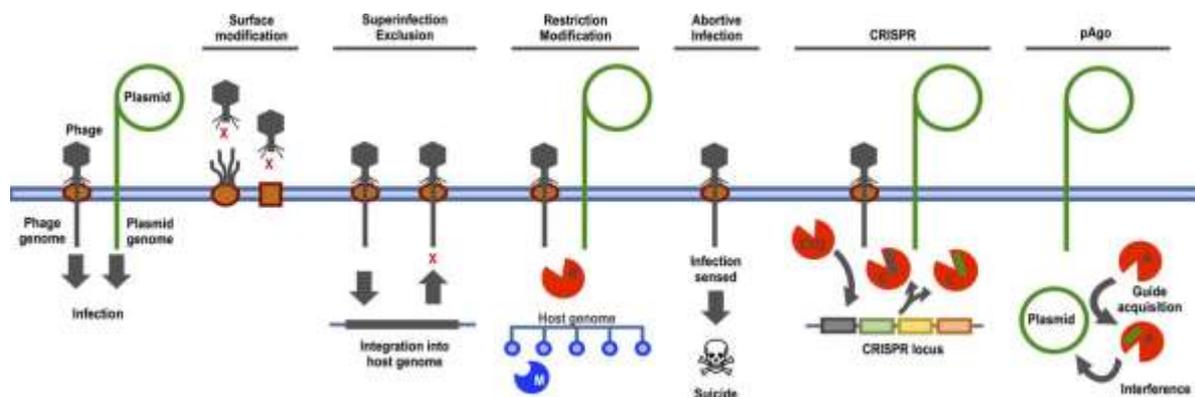


Figure 15: Différents systèmes de défense contre les attaques virales et plasmidiques observées chez des cellules bactériennes (van Houte *et al* 2016).

i. Immunité de l'hôte

L'exemple de la restriction modification (RM) – immunité innée

Les **systèmes RM** ont été les premiers mécanismes de défense découverts et étudiés. Ils sont classés en 4 types en fonction de la composition de leurs sous-unités, de leurs besoins en ATP, leurs sites de reconnaissance et de leurs mécanismes de clivage. Le fonctionnement général de ces modules repose sur la méthylation à l'aide d'une méthyltransférase (MTase) pour marquer et protéger l'ADN génomique et le clivage de l'ADN exogène non méthylié à l'aide d'une enzyme de restriction de type endonucléase (REase).

Le système Pgl et le système BREX – immunité innée

Le **système Pgl** (Phage growth limitation) est observable chez *Streptomyces coelicolor* A3(2) qui peut présenter les deux phénotypes Pgl⁺ et Pgl⁻ dans sa population cellulaire (Figure 16). Les souches présentant le phénotype Pgl⁺ peuvent être infectées une première fois par le virus ϕ C31. Cependant, les virions relargués suite à cette infection sont modifiés et pourront de moins en moins infecter les souches Pgl⁺ au fur et à mesure des infections. Les souches Pgl⁺ possèderaient une fonction de modification ciblant le virus au niveau de l'ADN et qui ne serait pas létal pour celui-ci. Cette stratégie serait un avantage pour la colonie de

Introduction générale

Streptomyces. Le sacrifice de certaines cellules infectées protégerait les clones tout en permettant de produire des virions qui vont infecter les espèces concurrentes de la même niche ne possédant pas le locus Pgl (Sumbly and Smith 2002).

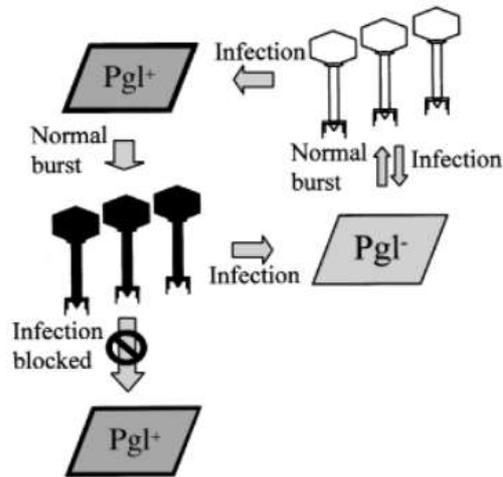


Figure 16: Le mécanisme Pgl: les cellules de *S. coelicolor* Pgl⁺ sont en gris foncé et les cellules de *S. coelicolor* Pgl⁻ sont en gris clair. Les virus non modifiés sont en blanc et les virus modifiés sont en noir (Sumbly and Smith 2002).

Le **système BREX** (BacteRiophage EXclusion) est proche du système Pgl, et notamment les gènes *pglX* et *pglZ* sont communs à ces deux mécanismes, mais repose sur une stratégie différente. En effet, le système BREX protège la cellule infectée dès la première infection par le virus en empêchant la réplication ou l'intégration du virus (Figure 17). Aucun relargage de virus n'est possible. Si l'utilisation de la méthylation *via* le gène *pglX* est impliquée, il n'y a pas de clivage de l'ADN viral. De plus, le mécanisme BREX a une résistance à une large gamme de virus contrairement au système Pgl (Barrangou and Van Der Oost 2015, Koonin *et al* 2017a).

Introduction générale

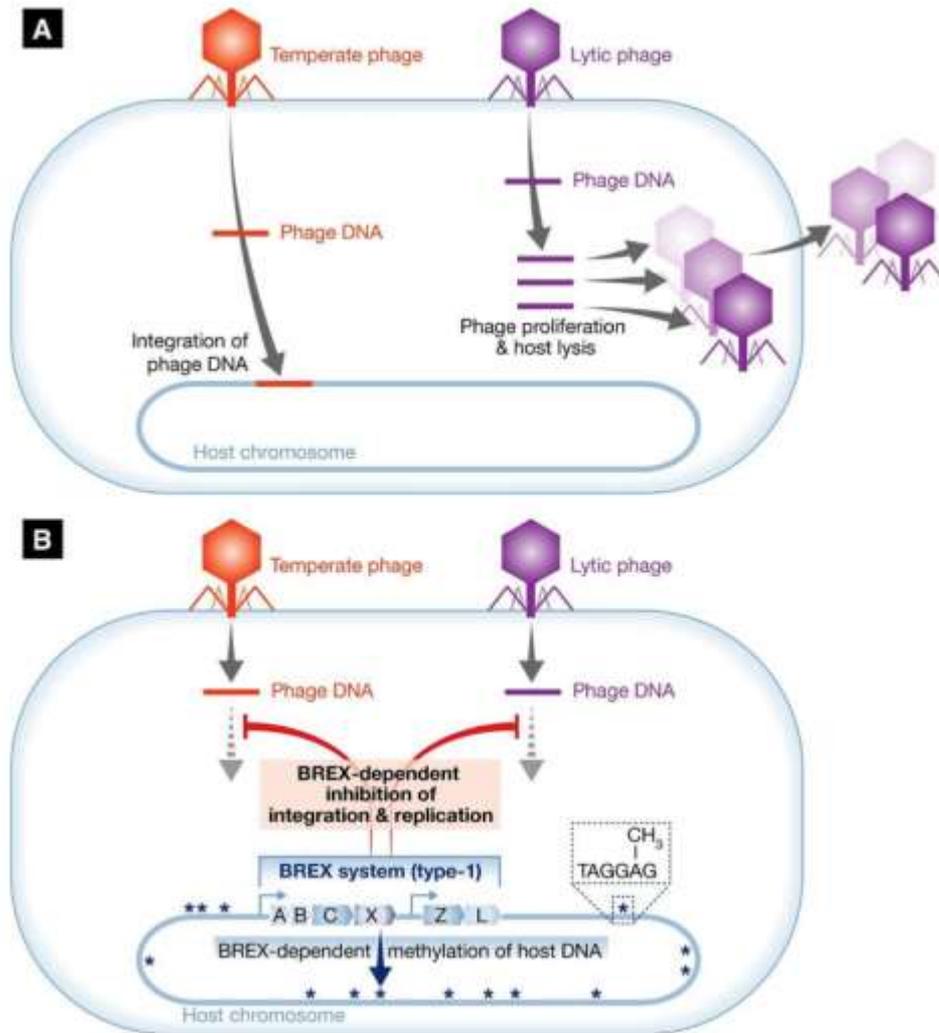


Figure 17: Mode de fonctionnement du système BREX avec en A: les cycles lysogénique et lytique classiques et en B: une cellule qui possède le système BREX et qui peut faire face à une infection par un virus tempéré ou virulent *via* la transcription du cluster BREX qui empêche la réplication ou l'intégration du virus. (Barrangou and Van Der Oost 2015).

Les protéines argonautes – immunité innée

Le système de défense centré sur les **protéines argonautes (Ago)** se base sur la reconnaissance de l'ADN endogène mais également sur la reconnaissance de l'ADN exogène à l'aide de molécules guides (ARN ou ADN), ce qui le différencie des systèmes de RM. Originellement, les protéines Ago sont décrites comme jouant un rôle clé dans la dégradation de l'ARN exogène notamment par leur capacité de clivage. Plus tard, différents modes d'action des protéines Ago ont été observés, comme la suppression de la transcription d'ARNm cibles sans clivage (Figure 18).

Introduction générale

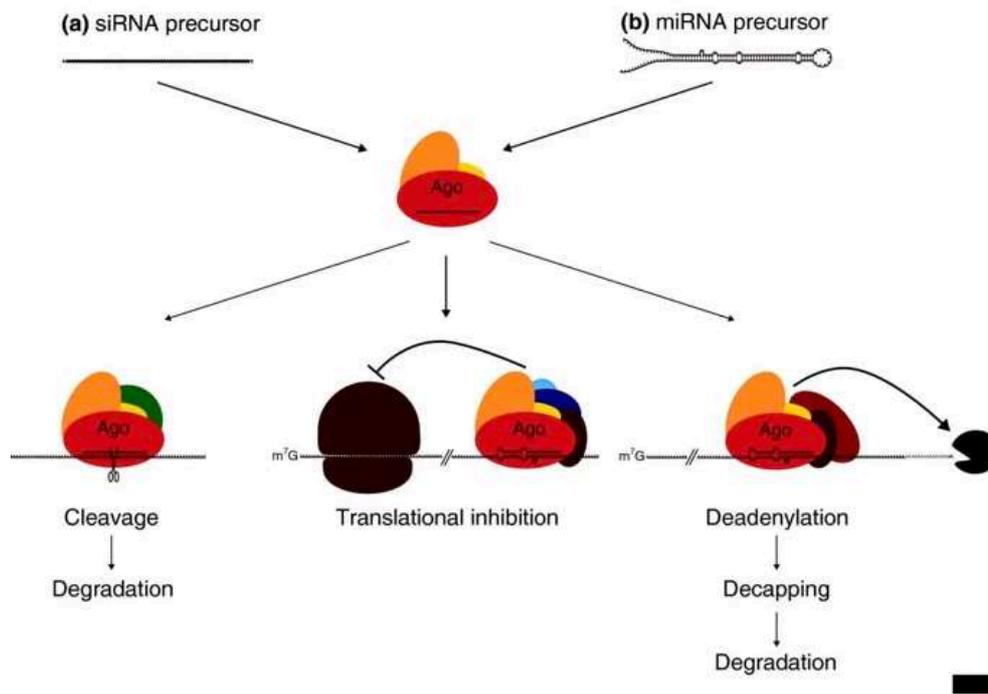


Figure 18: Modes d'action de protéines argonautes guidées par des petites molécules ARN (Höck and Meister 2008).

Ce système de reconnaissance du soi et du non-soi a été observé notamment chez *Methanocaldococcus jannaschii* qui est une archée méthanogène hyperthermophile. Dans ce cas, les protéines Ago de *M. jannaschii* (MjAgo) clivent exclusivement des substrats de type ADN à l'aide d'une molécule guide de type ADN également (observé *in vitro*). C'est aussi le cas pour les protéines Ago de *Pyrococcus furiosus* (PfAgo) et *Natronobacterium gregoryi* (NgAgo). La reconnaissance de la molécule guide est possible grâce à un groupe phosphate placé à son extrémité 5'. A l'aide du guide, la protéine Ago s'attache partiellement ou totalement à l'acide nucléique cible. Ce n'est que dans le cas d'un attachement total que la protéine clive la cible. Dans le cas de *M. jannaschii*, la protéine MjAgo n'est pas toujours dépendante du guide pour effectuer son rôle d'endonucléase. Elle est capable, sans molécule guide, de s'occuper de longs ADN doubles brins et de générer des produits de clivage qui pourront être utilisés comme guide pour une seconde étape de clivage. Cette seconde étape de clivage est plus efficace car les MjAgo ont déjà amorcé leur activité endonucléasique et, cette fois-ci, elles peuvent être guidées (Figure 19) (Zander *et al* 2017).

Introduction générale

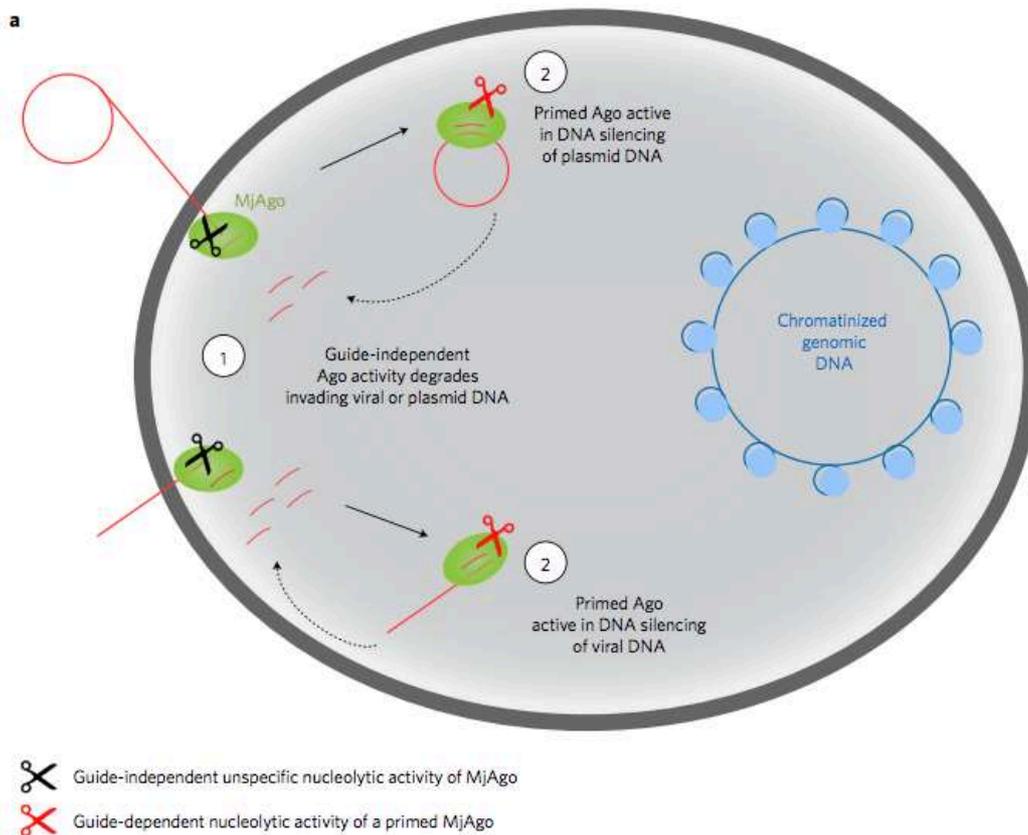


Figure 19: Modèle putatif du fonctionnement de MjAgo guide-dépendante et guide-indépendante. 1 : Des acides nucléiques exogènes envahissent la cellule (ADN viral ou plasmidique). Ces acides nucléiques sont reconnus par MjAgo et sont dégradés par celle-ci. L'ADN génomique est protégé de MjAgo grâce aux protéines histones qui maintiennent l'ADN génomique dans un état condensé. 2 : La première étape a servi d'amorce à l'activité de MjAgo, la seconde étape permet un clivage plus efficace grâce aux MjAgo amorcées. Les courts fragments d'ADN résultant du premier tour de clivage peuvent servir de guide pour diriger la dégradation lors de cette deuxième étape (Zander *et al* 2017).

Le système CRISPR-Cas – Immunité adaptative

Le **système CRISPR-Cas** (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – associated with *cas* genes ») est le mieux décrit des systèmes de défense contre les intrusions d'ADN exogène dans les cellules. Ce *locus* est constitué de plusieurs répétitions de courtes séquences partiellement palindromiques non contiguës appelées « repeats » et qui sont très conservées. Les « repeats » sont séparées par des morceaux d'ADN exogènes (morceau de génome viral ou d'ADN plasmidique) appelés « spacers » qui sont hypervariables. Le rôle des CRISPR est de reconnaître l'ADN exogène. Les gènes *cas* vont coder pour des protéines fonctionnelles qui vont agir en tant que nucléases, hélicases, polymérases ou encore comme protéines de liaisons aux acides nucléiques. Ces protéines ont pour rôle d'éliminer l'ADN exogène (Hille *et al* 2018, Makarova *et al* 2015). Le système d'immunité CRISPR se déroule en trois phases : l'adaptation, la biogénèse d'ARN CRISPR (ARNcr) et l'interférence. La

Introduction générale

première phase d'adaptation correspond à l'intrusion d'ADN exogène qui va être pris en charge et intégré dans la région CRISPR sous forme de « spacers ». Il y a ainsi une trace de cette infection au niveau du CRISPR. Quand la région du CRISPR est transcrite, un long précurseur ARNcr est produit, c'est le pré-ARNcr. Ce pré-ARNcr est traité notamment au niveau des séquences répétées pour aboutir à des ARNr matures. Ces ARNr vont servir de guide lors d'une nouvelle infection pour cliver les séquences, reconnues par complémentarité (appelées « protospacers »), présentes dans les acides nucléiques exogènes (Figure 20).

Avec les études croissantes sur ce système d'immunité acquise, deux classes de système CRISPR-Cas ont été décrites en fonction de la composition et de la complexité des modules effecteurs : la classe 1 avec des modules effecteurs complexes composés de sous-unités multiples et la classe 2 avec des modules effecteurs composés d'une unique et large protéine. Ces classes sont elles-mêmes sous-divisées en 6 types contenant diverses subdivisions en fonction de la composition des gènes *cas* ((Hille *et al* 2018, Koonin *et al* 2017a, Koonin *et al* 2017b, Koonin *et al* 2017c).

Ce système est particulièrement répandu chez les archées, avec environ 90 % des génomes archéens concernés, tandis que « seule » la moitié des génomes bactériens présente ce système (Bernheim 2017). Il semble même ubiquitaire chez les archées hyperthermophiles (Koonin *et al* 2017b). Il est souvent vu comme la mémoire des infections passées.

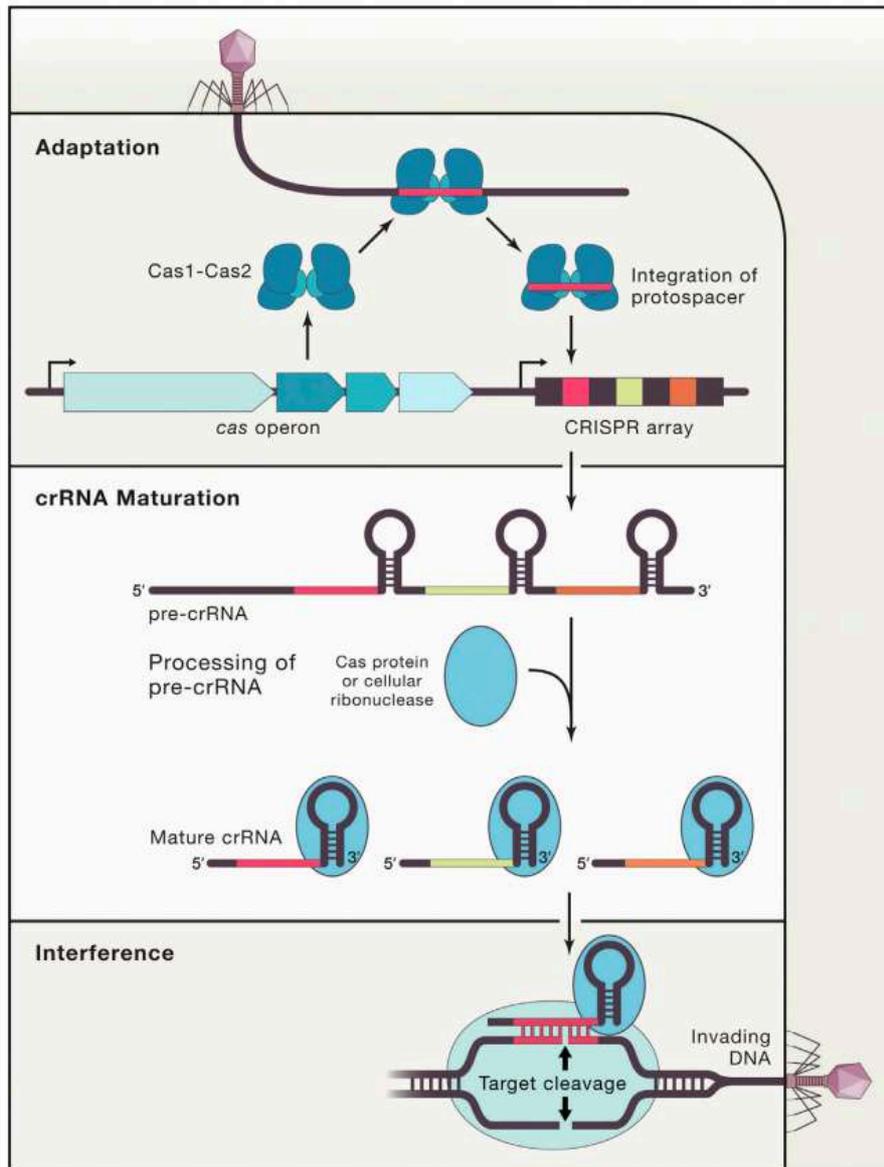


Figure 20: Les trois phases du système d'immunité CRISPR (Hille *et al* 2018).

ii. L'état de dormance et la mort cellulaire programmée

Les systèmes Toxines-Antitoxines (TA)

Les **systèmes toxines-antitoxines** sont classés en 6 types en fonction des toxines et antitoxines impliquées, les types I et II étant les plus décrits. Pour tous les systèmes TA, la toxine est une protéine qui tue la cellule si elle est exprimée (généralement une certaine dose est requise) et l'antitoxine inactive de façon réversible ou régule l'expression de cette toxine. La toxine intracellulaire est stable, contrairement à l'antitoxine. Ce système peut être à l'origine soit d'une entrée en dormance soit d'une lyse de la cellule, et ce, pour répondre à un potentiel stress comme l'entrée d'ADN exogène au sein de la cellule (Koonin *et al* 2017a, Makarova *et al* 2013).

Le système Abi (Abortive infection)

Le **système Abi** limite voire annule l'infection virale notamment par la mort programmée de la cellule infectée. Si la cellule subit un début d'infection classique, celle-ci est rapidement compromise, ne laissant pas le temps au virus de se répliquer ou très peu. Ainsi, peu de virions (voire aucun), sont relargués dans l'environnement limitant les possibilités d'infections d'autres cellules. Ce système peut être qualifié de « suicide altruiste » de la cellule infectée. Le mécanisme de ce système reste peu décrit à ce jour avec cependant des similarités avec les systèmes TA pour les cas décrits (Koonin *et al* 2017a, van Houte *et al* 2016).

iii. Stratégies virales pour échapper aux systèmes de défense de l'hôte

Face à ces nombreux systèmes de défense de l'hôte, les virus ont co-évolué en développant des stratégies pour échapper à ces mécanismes. Le plus couramment, ce sont des mutations ou des délétions au sein du génome viral qui vont lui permettre de ne pas se faire « repérer » par les différents systèmes de défenses cellulaires qui reposent largement sur la reconnaissance de l'ADN exogène. Ainsi, dans le cadre de l'**immunité CRISPR**, une mutation d'un « protospacer » empêche le système de reconnaître le virus déjà rencontré (Figure 21). Les virus peuvent également agir de façon plus directe sur les systèmes de défense en inhibant l'activité des protéines impliquées ou encore en détournant le système à son avantage. Par exemple, le virus, en codant pour les antitoxines des **systèmes TA**, maintient la viabilité de son hôte le temps de sa multiplication (Figure 22) (Stern and Sorek 2011).

Introduction générale

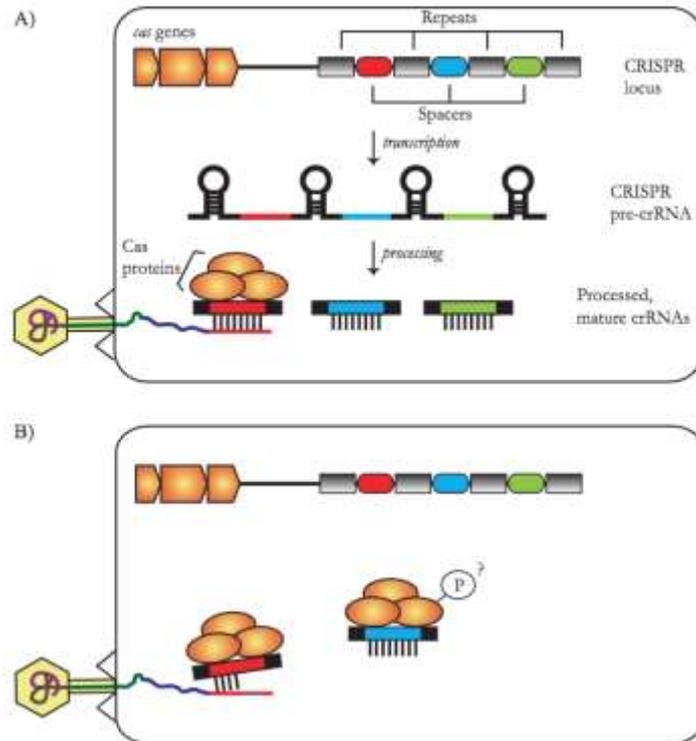


Figure 21: Le système CRISPR-Cas. A : Mécanismes d'action classique du système CRISPR-cas. B : Le virus échappe au système grâce à une mutation ou une recombinaison du « protospacer » cible (Stern et Sorek 2011).

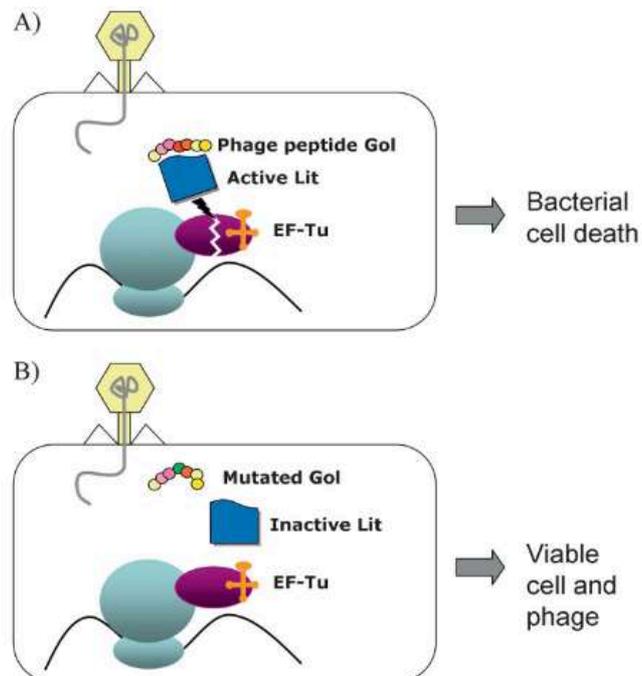


Figure 22: Le système Abi. A : Fonctionnement classique du système Abi qui entraîne la mort de la cellule infectée. B : Une mutation au niveau du polypeptide Gol réduit l'activation de la protéine Lit qui clive le facteur EF-Tu qui entraîne normalement la mort de la cellule. La cellule est maintenue viable, le virus peut réaliser une infection efficace (Stern et Sorek 2011).

B. L'ubiquité des virus de procaryotes et leurs impacts

1. Abondance

L'étude des virus s'est développée lorsque les techniques ont évolué. En effet, les méthodes d'études sont devenues de plus en plus performantes et variées permettant ainsi d'estimer l'abondance des virus et d'entrevoir la diversité de ceux-ci. Ainsi, les virus qui sont **estimés à 10^{31}** , se révèlent comme étant les entités biologiques les plus abondantes sur Terre. Les virus de procaryotes sont prédominants et la plupart infectent des bactéries (Breitbart and Rohwer 2005, Breitbart 2012, Chow and Suttle 2015, Danovaro *et al* 2008). S'ils sont particulièrement abondants, ils sont également ubiquistes puisque largement répartis et ce notamment dans les environnements marins. Ce sont des métadonnées de milliers d'échantillons qui ont permis de déterminer que la plupart des génotypes étaient retrouvés dans plusieurs stations d'échantillonnage pouvant être géographiquement éloignées (Paez-Espino *et al* 2016).

a. Virus marins et évolution des techniques d'observation

L'existence des virus marins est considérée depuis les **années 60** avec les études d'Anderson et son équipe, cependant leur importance fut sous-estimée pendant longtemps. C'est en 1989, grâce à la **microscopie électronique en transmission (MET)**, que Bergh et son équipe estime la quantité de particules de type viral à 10 millions par millilitre d'eau de mer (Bergh *et al* 1989) (Figure 23). Avec un total de 10^{30} VLPs dans l'ensemble des océans, les virus apparaissent comme les prédateurs marins les plus abondants. Leur abondance est corrélée à celle des procaryotes qui représentent plus de 90 % de la biomasse des océans. Malgré la prédominance apparente des procaryotes dans les océans, les virus sont 15 fois plus abondants dans ces écosystèmes marins pour une biomasse bien inférieure (5 % de la biomasse des océans), due à leur petite taille (Suttle 2007, Wommack and Colwell 2000). Ce sont les méthodes de comptage direct telles que la microscopie électronique en transmission ou encore la microscopie à épifluorescence qui ont permis l'expansion des études en écologie virale au niveau marin (Ackermann 2007, Breitbart 2012).

Introduction générale

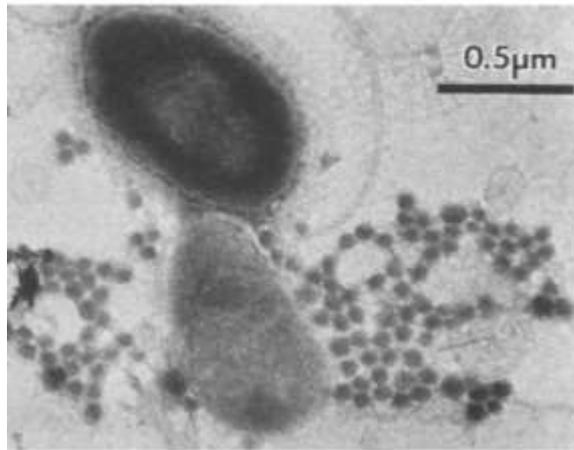


Figure 23: Bactéries et particules de type viral observées en microscopie électronique en transmission (Børshøj *et al* 1990).

Si la méthode standard utilisée pour les comptages directs était la microscopie électronique en transmission, celle-ci était contraignante au niveau du temps passé à la préparation des échantillons et au niveau du matériel nécessaire (ultracentrifugeuse et microscope électronique en transmission). La MET permet néanmoins d'observer la morphologie des particules détectées. La **microscopie à épifluorescence**, basée sur le marquage fluorescent des acides nucléiques au SYBR Green, s'est par la suite révélée être une méthode de choix pour les comptages directs rapides des particules de type viral (Noble and Fuhrman 1998, Suttle and Fuhrman 2010) (Figure 24). Cependant, cette méthode a ses limites et engendrerait une surestimation des abondances virales. Certains signaux considérés comme des particules virales peuvent en réalité correspondre à l'observation d'ADN associé à des vésicules membranaires ou encore des agents de transfert de gènes (GTAs) (Forterre *et al* 2013). De plus, cette méthode n'est pas adaptée à l'étude des virus à ADN simple brin ou à ARN. Il y a donc une surestimation des virus à ADN double brin, qui sont considérés comme majoritaires puisque la plupart des virus de procaryotes sont des virus à ADN double brin, conduisant à une absence d'information concernant les virus à ADN simple brin ou à ARN (Holmfeldt *et al* 2012, Steward *et al* 2013).

Introduction générale



Figure 24: Photographie de microscopie à épifluorescence d'échantillon d'eau de mer marqué au SYBR Green. Les virus sont indiqués par une flèche pleine et les bactéries par une flèche en pointillés (Suttle and Fuhrman 2010).

D'autres méthodes ont été mises à contribution pour améliorer les études en écologie virale avec l'estimation d'abondances virales par la **cytométrie en flux** (Figure 25). La cytométrie en flux repose également sur le marquage des acides nucléiques. Les particules marquées sont dénombrées en fonction de leur fluorescence suite à leur passage devant un laser. Leur fluorescence, mais également leur taille, permet une distinction en populations (virale ou procaryotique). Ainsi, les cellules, les particules virales et même des sous-groupes viraux sont distinguables (Marie *et al* 1999). Très récemment, l'**interférométrie** a été mise au point dans le but de distinguer les nanoparticules et donc de différencier les virus des vésicules membranaires (Figure 26). C'est un dispositif d'imagerie qui prend en compte le signal optique des particules observées (diffraction) et le mouvement brownien de ces mêmes particules (Boccaro *et al* 2016).

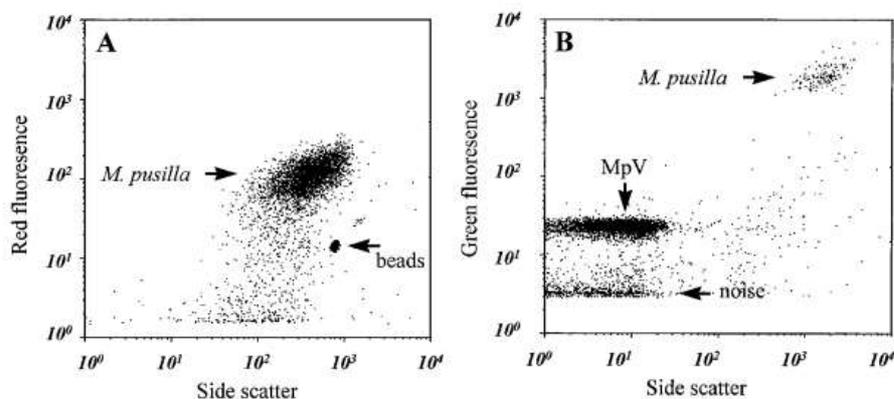


Figure 25: Cytogrammes représentant (A) la population algale (*Micromonas pusilla*) et (B) la population virale (MpV = MpVuF10-38) qui l'infecte. L'ADN viral a été marqué au SYBR Green I (Brussaard *et al* 1999).

Introduction générale

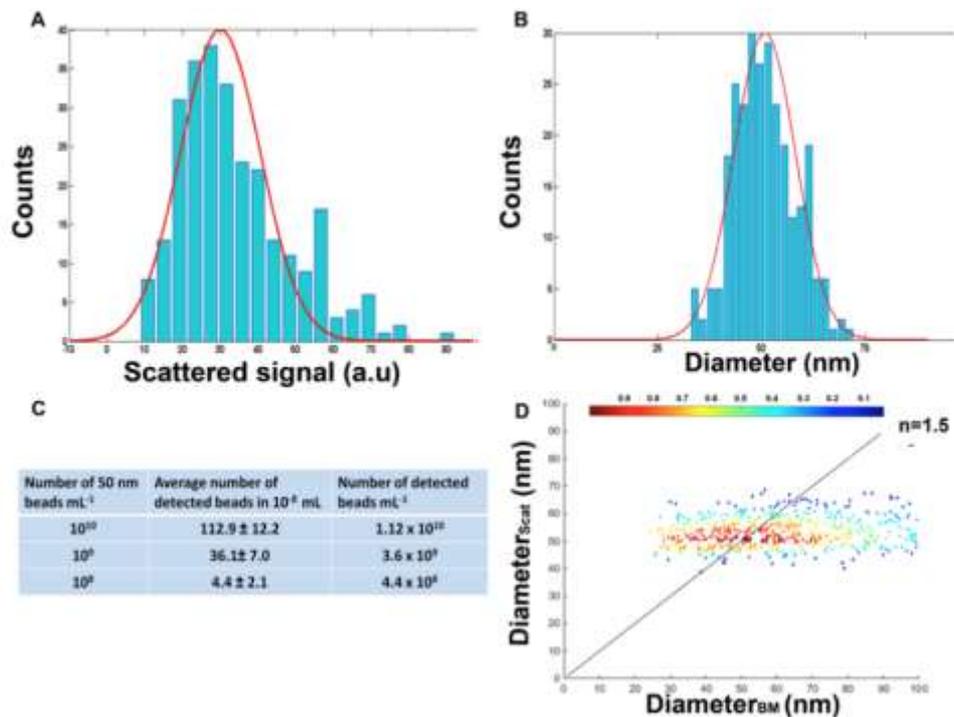


Figure 26: Résultats obtenus en interférométrie avec des billes de silice de 50 nm. (A) : Histogrammes des signaux de diffraction enregistrés. (B) Histogramme de la taille des particules détectées. (C) Corrélation entre le nombre de particules mesurées et la dilution. (D) Diamètres des billes en fonction du niveau de diffraction du signal et du diamètre mesuré via le mouvement brownien. La barre de couleur correspond au nombre de particules par unité de surface. (Boccaro *et al* 2016)

Les estimations d'abondance virale vont de l'ordre de $3 \cdot 10^6$ VLPs/ml dans l'océan profond à environ 10^8 VLPs/ml au niveau des eaux côtières (Suttle 2005, Suttle 2007). Au niveau des sources hydrothermales, peu d'informations sont disponibles concernant l'abondance et la diversité des virus. Il semble cependant que les virus soient plus abondants au niveau des sites hydrothermaux actifs qu'au niveau de l'eau de mer environnante. Des estimations de l'abondance virale, en microscopie à épifluorescence, atteignent 10^6 VLPs par ml au niveau de sources hydrothermales actives (Ortmann and Suttle 2005).

b. Approches métagénomiques

La grande majorité de la diversité microbienne reste incultivée, limitant ainsi les études de diversité virale basée sur des techniques dépendantes des cultures. Les études indépendantes des cultures se sont fortement développées ces dernières années dans le but d'améliorer les connaissances de la diversité microbienne et virale. Si la diversité microbienne peut être étudiée par des approches utilisant le gène ADNr 16S, il n'existe pas de marqueur génétique partagé par tous les virus permettant une telle approche. Certaines études basées sur la comparaison de certains gènes conservés et partagés entre différents membres d'une groupe taxonomique viral ont permis d'appréhender la diversité virale au sein de groupes connus de

Introduction générale

virus. **La métagénomique** entre alors en jeu pour s'affranchir de ces limitations afin de découvrir de nouveaux groupes viraux. Les métagénomomes viraux obtenus à partir d'échantillons de divers environnements ont permis de s'apercevoir que la grande majorité de la diversité virale reste non caractérisée. Les études en métagénomique peuvent apporter des indices sur la composition et la structure de communautés virales environnementales (Breitbart and Rohwer 2005, Coutinho *et al* 2017, Edwards and Rohwer 2005, Kristensen *et al* 2010).

Récemment, l'idée d'intégrer les virus découverts *via* les études métagénomiques au classement ICTV a été discuté (Simmonds *et al* 2017).

Grâce aux techniques d'étude de l'abondance et de la diversité virale, il a été montré que les sources hydrothermales actives sont un réservoir de communautés virales abondantes et variées. **Les viromes** analysés montrent que seulement 25 % des séquences trouvent une similarité avec les séquences disponibles dans les banques de données. Ces réservoirs de nouveaux gènes viraux peuvent être impliqués dans l'adaptation des hôtes à ces environnements hydrothermaux marins (Rohwer and Thurber 2009).

Par exemple, une étude métagénomique, menée en 2014, sur des panaches hydrothermaux du bassin de Lau (Océan Pacifique ouest) et du bassin de Guaymas (Golfe de Californie) a permis d'extraire 18 séquences génomiques virales correspondant à des caudovirus à ADN double brin qui infectent des bactéries impliquées dans l'oxydation du soufre. Ce métabolisme chimiotrophe est largement répandu dans les systèmes hydrothermaux. Quinze de ces génomes viraux contiennent des gènes codant pour des sous-unités d'une enzyme qui intervient dans l'oxydation du soufre élémentaire. Ces découvertes impliquent les virus comme agent clé dans le cycle du soufre et comme réservoir de diversité génétique (Anantharaman *et al* 2014).

Ces techniques, dites indépendantes des cultures, sont complémentaires des études basées sur les cultures, ces dernières offrant des génomes viraux référence nécessaires pour l'interprétation des données issues de métagénomomes.

2. Impacts

Reconnus comme des acteurs majeurs des écosystèmes qu'ils envahissent, les virus impactent les environnements marins à différents niveaux. S'ils sont impliqués dans le cycle de vie de leur hôte, ils sont également importants à plus grande échelle. Notamment, ils vont influencer sur les cycles biogéochimiques ou encore l'évolution à plus long terme de leurs hôtes par des transferts horizontaux de gènes.

a. Implications des virus au niveau des cycles biogéochimiques

L'**abondance et le cycle de vie** des virus marins infectant les procaryotes engendrent des conséquences non négligeables au niveau des cycles biogéochimiques.

Les virus ont pour but de se maintenir en se multipliant *via* le détournement de la machinerie cellulaire ce qui peut conduire à la lyse de leurs hôtes. Chaque jour, 10^{28} infections auraient lieu dans les océans, permettant ainsi le relargage de 10^9 tonnes de carbone issus des cellules lysées (Suttle 2007).

Les virus ont donc un rôle important dans la **pompe biologique du carbone** et plus globalement sur les flux de carbone. Ils ont également un impact sur la chaîne alimentaire puisque les organismes infectés et lysés ne sont plus disponibles pour les niveaux trophiques supérieurs, dits brouteurs, tandis que la matière organique dissoute supplémentaire produite est rendue disponible pour d'autres organismes (bactéries hétérotrophes principalement). Ce phénomène est connu sous le nom de court-circuitage viral ou « **viral shunt** » (Figure 27). D'autres sous-produits (nutriments) de la lyse semblent stimuler la croissance cellulaire. Le court-circuitage viral engendre également un transfert de carbone vers les océans profonds par une augmentation de la sédimentation de l'hôte infecté ainsi que par la formation d'agrégats d'origine cellulaire pendant la lyse virale (Breitbart 2012, Danovaro *et al* 2011, Laber *et al* 2018, Weitz and Wilhelm 2012). La lyse virale des microorganismes marins montre divers impacts sur la pompe biologique du carbone qui sont importants mais peu pris en compte dans les modèles écosystémiques applicables aux prévisions climatiques.

Au niveau des sédiments marins profonds, les virus vont avoir un impact important sur la mortalité microbienne notamment des archées avec un relargage d'environ 0,3 à 0,5 gigatonnes de carbone par an (Danovaro *et al* 2016).

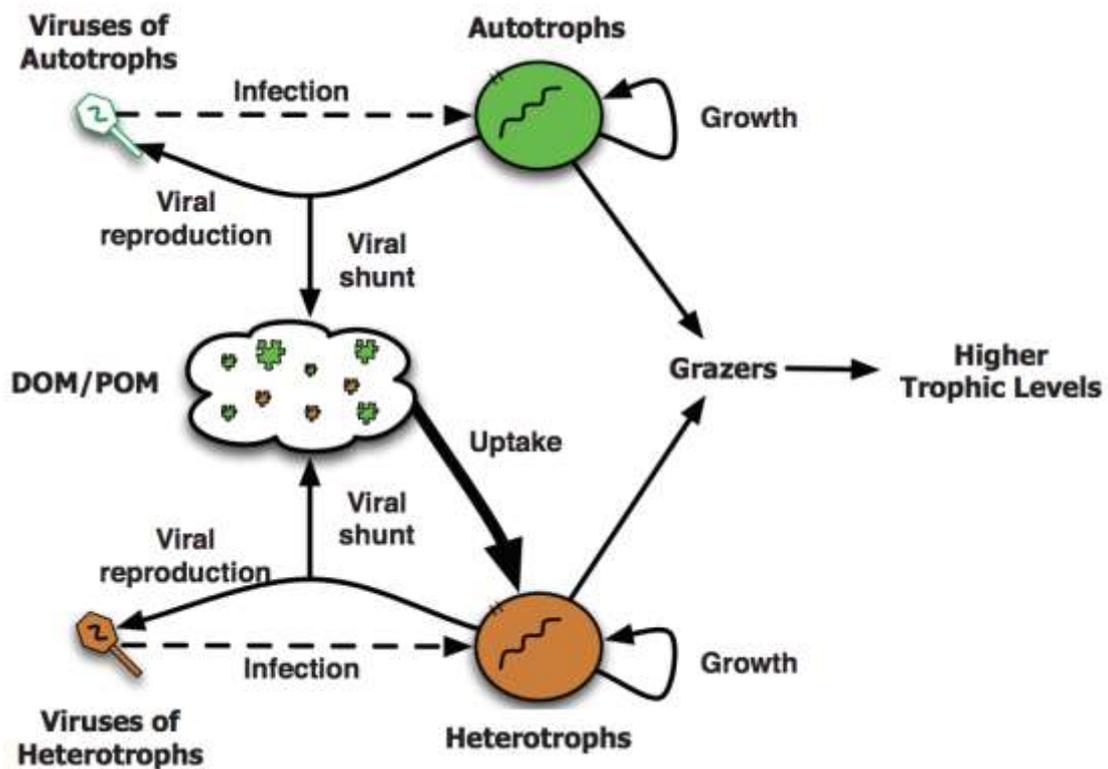


Figure 27 : Schéma simplifié de la chaîne alimentaire marine et l'implication des virus sur celle-ci. La lyse cellulaire induite par les virus permet le relargage de matériaux cellulaires dans l'environnement marin comme la POM (matière organique particulaire) et la DOM (matière organique dissoute) qui sont disponibles pour les hétérotrophes primaires. Les cellules infectées ne sont plus disponibles pour les brouteurs du niveau trophique supérieur (Weitz and Wilhelm 2012).

b. Implications des virus dans les transferts horizontaux de gènes

Les virus sont des acteurs majeurs de l'équilibre des communautés microbiennes notamment *via* la mortalité cellulaire engendrée. Ils jouent également d'importants rôles dans l'adaptation et l'évolution de ces communautés *via* les **transferts horizontaux de gènes** (HGT) en apportant de nouvelles capacités à leurs hôtes (Figure 28).

Introduction générale

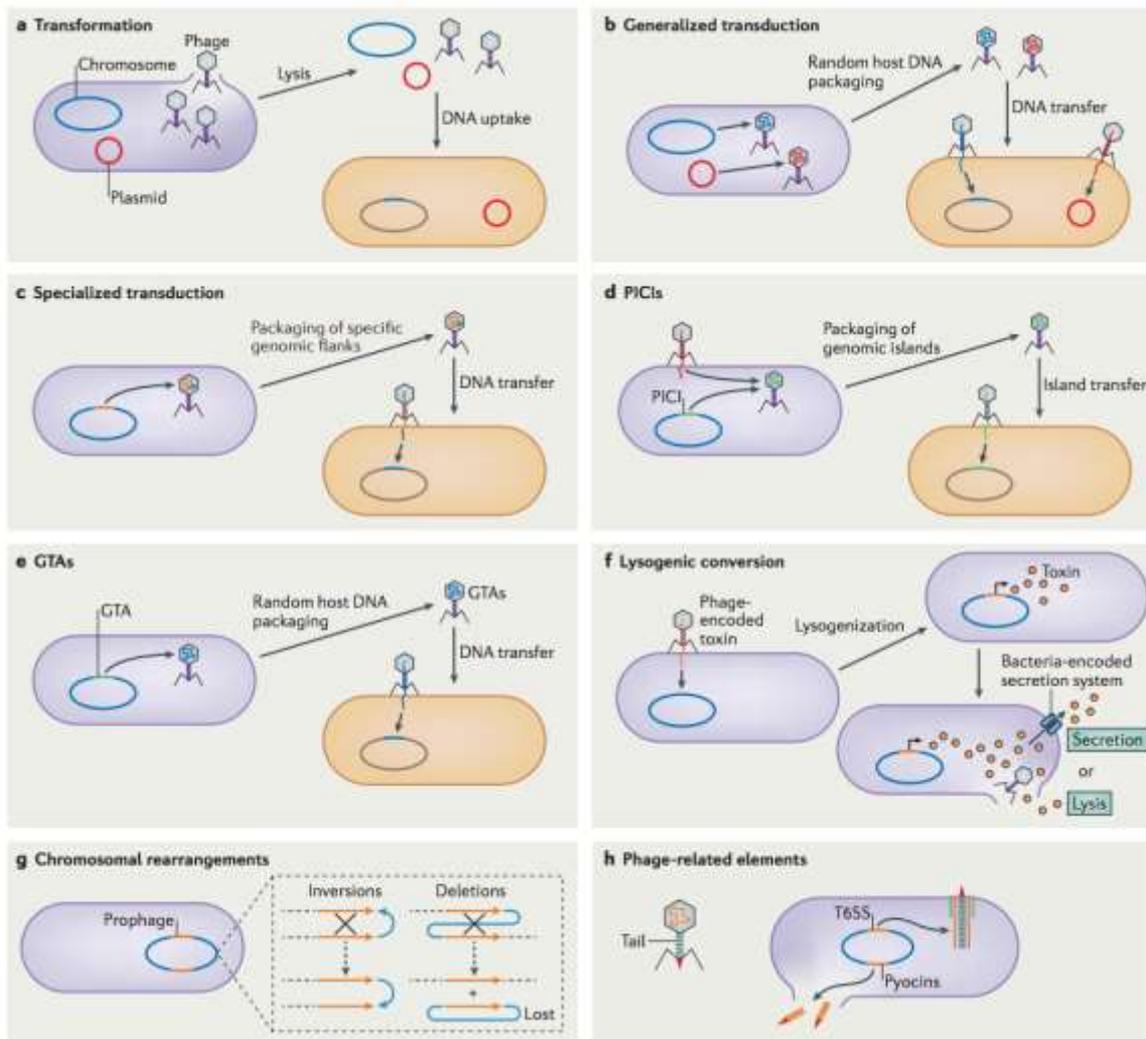


Figure 28 : Implications des virus dans l'évolution et la pathogénicité de leurs hôtes par divers mécanismes (Salmond and Fineran 2015).

Les trois mécanismes d'HGTs les plus connus sont la transformation, la conjugaison et la transduction généralisée ou spécialisée (Salmond and Fineran 2015, Soucy *et al* 2015, Touchon *et al* 2016). Les virus sont des acteurs importants pour certains de ces mécanismes de transferts.

Lorsque les virus provoquent la lyse de leur hôte pour se propager dans l'environnement, il y a relargage d'ADN libre dans l'environnement et donc de gènes. Les cellules de l'environnement peuvent alors intégrer ces morceaux d'ADN par **transformation naturelle**.

Introduction générale

Les **phénomènes de transduction** sont caractérisés par le transfert d'ADN non viral par l'intermédiaire des virus. Ce transport d'ADN se fait *via* les capsides virales qui contiennent le matériel génétique. La **transduction généralisée** est réalisée par les virus virulents ou tempérés. Au moment de l'empaquetage, c'est de l'ADN chromosomique qui est encapsidé par erreur et qui peut alors être délivré à une nouvelle cellule hôte. Cet ADN, s'il reste libre, peut être finalement perdu à la génération suivante. Il peut également être intégré au chromosome de la cellule par recombinaison homologue. La **transduction spécialisée** n'est réalisée que par des virus tempérés. En effet, ces virus ont la particularité de s'intégrer au génome de leur hôte pour se maintenir sous forme de provirus. Lorsque le provirus doit s'exciser du génome de son hôte, il peut emporter une partie du chromosome de l'hôte par excision imprécise. Ainsi, les particules transductrices peuvent infecter de nouveaux hôtes et injecter de l'ADN chromosomique correspondant aux gènes proches du site d'intégration du virus.

D'autres mécanismes entrent en jeu dans les transferts de gènes médiés par les virus :

Les PICIs (« Phage Inducible Chromosomal Islands » = îlots chromosomiques phage-inductible) mettent en jeu un système de piratage moléculaire. En effet, des îlots chromosomiques vont prendre la place du génome viral dans les capsides de virus dits « helper ». Ils vont ainsi accroître fortement leur probabilité de transduction (Christie and Dokland 2012).

La conversion lysogénique opérée par des virus tempérés se traduit par l'expression de gènes viraux par la cellule infectée lui conférant de nouvelles capacités. Ce phénomène affecte souvent la pathogénicité de l'hôte. Un exemple connu de conversion lysogénique concerne le phage λ d'*E. coli* avec l'expression du gène *lom*. Ce gène code pour une protéine membranaire qui facilite l'adhésion du pathogène aux cellules épithéliales buccales humaines (Bondy-Denomy and Davidson 2014, Reeve *et al* 1979).

Bien que la présence d'un provirus immunise le plus souvent la cellule infectée contre d'autres infections virales, il est possible qu'une cellule porte **deux provirus** dans son génome. Ces provirus peuvent partager des similarités permettant des réarrangements chromosomiques chez l'hôte. Ces réarrangements peuvent avoir plusieurs effets sur les capacités adaptatives de l'hôte.

Les autres éléments génétiques mobiles

Les **GTAs (« Gene Transfer Agents »)** ou encore les **vésicules membranaires** sont d'autres exemples d'éléments génétiques mobiles responsables de phénomènes de HGTs. Les **GTAs** sont des particules ressemblant fortement à des virus caudés (Figure 29). Ces particules contiennent des fragments d'ADN qu'elles peuvent injecter dans des cellules. La différence majeure entre les GTAs et les virus est la capacité à coder pour leurs protéines de capsid. Si ces particules encapsident de l'ADN chromosomique de la cellule dont elles sont issues, elles ne sont pas le résultat d'un empaquetage accidentel comme dans le cas d'une transduction. Les GTAs sont produits par un mécanisme contrôlé par la cellule et se propagent dans l'environnement suite à la lyse cellulaire (Lang *et al* 2012). Les GTAs ne sont pas restreints au domaine bactérien, l'archée méthanogène *Methanococcus voltae* produit spontanément des particules de type GTAs appelée VTAs (« *Voltae* Transfer Agents »). Les VTAs contiennent des fragments d'ADN chromosomique de 4,4 kb et ces VTAs sont impliqués dans des phénomènes de transformation (Figure 29 d) (Eiserling *et al* 1999).

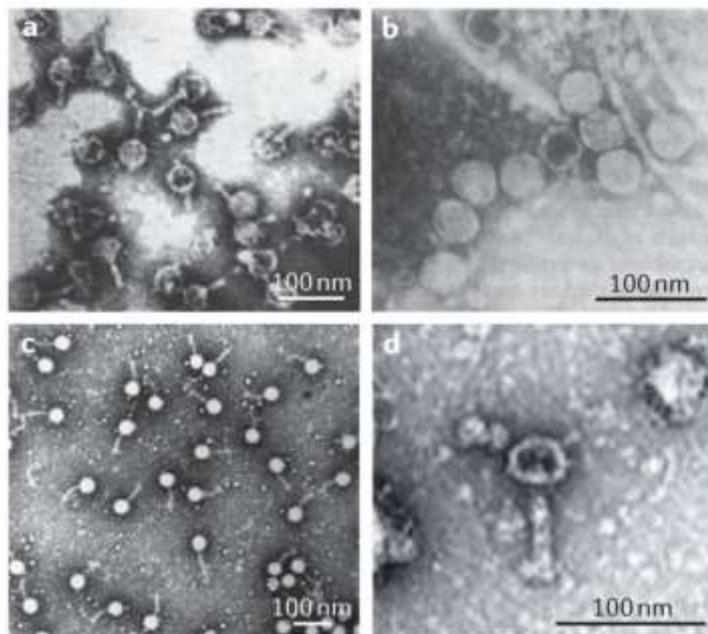


Figure 29 : Observation en microscopie électronique en transmission de GTAs. a : GTA de *Rhodobacter capsulatus*. b : Particules de Dd1 issues de *Desulfovibrio desulfuricans*. c : Particules virales de *Serpulina hyodysenteriae* (VSH-1) dans *Brachispira hyodysenteriae*. d : Particules de « *Voltae* transfer agent » issues de *Methanococcus voltae* (Lang *et al* 2012).

La production de **vésicules membranaires (VM)** est universelle, ce phénomène physiologique est retrouvé dans les trois domaines du vivant. Ce sont de petits compartiments sphériques de tailles variables allant de 50 nm à plus de 400 nm. Elles sont issues de bourgeonnements de la membrane cellulaire et sont sécrétées dans le milieu environnant.

Introduction générale

Leurs compositions et fonctions sont diverses (Deatherage and Cookson 2012, Gaudin *et al* 2014, Gyorgy *et al* 2011). Elles sont bien étudiées chez les eucaryotes et les bactéries (Widdel and Bak 1992).

Plus généralement, les vésicules membranaires sont abondantes au niveau de l'écosystème marin : 6.10^6 à 3.10^5 VMs/ml d'eau de mer et elles y jouent des rôles importants (Figure 30) (Biller *et al* 2014, Scanlan 2014) :

- Le recyclage du carbone,
- Echanges entre les cellules : transport de molécules toxiques, agent du *quorum sensing*, facteurs de pathogénicité et métabolites,
- Protection contre les attaques virales en jouant le rôle de leurre cellulaire (Manning and Kuehn 2011),
- HGTs : transport et transferts d'acide nucléiques par fusion avec des cellules réceptrices (Velimirov and Hagemann 2011).

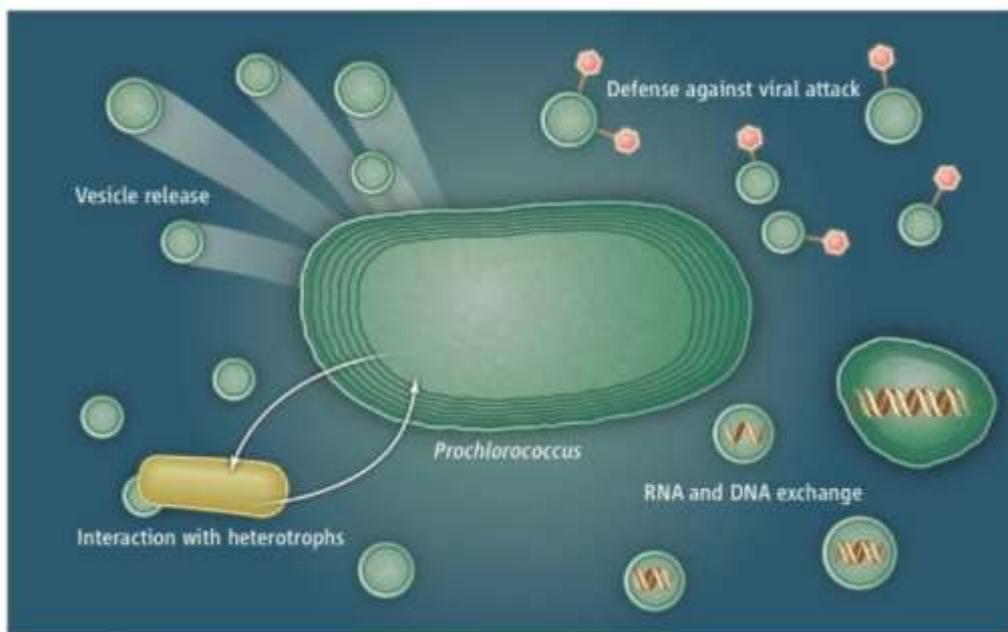


Figure 30 : Différents rôles des vésicules membranaires produites par *Prochlorococcus* dans l'environnement marin (Scanlan 2014).

II. Les hôtes : les archées

A. Généralités sur les archées

1. Découverte et caractéristiques des archées

Les **archées** représentent l'un des trois domaines du vivant. C'est en 1977, avec la définition des archées, que Carl Woese et George Fox émettent l'hypothèse d'un arbre du vivant à trois branches : les eucaryotes, les bactéries et les archées ; grâce à une classification basée sur l'analyse de l'ARN ribosomique 16S ou 18S (Woese and Fox 1977). Les archées, originellement classées parmi les bactéries, présentent en effet, des traits communs avec ces microorganismes tels que l'unicellularité et l'absence de noyau. Cependant les archées ont également des similitudes avec les eucaryotes, notamment au niveau de la réplication, transcription et traduction de l'information génétique. Par ailleurs, l'absence de peptidoglycane dans les parois cellulaires et les lipides liés par des liaisons éther sont des traits caractéristiques des archées. De plus, ce domaine montre une forte diversité phénotypique et métabolique. Certains types métaboliques, comme la méthanogénèse, ne sont retrouvés que chez les archées. Les extrêmophiles y sont largement répandus, et notamment des espèces hyperthermophiles, halophiles ou encore acidophiles. Par ailleurs de nombreuses espèces d'archées non extrêmophiles sont retrouvées dans divers habitats allant des océans à l'estomac humain. De manière plus générale, les archées sont des organismes ubiquitaires de tous les environnements grâce à la diversité de leurs métabolismes (Tableau 1).

Tableau 1 : Quelques caractéristiques des trois domaines du vivant. Les caractéristiques retrouvées uniquement chez les archées sont surlignées en jaune.

	Archées	Bactéries	Eucaryotes
Organisation	Unicellulaire	Unicellulaire	Uni/Pluricellulaire
Noyau	Non	Non	Oui
Organites	Non	Non	Oui
Matériel génétique	Chromosome Circulaire	Chromosome circulaire	Plusieurs chromosomes linéaires
Système CRISPR	Oui	Oui	Non
Liaisons des lipides	Ether	Ester	Ester
Chaînes carbonées	Isoprènes	Acides gras	Acides gras
Réplication / transcription / traduction	Type eucaryote	Bactérien	Eucaryote
Méthanogénèse	Oui	Non	Non

2. Classification des archées

La **classification des archées** est en perpétuelle évolution depuis leur découverte. Dans les années 90, deux grands *phyla* étaient reconnus : Les *Crenarchaeota* et les *Euryarchaeota*. Puis, dans les années 2000, d'autres *phyla* ont été définis, dont les *Nanoarchaeota* et les *Korarchaeota*. Plus récemment, certains ont été regroupés en un *phylum* nommé TACK avec les *Thaumarchaeota*, les *Aigarchaeota*, les *Crenarchaeota* et les *Korarchaeota*. Une classification basée sur 5 *phyla* est donnée dans des livres de référence (Figure 31). Avec les données génomiques disponibles qui ne cessent de croître grâce aux nouvelles techniques d'études, indépendantes des techniques de cultures classiques, de nouvelles classifications sont régulièrement proposées. Notamment, une classification basée sur 4 super *phyla* : les *Euryarchaeota*, TACK modifié (*Proteoarchaeota*), les Asgard et DPANN (Eme *et al* 2017, Spang *et al* 2017) (Figure 32).

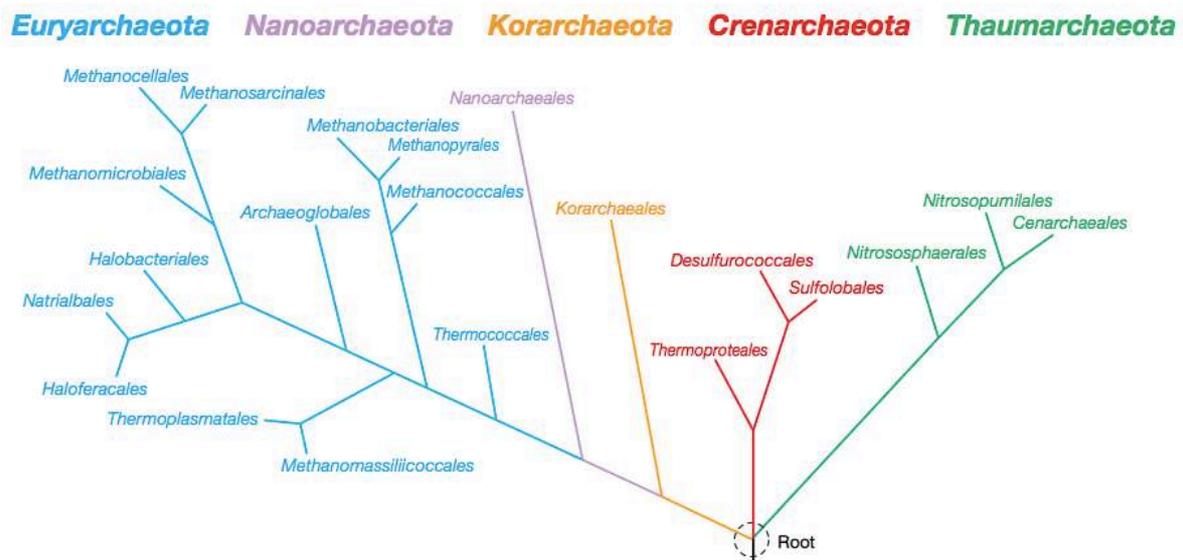


Figure 31 : Phylogénie des archées (Madigan *et al* 2010).

Introduction générale

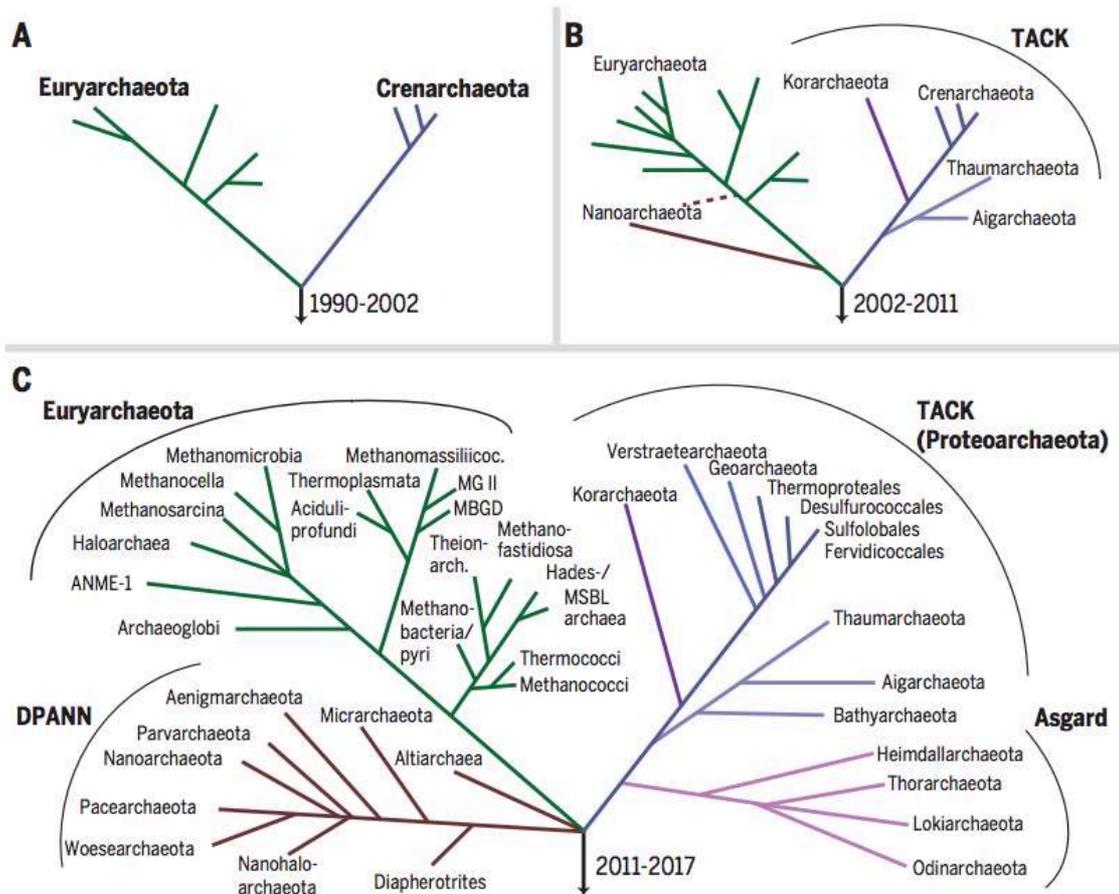


Figure 32 : Evolution de la classification des archées au cours des trente dernières années (Spang *et al* 2017).

Plus généralement, c'est **l'arbre de la vie** qui est régulièrement remis en question. Spang et son équipe font le lien entre les eucaryotes et les archées *via* les *Lokiarchaea* grâce à l'analyse de données de métagénomique. Selon leur étude, les eucaryotes émergeraient des archées et notamment du super *phylum* des Asgard. C'est la théorie eocyte (Figure 33). Cependant, ces résultats sont notamment remis en cause par Da Cunha et ses collaborateurs lors d'une nouvelle analyse du jeu de données et la mise en évidence de l'insertion de séquences potentiellement contaminées dans la première analyse de Spang et ses collaborateurs. Ainsi, selon cette nouvelle révision des données, les Asgard ne sont pas les ancêtres des eucaryotes mais bien un groupe proche des *Euryarchaeota* (Figure 34) (Da Cunha *et al* 2017, Da Cunha *et al* 2018, Gaia *et al* 2018). Très récemment, la première archée classée parmi les Asgard a été isolée après 2000 jours d'incubation en bioréacteur : *Candidatus Prometheoarchaeum syntrophicum* MK-D1. Cet unique représentant cultivé pourrait apporter des informations clés sur l'évolution des eucaryotes (Imachi *et al* 2019).

Introduction générale

Les débats sont courants en science et ils sont nécessaires pour répondre aux questions que les scientifiques se posent. Les liens évolutifs entre eucaryotes et archées ne sont pas encore élucidés et des études supplémentaires permettront de mieux les définir.

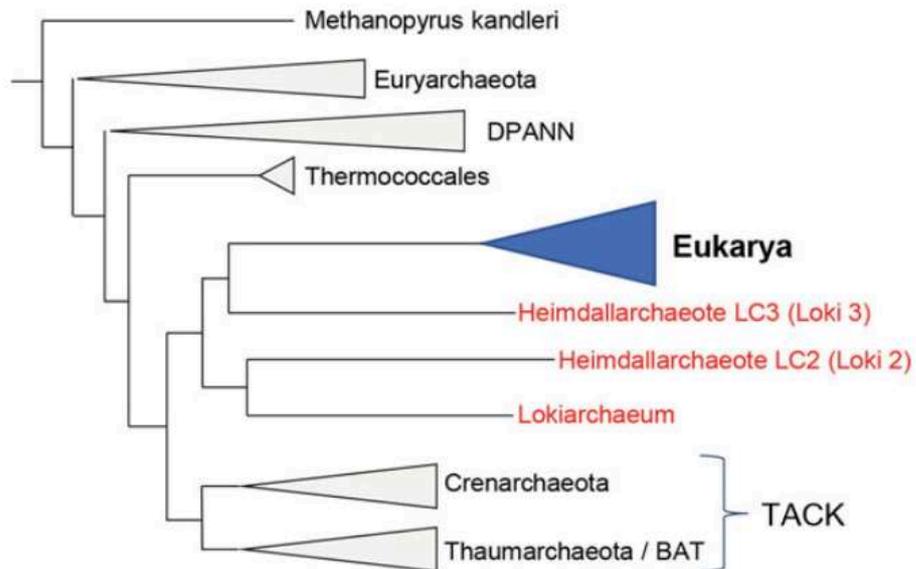


Figure 33 : Représentation schématique de la phylogénie obtenue suite à l'analyse de Spang et ses collaborateurs (Gaia *et al* 2018).

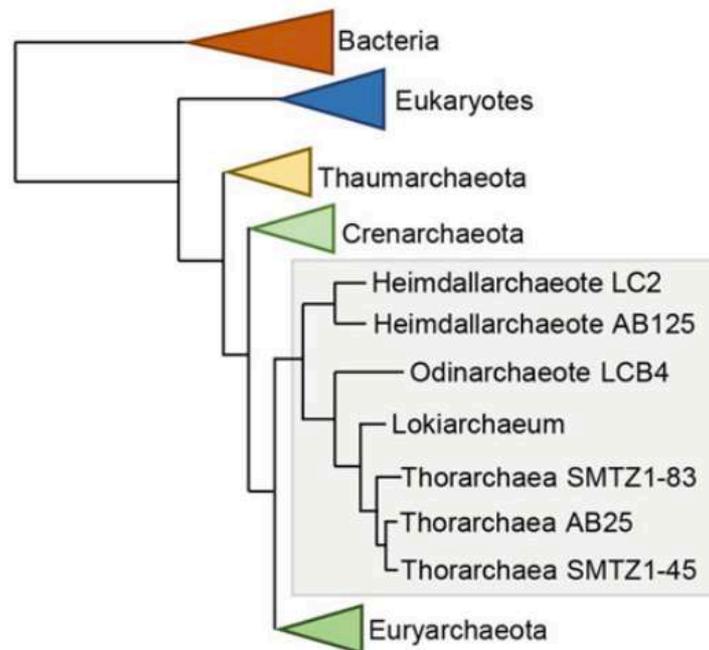


Figure 34 : Représentation schématique de la phylogénie obtenue suite à l'analyse de Da Cunha et ses collaborateurs (Gaia *et al* 2018).

3. Des microorganismes extrêmophiles

Zobell et son équipe ont débuté les premières études sur les microorganismes vivants dans des **environnements** aux conditions dites **extrêmes** dès les **années 50**, avec la découverte des piezophiles (Oppenheimer and ZoBell 1952). Il existe une variété d'environnements extrêmes sur Terre tels que les zones désertiques (froides ou chaudes), les environnements hypersalés, les sources hydrothermales terrestres (solfatares) ou océaniques ou encore les lacs de soude (Figure 35).



Figure 35 : Exemples d'environnements extrêmes (de gauche à droite): le lac Natron (lac de soude au Kenya - image libre de droit); Icebergs (Islande - Photographie personnelle); Fumerolles (Islande - Photographie personnelle).

Ces environnements sont perçus comme extrêmes du point de vue de l'homme car la vie humaine y est impossible. Ce sont des conditions physico-chimiques **proches des limites connues de la vie** qui caractérisent ces habitats avec des températures soit très basses ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) soit très hautes ($122\text{ }^{\circ}\text{C}$), des pressions allant jusqu'à 110 MPa , de fortes radiations, la présence ou l'absence d'oxygène, des pH allant de 0 à 12,8 ou encore de fortes concentrations en sels (jusqu'à 35 % de NaCl (m/v)). Ces environnements particuliers sont pourtant colonisés par une large gamme d'organismes vivants, qui ne tolèrent pas seulement ces conditions particulières mais en ont besoin pour vivre. Ces organismes sont qualifiés d'**extrêmophiles**. Ces extrêmophiles peuvent être classés selon les conditions requises à leur développement (Tableau 2), tels que les psychrophiles (basses températures), thermophiles (hautes températures), acidophiles (forte acidité du milieu), alcaliphiles (milieu très basique), halophiles (forte concentration en sels du milieu), piezophiles (fortes pressions hydrostatiques) (Cavicchioli *et al* 2011, Rampelotto 2013). La plupart des extrêmophiles sont polyextrêmophiles et tolèrent, voire requièrent, différents paramètres extrêmes dans leur environnement (Merino *et al* 2019).

Introduction générale

Tableau 2 : Positionnement des extrémophiles en fonction des paramètres de leur environnement (D'après Merino *et al* 2019)

Paramètres	Très bas à très haut				
Température	Psychrophile ($< 20\text{ °C}$)	Mésophile ($20\text{-}45\text{ °C}$)	Thermophile ($45\text{-}80\text{ °C}$)	Hyperthermophile ($> 80\text{ °C}$)	
Disponibilité en eau	Xérophile ($a_w < 0,7$)				
Pression	Piezotolérant ($0,1\text{-}10\text{ MPa}$)		Piezophile ($10\text{-}50\text{ MPa}$)	Hyperpiezophile ($> 50\text{ MPa}$)	
Salinité (pourcentage de NaCl (m/v))	Non halophile ($< 1,2\%$)	Halotolérant ($1,2\text{-}2,9\%$; tolère jusqu'à $14,6\%$)	Halophile ($> 8,8\%$)	Halophile extrême ($> 14,6\%$)	
pH	Hyperacidophile ($< \text{pH } 3$)	Acidophile ($< \text{pH } 5$)	Neutrophile ($\text{pH } 5\text{-}9$)	Alcaliphile ($> \text{pH } 9$)	Hyperalcaliphile ($> \text{pH } 11$)
Oxygène	Anaérobie strict	Anaérobie facultative	Aérotolérant	Microaéroophile ($< 21\%$)	Aérobie strict

Comparé aux bactéries, les archées sont fortement représentées chez les **extrémophiles** (Figure 36). Leur évolution est donc influencée par ces conditions particulières auxquelles elles sont confrontées de façon continue ou non. Leur adaptation à leur environnement est visible à différents niveaux : métabolisme particulier et adaptations structurelles (membranes cellulaires peu perméables) par exemple (Valentine 2007).

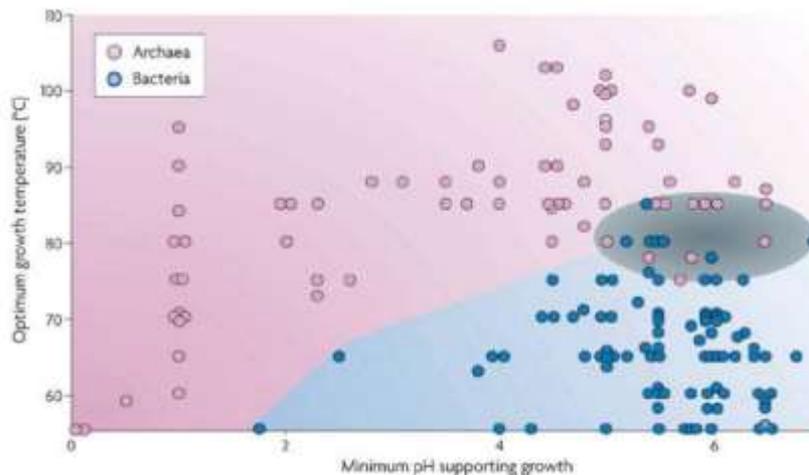


Figure 36 : Prédominances des archées dans les milieux extrêmophiles par rapport aux bactéries au regard des conditions de température et de pH auxquels sont confrontés ces microorganismes (Valentine, 2007).

B. Les hyperthermophiles

1. Généralités sur les hyperthermophiles

Les organismes vivants peuvent être classés selon leur **optimum** de température de croissance : psychrophiles, mésophiles, thermophiles ou hyperthermophiles. Certains de ces organismes préférant la vie dans des conditions de température dites « extrêmes » font plus généralement partie des extrémophiles.

Dès 1967, Thomas D. Brock et son équipe isolent des microorganismes avec des *optima* de température de croissance supérieurs à 75 °C issus de sources chaudes du parc national de Yellowstone (Brock 1967). Depuis, l'étude de ces organismes particuliers s'est développée et de nombreuses espèces ont été décrites (Tableau 3). Actuellement, les microorganismes hyperthermophiles sont définis comme ayant des températures optimales de croissance au-delà de 80 °C avec un record d'optimum à environ 106 °C pour *Pyrolobus fumarii* qui est capable de croître entre 90 °C et 113 °C (Blöchl *et al* 1997). La méthanogène piezophile, *Methanopyrus kandleri* souche 116, a quant à elle un optimum de croissance à 105 °C à des pressions hydrostatiques de 20 à 30 MPa et est capable de croître jusqu'à 122 °C à 40 MPa, ce qui fixerait la température limite haute de la vie à 122 °C (Takai *et al* 2008). Les hyperthermophiles sont majoritairement des archées à l'exception des genres *Thermotoga* et *Aquifex* qui sont des bactéries. Notamment, *Aquifex pyrophilus* est une bactérie qui a un optimum de croissance à 85 °C et est capable de proliférer à des températures comprises entre 67 °C et 95 °C (Huber and Stetter 1998, Huber *et al* 1992) (Tableau 4).

Introduction générale

Tableau 3 : Exemple d'archées hyperthermophiles (Repris de Vieille and Zeikus 2001).

Ordre	Organisme	T° opt.	Habitat	Ref.
Sulfolobales	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	87 °C	Champs de solfatares	(Zillig <i>et al</i> 1980)
Thermoproteales	<i>Pyrobaculum organotrophum</i>	102 °C	Champs de solfatares (Italie et Açores)	(Huber <i>et al</i> 1987)
Desulfurococcales	<i>Staphylothermus marinus</i>	92 °C	Plancher marin chaud (Italie)	(Fiala <i>et al</i> 1986)
Pyrodictiales	<i>Pyrolobus fumarii</i>	106 °C	Source hydrothermales océanique profonde (Ride médio-Atlantique)	(Blöchl <i>et al</i> 1997)
Thermococcales	<i>Pyrococcus abyssi</i>	96 °C	Source hydrothermale océanique profonde (Bassin Nord Fiji – Pacifique)	(Erauso <i>et al</i> 1993)
Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus profundus</i>	82 °C	Source hydrothermales océanique profonde (Bassin de Guaymas)	(Burggraf <i>et al</i> 1990b)
Methanococcales	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	85 °C	Source hydrothermale océanique profonde (Ride Est Pacifique)	(Jones <i>et al</i> 1983)
Methanobacterales	<i>Methanothermus fervidus</i>	83 °C	Source chaude terrestre (Islande)	(Stetter <i>et al</i> 1981)
Methanopyrales	<i>Methanopyrus kandleri</i>	98 °C	Source hydrothermale océanique peu profonde (au large de Vulcano, Italie)	(Kurr <i>et al</i> 1991)

Tableau 4 : Exemple de bactéries hyperthermophiles (Repris de Vieille and Zeikus 2001).

Ordre	Organisme	T° opt.	Habitat	Ref.
Aquificales	<i>Aquifex pyrophilus</i>	85 °C	Sédiments marins chauds – Ride de Kolbeinsey au nord de l'Islande	(Huber <i>et al</i> 1992)
Thermotogales	<i>Thermotoga maritima</i>	80 °C	Sédiments marins chauds - Italie	(Huber <i>et al</i> 1986)

2. Caractéristiques physiologiques des archées hyperthermophiles

Comme **les structures et les activités cellulaires** peuvent être affectées par des facteurs comme la température, les hyperthermophiles présentent un panel varié de stratégies leur permettant de s'adapter aux **hautes températures** (Figure 37). Ces microorganismes possèdent notamment des enzymes et des protéines très stables qui sont capables de conserver leur structure face à des températures proches de 100 °C. Elles sont dites thermostables, et ce notamment grâce à des adaptations de leur structure telles que des boucles plus courtes, un nombre plus important de liaisons disulfures, un noyau hydrophobe important avec une compaction dense de certaines régions hydrophobes (force de stabilisation induite par des effets hydrophobes et résistance au dépliement dans le

cytoplasme) ou encore des interactions électrostatiques plus nombreuses (charge de surface, augmentation du nombre de liaisons ioniques entre les charges positives et négatives de nombreux acides aminés) (Jorda and Yeates 2011, Reed et al 2013). Les hyperthermophiles présentent d'autres adaptations notables décrites ci-dessous.

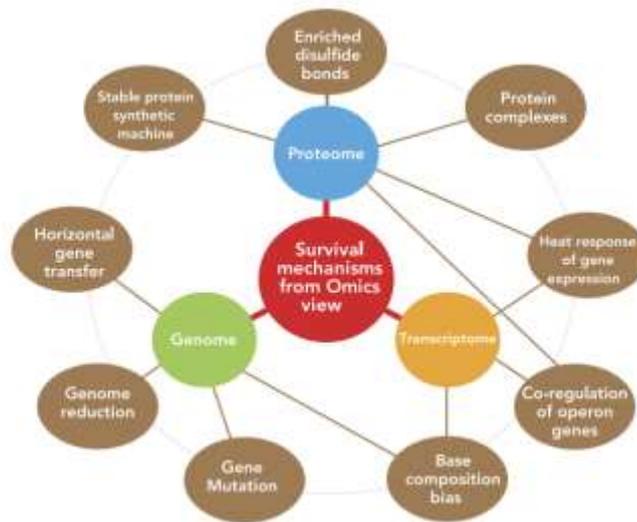


Figure 37 : Stratégies utilisées par les thermophiles pour faire face aux hautes températures (Wang et al 2015b).

a. Les protéines chaperons (heat shock proteins)

Des **protéines chaperons** (HSP, pour « Heat Shock Proteins » ou protéine de choc thermique) sont impliquées dans l'adaptation des organismes vivants à hautes températures. Elles sont synthétisées lors d'un stress comme une exposition temporaire à une température supérieure à l'optimum de croissance de ces microorganismes. Ces protéines chaperons sont largement produites par les hyperthermophiles et agissent soit en stabilisant soit en dégradant les protéines dénaturées (Baross and Holden 1996). Si le mécanisme d'action des protéines chaperons est bien défini pour les eucaryotes et les bactéries, ce n'est pas le cas chez les archées. La famille de chaperons archéens la mieux caractérisée est celle des HSP60. Ils forment des complexes moléculaires larges et ont un poids moléculaire d'environ 1 MDa. Ils ont une structure à double anneau possédant une cavité centrale où les protéines mal repliées sont séquestrées pour être correctement repliées. Ce groupe de protéines appartenant à la famille des HSP60 est présent chez toutes les archées pour qui il représente le thermosome. Un autre chaperon retrouvé chez les archées est la PFD (« Prefoldin ») qui est capable de se fixer à une large gamme de protéines mal repliées pour les transférer au thermosome pour être repliées correctement (Figure 38) (Lemmens et al 2018).

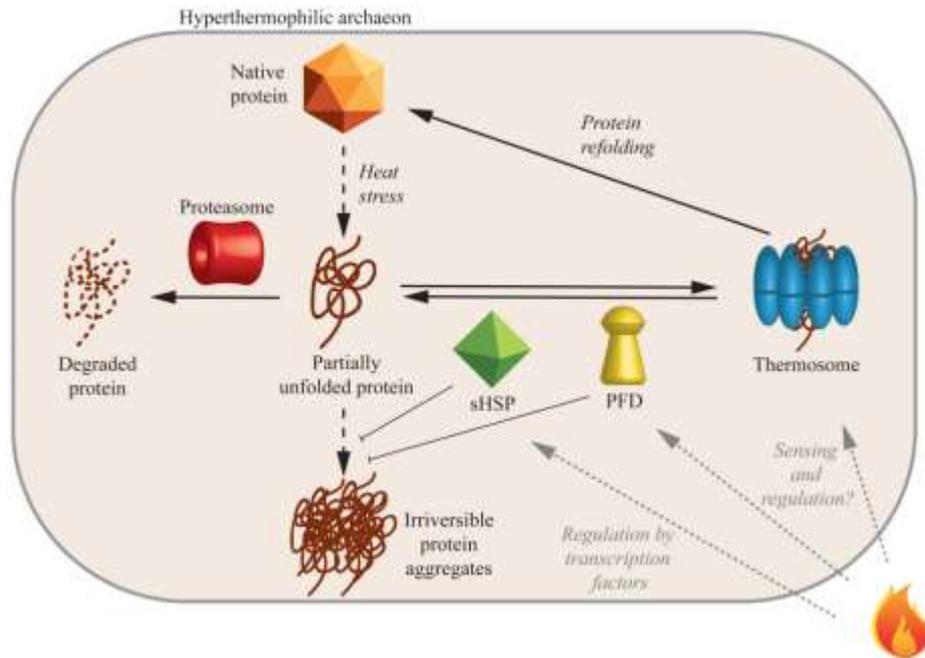


Figure 38 : Schéma du déroulement de la réponse à un stress à la chaleur chez une archée hyperthermophile. La régulation transcriptionnelle de l'expression des protéines HSPs a seulement été décrite pour *Pyrococcus furiosus* (Phr) et *Archaeoglobus fulgidus* (HSR1) (Lemmens *et al* 2018)

b. ADN reverse gyrase

La **reverse gyrase** est la seule protéine présente de façon ubiquiste chez tous les organismes hyperthermophiles (Catchpole and Forterre 2019). Cette protéine découverte en 1984 à partir d'extraits cellulaires de *Sulfolobus* est une topoisomérase de type II qui introduit des surenroulements positifs de la double hélice d'ADN. L'ADN surenroulé négativement semble être un substrat favorable aux activités de réplication, transcription et recombinaison. Pour les organismes hyperthermophiles, la reverse gyrase va permettre de stabiliser la molécule d'ADN et empêcher ainsi sa dénaturation à haute température (Kikuchi and Asai 1984). Bien qu'elle ait été détectée chez des thermophiles modérés, c'est tout de même un bon indice de la capacité d'un micro-organisme à se développer à haute température. En effet, son expression semble étroitement liée à l'adaptation à une élévation de la température dans les environnements hydrothermaux. Par exemple, l'archée *Thermococcus kodakarensis* mutée pour le gène de la reverse gyrase n'est plus capable de se développer pour une température d'incubation supérieure à 90 °C tandis que la souche sauvage est capable de se développer jusqu'à 100 °C (Heine and Chandra 2009). De plus, chez la bactérie *Nautila profundicola* l'expression de la reverse gyrase est 100 fois supérieure durant un stress à 65 °C (Campbell *et al* 2009, Catchpole and Forterre 2019). Cette thermoadaptation des bactéries a

sans doute fait l'objet d'un transfert horizontal de gènes de thermotolérance des archées aux bactéries, en témoigne par exemple le génome d'*Aquifex aeolicus* qui présente de nombreux gènes d'origine archéennes (Aravind et al 1998).

c. Polyamines et sels

Certains hyperthermophiles présentent une **concentration en sels** très importante. Il a été démontré que certains ions (KCl, MgCl₂ par exemple) protégeaient l'ADN contre la thermodénaturation et empêchaient le clivage et la dépurination en protégeant plus particulièrement la liaison N-glycosidique de la purine. Les polyamines et sels assurent une stabilisation de l'ADN (Marguet and Forterre 1998, Reed *et al* 2013).

d. Membrane et paroi cellulaire des archées

Les archées thermophiles ont des **lipides membranaires** de type glycérol-éther. Les liaisons éther sont plus stables que les liaisons ester retrouvées dans les membranes bactériennes. La présence de chaînes isoprénoïdes au niveau des membranes archéennes permet : une perméabilité des barrières et un état liquide cristallin qui aide au maintien des fonctions vitales de la cellule (Koga 2012). Certaines archées peuvent présenter une membrane lipidique monocouche formée de tétra-éthers atypiques composés de deux têtes hydrophiles reliées par des chaînes alkyles qui est une adaptation qui permet une rigidification efficace et une absence de plan de clivage. La structure de la membrane archéenne ainsi que sa composition chimique particulière lui confèrent une résistance particulière en condition de stress et plus particulièrement face aux hautes températures (Siliakus *et al* 2017, Valentine 2007).

La majorité des archées sont dépourvues de peptidoglycane au niveau de leur paroi cellulaire, et possèdent à la place une **S-layer** qui est composée de protéines spécifiques formant une structure rigide semi-cristalline. La S-layer est impliquée dans le maintien de la forme et de l'intégrité de la cellule notamment face aux conditions extrêmes auxquelles sont confrontées de nombreuses archées (Sleytr *et al* 2014).

e. Contenu en G-C

Le **contenu en G-C** est un indicateur de la stabilité de l'ADN pour les organismes thermophiles et hyperthermophiles. La paire de bases G-C est plus thermostable que la paire de bases A-T / A-U grâce à une liaison hydrogène supplémentaire. Un taux plus élevé en G-C

Introduction générale

au niveau de l'ADN et de l'ARN, et encore plus particulièrement pour l'ARN ribosomal, est observé pour ces organismes (Basak *et al* 2010, Wang *et al* 2015b, Zheng and Wu 2010). L'archée hyperthermophile *Pyrococcus abyssi* présentent un contenu en G-C de 44,7 % dans son génome par exemple (Fukui *et al* 2005).

f. Histone-like

Ces **protéines** peuvent compacter l'ADN en structures qui ressemblent à des nucléosomes et maintiennent l'ADN sous sa forme double brin lorsqu'il est confronté à de hautes températures. Cela a notamment été observé chez *Methanothermus fervidus* (Li *et al* 1998, Sandman and Reeve 2006).

3. Les habitats des micro-organismes thermophiles

Les microorganismes vivants à hautes températures sont présents dans **divers biotopes**, naturels ou créés par l'homme, largement repartis sur la Terre. Ils peuvent être terrestres ou marins. Ces environnements chauds sont le plus souvent associés à des zones tectoniques actives, et les plus connus sont les zones de **volcanisme et de géothermalisme** ainsi que les sources hydrothermales océaniques profondes (Mehta and Satyanarayana 2013).

a. Les sources chaudes terrestres

Au niveau des **zones tectoniquement actives**, les mouvements de la croûte terrestre vont engendrer de fortes pressions et de hautes températures. Les matériaux magmatiques produits vont être une source de chaleur pour les eaux souterraines qui s'infiltrent dans la croûte terrestre. Ces eaux atteignent des températures très élevées, mais sont également sous pression lithosphérique. Lorsque le fluide chauffe, la pression augmente d'autant plus et la pression générée permet au fluide de remonter en surface avec force. Ce fluide est enrichi en minéraux et divers éléments. Ces événements conduisent à la formation de fumerolles, de sources chaudes (ou thermales) ou encore de geysers.

i. Les fumerolles et solfatares

Les **fumerolles** sont des ouvertures (fissures, bouches ou événements) dans la croûte terrestre (Figure 39). A la surface, de la vapeur et des gaz divers (dioxyde de carbone, dioxyde de soufre, hydrogène sulfuré) sont issus de ces fumerolles. Au niveau de ces formations géologiques, il y a peu d'eau et cette eau est souvent émise sous forme de vapeur avant d'atteindre la surface. Les **solfatares** sont à distinguer des fumerolles et sont caractérisés par

Introduction générale

leurs émissions de gaz soufrés (Figure 39). Le plus souvent, les solfatares sont retrouvés dans des champs de solfatares qui comprennent des sols, eaux de surface et boues chauffées, par des activités volcaniques (chambres magmatiques) se situant en dessous de ces champs. Si les champs de solfatares sont toujours des environnements chauds, températures allant jusqu'à 100 °C, et riches en soufre, leur composition chimique est cependant très variable et dépendante de la géologie environnante. Les plus connus sont retrouvés en Islande, Italie ou encore au parc de Yellowstone aux Etats-Unis.



Figure 39 : Photographies de fumerolles et solfatare en Islande (Photographies personnelles).

ii. Les sources chaudes terrestres et geysers

Les **sources chaudes terrestres** sont formées d'eaux chauffées soit par la chaleur géothermique de la croûte terrestre pour les zones non volcaniques, soit par contact avec des chambres magmatiques pour les zones volcaniques. La pression engendrée par la température qui augmente permet aux eaux de percoler jusqu'à la surface terrestre pour former des sources chaudes ou encore des geysers lorsque la pression est forte. En remontant à la surface, les eaux de percolation s'enrichissent en minéraux dissouts. Les sources chaudes terrestres sont généralement très saturées en minéraux divers. Leur composition chimique affecte fortement le caractère alcalin ou acide de ces sources.

Les **geysers** sont des sources chaudes particulières où de l'eau et de la vapeur sont éjectées à intervalles plus ou moins réguliers. Si les sources chaudes terrestres sont souvent retrouvées à travers le monde, les geysers sont des phénomènes rares très localisés au niveau de zones volcaniques.

iii. Les environnements chauds terrestres créés par l'homme

Les environnements chauds résultant d'**activités humaines** sont majoritairement les drainages miniers, les déchets biologiques et leur traitement ainsi que les techniques de compostage des déchets organiques. Bien que les températures atteintes au niveau de ces habitats soient plus basses que celles des environnements naturels, elles permettent la croissance d'organismes thermophiles modérés à extrêmes.

Les **drainages miniers acides** désignent les fluides acides (pH 2,3–6,5) produits dans les mines de charbon ou de métaux. Ces fluides sont riches en métaux et peuvent être très chauds (températures pouvant atteindre les 70 °C) notamment grâce aux réactions exothermiques générées par l'oxydation des sulfures de métal. L'acidité, la chaleur et la présence de substances toxiques n'empêchent pas la colonisation de ce biotope. Les terrils qui sont des piles de déchets résultant de l'exploitation des mines de charbon peuvent être chauffés à haute température par combustion spontanée. Ces biotopes ont permis l'isolement de microorganismes hyperthermophiles appartenant aux genres *Sulfolobus*, *Metallosphaera*, *Acidianus* et *Stygiolobus* (Cayol *et al* 2015, Huber and Stetter 1998).

Les **déchets biologiques** produits par l'homme ainsi que les usines de traitements de ces déchets offrent également des conditions idéales à la formation de la vie microbienne et notamment à la vie thermophile.

Le **compostage** permet une décomposition auto-chauffante aérobie des déchets organiques. Le compostage peut être effectué sur sol, où les températures générées peuvent atteindre 55-60 °C, ou en bioréacteur, où les températures du compost peuvent atteindre les 80 °C (Tuomela *et al* 2000).

Les **déchets résultant de l'agriculture** sont souvent traités et stockés sous conditions anaérobies et acides. La fermentation anaérobie qui en résulte consomme la part organique de ces déchets et permet la production de biogaz qui peut être utilisé comme source d'énergie. Cette dégradation anaérobie de la biomasse avec production de biogaz est réalisée par des communautés microbiennes diverses en fonction du type de substrats disponibles (Ziganshin *et al* 2013). De nos jours, le substrat le plus commun pour la fermentation dans le but de produire de méthane comme biofioul est l'ensilage agricole de maïs. Ces fermentations

sont souvent réalisées à haute température, permettant le développement de méthanogènes thermophiles (Ciešlik *et al* 2016).

b. Les sources hydrothermales océaniques profondes

La Terre, parfois surnommée la **planète bleue**, est recouverte pour 70 % de sa surface par les mers et océans. Le **monde abyssal** quant à lui représente les deux tiers de la surface du globe. Et pourtant, les sources hydrothermales océaniques profondes n'ont été découvertes qu'en 1977 lors d'une exploration à 2500 m de profondeur, au large des Galápagos, à l'aide du submersible Alvin. Ces **sources hydrothermales océaniques profondes** font partie des environnements les plus extrêmes sur Terre (Flores and Reysenbach 2011). Au niveau de cet écosystème particulier, les conditions de vie sont caractérisées par l'absence de lumière, des gradients physico-chimiques importants (température, pH, ...), la présence de métaux lourds et de hautes pressions hydrostatiques (Prieur *et al* 1995) (Figure 40). Pourtant, la vie microbienne y est abondante (environ 10^4 à 10^6 procaryotes par ml) et diverse avec une grande variété de psychrophiles, mésophiles, (hyper)thermophiles, acidophiles, piezophiles et même d'halophiles modérés appartenant tant au domaine des bactéries qu'au domaine des archées (Figure 41) (Takai and Nakamura 2011, Williamson *et al* 2008). Les méthanogènes et les *Thermococcales* sont des microorganismes hyperthermophiles clés, notamment par leur métabolisme, au sein de ces écosystèmes particulier (Dick 2019).



Figure 40 : Photographie et caractéristiques physico-chimiques d'une source hydrothermale océanique profonde (reprise d'une photographie de la collection IFREMER).

Introduction générale

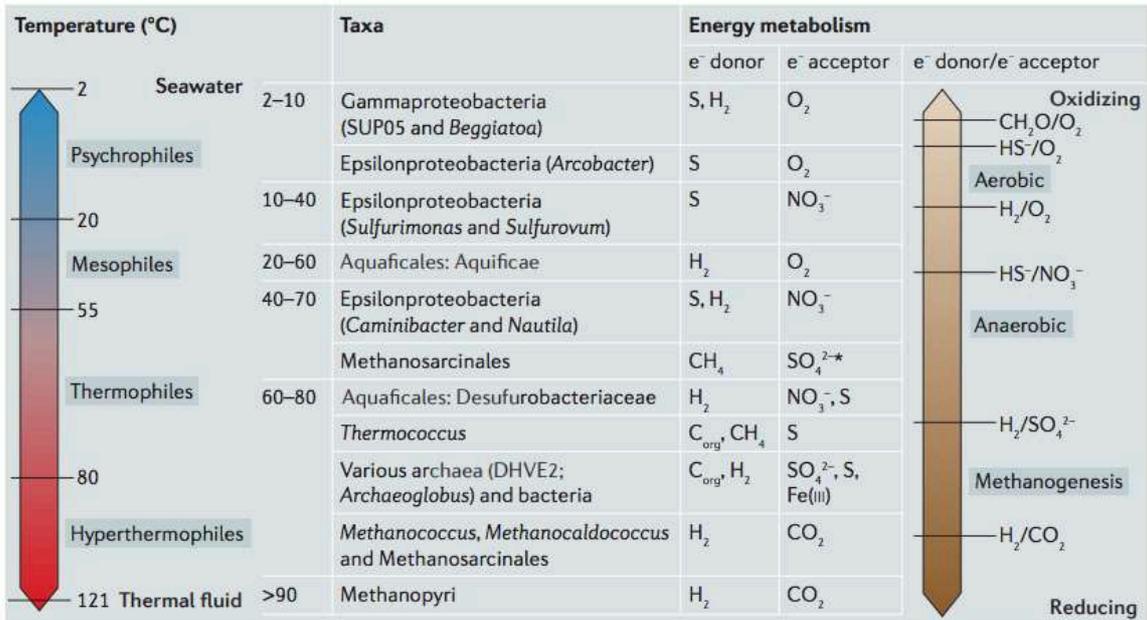


Figure 41 : Diversité microbienne retrouvée au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes (Dick 2019).

i. Répartition géographique

Les sources hydrothermales océaniques profondes sont associées à des **zones d'activités tectoniques intenses**. Elles sont réparties le long des dorsales océaniques et les bassins arrière Arc, à des profondeurs allant de 700 m à 5000 m sous la surface des océans, sur plus de 200 localisations (confirmées ou présumées) dans les océans Pacifique, Atlantique et Indien (Figure 42) (Jebbar *et al* 2015).

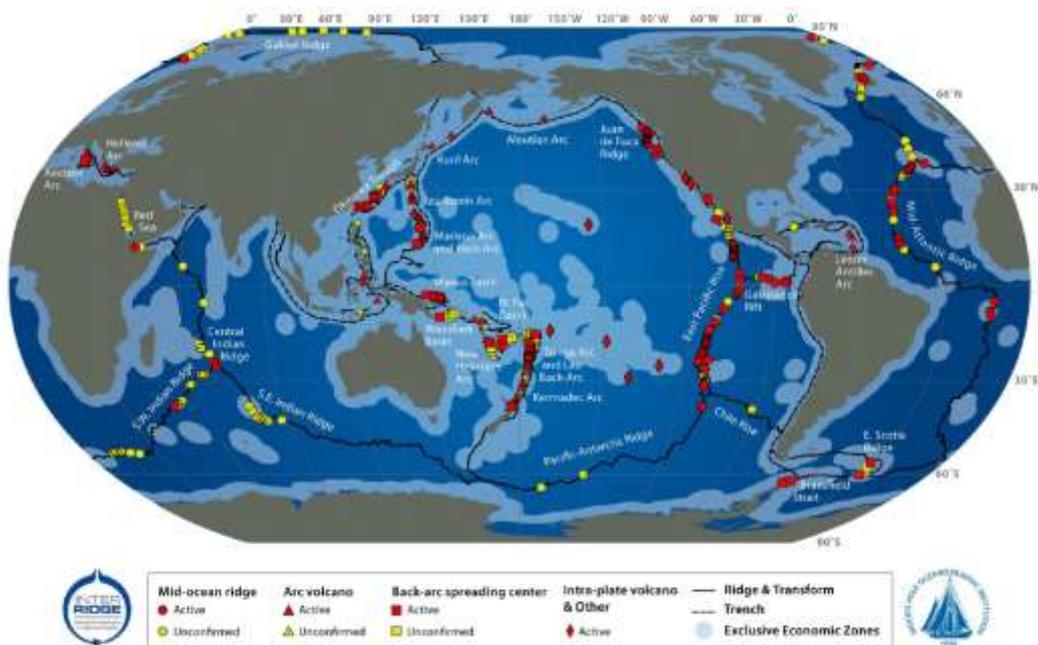


Figure 42 : Répartition globale des sites hydrothermaux (Jebbar *et al* 2015).

ii. Formation des cheminées hydrothermales océaniques profondes

L'activité des plaques tectoniques engendre la formation de **zones d'accrétion** (dorsales océaniques) où les plaques océaniques s'écartent et où se forme le plancher *de novo*. L'**eau de mer** s'infiltré au niveau de ces régions de fracture de la croûte terrestre et se réchauffe au contact d'une **chambre magmatique**. Progressivement, l'eau infiltrée va s'enrichir en gaz dissous (méthane, dihydrogène, sulfure d'hydrogène, monoxyde et dioxyde de carbone) grâce à la chambre magmatique et en minéraux et éléments divers lors de sa remontée vers le plancher océanique (lessivage des roches rencontrées). Sous l'effet de la **chaleur et de la pression**, le fluide enrichi, acide, anoxique et très chaud (environ 350 °C) est donc émis via des formations appelées cheminées hydrothermales. Ces cheminées sont formées par la précipitation des éléments contenus dans le **fluide chaud et anoxique** quand celui-ci rencontre l'eau de mer froide (2 °C). La rencontre du fluide hydrothermal et de l'eau de mer crée des **gradients** de températures, de concentration en oxygène, de pH, ... Ces conditions physico-chimiques fluctuantes sont d'autant de conditions de vie adéquates pour une large diversité d'organismes rencontrés au niveau de ces écosystèmes originaux (Figure 43) (Flores and Reysenbach 2011).

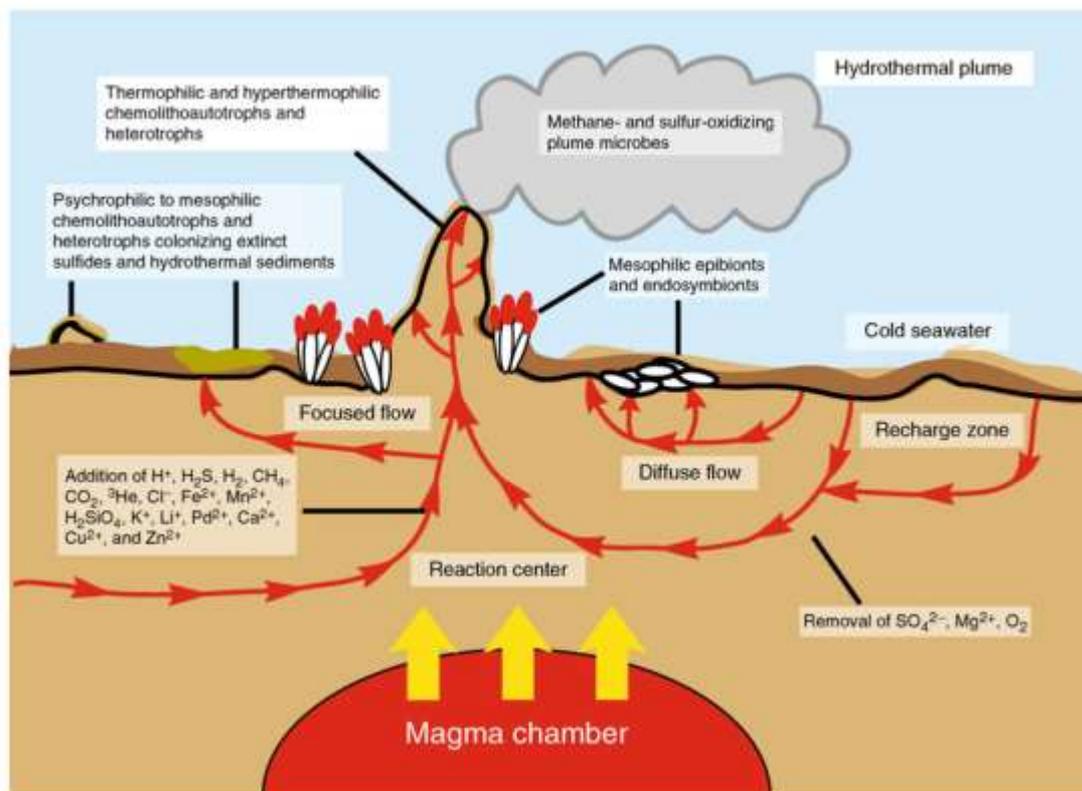


Figure 43 : Schéma du fonctionnement d'une cheminée hydrothermale profonde (Flores and Reysenbach 2011).

C. Quelques représentants de la diversité archéenne

L'étude des archées a permis l'isolement et la caractérisation d'éléments génétiques mobiles tels que les virus. La grande majorité des virus d'archées ont été isolés de **Crenarchaeota hyperthermophiles** et d'**Euryarchaeota hyperthermophiles** et/ou halophiles. Les méthanogènes, les halophiles extrêmes, les ordres des *Thermococcales* et des *Sulfolobales* rassemblent des espèces modèles pour les études de génétiques et leur éléments génétiques mobiles sont particulièrement étudiés (Leigh *et al* 2011).

Parmi les **Crenarchaeota**, les espèces du genre **Sulfolobus** qui font partie de l'ordre des *Sulfolobales* ont permis l'isolement de nombreux éléments génétiques mobiles comme les virus et les plasmides. Ce sont notamment les espèces bien étudiées : *S. solfataricus* infectée par des *Fusellovirus* (les SSVs) et *S. islandicus* infectée par les *Rudivirus* SIRV1 et SIRV2 (Prangishvili 2013). Plus généralement, les *Sulfolobales* sont des microorganismes hyperthermophiles, aérobies et, pour une grande majorité, acidophiles. Elles colonisent des sources chaudes terrestres acides et riches en soufre qu'elles utilisent pour leur métabolisme (Leigh *et al* 2011).

Ici seront données de plus amples informations concernant les **Euryarchaeota** puisque comprenant les genres étudiés lors des présents travaux de thèse.

Le phylum des **Euryarchaeota** est composé de 7 classes (*Methanobacteria*, *Methanococci*, *Halobacteria*, *Thermoplasmata*, *Thermococci*, *Archeoglobi* et les *Methanopyri*) et comprennent notamment des groupes importants tels que **les méthanogènes, les halophiles extrêmes et les Thermococcales**. Les *Methanococci* sont divisées en trois ordres tandis que les autres classes ne contiennent qu'un ordre. Parmi les *Euryarchaeota*, un certain nombre de système hôte-virus sont connus qui seront détaillés dans la partie suivante consacrée aux virus d'archées.

1. Les halophiles extrêmes

Souvent appelées « *Haloarchaea* » et « *Halobacteria* », ce groupe comprend divers microorganismes associés à des environnements fortement **concentrés en sel**. Ces environnements peuvent être naturellement salés comme les bassins d'évaporation solaires, les lacs salés (380 g/l d'eau pour la lac Rose au Sénégal) et la mer morte (environ 250 g/l d'eau soit 22 à 25 % de NaCl (m/v) ou être artificiels comme la surface de salaison de certains aliments. Ces habitats sont qualifiés d'hypersalins. Ces archées sont halophiles extrêmes et ont un besoin en sel extrêmement élevé pour leur survie avec des concentrations en NaCl (m/v) supérieures à 9 % et optimales à partir de 14,6 % et allant pour certains de ces organismes jusqu'à des concentrations proches de la saturation (la saturation pour le NaCl en solution est de 32 %) (Merino *et al* 2019). Ces halophiles extrêmes sont notamment présents dans les genres : *Halobacterium*, *Haloferax* et *Natronobacterium*. Il a été observé que de nombreuses archées halophiles produisent des **vésicules** de gaz. Par exemple, les cellules d'*Haloquadratum* forment des vésicules de gaz qui pourraient avoir plusieurs fonctions possibles : pour les aider à flotter dans leur habitat hypersalé et entrer en contact avec les couches les plus en surface qui sont plus oxygénées et ainsi prévenir la limitation en oxygène ou encore pour capter plus d'énergie lumineuse (Oren 2013). De nombreuses halophiles sont aérobies obligatoires. Les génomes de certaines halophiles sont originaux dans le sens où elles possèdent de grands **plasmides** qui contiennent 30 % de l'ADN total de la cellule. Les plasmides des halophiles extrêmes sont également les plus gros plasmides connus. Le ratio G-C de ces plasmides diffère notablement de celui de l'ADN chromosomique suggérant une origine différente (Forterre *et al* 2015, Leigh *et al* 2011). Les **virus d'*Haloarchaea*** ont fait l'objet de nombreuses recherches puisque ces archées sont souvent anaérobies et mésophiles donc facilement cultivable en laboratoire. Notamment, le premier virus d'archée a été isolé de la souche *Halobacterium salinarum* et depuis plusieurs virus appartenant à diverses familles de virus telles que les *Caudoviridae*, *Salterprovirus*, *Pleolipoviridae* et *Sphaerolipoviridae*, ont été décrits (Forterre *et al* 2015).

2. Les *Thermococcales*

La première espèce de ***Thermococcales***, *Thermococcus celer*, a été décrite **en 1983** par Wolfram Zillig et ses collaborateurs (Zillig *et al* 1983). Elle a notamment joué un rôle important dans la construction de l'arbre phylogénétique des archées. Depuis, plus de 40 espèces de *Thermococcales* (3 *Palaeococcus*, 9 *Pyrococcus* et 38 *Thermococcus*) ont été décrites et 17 génomes complets sont disponibles. Les *Thermococcales* sont représentées par une famille, les *Thermococcaceae* qui comprend trois genres : les ***Thermococcus***, les ***Pyrococcus*** et les ***Palaeococcus***. Les espèces décrites de cet ordre ont pour la plupart été isolées de **sources hydrothermales océaniques profondes** où elles sont abondantes (Price *et al* 2015). Elles sont anaérobies obligatoires et chimio-organotrophes, capables de fermenter une large gamme de composés organiques tels que l'amidon, les peptones, l'extrait de levures. Elles sont notamment capables d'utiliser le soufre élémentaire comme accepteur d'électrons, ce qui engendre une production d'hydrogène sulfuré (H₂S). Actuellement, les *Thermococcales* se distinguent par leur caractère hyperthermophile puisqu'elles sont toutes capables de se développer au-dessus de 80 °C. Le genre *Thermococcus* est le plus représenté tandis que le genre *Palaeococcus* ne contient que trois espèces décrites (Schut *et al* 2014). L'étude des génomes de certaines souches modèles de *Thermococcales* a permis le développement d'**outils génétiques** chez *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus kodakarensis* et *Thermococcus barophilus* (Thiel *et al* 2014). *P. furiosus*, qui est la première espèce du genre *Pyrococcus* décrite, ainsi que *Thermococcus kodakarensis*, sont sûrement les plus étudiées des *Thermococcales*. L'étude des **éléments extrachromosomiques** des souches de *Thermococcales* disponibles a permis de mettre en évidence l'existence de **plasmides** et de **virus** interagissant avec ces cellules et qui sont des éléments de choix pour des manipulations génétiques (Soler *et al* 2011).

La production de **vésicules membranaires** par les *Thermococcales* hydrothermales a été observée et ces vésicules semblent impliquées dans un système de détoxification du soufre en excès dans la cellule (Gaudin *et al* 2014, Gorlas *et al* 2015). Deux systèmes hôtes-virus issus d'environnements hydrothermaux océaniques profonds ont été décrits. Ce sont *P. abyssi* avec son virus PAV1 et *T. prieurii* avec son virus TPV1 (Geslin *et al* 2003a, Gorlas *et al* 2012). Ces virus seront décrits dans la partie suivante consacrée aux virus d'archées.

3. Les méthanogènes

a. Historique et généralités

Alessandro Volta, **en 1776**, étudie des bulles de gaz inflammables qui s'échappent des sédiments d'une zone peu profonde du lac Majeur (lac italo-suisse). Ses expériences lui ont permis d'établir une relation entre le gaz produit et la décomposition de matériel organique (du matériel végétal saturé en eau). Les **expériences de Volta** ont attisé la curiosité d'autres scientifiques comme Lavoisier qui introduit le terme d'hydrogène carboné pour qualifier le gaz observé. C'est **en 1865** que le terme **méthane** est proposé puis adopté **en 1892** par le Congrès consacré à la nomenclature en chimie (Wolfe 2012).

Le premier isolement de méthanogène date **de 1933**, Stephenson et Stickland décrivent alors un organisme capable d'oxyder l'hydrogène et de réduire des composés carbonés tels que le dioxyde de carbone, le monoxyde de carbone, le formate, le formaldéhyde ou encore le méthanol en méthane. **L'année 1936** marque le début des études de la **méthanogénèse** avec les expériences de Barker et ses collaborateurs (Barker 1936, Wolfe 2012).

Depuis, de nombreuses espèces de méthanogènes ont été décrites. Particulièrement **ubiquistes**, elles ont été isolées d'environnements variés allant de rumens d'animaux aux sédiments marins profonds. Les méthanogènes colonisent une large gamme d'environnements présentant des conditions physico-chimiques très variées ; il a été décrit des méthanogènes acidophiles à alcaliphiles (pH 3 à 10,2), psychrophiles à hyperthermophiles (-2 °C à 122 °C) et colonisant aussi bien les eaux douces des estuaires que les environnements très salés (Buan 2018). Ce sont des microorganismes anaérobies stricts et bien que de nombreux extrêmophiles soient présents chez les méthanogènes, la plupart des méthanogènes sont mésophiles et non-halophiles. Elles puisent leur énergie de l'hydrogène et peuvent avoir des sources de carbone variées. Elles peuvent notamment utiliser trois types de substrats : le CO₂, les substrats méthylés et les substrats acétylés. Le produit de leur métabolisme est le méthane, on parle de méthanogénèse, processus qui se déroule exclusivement en anaérobiose. De par leur métabolisme et leur contenu génétique varié, les méthanogènes sont phylogénétiquement et morphologiquement très diverses (Hedderich *et al* 2013, Lyu and Liu 2018).

b. Taxonomie et phylogénie

Les archées méthanogènes sont regroupées dans le phylum des *Euryarchaeota* et sont réparties en 3 classes qui comprennent 7 ordres : les *Methanobacteriales*, les *Methanococcales*, les *Methanomicrobiales*, les *Methanopyrales*, les *Methanosarcinales*, les *Methanocellales* et les *Methanomassiliicoccales*. Cette phylogénie est basée sur la comparaison de l'ARNr 16S ainsi que sur la comparaison de propriétés phénotypiques propres à chaque ordre (la morphologie, la structure de la paroi cellulaire, la composition des lipides de la cellule, ou encore les substrats utilisés par la cellule pour effectuer la méthanogénèse) (Tableau 5 et Figure 44). La classe I comprend les ordres des *Methanobacteriales*, des *Methanococcales* et des *Methanopyrales* ; la classe II comprend les *Methanomicrobiales* et la classe III comprend les *Methanosarcinales*. La description des *Methanocellales* a flouté les classes II et III laissant penser à une classe qui comprendrait les ordres de ces deux classes. De plus, le dernier ordre décrit, les *Methanomassiliicoccales*, n'est inclus dans aucune classe et pourrait appartenir à une quatrième classe (Borrel *et al* 2013, Lyu and Liu 2018). D'après les données actuelles, les méthanogènes, partagent toutes les mêmes enzymes homologues et autres cofacteurs nécessaires à la méthanogénèse. Elles sont considérées comme faisant partie d'une lignée monophylétique ancienne. Cependant, des méthanogènes seraient également présentes dans les *phyla* récemment proposés des *Bathyarchaeota* et des *Verstraetearchaeota* (Lyu and Liu 2018).

Introduction générale

Tableau 5 : Quelques caractéristiques représentatives de chaque ordre de méthanogènes (repris de Lyu and Liu 2018).

Ordre	Morphologie	Substrats majeurs de la méthanogénèse (entre parenthèses, composés utilisés minoritairement)	Mobilité	Pari cellulaire
Methanobacteriales	Bâtonnets / coques	H ₂ + CO ₂ , (formate, CO, méthanol, alcools secondaires)	Non (sauf le genre <i>Methanothermus</i>)	Pseudomuréine, protéine
Methanococcales	Coques	H ₂ + CO ₂ , formate	+	Protéine
Methanomicrobiales	Coques / bâtonnets / spirales / bâtonnets gainés	H ₂ + CO ₂ , formate	+/-	Protéine, Glycoprotéine
Methanosarcinales	<i>Pseudosarcina</i> / coques / bâtonnets gainés	Méthanol, méthylamine, acétate, (H ₂ + CO ₂ , composés méthoxylés aromatiques)	Non	Protéine, Glycoprotéine
Methanopyrales	Bâtonnets	H ₂ + CO ₂	+	Pseudomuréine
Methanocellales	Bâtonnets	H ₂ + CO ₂ , formate	Non	nd
Methanomassiliicoccales	Coques	H ₂ + méthanol, méthylamine	Non	nd

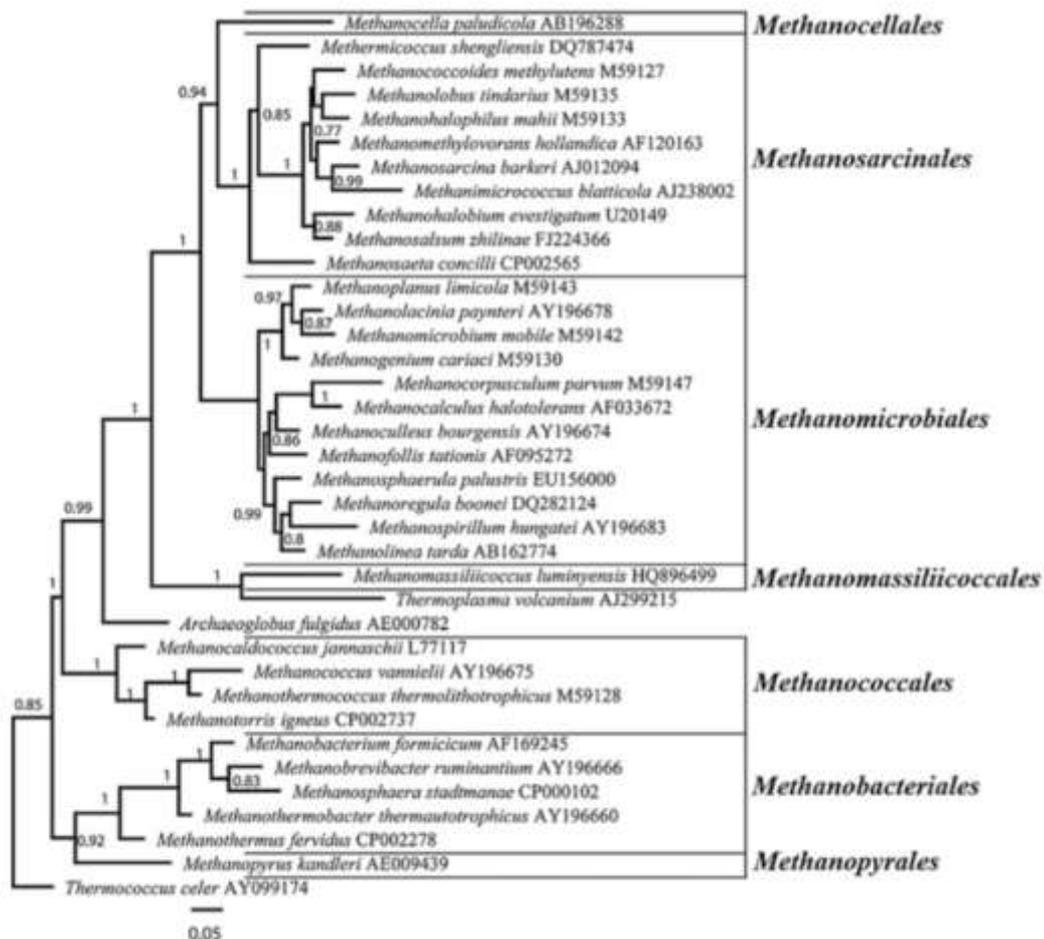


Figure 44 : Arbre phylogénétique basé sur la comparaison de séquences presque complètes de l'ARNr 16S, d'espèces types de 34 genres de méthanogènes (Lyu and liu 2018).

Introduction générale

Parmi les **7 ordres** décrits de méthanogènes, 4 comprennent des genres ou espèces impliquées dans des **systèmes hôte-virus** décrits ou suspectés. Ce sont les *Methanobacteriales*, les *Methanococcales*, les *Methanomicrobiales* et les *Methanosarcinales* (Tableau 6).

Tableau 6 : Espèces de méthanogènes d'intérêt pour chaque ordre : Surligné en bleu clair : genres et espèces d'intérêt impliqués dans un système hôte-virus décrit ou suspecté. En orange : les espèces hyperthermophiles étudiées dans cette étude. Surligné en gris sont les espèces d'intérêt pour les ordres où aucun système hôte-virus n'est connu à ce jour.

Ordre	Famille	Genre	Espèces
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i>	
		<i>Methanothermobacter</i>	<i>M. marburgensis</i> <i>M. wolfeii</i>
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcaceae</i>	<i>Methanococcus</i>	<i>M. voltae</i>
	<i>Methanocaldococcaceae</i>	<i>Methanocaldococcus</i>	<i>M. fervens</i> <i>M. jannaschii</i> <i>M. vulcanius</i>
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanomicrobiaceae</i>	<i>Methanoculleus</i>	<i>M. taiwanensis</i>
		<i>Methanofollis</i>	<i>M. aquaemaris</i>
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcinaceae</i>	<i>Methanosarcina</i>	<i>M. mazei</i> <i>M. barkeri</i> <i>M. soligedili</i>
	<i>Methanosaetaceae</i>	<i>Methanosaeta</i>	
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyraceae</i>	<i>Methanopyrus</i>	<i>M. kandleri</i>
<i>Methanocellales</i>	<i>Methanocellaceae</i>	<i>Methanocella</i>	<i>M. paludicola</i>
<i>Methanomassiliococcales</i>	<i>Methanomassiliococcaceae</i>	<i>Methanomassiliococcus</i>	<i>M. luminyensis</i>

Les *Methanobacteriales* : Elles sont divisées en 2 familles et 5 genres.

La famille ***Methanobacteriaceae*** contient 4 genres dont trois principalement mésophiles et 1 genre thermophile (*Methanothermobacter*). Le genre *Methanothermobacter* contient notamment deux espèces thermophiles qui sont impliquées dans des relations hôtes-virus : *M. marburgensis* et *M. wolfeii*. Les **virus tête-queue ϕ F1 et ϕ F3** ont été démontré comme capables d'infecter des espèces du genre *Methanobacterium* (Nölling et al 1993). La famille ***Methanothermaceae*** contient le genre hyperthermophile *Methanothermus*

Introduction générale

représenté par les deux **espèces hyperthermophiles** pouvant croître jusqu'à 97 °C : *Methanothermobacter feravidus* et *Methanothermobacter sociabilis* (Lauerer *et al* 1986, Stetter *et al* 1981).

Les Methanococcales : Elles sont divisées en 2 familles et 4 genres.

Les **Methanococcaceae** sont mésophiles à thermophiles extrêmes et le genre mésophile *Methanococcus* contient l'espèce *M. voltae* qui est impliqué dans un **système hôte-virus** (Wood *et al* 1989). Les **Methanocaldococcaceae** sont toutes hyperthermophiles et parmi ces méthanogènes hyperthermophiles, des provirus ont été détectés dans le génome de trois espèces : *M. fervens*, *M. jannaschii* et *M. vulcanius* (Krupovic *et al* 2010). Ces espèces font l'objet des présents travaux de thèse, elles seront plus particulièrement décrites dans les chapitres 1 et 2 de ce manuscrit. Les *Methanococcales* sont génétiquement diverses mais partagent quelques caractéristiques comme la prédominance de l'utilisation de l'H₂ pour la réalisation de la méthanogénèse (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques des méthanogènes hyperthermophiles des genres *Methanocaldococcus* (en blanc) et *Methanothermobacter* (en jaune). Nd = non déterminé. +/- : structure de type flagelles observés mais cellules non mobiles (repris de Lyu and Liu 2018).

Caractéristiques	<i>M. jannaschii</i>	<i>M. infernus</i>	<i>M. fervens</i>	<i>M. indicus</i>	<i>M. villosus</i>	<i>M. bathoardescens</i>	<i>M. vulcanius</i>	<i>M. igneus</i>	<i>M. formiculus</i>
Souche	JAL-1	ME	AG86	SL 43	KIN24-T80	JH146	M7	Kol 5	Mc-S-70
Taille de la cellule (µM)	1,5	1-3	1-2	1-3	1-2	1-2	1-3	1-2	0,8-1,5
Flagelles	+	+	nd	+	+	+	+	+/-	+/-
Substrat pour la méthanogène	H ₂ + CO ₂ , formate								
Autotrophie	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Température de croissance (°C)	50-91 (opt. 85)	55-91 (opt. 85)	48-92 (opt. 85)	50-86 (opt. 85)	55-90 (opt. 80)	58-90 (opt. 82)	49-89 (opt. 80)	45-91 (opt. 88)	55-83 (opt. 75)
NaCl optimum	3,0	2,0	3,0	3,0	2,5	2,9	2,5	1,8	2,4
Contenu en GC (%)	31	33	33	31	30	30,8	31	31	33
Temps de doublement (min) – en condition opt.	26	35-40	20-30	25-30	45	20	45	30	30
Références	Jones <i>et al</i> , 1983	Jeanthon <i>et al</i> , 1998	Zhao <i>et al</i> , 1988	L'Haridon <i>et al</i> , 2003	Bellack <i>et al</i> , 2011	Stewart <i>et al</i> , 2015	Jeanthon <i>et al</i> , 1999	Burggraf <i>et al</i> , 1990	Takai <i>et al</i> , 2004

Introduction générale

Les *Methanomicrobiales* : Cet ordre contient des méthanogènes issues d'environnements divers qui vont du rumen de bovins aux écosystèmes marins et qui réalisent toutes la méthanogénèse à partir d'H₂ (le formate et autres alcools peuvent être utilisés comme alternatives). Divisé en 4 familles et 11 genres, dont 3 non assignés à une famille, des indices de **systemes hôte-virus** ont été reportés au sein de la famille des *Methanomicrobiaceae* chez les espèces mésophiles *Methanoculleus taiwanensis* et *Methanofollis aquaemaris* (Lai and Chen 2001, Weng *et al* 2015).

Les *Methanosarcinales* : Les *Methanosarcinales* sont divisées en 4 familles et 10 genres. C'est sûrement l'ordre qui présente le plus de diversité quant aux substrats utilisés pour la méthanogénèse. Les *Methanosarcinaceae* sont toutes capables d'utiliser des composés méthylés pour réaliser la méthanogénèse, certaines sont capables d'utiliser l'H₂ et les genres *Methanosarcina* et *Methanosaeta* sont les seuls méthanogènes capables d'utiliser l'acétate comme substrat. **MetSV** est un virus décrit comme étant capable d'infecter les souches du genre *Methanosarcina* : *M. mazei*, *M. barkeri* et *M. soligedili* (Weidenbach *et al* 2017). Des **particules de types virales** ont été détectées dans des échantillons de sédiments anoxiques du Lac Pavin et dans des bioréacteurs qui seraient majoritairement colonisés par des *Methanosaeta*, potentiels hôtes pour ces particules (Borrel *et al* 2012, Chien *et al* 2013).

Les *Methanopyrales* : Cet ordre n'est représenté que par une unique espèce, *Methanopyrus kandleri*, qui détient le record de température de croissance maximale avec 122 °C à 40 MPa (Takai *et al* 2008). C'est une méthanogène hydrogénotrophe proche des *Methanobacteriales* et *Methanococcales* qui possède des caractéristiques originales telles que sa topoisomérase **Topo V** qui est unique. Cette topoisomérase est retrouvée seulement chez les souches de *Methanopyrus*, et qui semble proche de la topoisomérase I des eucaryotes (Rajan *et al* 2014). Sa position phylogénétique n'est pas claire bien que son contenu élevé en GC, qui est une caractéristique partagée par toutes les hyperthermophiles méthanogènes et non méthanogènes, indique une origine ancienne.

Les *Methanocellales* : Les *Methanocellales* sont représentées par une famille et un genre contenant trois espèces plutôt mésophile : *Methanocella avoryzae*, *M. paludicola* et *M. conradii*. Elles utilisent l'H₂ (ou le formate en alternative) pour réaliser la méthanogénèse mais ont absolument besoin d'acétate pour leur croissance. Elles ont toutes été isolées de sols de rizières.

Les *Methanomassiliococcales* : Les *Methanomassiliococcales* contiennent une famille et deux genres. Cependant, une seule espèce a été décrite : ***Methanomassiliococcus luminyensis*** isolée de fèces humaines. Elle réduit le méthanol en présence d' H_2 pour produire du méthane. Elle est aussi capable de réduire la tri-, di- et monométhylamine en présence d' H_2 (Borrel *et al* 2013).

c. La méthanogénèse

Le **méthane (CH_4)** est le produit final de la méthanogénèse effectuée par les méthanogènes. Ce gaz est un acteur important de l'effet de serre, il est notamment 25 fois plus puissant que le CO_2 en potentiel de réchauffement global (PRG) et il est responsable d'environ 20 % du réchauffement global actuel. Les émissions de méthane sont d'environ 500 à 600 Tg par an et la majorité de ces émissions est le résultat de la méthanogénèse (environ 70 %). 40 % du méthane résultant de la méthanogénèse n'est pas émis dans l'atmosphère puisqu'il est oxydé par des bactéries et des archées méthanotrophes (Lyu *et al* 2018). De plus, lors de la formation de méthane à partir de glucides, pour chaque mole de CH_4 produite, une mole de CO_2 est également formée. Les méthanogènes, en réalisant les dernières étapes de la dégradation anaérobie des produits organiques *via* la méthanogénèse, jouent un rôle crucial dans le cycle global du carbone (Anderson *et al* 2009, Hedderich *et al* 2013).

Il existe trois grandes voies de la méthanogénèse : **hydrogénotrophe, méthylotrophe et acétoclastique** (Figure 45).

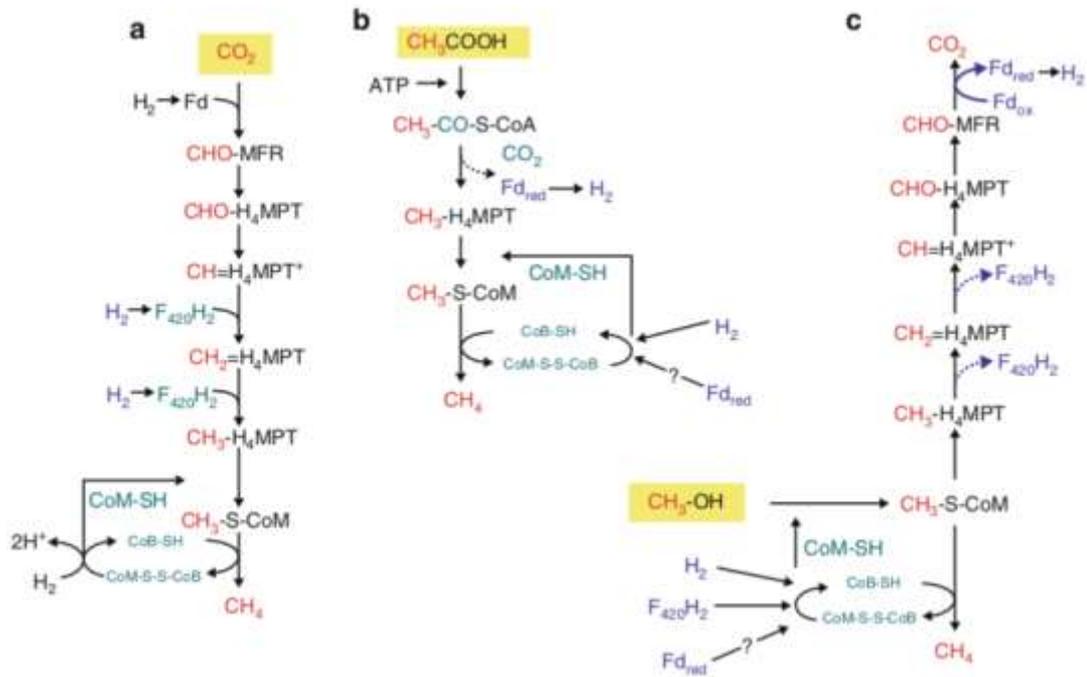


Figure 45 : Les trois voies de la méthanogénèse. a) Méthanogénèse hydrogénotrophe utilisant l' H_2 b) Méthanogénèse acétoclastique c) Méthanogénèse méthylotrophe utilisant du méthanol (Heiderich *et al* 2013).

La méthanogénèse hydrogénotrophe : La plupart des méthanogènes réduit le CO_2 en CH_4 . Pour cela, elles utilisent l'hydrogène (H_2) et le formate comme donneurs d'électrons majeurs. Elles peuvent également utiliser certains alcools tels que le 2-propanol, le 2-butanol, le cyclopentanol et l'éthanol comme donneurs d'électrons. 8 électrons sont nécessaires pour réduire le CO_2 en méthane donc 4 molécules de H_2 , 4 molécules de formate ou 4 molécules de 2-propanol sont consommés. La réduction du CO_2 en CH_4 se fait via des transporteurs intermédiaires du carbone 1 (C1): le méthanofurane (MFR), le tétrahydromethanesulfonate (H_4MPT) ou ses dérivés et le 2-mercaptoethanesulfonate (coenzyme M, CoM-SH) (Figure 46). La réaction débute avec la réduction, *via* une ferrédoxine, du CO_2 et du MFR chacun de deux électrons pour former du formyl-MFR. Le groupe formyle est alors rattaché au groupe amine du coenzyme. Le groupe formyle est ensuite transféré au N5 du H_4MPT . Le formyl- H_4MPT se cyclise en méthenyl- H_4MPT qui est réduit en deux étapes, *via* le donneur d'électron F_{420} , en méthyl- H_4MPT . Le groupe méthyle est finalement transféré au groupe thiol du coenzyme M. Le méthyl-thioéther ainsi formé est réduit en CH_4 qui est le produit final de la réaction (Figure 45 – a). Pour cette étape finale la méthyl-réductase, les coenzymes CoM et CoB sont requis.

Introduction générale

La méthanogénèse acétoclastique : L'acétate est le substrat utilisé pour réaliser la méthanogénèse dans ce cas. Cette réaction, appelée acétoclastique, résulte de la division de l'acétate en CO_2 et CH_4 . Le groupe méthyle de l'acétate est réduit en méthane en utilisant les électrons obtenus de l'oxydation du carbone 1 du groupe carboxyle de l'acétate. Le groupe méthyle entre dans la voie du carbone 1 au niveau du méthyl-H4MPT (Figure 45– b).

La méthanogénèse méthylotrophe : Certaines méthanogènes utilisent comme substrat à la méthanogénèse des composés méthylés dont le groupe méthyle est relié à un oxygène, un azote ou du soufre tels que : le méthanol, la monométhylamine, la diméthylamine, la triméthylamine, le tétraméthylammonium, le diméthylsulfide et le méthane thiol. Le groupe méthyle de ces composés entre en jeu dans la voie de réduction du carbone 1 au niveau du coenzyme M (CoM) pour être réduit en CH_4 . Les électrons nécessaires pour cette réaction sont obtenus de l'oxydation du groupe méthyle en CO_2 . Cette oxydation se fait en suivant l'interversion des étapes de réduction du CO_2 de la méthanogénèse. 6 électrons sont obtenus de cette oxydation et 2 seulement sont nécessaires à la réaction de réduction du groupe méthyle en méthane. Donc pour chaque molécule de CO_2 formée, 3 molécules de CH_4 sont formées. En présence d' H_2 , l'oxydation du groupe méthyle est inhibée et le groupe méthyle est totalement réduit en CH_4 (Figure 45 – c).

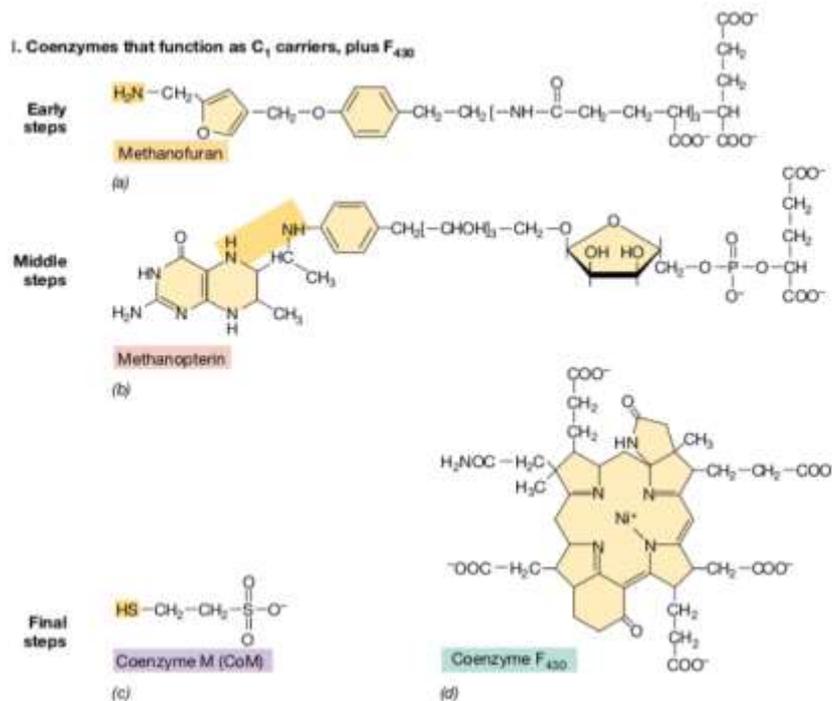


Figure 46 : Coenzymes transporteurs du carbone 1 et le coenzyme F_{430} impliqués dans la méthanogénèse (Madigan *et al* 2010).

Introduction générale

i. Les coenzymes qui ont la fonction de donneur d'électrons

Les **coenzymes F420 et CoB** sont des donneurs d'électrons impliqués dans la méthanogénèse (Figure 47). Le F420 participe à plusieurs étapes de la réduction du CO₂ notamment. Il a été nommé ainsi car il est capable, sous sa forme oxydée, d'absorber la lumière à 420 nm et qu'il fluoresce en bleu. C'est une particularité qui peut se révéler intéressante lors de l'observation des cellules de méthanogènes sous microscope optique à l'aide de lumière UV puisqu'elles fluorescent alors en bleu.

II. Coenzymes that function as electron donors

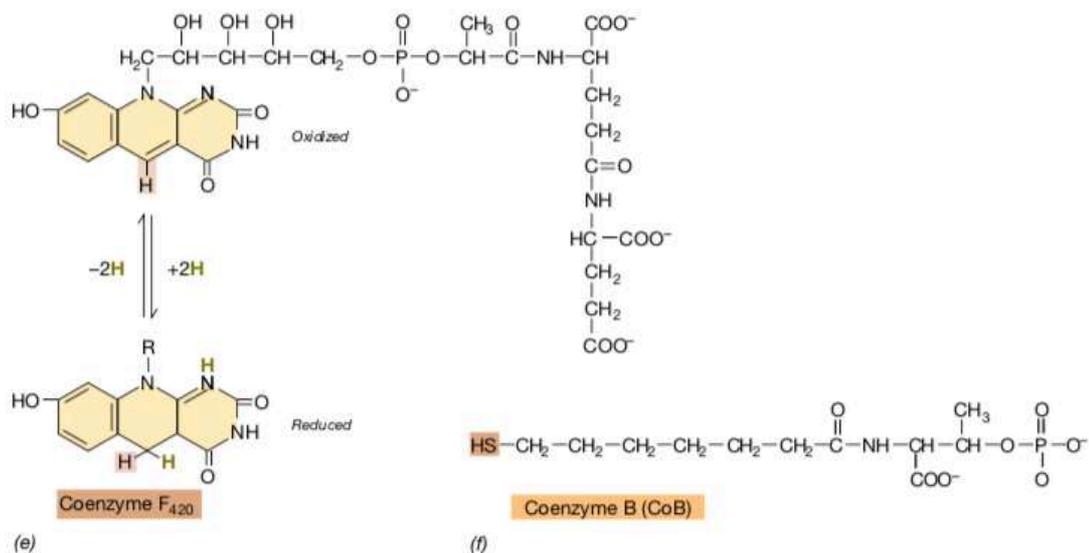


Figure 47 : Les coenzymes F420 et CoB ont la fonction de donneurs d'électron dans la réaction de méthanogénèse (Madigan *et al* 2010).

ii. L'étape finale de la méthanogénèse

Les trois voies de la méthanogénèse débutent différemment mais **l'étape finale** reste la même. Le méthyl-coenzyme M réagit avec le coenzyme B pour former du méthane et un hétérodisulfide (CoM + CoB) et ce à l'aide de la méthyl-coenzyme M réductase (Mcr). La Mcr est donc une enzyme clé de la réaction de méthanogénèse. Elle contient notamment le coenzyme F430 qui est un nickel porphinoïde qui doit être fortement réduit et dans sa forme Ni(I) pour que l'enzyme soit active (Figure 46). L'hétérodisulfide produit est un acteur clé de la réaction également, il est important pour la cellule puisqu'il a été observé chez des *Methanosarcina* que sa réduction est couplée à de la conservation d'énergie (Hedderich *et al* 2013).

iii. Aspect biotechnologique du métabolisme des méthanogènes

Les méthanogènes sont un groupe très divers et sont capables de faire face à des conditions variées dites normales aux plus extrêmes, ce qui en fait un groupe de microorganismes d'intérêt pour des applications fondamentales mais également biotechnologiques.

Elles peuvent être utilisées pour produire de la **bioénergie** par exemple. En effet, certaines méthanogènes sont connues pour produire de l'hydrogène lorsque cet élément essentiel à leur développement vient à manquer. Ce phénomène pourrait être qualifié de méthanogénèse inversée (Lupa *et al* 2008, Valentine and Reeburgh 2000). La mise en place d'**outils génétiques** pour augmenter la production d'hydrogène par les méthanogènes permettrait d'utiliser les méthanogènes à un niveau industriel (Goyal *et al* 2016). De façon plus générale, les méthanogènes modifiées génétiquement sont étudiées et utilisées pour la production de produits d'intérêts comme le méthane dans le milieu industriel (Enzmann *et al* 2018).

En effet, l'application la plus évidente des méthanogènes est la production de méthane par ces microorganismes à partir de matière organique, méthane qui peut être utilisé comme **biofioul**. Ce sont notamment les méthanogènes acétoclastiques qui semblent intéressantes pour ce procédé industriel qui pourrait fournir 25 % de la bioénergie utilisée en Europe d'ici 2020. L'utilisation de déchets issus du secteur agricole (Tableau 8) est également courante pour l'obtention de biogaz à l'aide de biofermenteurs (Enzmann *et al* 2018).

Les méthanogènes sont également impliquées dans le **traitement des eaux usées** ce qui conduit à la production de biogaz et à l'assainissement des eaux (Martin *et al* 2011).

Tableau 8 : Production de biogaz à partir de déchets organiques (Enzmann *et al* 2018).

Substrate	Biogas (ml/gVS)	Methane (ml/gVS)	Methane content (%)	References
Food waste	784	518	66.1	Liu et al. (2009)
Green waste	631	357	56.5	Liu et al. (2009)
Bovine manure	150	40	46.5	Fantozzi and Buratti (2009)
Chicken manure	220	110	66.6	Fantozzi and Buratti (2009)
Pig manure	412	216	52	Amon et al. (2006)
Sugar beet	730	387	53	Weiland (2010)
Grass	211	150	71	Yu et al. (2002)
Maize	560	291	52	Weiland (2010)
Microalgae (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	784	518	66.1	Mussgnug et al. (2010)
Microalgae (<i>Arthrospira platensis</i>)	631	357	56.5	Mussgnug et al. (2010)

VS volatile solids

III. Les virus d'archées

A. La diversité des virus d'archées

1. Généralités et historique

Il y a **45 ans**, avant même la reconnaissance d'un troisième domaine du vivant regroupant les *Archaea*, le premier virus d'archée était isolé. Celui-ci (Figure 48), nommé **PM2** et décrit en 1974 par Torsvik et Dundas, est un *caudovirus* qui infecte l'espèce halophile extrême *Halobacterium salinarum* (Torsvik and Dundas 1974). Depuis, **plus de 80 virus d'archées** ont été découverts (Prangishvili *et al* 2017, Snyder *et al* 2015). Pourtant, les virus d'archées sont la part la plus énigmatique de la virosphère. La plupart infectent des hôtes extrémophiles et sont donc confrontés à des conditions physico-chimiques particulières.

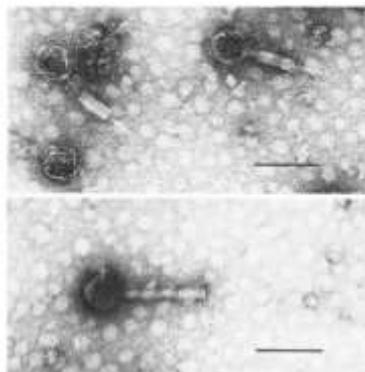


Figure 48 : Photographies en microscopie électronique en transmission de PM2, premier virus d'archée décrit. La barre d'échelle = 0,1 μm (Torsvik and Dundas 1974).

La **diversité morphologique** des virus d'archées est remarquable, avec des formes originales uniquement retrouvées chez ceux-ci. D'un **point de vue génomique**, ces virus se distinguent par la difficulté à retrouver des séquences déjà connues dans les bases de données à disposition. En effet, 75 % de leurs gènes codent pour des protéines inconnues (Krupovic *et al* 2018). La grande majorité des virus d'archées ont été isolés d'archées halophiles extrêmes (une trentaine de virus décrits) et/ou hyperthermophiles (une cinquantaine de virus décrits) (Dellas *et al* 2014, Krupovic *et al* 2018, Munson-McGee *et al* 2018, Pietila *et al* 2014, Prangishvili *et al* 2017, Snyder *et al* 2015). Les virus d'archées ne représentent que 2 % des presque 6000 virus de procaryotes caractérisés à ce jour mais possèdent une diversité morphologique plus élevée que celle des virus de bactéries et d'eucaryotes (Krupovic *et al* 2018, Prangishvili *et al* 2017).

2. Diversité morphologique et génétique des virus d'archées

Les virus d'archées présentent les morphologies et les contenus génomiques les plus originaux de la virosphère. Ils sont actuellement classés en **17 familles**, deux ordres comprenant 5 familles, et un genre non assigné (Figure 49).

Les virus d'archées peuvent être divisés en deux catégories :

- **Les virus spécifiques d'archées** regroupent les archaeovirus aux contenus génomiques uniques sans similarité avec des virus de bactéries ou d'eucaryotes et/ou présentant des morphologies atypiques qui ne sont retrouvées que chez les virus d'archées. Parmi ceux-là sont retrouvés les *Ampullaviridae* qui ont une morphologie en forme de bouteille ou encore les *Fuselloviridae* qui sont en forme de citron. Malgré leur morphologie commune aux virus de bactéries et d'eucaryotes, les virus filamenteux d'archées, comme les *Rudiviridae*, ne partagent pas de similarités génétiques avec les virus infectant les autres domaines du vivant (Figure 50).
- **Les virus cosmopolites** regroupent les archaeovirus aux contenus génomiques et morphologies plus classiques, similaires aux virus infectant les autres domaines du vivant. Ce sont notamment les caudovirus qui présentent une morphologie tête-queue (Figure 50).

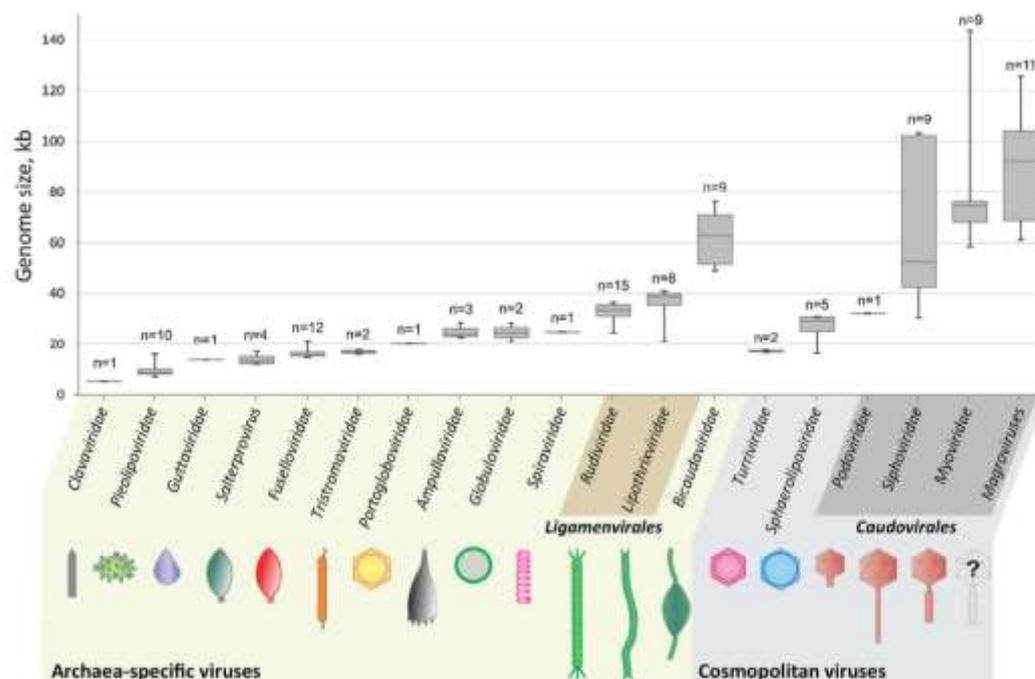


Figure 49 : Diversité morphologique des virus d'archées et distribution de la taille des génomes correspondant à chaque groupe de virus (Krupovic *et al* 2018).

Introduction générale

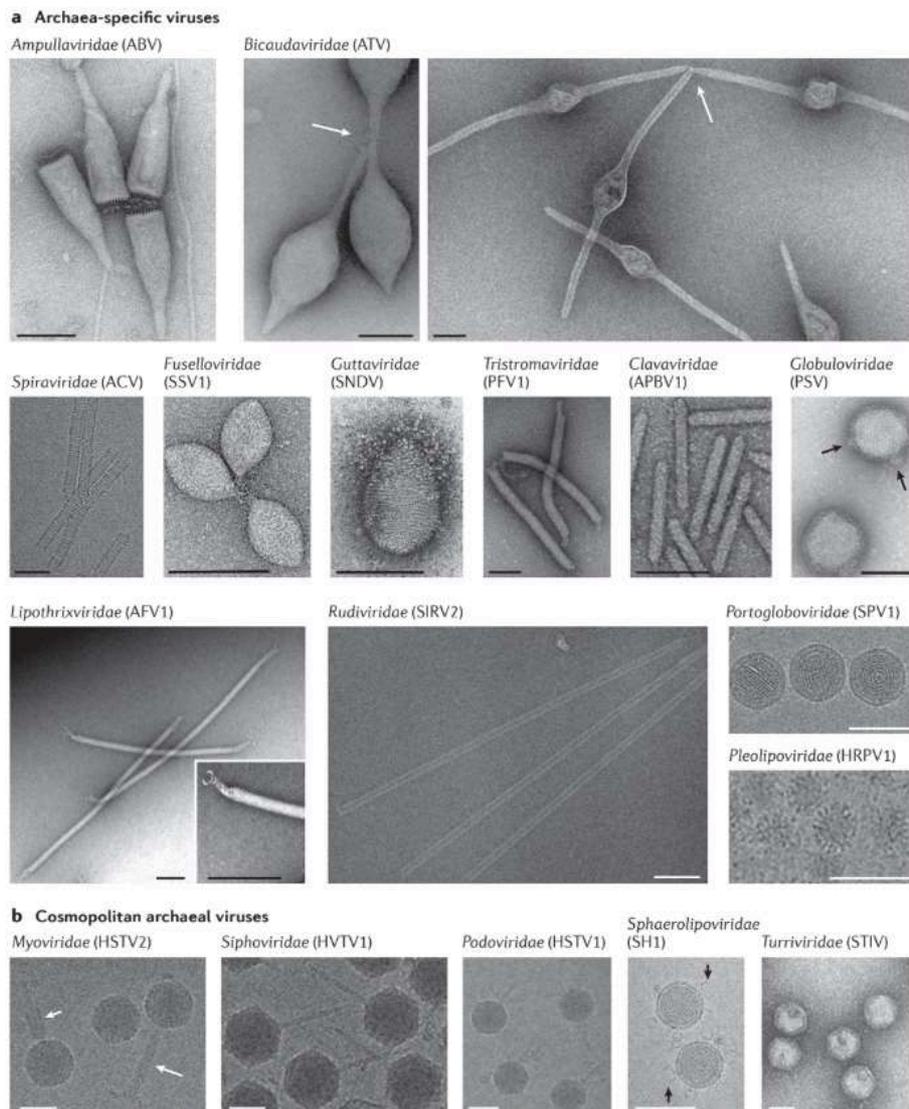


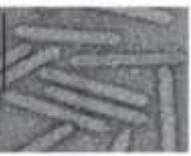
Figure 50 : Photographies des différents morphotypes observés chez les virus d'archées en microscopie électronique en transmission. a : Les virus spécifiques d'archées. b : Les virus cosmopolites (Prangishvili *et al* 2017).

a. Les virus spécifiques d'archées

Parmi les 17 familles de virus d'archées, 12 familles, ainsi que le genre des *Salterprovirus*, contiennent des virus spécifiques des archées regroupant des morphologies et des contenus génétiques particulièrement originaux. La grande majorité des **virus spécifiques** d'archées infectent des hôtes hyperthermophiles appartenant aux **Crenarchaeota**, à l'exception des *Salterprovirus* et des *Pleolipoviridae* qui regroupent des virus infectant des **Euryarchaeota** (Tableau 9). Les virus citrons non classés PAV1 et TPV1 infectent eux aussi des *Euryarchaeota* (Geslin *et al* 2003a, Geslin *et al* 2007, Gorlas *et al* 2012).

Introduction générale

Tableau 9 : Les virus spécifiques d'archées.

Famille	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
Clavoviridae	APBV1 – <i>Aeropyrum pernix</i> bacilliform virus 1	<i>Aeropyrum pernix</i> K1	Source chaude côtière, Japon	Double brin circulaire – 5,278 kb	Hyperthermophile (90 °C) / Etat porteur	(Mochizuki <i>et al</i> 2010)
						
Pleolipoviridae	HRRV-1 – <i>Halorubrum</i> virus 1	<i>Halorubrum</i> PV6	Marais salant, Trapani, Italie	Simple brin circulaire – 7,048 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Pietilä <i>et al</i> 2010, Pietilä <i>et al</i> 2016, Zaretsky <i>et al</i> 2018)
	HRRV-2 – <i>Halorubrum</i> virus 2	<i>Halorubrum</i> SSS-4	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Simple brin circulaire – 10,656 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Atanasova <i>et al</i> 2013, Pietilä <i>et al</i> 2016)
						
	HRRV-3 – <i>Halorubrum</i> virus 3	<i>Halorubrum</i> SP3-3	Bassin expérimental d'eau de mer, Sedom, Israël	Double brin circulaire – 8,770 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Atanasova <i>et al</i> 2013, Pietilä <i>et al</i> 2016)
	HRRV-6 – <i>Halorubrum</i> virus 6	<i>Halorubrum</i> SS7-4	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Simple brin circulaire – 8,549 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Atanasova <i>et al</i> 2013, Pietilä <i>et al</i> 2016)
	HGPV-1 – <i>Halogeometricum</i> virus 1	<i>Halogeometricum</i> CG-9	Marais salant, Cabo de Gata, Espagne	Double brin circulaire – 9,694 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Atanasova <i>et al</i> 2013, Pietilä <i>et al</i> 2016)
	HHPV-1 – <i>Halorcula</i> virus 1	<i>Halorcula</i> <i>hispanica</i>	Marais salant, Italie	Double brin circulaire – 8,082 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Juez <i>et al</i> 1986, Pietilä <i>et al</i> 2016)
	HHPV-2 – <i>Halorcula</i> virus 2	<i>Halorcula</i> <i>hispanica</i>	Marais salant, Hulu Island, Laoning, Chine	Simple brin circulaire – 8,176 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Juez <i>et al</i> 1986, Pietilä <i>et al</i> 2016)
	His2 virus	<i>Halorcula</i> <i>hispanica</i>	Lac hypersalin, Victoria, Australie	Simple brin linéaire – 16,067 kb	Mésophile / Halophile / Non virulent	(Juez <i>et al</i> 1986, Pietilä <i>et al</i> 2016)
	Guttaviridae	SNDV – <i>Sulfolobus newzealandicus</i> droplet-shaped virus	<i>Sulfolobus</i> STH3/1	Champs de solfatares, Nouvelle-Zélande	Double brin circulaire – 20kb	Hyperthermophile / Etat porteur
	APOV1 – <i>Aeropyrum pernix</i> ovoid virus 1	<i>Aeropyrum pernix</i> K1	Source chaude côtière, Japon	Double brin circulaire – 13,769 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Mochizuki <i>et al</i> 2011)

Introduction générale

Famille	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
 Salterprovirus	His1 virus	<i>Haloarcula hispanica</i>	Lac hypersalin, Victoria, Australie	Double brin linéaire – 14,9 kb	Mésophile / Halophile	(Bath and Dyall-Smith 1998)
	SSV1 – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 1	<i>Sulfolobus shibatae</i>	Source chaude acide, Beppu, Japon	Double brin circulaire - 15,5 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Palm <i>et al</i> 1991)
	SSV2 – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 2	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude acide, Islande	Double brin circulaire – 14,8 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Stedman <i>et al</i> 2003)
	SSV4 – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 4	<i>Sulfolobus islandicus</i>	Source chaude acide, Islande	Double brin circulaire – 15,1 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Peng 2008)
	SSV5 – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 5	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude acide, Islande	Double brin circulaire – 15,3 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Redder <i>et al</i> 2009)
	SSV7 – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 7	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude acide, Islande	Double brin circulaire – 15,6 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Redder <i>et al</i> 2009)
	SSV6 – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 6	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude acide, Islande	Double brin circulaire – 17,6 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Redder <i>et al</i> 2009)
	SSV8 (ou SSVRH) – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 8	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Norris Geyser Basin, Yellowstone, USA	Double brin circulaire – 17,4 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Contursi <i>et al</i> 2014, Wiedenhft <i>et al</i> 2004)
	SSV9 (ou SSVK1) – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 9	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude acide, Kamchatka, Russie	Double brin circulaire – 16,4 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Contursi <i>et al</i> 2014, Wiedenhft <i>et al</i> 2004)
	SSV10 – <i>Sulfolobus</i> spindle-shaped virus 10	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude (Devil's Kitchen), Californie, USA	Double brin circulaire – 16,2 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Goodman and Stedman 2018)
ASV1 – <i>Acidianus</i> spindle-shaped virus 1	<i>Acidianus brierleyi</i>	Source chaude acide, Islande	Double brin circulaire – 24,2 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Redder <i>et al</i> 2009)	

Introduction générale

Famille	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
Tristromaviridae	PFV1 – <i>Pyrobaculum filamentous virus 1</i>	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	Source chaude, Pozzuoli, Italie	Double brin linéaire – 17,7 kb	Hyperthermophile / Cycle lytique	(Rensen <i>et al</i> 2016)
	TTV1 – <i>Thermoproteus tenax virus 1</i>	<i>Thermoproteus tenax</i>	Solfatare, Krafla, Islande	Double brin linéaire – 16 kb	Hyperthermophile / Cycle lytique	(Janekovic <i>et al</i> 1983)
Portogloboviridae						
Ampullaviridae	SPV1 – <i>Sulfolobus polyhedral virus 1</i>	<i>Sulfolobus</i>	Source chaude acide, Beppu, Japon	Double brin circulaire – 20 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Liu <i>et al</i> 2017)
	ABV – <i>Acidianus bottle-shaped virus</i>	<i>Acidianus convivator</i>	Source chaude acide, Pozzuoli, Italie	Double brin linéaire – 23,9 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Häring <i>et al</i> 2005a)
Globuloviridae	PSV – <i>Pyrobaculum spherical virus</i>	<i>Pyrobaculum</i>	Source chaude, Obsidian pool, Yellowstone, USA	Double brin linéaire – 28,3 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Häring <i>et al</i> 2004)
	TTSV1 – <i>Thermoproteus tenax spherical virus 1</i>	<i>Thermoproteus tenax</i>	Source chaude, Indonésie	Double brin linéaire – 21,6 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Ahn <i>et al</i> 2006)
Spiraviridae						
ACV – <i>Aeropyrum coil-shaped virus</i>	<i>Aeropyrum pernix</i>	Source chaude côtière, Japon	Simple brin linéaire – 24,893 kb	Hyperthermophile / Non virulent	(Mochizuki <i>et al</i> 2012)	

Introduction générale

Famille	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
 Bicaudaviridae	ATV – <i>Acidianus</i> two-tailed virus	<i>Acidianus convivator</i>	Source chaude acide, Pozzuoli, Italie	Double brin circulaire – 62,7Kb	Hyperthermophile / Cycle lysogénique	(Prangishvili 2006)
	ARV1 – <i>Acidianus</i> rod-shaped virus 1 SIRV1 – <i>Sulfolobus islandicus</i> rod-shaped virus 1 SIRV2 – <i>Sulfolobus islandicus</i> rod-shaped virus 2 SRV – <i>Stygiolobus</i> rod-shaped virus SMR1 – <i>Sulfolobus</i> Mexican rudiavirus 1	<i>Acidianus Aci26</i> <i>Sulfolobus islandicus</i> <i>Stygiolobus</i> <i>Sulfolobus islandicus</i>	Source chaude acide, Pozzuoli, Italie Champs de solfatare, Islande Source chaude, Açores, Portugal Source chaude acide, Yellowstone, USA	Double brin linéaire – 24,6kb Double brin linéaire – 32,3kb Double brin linéaire – 35,5kb Double brin linéaire – 28kb Double brin linéaire – 27,4kb	Hyperthermophile / Non virulent Hyperthermophile / Non virulent Hyperthermophile / Non virulent Hyperthermophile -	(Vestergaard <i>et al</i> 2005) (Prangishvili <i>et al</i> 1999) (Prangishvili <i>et al</i> 1999) (Vestergaard <i>et al</i> 2008b) (Servin-Garcidueñas <i>et al</i> 2013)
 Lipothrixviridae	AFV1 – <i>Acidianus</i> filamentous virus 1 AFV2 – <i>Acidianus</i> filamentous virus 2 AFV3 – <i>Acidianus</i> filamentous virus 3 AFV6 – <i>Acidianus</i> filamentous virus 6 AFV7 – <i>Acidianus</i> filamentous virus 7 AFV8 – <i>Acidianus</i> filamentous virus 8 AFV9 – <i>Acidianus</i> filamentous virus 9 SIFV – <i>Sulfolobus islandicus</i> filamentous virus	<i>Acidianus hospitalis</i> <i>Acidianus F28</i> <i>Acidianus Aci25</i> <i>Acidianus convivator</i> <i>Acidianus convivator</i> <i>Acidianus convivator</i> <i>Acidianus convivator</i> <i>Acidianus convivator</i> <i>Acidianus convivator</i> <i>Acidianus convivator</i>	Source chaude acide, Yellowstone, USA Source chaude acide, Pozzuoli, Italie Source chaude acide, Kamchatka, Russie Champs de solfatare, Islande	Double brin linéaire – 21,1kb Double brin linéaire – 31,8kb Double brin linéaire – 40,5kb Double brin linéaire – 39,6kb Double brin linéaire – 36,9kb Double brin linéaire – 38,2kb Double brin linéaire – 41,2kb Double brin linéaire – 40,9kb	Hyperthermophile / Etat porteur Hyperthermophile / Etat porteur	(Bettstetter <i>et al</i> 2003) (Häring <i>et al</i> 2005b) (Vestergaard <i>et al</i> 2008a) (Vestergaard <i>et al</i> 2008a) (Vestergaard <i>et al</i> 2008a) (Bize <i>et al</i> 2008) (Bize <i>et al</i> 2008) (Arnold <i>et al</i> 2000b)

Introduction générale

Morphologie	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
	PAV1 (<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1)	<i>Pyrococcus abyssi</i> GE23	Source hydrothermale océanique profonde, Sud-ouest Pacifique	Double brin circulaire – 18 kb	Hyperthermophile (85 °C) – Etat porteur	(Geslin <i>et al</i> 2003a)
	TPV1 (<i>Thermococcus prieurii</i> virus 1)	<i>Thermococcus prieurii</i>	Source hydrothermale océanique profonde, Dorsale Est-Pacifique	Double brin circulaire – 21,5 kb	Hyperthermophile (85 °C) – Cycle lysogénique	(Gorlas <i>et al</i> 2012)
Fuseau (non classé)	ATSV (<i>Acidianus</i> tailed spindle-shaped virus)	<i>Acidianus</i>	Source chaude acide, Yellowstone, USA	Double brin circulaire – 70,8 kb	Hyperthermophile (80 °C)	(Hochstein <i>et al</i> 2015)
	STSV1 (<i>Sulfolobus tengchongensis</i> spindle-shaped virus 1)	<i>Sulfolobus tengchongensis</i>	Source chaude acide et mare de boue, Tengchong, Chine	Double brin circulaire – 75,3 kb	Hyperthermophile (80 °C)	(Xiang <i>et al</i> 2005)
	STSV2 (<i>Sulfolobus tengchongensis</i> spindle-shaped virus 1)	<i>Sulfolobus tengchongensis</i>	Source chaude acide et mare de boue, Tengchong, Chine	Double brin circulaire – 76 kb	Hyperthermophile (80 °C)	(Erdmann <i>et al</i> 2014)
	SMV1 (<i>Sulfolobus monocaudavirus</i> 1)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude acide, Yellowstone, USA	Double brin circulaire – 48,8 kb	Hyperthermophile (80 °C)	(Erdmann <i>et al</i> 2013)

Introduction générale

Les *Pleolipoviridae*

La famille *Pleolipoviridae* est constituée de 8 membres non lytiques infectant des halophiles extrêmes mésophiles : HRPV-1, HRPV-2, HRPV-3, HRPV-6, ces 4 virus infectent des souches d'*Halorubrum*. Concernant les 4 autres, HGPV-1 infecte une souche d'*Halogeometricum*, HHPV-1, HHPV-2 et His2 infectent tous les trois des souches d'*Haloarcula hispanica*. Les virions de cette famille ressemblent à des vésicules membranaires pléomorphes renfermant le génome viral. Ils possèdent deux protéines majeures de structure et une membrane interne. Ils partagent la même organisation au niveau de leurs génomes bien qu'ils puissent être simple ou double brin, circulaire ou linéaire (Pietilä *et al* 2016).

Les *Salterprovirus*

Ce genre contenait auparavant deux virus His1 et His2 qui infectent l'espèce halophile et mésophile *Haloarcula hispanica* dans une relation de type lytique (Bath *et al* 2006). His2 est maintenant classé parmi les *Pleolipoviridae*. His1 est donc maintenant le seul représentant des *Salterprovirus*, avec une morphologie similaire à celle des *Fusellovirus* (en forme de citron). Les virions de His1 sont flexibles et de forme allongée (Bath and Dyall-Smith 1998). Le génome est constitué d'un ADN double brin linéaire de 14,9 kb. His1 et His2 ont une ADN polymérase homologue de type B, utilisant un amorçage protéique, et cette ADN polymérase n'a jamais été observé chez les *Fuselloviridae*. A l'exception des ORFs codant leurs ADN polymérases, His1 et His2 partagent peu de similarités.

Les *Fuselloviridae*

La famille *Fuselloviridae* comprend 10 virus classés : SSV1, SSV2, SSV4, SSV5, SSV6, SSV7, SSV8 (ou SSVRH), SSV9 (ou SSVRH), SSV10 et ASV1. Ces virus infectent, dans une relation de lysogénie, des crénarchées hyperthermophiles et acidophiles de l'ordre des *Sulfolobales* et pour la plupart du genre *Sulfolobus* (à l'exception d'ASV1 qui infectent une *Acidianus*). Ce sont des virus fusiformes. Une de leurs extrémités porte des petites fibres caudales. Ces virus présentent des génomes très proches constitués d'ADN double brin circulaire de 15 kb à 24 kb. Le virus SSV1 (Figure 51) est un virus modèle particulièrement bien étudié (Martin *et al* 1984, Redder *et al* 2009). Il a notamment la particularité de posséder un ADN super-enroulé. Son cycle de vie sera détaillé en comparaison du cycle de vie de SIRV2 dans la partie consacrée à ce virus (*Rudiviridae* – Figure 53).

Introduction générale

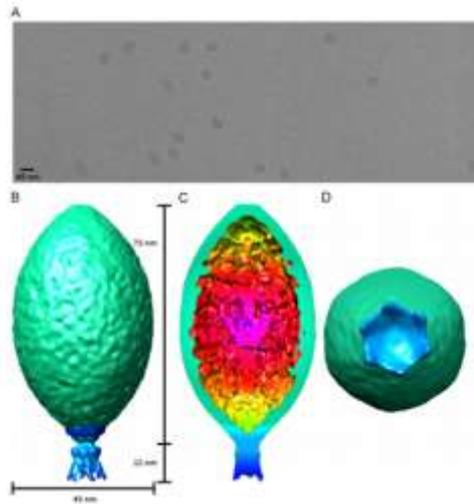


Figure 51 : Structure du virus SSV1 étudiée en Cryo-microscopie électronique. a: Photographie des particules virales de SSV1 en Cryo-EM. b,c,d: Reconstruction tridimensionnelle d'une particule de SSV1 (Stedman *et al* 2015).

Les virus non classés STSV1, PAV1 et TPV1 pourraient être inclus dans cette famille de virus, notamment du fait de leur morphologie fusiforme. De plus, un composant majeur de la structure de la capsid de PAV1, la MCP, codée par l'ORF121, est homologue aux MCPs des *Fusellovirus*. La MCP de TPV1 trouve une homologie avec les MCP du virus APSV1 et des VLPs de *Methanococcus voltae* A3 (Krupovic *et al* 2014). Le virus enveloppé STSV1 (*Sulfolobus tengchongensis* spindle-shaped virus) infecte *Sulfolobus tengchongensis* dans une relation d'infection chronique. Son génome viral ne s'intègre pas au génome de l'hôte contrairement aux autres *Fusellovirus*. De plus, son génome ne montre pas de similarité significative avec les autres *Fusellovirus*. PAV1 et TPV1 infectent des euryarchées hyperthermophiles issues de sources hydrothermales océaniques profondes. Ils seront détaillés dans la partie consacrée aux virus isolés de cet environnement particulier (Bize *et al* 2013, Geslin *et al* 2007, Gorlas *et al* 2012).

Les Ampullaviridae

Les *Ampullaviridae* ont pour seul représentant ABV (*Acidianus* bottle-shaped virus) qui infecte la crenarchée hyperthermophile *Acidianus convivator* de façon non virulente. La morphologie d'ABV est particulière et complexe en forme de bouteille. L'extrémité la plus large des virions possède des fibres fines, courtes et rigides. L'ADN double brin linéaire de 23,9 kb a été entièrement séquencé et il présente très peu de similarités avec les séquences déjà disponibles dans les bases de données. De façon intéressante, l'un des ORF code pour la protéine homologue de l'ADN polymérase retrouvé chez His1 et His2 mais également chez

Introduction générale

l'adénovirus humain ou le phage $\phi 29$ suggérant une origine ancienne de cette séquence génétique, ultérieure à la divergence des trois domaines du vivant (Häring *et al* 2005a, Peng *et al* 2007). L'ADN polymérase de $\phi 29$ est couramment utilisé en biologie moléculaire (Thermo Scientific) et pour le séquençage d'ADN (Pacific Biosystems) (Zhang *et al* 2015). Celle du virus ABV est particulièrement intéressante pour ce genre d'applications du fait de sa stabilité à haute température (Peng *et al* 2010).

Les Spiraviridae

Le virus ACV (*Aeropyrum* coil-shaped virus) est le seul membre de la famille des *Spiraviridae*. Il infecte la crenarchée hyperthermophile *Aeropyrum pernix* de façon non virulente. Il présente une morphologie en forme de serpent. Son génome est constitué d'ADN simple brin linéaire de 24,8 kb soit le plus grand ADN simple brin connu. C'est également le seul virus hyperthermophile à ADN simple brin parmi les virus d'archées hyperthermophiles (Mochizuki *et al* 2012).

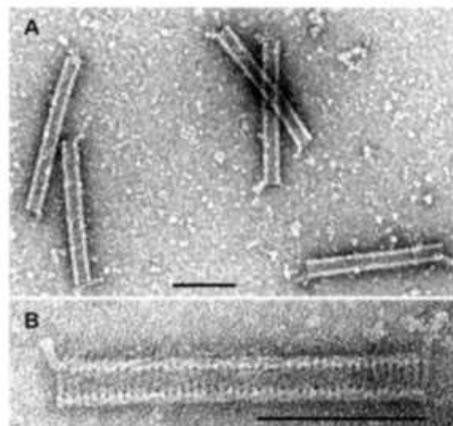


Figure 52 : Observation en microscopie électronique des virions d'ACV (Mochizuki *et al* 2012)

Les Rudiviridae

La famille des *Rudiviridae* est représentée par 5 virus non virulents : ARV1 infecte *Acidianus*, SIRV1 et SIRV2 infectent *Sulfolobus islandicus*, SRV infecte *Stygiolobus*, SMR1 infecte *Sulfolobus islandicus* (Prangishvili *et al* 1999, Vestergaard *et al* 2005, Vestergaard *et al* 2008a). Ces virus infectent des crenarchées hyperthermophiles appartenant à l'ordre *Sulfolobales*. Ils présentent une morphologie en forme de long bâtonnet rigide se terminant par trois fibres caudales. Leur génome composé d'ADN double brin linéaire de de 24,6 kb à 35,5 kb. Ils partagent plusieurs éléments caractéristiques de leur génome : des séquences

Introduction générale

inversées répétées longues aux extrémités du génome et 17 ORFs partagés (codant pour des protéines de structure ou impliquées dans la réplication de l'ADN).

SMR1, qui partage ces éléments caractéristiques des *Rudivirus*, est particulier puisqu'il n'a été découvert qu'à partir de données de métagénome (Servín-Garcidueñas *et al* 2013).

SIRV2 présente un mécanisme de sortie de son hôte très original impliquant des structures pyramidales (VAPs). Sur la Figure 53, sont représentées les différentes étapes du cycle de vie du virus lytique SIRV2 en (a) et du virus tempéré SSV1 en (b). Les 2 premières étapes consistent en la progression du virion vers la surface de la cellule le long d'un flagelle de l'hôte. Puis, le virion se désassemble pour injecter son ADN au sein de la cellule (étape 3). Le génome viral est répliqué dans une partie du cytoplasme (étape 4). Les virions sont alors assemblés et disposés en faisceaux d'environ 50 particules virales. En parallèle, des structures pyramidales se forment à la surface de la cellule perforant la S-layer (étape 5). Enfin, les faisceaux de particules virales se séparent en virions matures. Les structures pyramidales s'ouvrent pour laisser les virions se propager dans l'environnement (étape 6).

La Figure 53 montre également les différentes étapes du cycle de vie de SSV1. SSV1 est un virus tempéré qui peut être induit suite à un facteur de stress pour la cellule. L'irradiation aux UVs par exemple conduit à l'induction du virus qui entre en cycle lytique (étape 1). Le génome viral s'excise du génome de son hôte et se réplique (étape 2). La nucléoprotéine virale est formée suite à l'expression des protéines virales. Cette nucléoprotéine va bourgeonner à travers la membrane cellulaire qui contient des protéines de structure de la capsid virale (en vert sur le schéma) (étape 4). Ainsi des particules virales de forme allongée (forme de citron) sont produites. Les particules virales matures se détachent de la membrane de l'hôte et peuvent se propager dans l'environnement (étape 5).

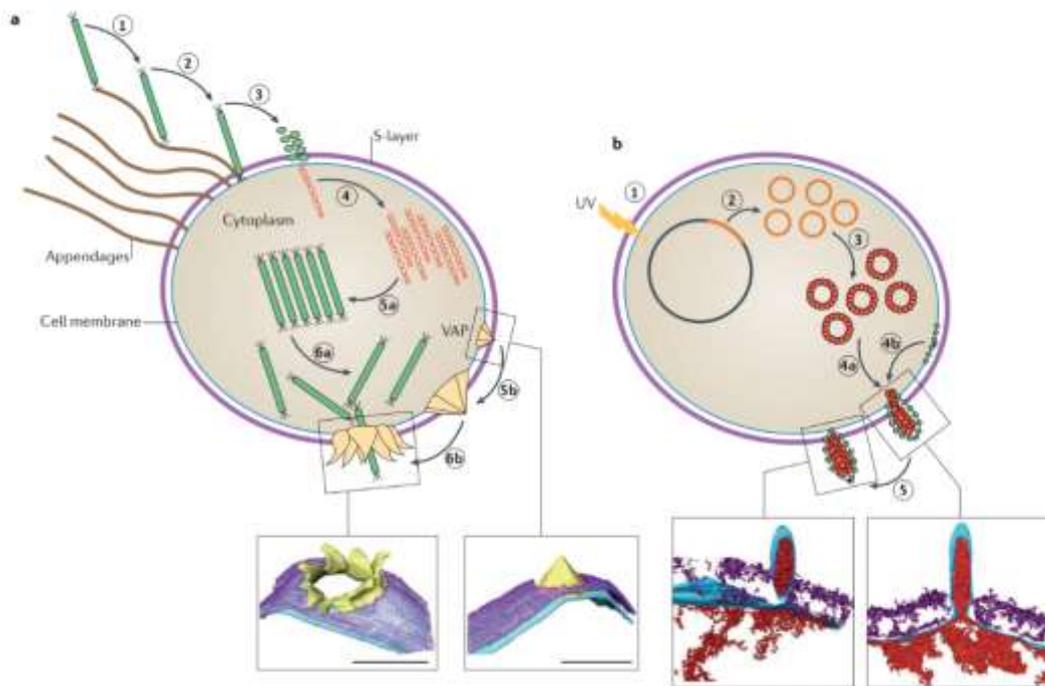


Figure 53 : Cycle de vie de deux virus de *Sulfolobales*. a : SIRV2 qui est lytique et b : SSV1 qui est tempéré (Prangishvili *et al* 2017).

Les Bicaudaviridae

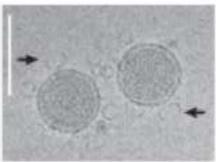
Les *Bicaudaviridae* sont représentés par l'unique virus en forme de citron ATV (« *Acidianus* Two-tailed Virus ») qui est particulier puisqu'il est capable de développer, en dehors de son hôte, deux prolongements à ses extrémités (décrit p. 18/19). Il infecte la crenarchée hyperthermophile *Acidianus convivator* dans une relation de lysogénie. Son génome est constitué d'ADN double brin circulaire de 62,7 kb (Häring *et al* 2005c).

b. Les virus cosmopolites

Parmi les 17 familles de virus d'archées, 5 familles comprennent des **virus cosmopolites** qui sont pour la plupart associés à des **archées halophiles** ou **méthanogènes**, à l'exception de la famille *Turriviridae* qui regroupe des virus de *Sulfolobales* (Tableau 10). Les **virus d'Euryarchaeota** présentent une moins grande diversité de morphologies que les virus de *Crenarchaeota* puisque la majorité des virus d'euryarchées sont des **têtes-queues**. Aucun virus présentant une morphologie tête-queue n'a été isolé de conditions hyperthermophiles, du moins avant ces travaux de thèse. Les *caudovirus* d'archées partagent des similarités avec les *caudovirus* infectant des bactéries (homologies fonctionnelles au niveau des protéines et une synténie retrouvée pour l'organisation du génome). Ces similarités suggèrent une origine commune pour ces virus ainsi que de possibles échanges de gènes entre ces deux domaines (Atanasova *et al* 2016, Dellas *et al* 2014, Sencilo and Roine 2014).

Introduction générale

Tableau 10 : Les virus cosmopolites d'archées

Famille	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
Turriviridae 	STTV1 – <i>Sulfolobus turreted</i> icosahedral virus 1	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Source chaude acide, Yellowstone, USA	Double brin circulaire – 17,7 kb	Hyperthermophile / Etat porteur	(Rice <i>et al</i> 2004)
	STTV2 – <i>Sulfolobus turreted</i> icosahedral virus 2	<i>Sulfolobus islandicus</i>	Source chaude acide, Islande	Double brin circulaire – 16,6 kb	Hyperthermophile / Cycle lysogénique	(Happonen <i>et al</i> 2010)
	HHV-2 – <i>Haloarcula hispanica</i> icosahedral virus 2	<i>Haloarcula PV7</i>	Lac hypersalin, Australie	Double brin linéaire – 30,5 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Jaakkola <i>et al</i> 2012)
Sphaerolipoviridae 	PH1 – <i>Haloarcula hispanica</i> virus	<i>Haloarcula hispanica</i>	Lac hypersalin, Pink Lake, Australie	Double brin linéaire – 28 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Porter <i>et al</i> 2013)
	SH1 – <i>Haloarcula hispanica</i> virus	<i>Haloarcula hispanica</i>	Lac hypersalin, Australie	Double brin linéaire – 31,3 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Jaakkola <i>et al</i> 2012)
	HCV1 – <i>Haloarcula californiae</i> icosahedral Virus 1	<i>Haloarcula californiae</i>	Lac hypersalin, Californie, USA	Double brin linéaire – 30,8 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Demina <i>et al</i> 2016)
	SNJ1 – <i>Natrinema</i> virus	<i>Natrinema J7-2</i>	Mine de sel, Chine	Double brin circulaire – 16,3 kb	Mésophile / Halophile / Tempéré	(Zhang <i>et al</i> 2012)
Podoviridae 	HSTV-1 – <i>Haloarcula sinaiiensis</i> head-tail virus 1	<i>Haloarcula sinaiiensis</i>	Lac hypersalin, Italie	Double brin circulaire – 32,2 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Atanasova <i>et al</i> 2012, Dellias <i>et al</i> 2014)

Introduction générale

Famille	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
	ΦM1 – <i>Methanobacterium</i> virus	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	Digesteur de boues anaérobies	Double brin linéaire – 30,4 kb	Thermophile / Virulent	(Jordan <i>et al</i> 1989)
	ΦM3 – <i>Methanobacterium</i> virus	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	Mutant spontané de ΦM1	Double brin linéaire – 26,1 kb	Thermophile / Virulent	(Pfiester <i>et al</i> 1998)
	ΦM100 – <i>Methanobacterium</i> virus	<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	-	Double brin linéaire - 28,8 kb	Thermophile / Défectif	(Luo <i>et al</i> 2001)
	ΦF1 – <i>Methanobacterium thermoformicum</i>	<i>Methanobacterium thermoformicum</i>	-	Double brin linéaire – 85 kb	Thermophile / Virulent	(Nölling <i>et al</i> 1993)
	ΦF3 – <i>Methanobacterium thermoformicum</i>	<i>Methanobacterium thermoformicum</i>	-	Double brin linéaire ou circulaire – 36 kb	Thermophile / Virulent	(Nölling <i>et al</i> 1993)
	HCTV-1 – <i>Haloarcula californiae</i> Tail virus 1	<i>Haloarcula californiae</i>	Lac hypersalin, Italie	Double brin linéaire – 103,2 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilio and Roine 2014)
	HCTV-2 – <i>Haloarcula californiae</i> Tail virus 2	<i>Haloarcula californiae</i>	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Double brin circulaire – 54,3 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilio and Roine 2014)
	HCTV-5 – <i>Haloarcula californiae</i> Tail virus 5	<i>Haloarcula californiae</i>	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Double brin linéaire – 102,1 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilio and Roine 2014)
	HVTV-1 – <i>Haloarcula vallismortis</i> Tail virus 1	<i>Haloarcula vallismortis</i>	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Double brin linéaire – 101,7 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilio and Roine 2014)
	HHTV-1 – <i>Haloarcula hispanica</i> Tail virus 1	<i>Haloarcula hispanica</i>	Lac hypersalin, Italie	Double brin circulaire – 49,1 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilio and Roine 2014)
	HHTV-2 – <i>Haloarcula hispanica</i> Tail virus 2	<i>Haloarcula hispanica</i>	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Double brin circulaire – 52,6 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilio and Roine 2014)
	BJ1	<i>Haloarubrum</i> sp BJ1 BJ1	Lac hypersalin, Mongolie	Double brin linéaire – 42,2 kb	Mésophile / Halophile / Tempéré	(Sencilio and Roine 2014)
	HRTV-4 – <i>Haloarubrum</i> Tail virus 4	<i>Haloarubrum</i>	Lac hypersalin, Italie	Double brin circulaire – 35,7 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilio and Roine 2014)



Siphoviridae

Introduction générale

Famille	Virus	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
Myoviridae 	HGTV-1 – <i>Halogrammum</i> Tail virus 1	<i>Halogrammum</i>	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Double brin circulaire – 143,8 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilo and Roine 2014)
	ΦH – <i>Halobacterium</i> virus	<i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i> R1	-	Double brin linéaire – 58 kb	Mésophile / Halophile / Tempéré	(Schmabel <i>et al</i> 1982) (Dyall-Smith <i>et al</i> 2018)
	HF1	<i>Haloferax lucentense</i>	Saline de Cheetham, Australie	Double brin linéaire – 75,9 kb	Mésophile / Halophile / Etat porteur	(Sencilo and Roine 2014)
	HF2	<i>Halorubrum coriense</i>	Saline de Cheetham, Australie	Double brin linéaire – 77,6 kb	Mésophile / Halophile / Etat porteur	(Sencilo and Roine 2014)
	ΦCh1	<i>Nitralba magadii</i>	-	Double brin circulaire – 58,5 kb	Mésophile / Halophile / Tempéré	(Sencilo and Roine 2014)
	HSTV-2 – <i>Halorubrum sodomense</i> head-tail virus 2	<i>Halorubrum sodomense</i>	Eilat, Israël	Double brin linéaire – 68,2 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Dellas <i>et al</i> 2014)
	HRTV-5 – <i>Halorubrum</i> Tail virus 5	<i>Halorubrum</i>	Lac hypersalin, Italie	Double brin linéaire – 76,1 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilo and Roine 2014)
	HRTV-7 – <i>Halorubrum</i> Tail virus 7	<i>Halorubrum</i>	Marais salant, Samut Sakhon, Thaïlande	Double brin linéaire – 69 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilo and Roine 2014)
	HRTV-8 – <i>Halorubrum</i> Tail virus 8	<i>Halorubrum</i>	Lac hypersalin, Italie	Double brin linéaire – 74,5 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Sencilo and Roine 2014)
	Hh1 – <i>Halobacterium halobium</i> virus 1	<i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i>	Sauce aux anchois fermentée, Philippines	Double brin – 32,7 kb	Mésophile / Halophile / Etat porteur	(Dellas <i>et al</i> 2014)
	Hh3 – <i>Halobacterium halobium</i> virus 3	<i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i>	Sauce aux anchois fermentée, Philippines	Double brin – 29,4 kb	Mésophile / Halophile / Etat porteur	(Dellas <i>et al</i> 2014)
	Ja1	<i>Halobacterium</i> <i>salinarum</i>	Marais salant, Jamaïque	-	Mésophile / Halophile / Virulent	(Dellas <i>et al</i> 2014)

Introduction générale

ΦN	<i>Halobacterium salinarum</i>	-	Double brin linéaire – 56 kb	Mésophile / Halophile / Virulent	(Dellas <i>et al</i> 2014)
HITV-1 et 2 – <i>Halorcula japonica</i> head- tail viruses	<i>Halorcula japonica</i>	Marais salants	-	Mésophile / Halophile / Virulent	(Atanasova <i>et al</i> 2012, Dellas <i>et al</i> 2014)
Myoviridae					
HATV1 et 2 – <i>Halorcula</i> head-tail viruses	<i>Halorcula</i>	Marais salants	-	Mésophile / Halophile / Virulent	(Atanasova <i>et al</i> 2012, Dellas <i>et al</i> 2014)
HS1 – <i>Halobacterium salinarum</i> virus 1	<i>Halobacterium salinarum</i>	Culture de <i>H. salinarum</i> isolée de morue salée	-	Mésophile / Halophile / Etat porteur	(Dellas <i>et al</i> 2014)
S45	<i>Halobacterium salinarum</i>	Marais salant, Jamaïque	Double brin	Mésophile / Halophile / Virulent	(Dellas <i>et al</i> 2014)
SS100	<i>Halobacterium salinarum</i>	Marais salant, Jamaïque	-	Mésophile / Halophile / Etat porteur	(Dellas <i>et al</i> 2014)



Introduction générale

Les Turriviridae

Les virus STIV1 et STIV2 (« *Sulfolobus* turreted icosahedral virus » 1 et 2) sont regroupés dans la famille *Turriviridae*. Ils infectent respectivement *Sulfolobus solfataricus* et *Sulfolobus islandicus*, crénarchées hyperthermophiles, dans une relation de type chronique pour le premier et lysogénique pour le deuxième. Les virions sont enveloppés et de forme icosaédrique présentant des structures bourgeonnantes à la surface de la capsid. Leur génome est composé d'ADN double brin circulaire de 17,7 kb et 16,6 kb. Les deux virus sont similaires sur le plan structurel, génomique et sur le mécanisme de sortie de leur hôte, qui est particulier, à l'image de celui retrouvé chez SIRV2 (*Rudivirus*) (Happonen *et al* 2010, Rice *et al* 2004). Pourtant les virus STIV et SIRV2 n'appartiennent pas à la même famille de virus et leurs virions ne partagent pas la même morphologie. De plus, aucune similarité n'a été détectée dans leur séquence génomique. Lors de la sortie des virions, les virus SIRV induisent un changement radical de la morphologie de leur hôte avec la formation de structures pyramidales (VAPs = « Virus Associated Pyramids ») juste avant la lyse de l'hôte (Figure 54). Ces structures sont constituées uniquement de protéines C92 codées par le génome de STIV (Snyder *et al* 2013).

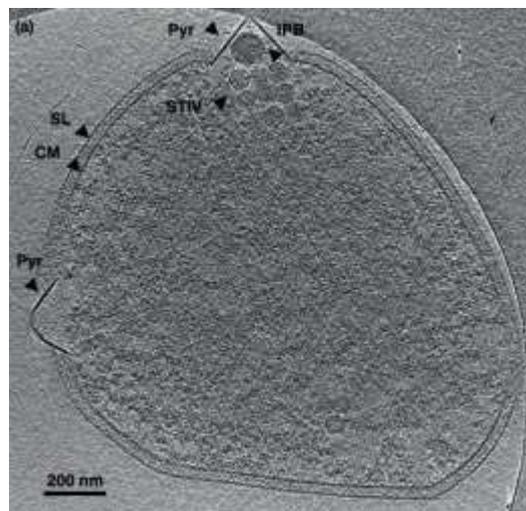


Figure 54 : Cryo-électromicroscopie d'une cellule de *Sulfolobus* infectée par STIV. Pyr = Structures Pyramidales ; PS = Espace périplasmique ; CM = Membrane cellulaire ; SL = S-Layer. (Fu and Johnson 2012).

Les Podoviridae

HSTV-1 est le seul virus d'archée classé dans les *Podoviridae*. Il infecte l'halophile mésophile *Haloarcula sinaiensis* dans une relation de type lytique. Il possède une morphologie tête-queue avec une queue non contractile et courte. C'est un virus non enveloppé. Il présente un repliement de type HK97 décrit originellement chez le

Introduction générale

bactériophage HK97 et qui est aussi présent chez les *Herpesvirus* (Atanasova *et al* 2012, Dellas *et al* 2014, Pietila *et al* 2013a, Pietila *et al* 2013b).

Les Siphoviridae

Les *Siphoviridae* regroupent des virus de morphologie tête-queue d'euryarchées halophiles mésophiles et de méthanogènes thermophiles. Ces derniers seront détaillés dans la partie consacrée aux virus de méthanogènes. Les virus d'halophiles appartenant à cette famille sont : HCTV, HVTV, HHTV, HRTV et un virus BJ1 qui infectent des souches *Haloarcula* et des souches *Halorobrum*. Leur génome est constitué d'ADN double brin circulaire ou linéaire allant de 35,7 kb à 103,2 kb (Dellas *et al* 2014, Sencilo and Roine 2014).

Les Myoviridae

Les *Myoviridae* regroupent des virus de morphologie tête-queue d'euryarchées halophiles mésophiles qui infectent des souches d'*Halogramum*, d'*Halobacterium*, d'*Halorobrum*, d'*Haloarcula* et la souche *Nitrialba magadii* (Dellas *et al* 2014, Sencilo and Roine 2014). ***Halobacterium virus* Φ H** a été décrit en **1982** par Schnabel et son équipe (Figure 55). Il a été isolé d'une culture d'*Halobacterium salinarum* souche R1 après une lyse spontanée (Schnabel *et al* 1982). Jusque dans les années 90, ce virus a été beaucoup étudié notamment d'un point de vue génétique. Pourtant son génome n'a été entièrement séquencé qu'en 2018 par Dyll-Smith et son équipe (Dyll-Smith *et al* 2018). Son génome est composé d'un ADN double brin de 58 kb qui code pour 97 protéines. Φ H présente 53 % d'identités de séquences et un haut niveau de synténie avec Φ CH1 qui infecte la souche *Nitrialba magadii* (Figure 56). Φ H ne s'intègre pas au génome de son hôte mais existe sous forme de plasmide. Lorsque le virus est porté par son hôte sous forme de plasmide, l'hôte est protégé de la surinfection. Ce virus est capable de réaliser un cycle lytique ou un cycle lysogénique et ce grâce à un mécanisme ARN-dépendant (Stolt *et al* 1994).

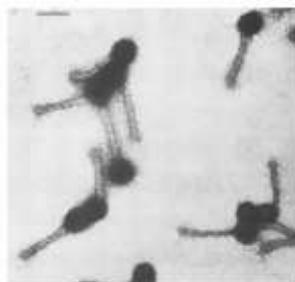


Figure 55 : Photographie en microscopie électronique du virus Φ H. La barre d'échelle représente 0,1 μ m (Schnabel *et al*, 1982)

Introduction générale

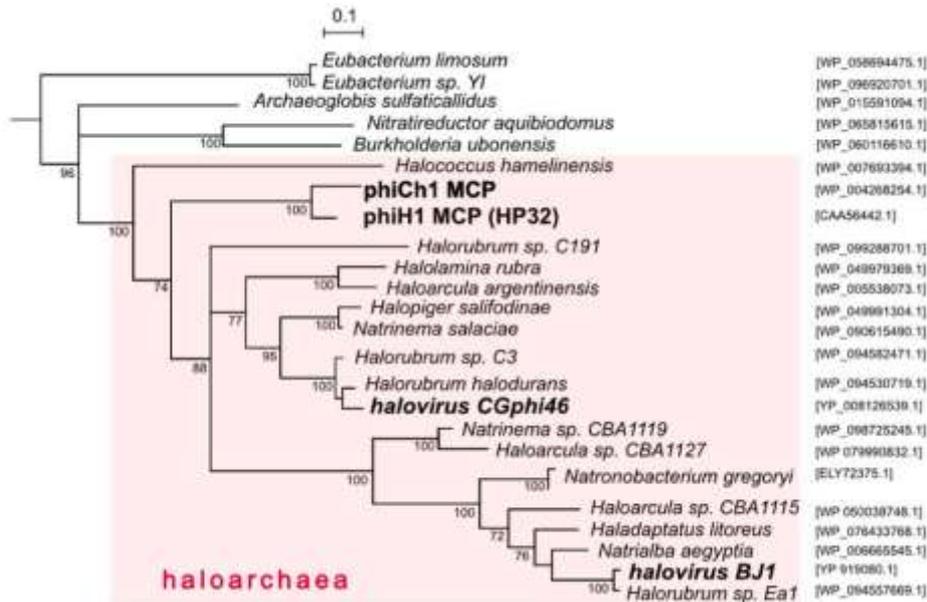


Figure 56 : Arbre phylogénétique obtenu à partir de la comparaison de la MCP (« Major Capsid Protein ») de ΦH, de virus halophiles et de protéines proches d'haloarchées (Dyall-Smith *et al* 2018).

Les Magrovirus

De façon intéressante, d'après des études basées sur des analyses métagénomiques, la famille des *Magrovirus* regrouperait les virus qui infectent des **euryarchées du Marine groupe II (MG-II)**. Ces virus ont un génome à ADN double brin de 65 à 100 kb. Leur ADN coderait pour des modules de structure caractéristiques des virus présentant une morphologie tête-queue. Les archées du MG-II sont dominantes dans la zone photique des océans oligotrophes. Cette zone, aussi appelée zone épipélagique, de taille variable, est comprise entre la surface et la profondeur maximale d'un océan qui est exposée à une lumière suffisante pour que la photosynthèse ait lieu. C'est la zone où se joue la majorité de la productivité marine primaire. Le MG-II possède une variation saisonnière et représente 90 % des archées totales et un tiers des cellules microbiennes pendant les blooms de printemps dans l'Atlantique. Ce groupe extrêmement abondant et qui est un acteur majeur de la vie microbienne des océans ne possède qu'un représentant cultivé. L'étude de ce groupe est le résultat de l'utilisation de données métagénomique au service de l'écologie microbienne. Les virus infectant ce groupe sont abondants et très répandus, ils semblent donc être également des agents puissants contrôlant le cycle de vie de leurs hôtes au niveau de l'océan global (Krupovic *et al* 2018, Philosof *et al* 2017).

c. L'apport de la métagénomique dans les études de diversité virale

Les **études de métagénomiques**, comprenant des **viromes**, n'ont cessé de se développer et permettent d'accroître considérablement les connaissances concernant la diversité virale. Grâce à des travaux sur des métagénomiques viraux, de nouvelles populations virales infectant par exemple des *Thaumarchaeota* ont été identifiées. Les *Thaumarchaeota* sont abondantes dans l'écosystème océanique et sont impliquées dans les cycles de l'azote et du carbone puisqu'elles oxydent l'ammoniac et fixent le carbone inorganique. Certains des virus identifiés possèdent des gènes qui codent pour une ammoniac monooxygénase thaumarchéenne (amoC). L'amoC virale est retrouvée pour la moitié du total des copies d'ADN codant pour une amoC dans la fraction cellulaire des métagénomiques. Ces analyses montrent l'impact non négligeable des virus dans le cycle de l'azote dans les océans (Ahlgren *et al* 2019, López-Pérez *et al* 2019).

De plus, l'étude des génomes de *Thaumarchaeota* a permis de mettre en évidence la présence **d'éléments génétiques mobiles** associés aux thaumarchées et notamment sous formes intégrées. Ces EGMs pourraient représenter de nouvelles familles de virus ou encore de plasmides (Krupovic *et al* 2019).

L'étude du génome de l'espèce candidate *Nitrosphaera viennensis* souche EN76, appartenant aux *Thaumarchaeota*, a révélé la présence d'un provirus intégré. Ce provirus présente des séquences typiques de virus à morphologie **tête-queue**, retrouvées notamment chez le bacteriovirus Mu, suggérant une origine ancienne de l'infection des archées par des virus de ce morphotype (Figure 57) (Krupovic *et al* 2011).

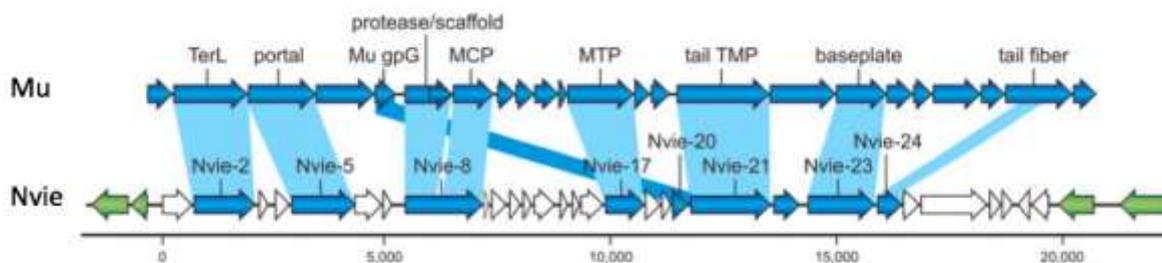


Figure 57 : Alignement génomique du provirus putatif Nvie-Pro1 avec le Myovirus de bactérie Mu (module morphogénétique). (Krupovic *et al* 2011)

B. Les virus des environnements chauds : le cas des sources hydrothermales océaniques profondes

1. Généralités

Si les **sources hydrothermales océaniques profondes** sont qualifiées d'oasis de vie présentant une diversité écologique importante, il n'y a cependant que peu d'informations à disposition concernant la diversité virale de ces écosystèmes. Pourtant les virus sont connus pour jouer des rôles essentiels notamment dans l'adaptation, l'évolution et la diversité des communautés microbiennes et ce y compris pour des environnements aussi particuliers que les sources hydrothermales océaniques profondes.

Au niveau de l'écosystème abyssal, **les virus** sont inclus dans ce que l'on peut nommer le « **mobilome abyssal** », qui regroupe les **éléments génétiques mobiles** tels que les virus, les plasmides ou encore les vésicules membranaires, retrouvés dans ces environnements profonds (Figure 58) (Lossouarn *et al* 2015a).

Les virus retrouvés au niveau des sources hydrothermales sont estimés à **10⁴ à 10⁷ VLPs** (« Virus Like Particles », particules de type viral) par ml, ils sont dix fois plus abondants que les procaryotes dans cet écosystème (Williamson *et al* 2008). Le terme VLPs est utilisé car les limites actuelles des technologies (microscopie à épifluorescence, cytométrie en flux) utilisées lors de ce type de quantification sont atteintes.

De nombreuses **bactéries et archées thermophiles** de systèmes hydrothermaux contiennent dans leurs génomes des **séquences CRISPR**, ces séquences étant le reflet d'infections virales passées. Cela montre donc que les bactéries et archées des sources hydrothermales sont des hôtes confrontés à des infections virales. Les études concernant les interactions entre ces hôtes et leurs virus laissent à penser que le cycle viral le plus commun au niveau des sources hydrothermales profondes est le **cycle lysogénique** (Anderson *et al* 2014, Horvath and Barrangou 2010, Marraffini and Sontheimer 2010). Ce type d'interaction peut sembler judicieux pour la préservation du virus car ainsi le génome viral reste protégé au sein du chromosome de son hôte au lieu de faire face à un environnement instable.

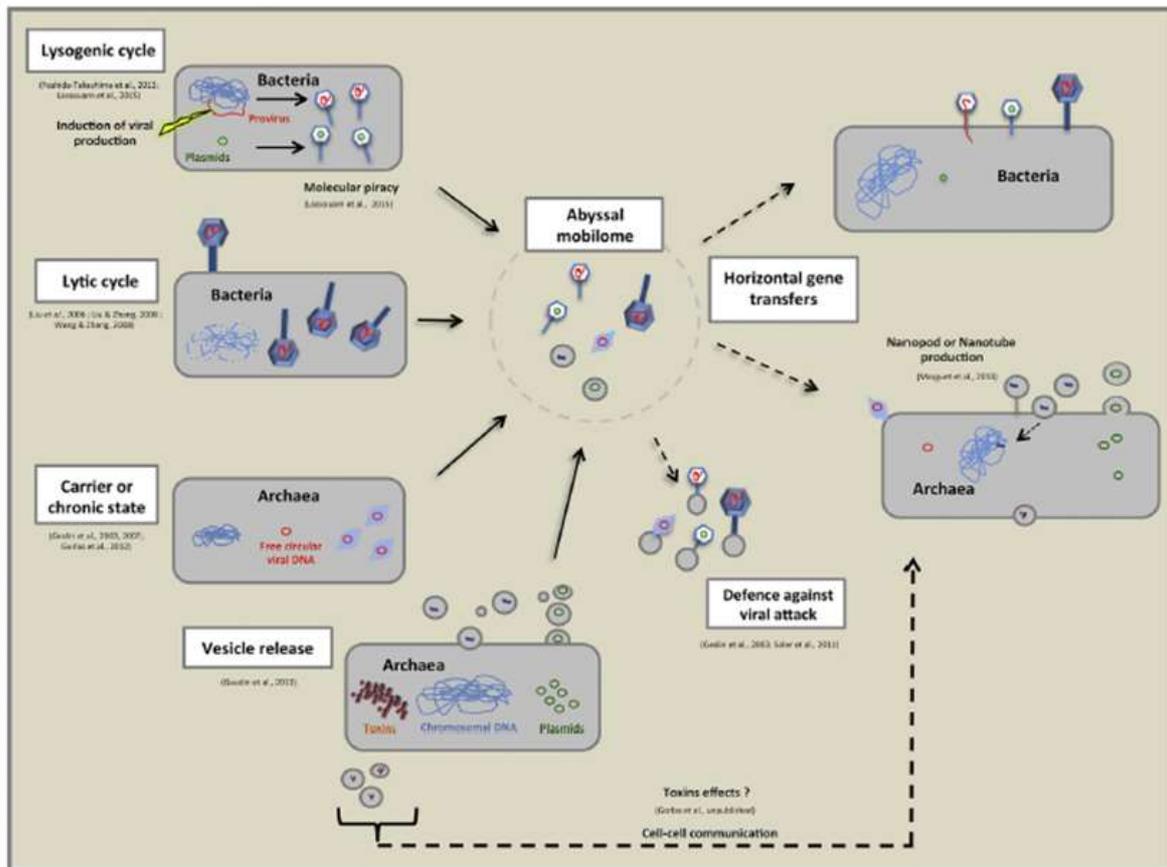


Figure 58 : Le mobilome abyssal et ses implications (Lossouarn *et al* 2015a)

Les connaissances concernant la **virosphère** de cet écosystème particulier restent très limitées. En effet, seulement 10 virus de sources hydrothermales océaniques profondes ont été décrits à ce jour. Huit d'entre eux sont des **bacteriovirus** dont quatre infectent des *Bacillus* (Liu *et al* 2006, Liu and Zhang 2008, Wang and Zhang 2010), un virus infectant une *Epsilonproteobacteria* (Yoshida-Takashima *et al* 2013) et 3 virus associés à des *Marinitoga* (Lossouarn *et al* 2015b, Mercier *et al* 2018). Parmi ces virus de bactéries, MPV1, MCV1 et MCV2 sont 3 siphovirus qui ont été décrits au LM2E. Les deux derniers sont des **archaeovirus** non virulents associés à des *Thermococcales* (Geslin *et al* 2003a, Gorlas *et al* 2012) et qui ont tous deux été décrits au LM2E (Tableau 11). Il est à noter qu'**aucun virus de méthanogènes** issues de cet écosystème n'a été décrit à ce jour. Or, les méthanogènes sont des acteurs majeurs au sein des sources hydrothermales océaniques profondes, de par leur métabolisme notamment (*cf.* La partie traitant de la méthanogénèse p.79).

Introduction générale

Tableau 11 : Virus associés aux sources hydrothermales océaniques profondes, d'après (Lossouarn *et al* 2015a). Surligné en bleu : les archaeovirus isolés de sources hydrothermales océaniques profondes.

Virus	Morphologie	Hôte	Génome à ADN	Caractéristiques	Références
BVW1	Tête-queue	<i>Bacillus sp. W13</i>	Double brin linéaire – 18 kb	Thermophile (65 °C) – Cycle lytique	(Liu <i>et al</i> 2006)
GVE1	Tête-queue	<i>Geobacillus sp. E26323</i>	Double brin circulaire – 41 kb	Thermophile (65 °C) – Cycle lytique	(Liu <i>et al</i> 2006)
GVE2	Tête-queue	<i>Geobacillus sp. E263</i>	Double brin linéaire – 40,9 kb	Thermophile (65 °C) – Cycle lytique / potentiellement lysogénique	(Liu and Zhang 2008)
DE6	Tête-queue	<i>Geobacillus sp. E263</i>	Double brin linéaire – 49,3 kb	Thermophile (65 °C) – Cycle lytique	(Wang and Zhang 2010)
Nsr-1	Tête-queue	<i>Nitratiruptor sp. SB155-2</i>	Double brin linéaire – 37,1 kb	Thermophile (55 °C) – Cycle lysogénique	(Yoshida-Takashima <i>et al</i> 2013)
MPV1	Tête-queue	<i>Marinitoga piezophila KA3</i>	Double brin linéaire – 43,7 kb	Thermophile (55 °C) – Cycle lysogénique	(Lossouarn <i>et al</i> 2015b)
MCV1	Tête-queue	<i>Marinitoga camini 97</i>	Double brin linéaire – 53 kb	Thermophile (60 °C) – Cycle lysogénique	(Mercier <i>et al</i> 2018)
MCV2	Tête-queue	<i>Marinitoga camini 55</i>	Double brin linéaire – 50,5 kb	Thermophile (60 °C) – Cycle lysogénique	(Mercier <i>et al</i> 2018)
PAV1	<i>Fusellovirus</i>	<i>Pyrococcus abyssi GE23</i>	Double brin circulaire – 18 kb	Hyperthermophile (85 °C) – Etat porteur	(Geslin <i>et al</i> 2003a)
TPV1	<i>Fusellovirus</i>	<i>Thermococcus prieurii</i>	Double brin circulaire – 21,5 kb	Hyperthermophile (85 °C) – Cycle lysogénique	(Gorlas <i>et al</i> 2012)

2. Les virus de bactéries isolées de sources hydrothermales océaniques profondes

a. Les virus de *Bacillus*

BVW1 (*Bacillus* virus W1) et **GVE1** (*Geobacillus* virus 1) sont deux virus tête-queue caractérisés en 2006 et isolés de sources hydrothermales océaniques profondes (Figure 59) (Liu *et al* 2006). Ils ont été isolés de souches issues d'échantillons de sédiments et d'eau de mer prélevés de champs hydrothermaux Est et Ouest Pacifique. Ce sont deux virus virulents, BVW1 infectant la souche **thermophile** *Bacillus* W13 (croissance optimale à 65 °C) et GVE1 infectant la souche **thermophile** *Geobacillus* E26323 (croissance à 65 °C) (Liu *et al* 2006).

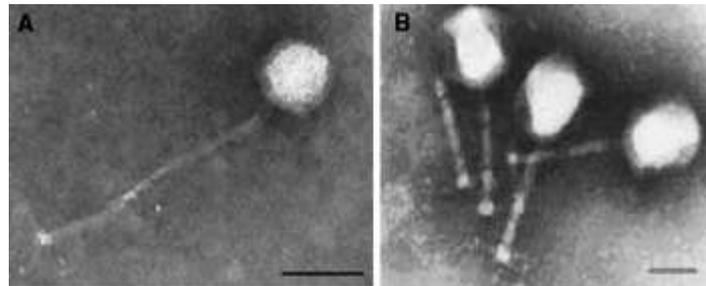


Figure 59 : Observation au microscope électronique en transmission de particules virales de BVW1 (A) et GVE1 (B) (barre d'échelle = 100 nm) (Liu *et al* 2006).

GVE2 (*Geobacillus* virus 2) est un virus virulent infectant la souche **thermophile** *Geobacillus* E263 (croissance à 60-65 °C). Très proche de GVE1, GVE2 possède une morphologie très similaire (Figure 60) tout comme son génome composé d'un ADN double brin linéaire de 41kb (Liu and Zhang 2008). De nombreuses études de ce virus ont permis de caractériser des protéines utilisées en biotechnologie. Ce sont notamment une protéine de liaisons à l'ADN simple brin, une protéine portale ou encore une endonucléase thermostable (Wang and Zhang 2008, Wei 2008, Zhang *et al* 2017). Ces études ont également permis d'identifier une endolysine impliquée dans la lyse cellulaire (Jin *et al* 2013).

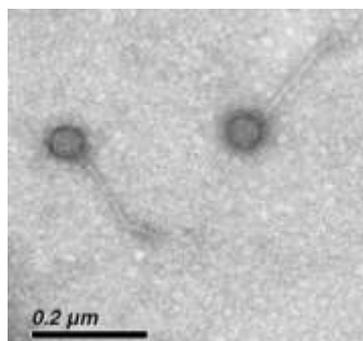


Figure 60 : Observation au microscope électronique en transmission de particules virales de GVE2 (Wang and Zhang 2008).

Introduction générale

D6E est un virus virulent infectant une souche **thermophile** de *Geobacillus* issue d'un champ hydrothermal de l'Est-Pacifique (croissance à 65 °C). Il appartient à la famille *Myoviridae* et possède une capsidie icosaédrique de 60 nm de diamètre et une queue contractile de 60 nm de long (Figure 61). Son génome est constitué d'un ADN double brin linéaire d'environ 50 kb qui présentent des similarités avec GVE2 et d'autres virus thermophiles (Wang and Zhang 2010). Notamment, D6E et GEV2 possèdent des modules de réplication et de transcription similaires suggérant des transferts de gènes entre ces types viraux.

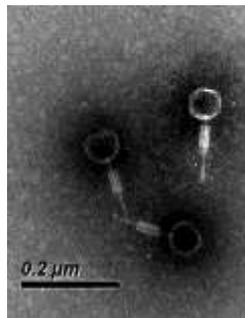


Figure 61 : Observation au microscope électronique en transmission de particules virales de D6E (Wang and Zhang 2010).

b. Le virus NrS-1

NrS-1 est un virus tempéré qui infecte la souche **thermophile** *Nitratiruptor* SB155-2 qui est une *Epsilonproteobacteria* (croissance à 55 °C). Cette souche a été isolée d'une cheminée hydrothermale du champ Iheya (Japon). NrS-1 appartient à la famille *Siphoviridae* et possède une capsidie de 64 nm de diamètre et une queue de 210 nm de long (Figure 62). Son génome est composé d'un ADN double brin linéaire de 37 kb. Les gènes viraux de NrS-1 trouvent de nombreux homologues au sein des génomes d'*Epsilonproteobacteria* suggérant une coévolution ancienne entre ces bactéries et leur virus. Cette coévolution serait même antérieure à la divergence de leurs habitats associée à certaines adaptations physiologiques (Yoshida-Takashima *et al* 2013).

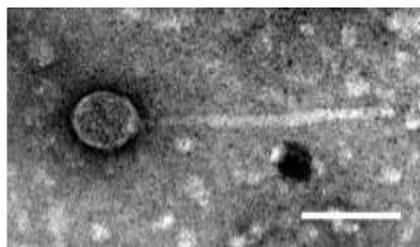


Figure 62 : Observation au microscope électronique en transmission d'une particule virale de NrS-1 (barre d'échelle = 100 nm) (Yoshida-Takashima *et al* 2013).

c. Les virus de *Marinitoga*

MPV1 (*Marinitoga piezophila* Virus 1) est un virus tempéré infectant la souche **thermophile** *Marinitoga piezophila* KA3 (croissance à 65 °C). La souche hôte provient d'une source hydrothermale océanique située le long de la dorsale du Pacifique Est, à 2630 m de profondeur. C'est une bactérie piezophile aisément cultivable à pression atmosphérique au terme de plusieurs repiquages (Alain *et al* 2002).

MPV1 appartient à la famille *Siphoviridae* et possède une capsid de 55 nm de diamètre et une queue flexible non contractile de 200 nm de long (Figure 63). Son génome est constitué d'un ADN double brin d'environ 44 kb. Les virions de MPV1 sont capables d'empaqueter le **plasmide pMP1** qui est porté par l'hôte de MPV1. Ce phénomène a lieu lors de l'induction de la production de particules virales par un facteur de stress. Lors d'un stress induit par la mitomycine C (4 µg/ml) déclenchant le cycle lytique de MPV1, il a été observé une concentration du plasmide 10 fois supérieure à la concentration observée en condition classique de culture tandis que le nombre de copies du génome viral est multiplié par 3 (Lossouarn *et al* 2015b). Cette relation entre le virus et le plasmide est un exemple de piratage moléculaire où un réplicon pirate, ici pMP1, utilise les protéines de structure codées par un autre réplicon, le virus MPV1, pour empaqueter son propre génome et ainsi se propager (Lossouarn *et al* 2015b). Le mécanisme d'encapsidation du plasmide reste encore inconnu.

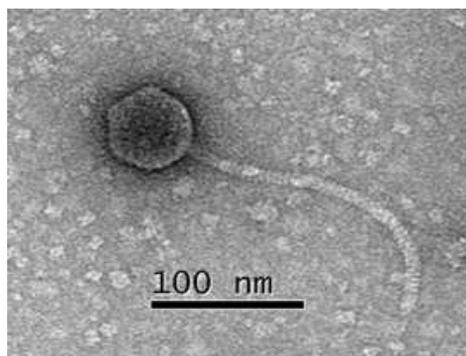


Figure 63 : Observation au microscope électronique en transmission de MPV1 (Lossouarn *et al* 2015b).

MCV1 et MCV2 (*Marinitoga camini* virus 1 et 2) sont deux virus tempérés de type tête-queue (Figure 64) infectant respectivement les souches **thermophiles** *Marinitoga camini* 97 et *Marinitoga camini* 55 (croissance à 60 °C). *Marinitoga camini* 97 a été isolée du site hydrothermal Lucky Strike situé sur la ride médio-Atlantique. *Marinitoga camini* 55 a été isolée d'un fumeur noir du site hydrothermal Menez Gwen également situé sur la ride médio-

Introduction générale

Atlantique (Mercier et al 2016). MCV1 et MCV2 possèdent un génome composé d'un ADN double brin linéaire respectivement de 53 kb et 50,5 kb (Mercier *et al* 2018).

Une comparaison de ces deux nouveaux génomes viraux à celui de MPV1, virus précédemment isolé de *Marinitoga piezophila*, a été réalisée, révélant la présence de nombreuses similarités. Un « core genome » de 35 ORFs partagé par ces **trois génomes viraux** a été identifié, incluant des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN (hélicase, résolvasse), l'assemblage des virions (protéine majeure de capsid, grande sous unité de la terminase) et le cycle viral (holine). Des protéines hypothétiques ont aussi été identifiées parmi ces gènes communs, elles portent probablement des fonctions importantes pour ces bacteriovirus.

Ainsi ces trois virus, malgré leur éloignement géographique, dorsale du Pacifique Est pour MPV1 et dorsale médio-atlantique pour MCV1 et MCV2, présentent de nombreuses similarités.

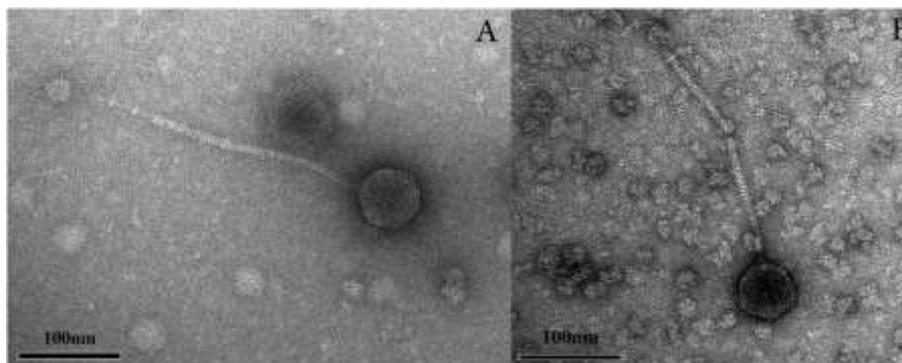


Figure 64 : Observation au microscope électronique en transmission de MCV1 (A) et MCV2 (B) (Mercier *et al* 2018).

Récemment, une nouvelle souche de *Marinitoga*, *M. lauensis*, a été décrite (*optimum* de température de croissance de 50-55 °C). Isolée d'une source hydrothermale océanique profonde, elle possède un prophage intégré dans son génome qui présente de fortes homologues de séquences avec les virus MPV1, MCV1 et MCV2. La séquence provirale possède 80 ORFs prédits. 53 ORFs sont homologues avec des régions provirales des virus de *Marinitoga* (L'Haridon *et al* 2019).

3. Les archaeovirus isolés de sources hydrothermales océaniques profondes

PAV1 (*Pyrococcus abyssi* virus 1) et **TPV1** (*Thermococcus prieurii* virus 1) sont les deux seuls virus d'archées connus et décrits à ce jour qui ont été isolés de sources hydrothermales océaniques profondes.

Décrit en **2003**, PAV1 est le premier virus isolé de l'environnement hydrothermal océanique. C'est un virus qui infecte la souche *Pyrococcus abyssi* GE23 sans intégration de son génome à celui de son hôte. Ce virus a établi une relation chronique avec son hôte, qui peut être définie comme un équilibre entre la multiplication cellulaire et la production virale. *Pyrococcus abyssi* GE23 est une souche de ***Thermococcales hyperthermophile*** (croissance à 85 °C) isolée du bassin du Nord des Fiji au Sud-Ouest du Pacifique à 2000 m de profondeur. PAV1 présente le morphotype des *Fusellovirus* c'est-à-dire une forme de citron, d'une taille de 120 nm x 80 nm (Figure 65).



Figure 65 : Observation au microscope électronique en transmission de particules virales de PAV1 attachées à une vésicule membranaire (Geslin *et al* 2003).

Son génome, entièrement séquencé, est composé d'un ADN circulaire de 18 kb (Geslin *et al* 2003a, Geslin *et al* 2007). Sur les 25 ORFs prédits, peu d'entre eux trouvent de similarités de séquences avec les séquences disponibles dans les bases de données et plus particulièrement, le génome de PAV1 ne trouve pas d'homologie avec les *Fusellovirus* ou encore les *Salterprovirus* dont les morphologies sont les plus proches. Cependant, PAV1, qui existe sous forme d'ADNccc (ADN circulaire clos de façon covalente) libre dans le cytoplasme de son hôte, semble proche de plasmides connus. 6 gènes de PAV1 ont des homologues chez des plasmides de *Thermococcales*, comprenant des régulateurs transcriptionnels (Krupovic *et al* 2013).

Introduction générale

De façon intéressante, les gènes que PAV1 partage avec des **plasmides de *Thermococcales*** sont regroupés et occupent la moitié du génome viral. Les séquences codant pour les protéines de structure du virion sont regroupées dans l'autre partie du génome viral (Figure 66). Cette observation laisse suggérer une possible recombinaison entre deux éléments génétiques mobiles ayant donné « naissance » au virus PAV1 (Krupovic *et al* 2013).

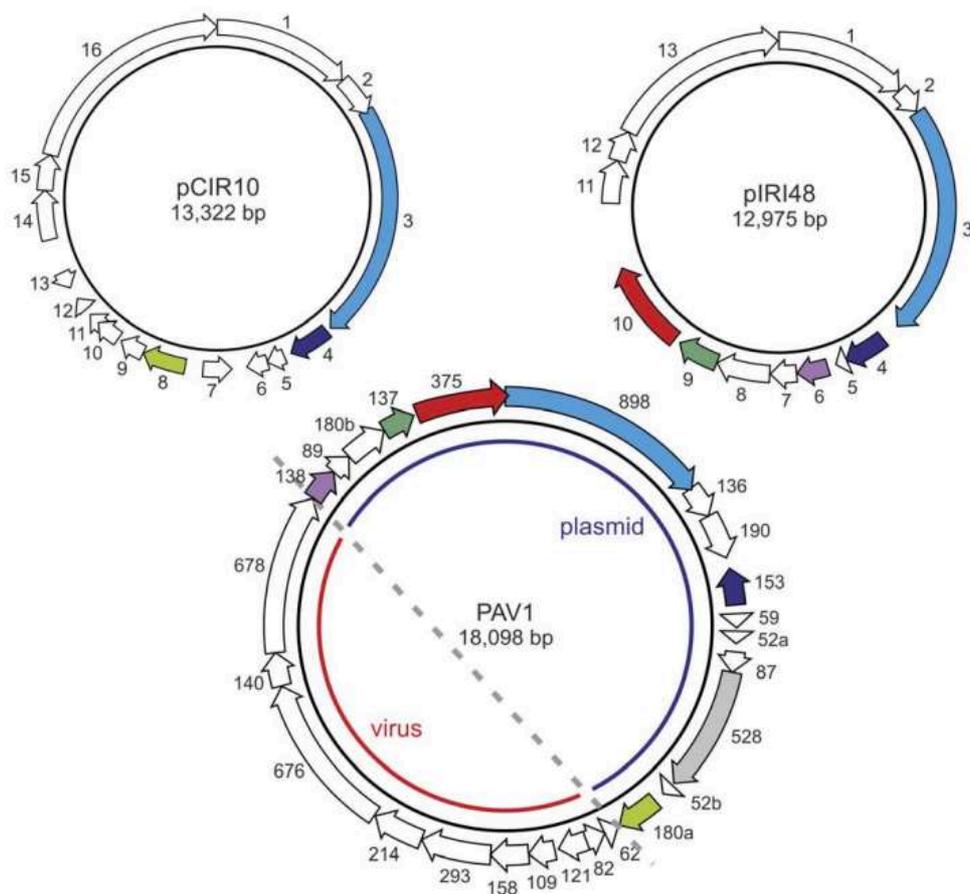


Figure 66 : Organisation génétique du génome de PAV1 et des plasmides de *Thermococcales* pCIR10 et pIRI48. Les gènes homologues sont représentés dans la même couleur (Krupovic *et al* 2013).

TPV1 est un virus tempéré qui infecte l'archée **hyperthermophile** *Thermococcus prieurii* (croissance à 85 °C) isolée d'un échantillon de cheminée hydrothermale collecté à 2700 m de profondeur sur la dorsale Est Pacifique. Il est produit spontanément de façon continue mais sa production peut être induite en condition de stress aux UVs sans provoquer la lyse de son hôte. TPV1 appartient à la famille *Fuselloviridae* avec une morphologie similaire à celle de PAV1 (en forme de citron) d'une taille de 140 nm x 80 nm (Figure 67). Son génome est constitué d'un ADN circulaire de 21 kb (Gorlas *et al* 2012).

Introduction générale

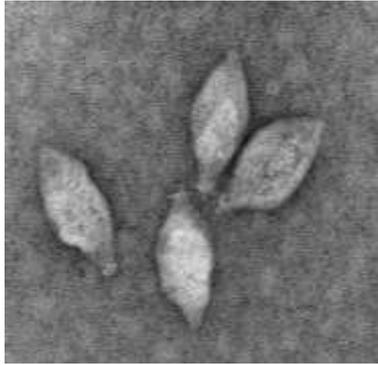


Figure 67 : Observation au microscope électronique en transmission de TPV1 (Gorlas *et al* 2012).

Bien que PAV1 et TPV1 soient similaires morphologiquement parlant et qu'ils infectent tous les deux des archées hyperthermophiles de l'ordre des *Thermococcales*, ils ne possèdent que deux gènes en commun. Ces gènes montrent une occurrence avec le domaine LamGL notamment. Ce domaine, appartenant à la famille des lectines/glucanases de type concanavoline, a une activité de liaison réversible aux polysaccharides pouvant intervenir à différents niveaux : stockage et transport, catalyse ou encore reconnaissance cellulaire et adhésion.

Ainsi les deux gènes communs chez PAV1 et TPV1 sont potentiellement impliqués dans la reconnaissance hôte-virus. Par ailleurs, ces gènes sont dans la partie du génome de PAV1 qui n'est pas homologue avec des plasmides de *Thermococcales* (Figure 66).

Finalement, TPV1 partagent plus de gènes homologues avec des éléments viraux intégrés aux génomes des souches *T. kodakarensis* et *T. gammatolerans* (TKV et TGV) qu'avec PAV1 (Gorlas *et al* 2012).

C. Les virus de méthanogènes

Les méthanogènes représentent un groupe important parmi les archées, pourtant peu d'informations sont disponibles concernant les virus les infectant. C'est **en 1989** que débutent les premières études concernant des particules de type viral produites par des méthanogènes, tout d'abord avec le **virus Ψ M1** produit par *Methanothermobacter marburgensis* et les **particules de type viral** produites par *Methanococcus voltae* **A3** (Jordan *et al* 1989, Meile *et al* 1989, Wood *et al* 1989). A ce jour, seulement cinq virus de méthanogènes sont effectivement décrits et ils ne sont pas tous classés dans des familles de virus connues.

En outre, des traces de l'existence de particules de type viral issues de méthanogènes ont également été reportées dans des digesteurs de boues et des sédiments marins notamment. Des séquences provirales ont également été détectées dans le génome de méthanogènes hyperthermophiles issues de sources hydrothermales océaniques profondes (Tableau 12).

Ces virus, particules de type viral et provirus associés aux méthanogènes sont décrit dans cette partie traitant des **virus de méthanogènes**.

Introduction générale

Tableau 12 : Virus et particules de type viral produites par des méthanogènes et provirus intégrés aux génomes de méthanogènes. Surigné en bleu clair : les systèmes étudiés dans ces travaux de thèse.

Virus / VLPs / Provirus	Morphologie	Hôte	Origine	Génome à ADN	Caractéristique	Référence
ψM1	Tête-queue	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	Digesteur de boues anaérobies	Double brin circulaire – 30,4 kb	Thermophile (55-60 °C) - Virulent	(Jordan <i>et al</i> 1989, Meile <i>et al</i> 1989)
ψM2	Tête-queue	<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	Mutant spontané de ψM1	Double brin linéaire – 26,1 kb	Thermophile (55-60 °C) - Virulent	(Pfiester <i>et al</i> 1998)
VLPs - <i>Methanococcus voltae</i> A3	Sphère	<i>Methanococcus voltae</i> A3	Sédiment de l'estuaire de Waccasassa, Floride – USA	Double brin circulaire – 23 kb	Mésophile (37 °C)	(Wood <i>et al</i> 1989)
φF1	Tête-queue	<i>Methanobacterium</i>	-	Double brin linéaire – 85kb	Thermophile (55 °C) - Virulent	(Nölling <i>et al</i> 1993)
φF3	Tête-queue	<i>Methanobacterium</i>	-	Double brin linéaire ou circulaire – 36 kb	Thermophile (55 °C) - Virulent	(Nölling <i>et al</i> 1993)
Provirus – ψM100	-	<i>Methanothermobacter wolfeii</i>	-	Double brin linéaire – 28,8 kb	Thermophile (55-60 °C) - Défectif	(Luo <i>et al</i> 2001)
VLPs - <i>Methanofollicis aquaemaris</i>	Sphère	<i>Methanofollicis aquaemaris</i>	Aquaculture (étang piscicole près de Wang-gong) – Taiwan	-	Mésophile (37 °C)	(Lai and Chen 2001)
VLPs - <i>Methanosaseta</i>	Pléomorphes de forme ellipsoïde	<i>Methanosaseta</i>	Sédiments anoxiques du Lac Pavin – France	-	Mésophile	(Borrel <i>et al</i> 2012)
VLPs - <i>Methanosaseta</i>	Tête-queue	<i>Methanosaseta</i>	Bioréacteurs	-	Mésophile	(Chien <i>et al</i> 2013)
VLPs – <i>Methanoculleus taiwanensis</i>	Bords proche de SIRV2	<i>Methanoculleus taiwanensis</i> CYW4 ^T	Sédiments marins profonds – Taiwan	-	Mésophile (37 °C)	(Weng <i>et al</i> 2015)
MetsV – <i>Methanosarcina</i> spherical virus	Sphère	<i>Methanosarcina</i> Gō1	<i>mazei</i> Boues d'épuration en condition anaérobie	Double brin linéaire de 11 kb	Mésophile - Virulent	(Weidenbach <i>et al</i> 2017)
Provirus – <i>Methanocaldococcus fervens</i>	-	<i>Methanocaldococcus fervens</i>	Sédiments marins de Guaymas	Double brin linéaire – 30,1 kb	Hyperthermophile	(Krupovic <i>et al</i> 2010)
Provirus – <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	-	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Echantillon de hydrothermale – Ride Est-Pacifique	Double brin linéaire – 30,4 kb	Hyperthermophile	(Krupovic <i>et al</i> 2010)
Provirus – <i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	-	<i>Methanocaldococcus vulcanius</i>	Echantillon de hydrothermale – Ride Est-Pacifique	Double brin linéaire – 30,1 kb	Hyperthermophile	(Krupovic <i>et al</i> 2010)

1. Les virus de méthanogènes décrits

a. Ψ M1 et Ψ M2

Ψ M1 (Meile *et al* 1989) (Jordan *et al* 1989)

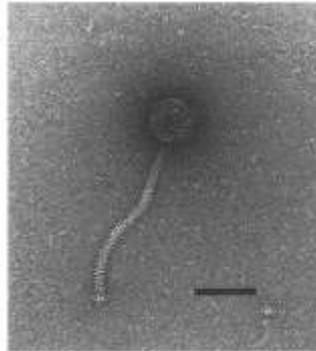


Figure 68 : Ψ M1 observé en microscopie électronique en transmission. L'échelle représente 70 nm (Jordan *et al* 1989).

L'espèce thermophile (croissance optimale à 55-60 °C) *Methanothermobacter marburgensis* (anciennement *Methanobacterium thermoautotrophicum*) appartient au genre ***Methanothermobacter*** de l'ordre ***Methanobacteriales*** (Wasserfallen *et al* 2000). Cette espèce est infectée par le virus virulent Ψ M1, et a été isolée d'un digesteur de boues anaérobie. Ce caudovirus est composé d'une tête icosaédrique d'environ 55 nm et une queue d'environ 210 nm (Figure 68). Ψ M1 contient un ADN linéaire double brin d'une taille d'environ 30,4 kb (déterminé en microscopie électronique à transmission) qui après analyse par RFLP (« Restriction Fragment Length Polymorphism », polymorphisme de longueur des fragments de restriction) a permis d'établir une carte circulaire du génome de 27,1 kb (Jordan *et al* 1989). Cette différence de taille suggère que le génome est constitué de molécules d'ADN permutées circulairement à redondances terminales (Meile *et al* 1989). Il a été observé qu'une partie des capsides virales (10-15 %) contient le plasmide cryptique pME2001 de 4,5 kb (Meile *et al* 1989) qui est empaqueté dans les capsides virales sous la forme de multimères. La taille totale de ces multimères est identique à la taille du génome viral ce qui montre que le mécanisme d'empaquetage du virus est précis pour ces deux éléments sans nécessité de similarités de séquences entre eux. L'étude de l'organisation du génome de Ψ M1 a permis d'identifier des sites *pac* suggérant un mécanisme d'empaquetage suivant le modèle du « headful » (Streisinger *et al* 1967). Par ailleurs, Ψ M1 est capable d'empaqueter de l'ADN chromosomique et de le transférer par transduction (Meile *et al* 1989). Cette étude a également permis d'isoler un phage mutant : Ψ M2 (Jordan *et al* 1989).

Introduction générale

ΨM2 (Pfister *et al* 1998)

Lors de l'étude du virus ΨM1, un mutant spontané de ce virus infectant également *M. marburgensis* a été mis en évidence : ΨM2. La mutation de ΨM2 consiste en une délétion dans son génome d'un fragment d'environ 0,7 kb qui a été déterminé comme étant l'élément DR1. Ce virus possède un génome d'une taille de 26,1 kb.

b. Particules de types virales isolées de *Methanococcus voltae* A3 (Wood *et al* 1989)

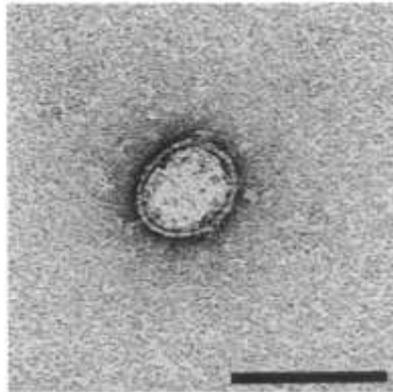


Figure 69 : Observation au microscope électronique de particules de type viral produite par *Methanococcus voltae* A3. L'échelle représente 100 nm (Wood *et al* 1989).

La souche mésophile (croissance optimale à 37 °C) ***Methanococcus voltae* A3** appartient à l'ordre des ***Methanococcales***. Cette souche produit des particules de type viral, qui présentent une morphologie oblate d'environ 52 nm par 70 nm et possèdent une capsidie enveloppée (Figure 69). L'ADN double brin circulaire de 23 kb contenu dans ces particules peut s'intégrer au génome de l'hôte. Ces particules ne semblent pas montrer de caractère infectieux.

c. φF1 et φF3 (Nölling *et al* 1993)

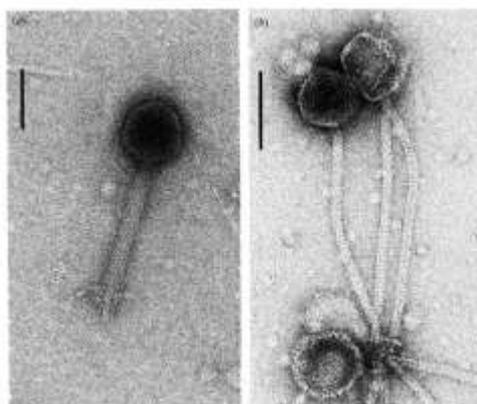


Figure 70 : Les virus φF1 (a) et φF3 (b) observés en microscopie électronique en transmission. L'échelle représente 70 nm (Nölling *et al* 1993).

Introduction générale

φF1 et φF3 sont deux virus virulents capables d'infecter des espèces thermophiles (croissance optimale à 55-60 °C) du genre *Methanobacterium*. Ils présentent tous les deux une morphologie similaire. φF1 est un tête-queue avec une tête icosaédrique d'environ 70 nm de diamètre et une queue non flexible d'environ 160 nm de long et 20 nm de large. φF3 est un tête-queue avec une tête icosaédrique d'environ 55 nm de diamètre et une queue flexible de 230 nm de long et 9 nm de large (Figure 70). Ils diffèrent cependant sur la taille et la topologie de leur génome ainsi que sur leur spécificité d'infectiosité. En effet, la taille du génome de φF1 est estimée à environ 85 kb contre environ 36 kb pour celui de φF3. De plus, φF1 présente un génome linéaire tandis que φF3 contient de l'ADN circulaire ou linéaire avec terminaisons redondantes. Les deux génomes viraux ne montrent pas de similarité. φF1 semblent pouvoir infecter une large variété d'hôtes comprenant notamment *M. thermoformicum* (souches Z-245, FTF, FF1, FF3 et CSM3) et *M. thermoautotrophicum*. *A contrario*, φF3 possède un spectre d'infection plus restreint puisqu'il ne concerne que *M. thermoformicum* FF3.

d. ΨM100 (Luo *et al* 2001)

L'espèce thermophile (croissance optimale à 60 °C) *Methanothermobacter wolfeii* appartient au genre *Methanothermobacter* qui fait partie des *Methanobacteriales* (Wasserfallen *et al* 2000). *M. wolfeii* possède un prophage défectif dans son génome nommé **ΨM100**. En effet, si la souche fait l'objet d'une lyse spontanée en conditions de limitation en H₂, aucune particule de type viral libre n'a pu être détectée. Le provirus code pour une pseudomuréine endopeptidase, la PeiW, qui est responsable de l'autolyse de l'hôte. Le génome de ΨM100 qui fait 28,8 kb montre 70,8 % d'identité avec le génome de ΨM2 (Pfister *et al* 1998) qui infecte la souche *Methanothermobacter marburgensis*.

e. MetSV – *Methanosarcina* spherical virus (Weidenbach *et al* 2017)

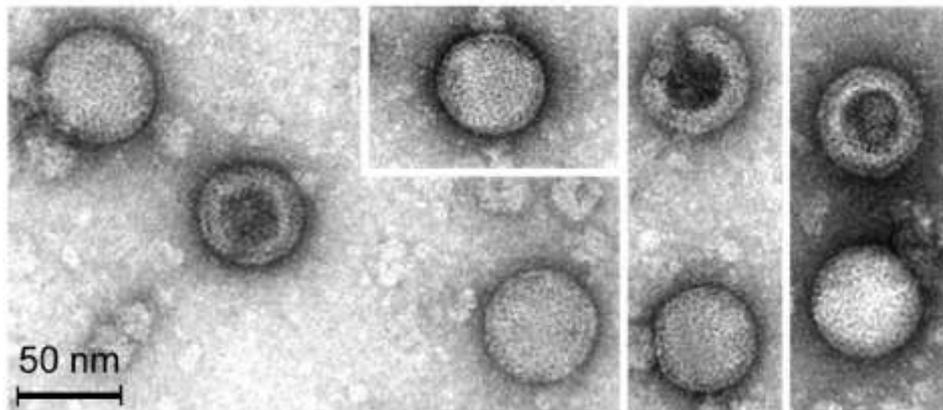


Figure 71 : MetSV en microscopie électronique en transmission (Weidenbach *et al* 2017).

MetSV est un virus virulent qui infecte des espèces mésophiles du genre *Methanosarcina* (*Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina barkeri* et *Methanosarcina soligedili*). Ce virus a été isolé à partir de la souche *Methanosarcina mazei* Gö1 issue de boues d'épuration en condition anaérobie. Il a une morphologie sphérique avec un diamètre d'environ 50 nm, entouré d'une enveloppe donnant un aspect de mûre (Figure 71). MetSV a une morphologie proche de PSV (*Pyrobaculum* spherical virus) mais présente des particules virales deux fois plus petites (Häring *et al* 2004). Il possède un ADN double brin linéaire de 11 kb avec 22 ORFs. Sur les 22 ORFs, 15 ne trouvent peu, voire, aucune similarité avec les séquences disponibles dans les bases de données publiques. 4 ORFs trouvent des homologies avec des protéines de type ADN polymérase B, ATPase, une protéine de liaison à l'ADN (régulateur transcriptionnel) ou encore une protéine de structure de la capsid. Plusieurs génomes de *Methanosarcinales* présentent des signatures dérivées de MetSV dans leurs *loci* CRISPR. Ce virus ne semble pas infecter les souches de *Methanosarcina* lorsque les cellules forment des agrégats. En effet, les cellules en agrégats semblent protégées de l'infection virale et donc de la lyse résultant de l'infection. C'est le premier virus infectant des *Methanosarcinales* décrit. Si la plupart des virus de méthanogènes sont classés chez les *Myoviridae* ou les *Siphoviridae* de par leur morphologie tête-queue, MetSV semble appartenir à une nouvelle famille de virus et n'est à ce jour pas classé.

2. Des particules de type viral détectées chez les méthanogènes

a. Le virus de *Methanofollis aquaemaris* (Lai and Chen 2001)

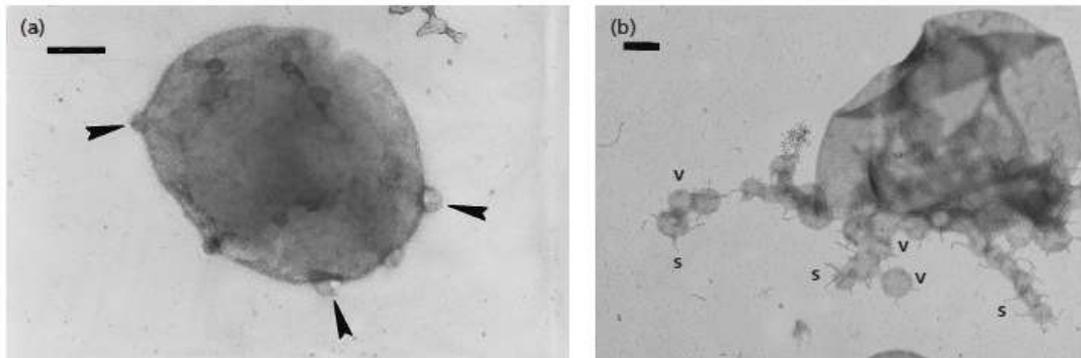


Figure 72 : Particules de type viral bourgeonnant de cellules de *Methanofollis aquaemaris* observées en microscopie électronique en transmission (Lai and Chen 2001).

La souche mésophile (croissance optimale à 37 °C) *Methanofollis aquaemaris* appartient au genre *Methanofollis* appartenant à l'ordre des *Methanomicrobiales*. Cette souche isolée d'un étang piscicole semble être infectée par un virus enveloppé en forme de coque de 200 nm de diamètre (Figure 72). Ce potentiel virus, ressemblant à des vésicules membranaires, n'a pas été décrit plus en détail.

b. Des indices de l'existence de virus de *Methanosaeta*

Les *Methanosaeta* sont probablement les producteurs de méthane les plus importants sur Terre (Smith and Ingram-Smith 2007). Ce genre appartient à l'ordre des *Methanosarcinales*.

Des virus détectés dans des sédiments anoxiques du Lac Pavin (Borrel et al 2012)

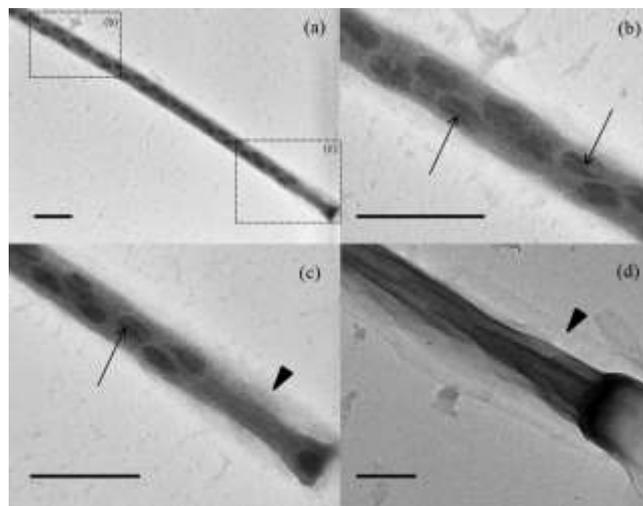


Figure 73 : Détection, en microscopie électronique en transmission, de virus pléomorphes de forme ellipsoïde infectant un procaryote filamenteux provenant de sédiments du lac Pavin.

Introduction générale

Lors d'une étude de la structure des communautés procaryotiques et virales des sédiments anoxiques du lac Pavin (France), des particules de type viral ont été détectées. Ces particules présentent des morphologies diverses. Un procaryote filamenteux a notamment été observé et, si l'identité de ce microorganisme n'a pas été confirmé, il présente des cellules morphologiquement proches de celles de l'espèce mésophile *Methanosaeta concilii* (Patel and Sprott 1990). Les *Methanosaeta* représentent le groupe d'archées majoritaire dans les sédiments du lac Pavin. Ce microorganisme semble infecté par un virus pléomorphe de forme ellipsoïde (Figure 73).

Des particules virales persistantes dans des bioréacteurs contenant majoritairement des *Methanosaeta* (Chien *et al* 2013)

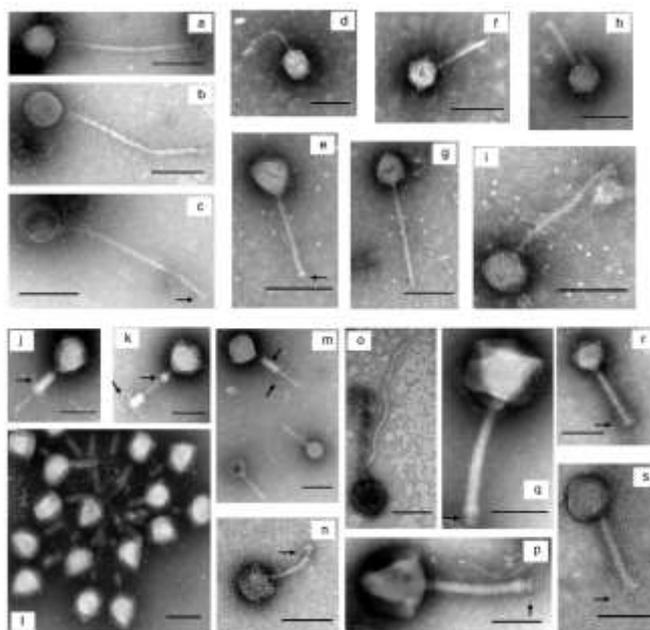


Figure 74 : Des VLPs isolées de bioréacteurs observées en microscopie électronique en transmission (Chien *et al*, 2013).

Des particules ressemblant à des virus sont souvent retrouvées dans les systèmes de digestion en condition anaérobie (Figure 74). Ce type de digesteur produit du méthane en conditions mésophile et anaérobie, et pour deux tiers du méthane produit, il l'est par des méthanogènes acétoclastiques dont les *Methanosaeta* représentent le genre dominant. Les *Methanosaeta* semblent être une cible pour de potentielles attaques virales, bien qu'aucun virus de *Methanosaeta* ne soit décrit à ce jour. Les particules observées présentent une morphologie tête-queue qui suggère la présence de *Siphoviridae* et *Myoviridae* infectant potentiellement les *Methanosaeta* qui colonisent ces systèmes de digestion en condition anaérobie.

c. *Methanoculleus taiwanensis* CYW4^T et ses VLPs (Weng *et al* 2015)

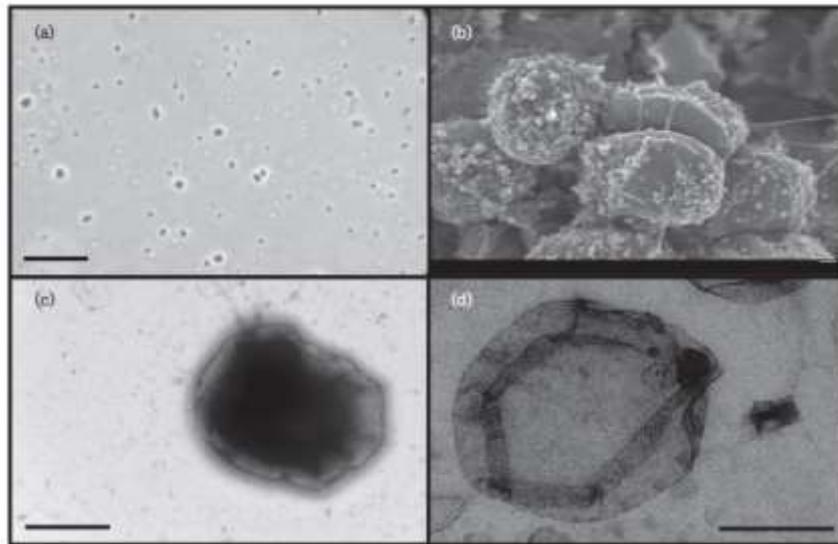


Figure 75 : La souche CYW4^T en microscopie électronique en transmission (Weng *et al* 2015).

La souche mésophile (37 °C) *Methanoculleus taiwanensis* CYW4^T appartient au genre ***Methanoculleus*** et à l'ordre des ***Methanomicrobiales*** de la famille des ***Methanomicrobiaceae***. Cette souche arbore des particules libres et attachées qui ressemblent à des particules virales ou à des vésicules membranaires (Figure 75). Certaines cellules présentent des bords triangulaires similaires à ceux observés chez *Sulfolobus islandicus* lors du relargage de son virus SIRV2 (Bize *et al* 2009). Enfin, en phase stationnaire, la densité cellulaire de la souche CYW4^T baisse drastiquement, ce qui pourrait indiquer une lyse cellulaire résultant d'une infection virale.

3. Des indices de l'existence de virus de méthanogènes hyperthermophiles

Il existe 9 méthanogènes hyperthermophiles de l'ordre des *Methanococcales* décrites à ce jour. Elles sont comprises dans les genres ***Methanocaldococcus*** et ***Methanotorris*** qui appartiennent à la famille des *Methanocaldococcaceae*. Elles sont toutes présentées sur la Figure 76 à l'exception de la dernière caractérisée : *Methanocaldococcus bathoardescens* (Bellack *et al* 2011, Burggraf *et al* 1990a, Jeanthon *et al* 1998, Jeanthon *et al* 1999b, Jones *et al* 1983, L'Haridon *et al* 2003, Slesarev *et al* 2002, Stewart *et al* 2015, Takai *et al* 2004, Zhao *et al* 1988).

Introduction générale

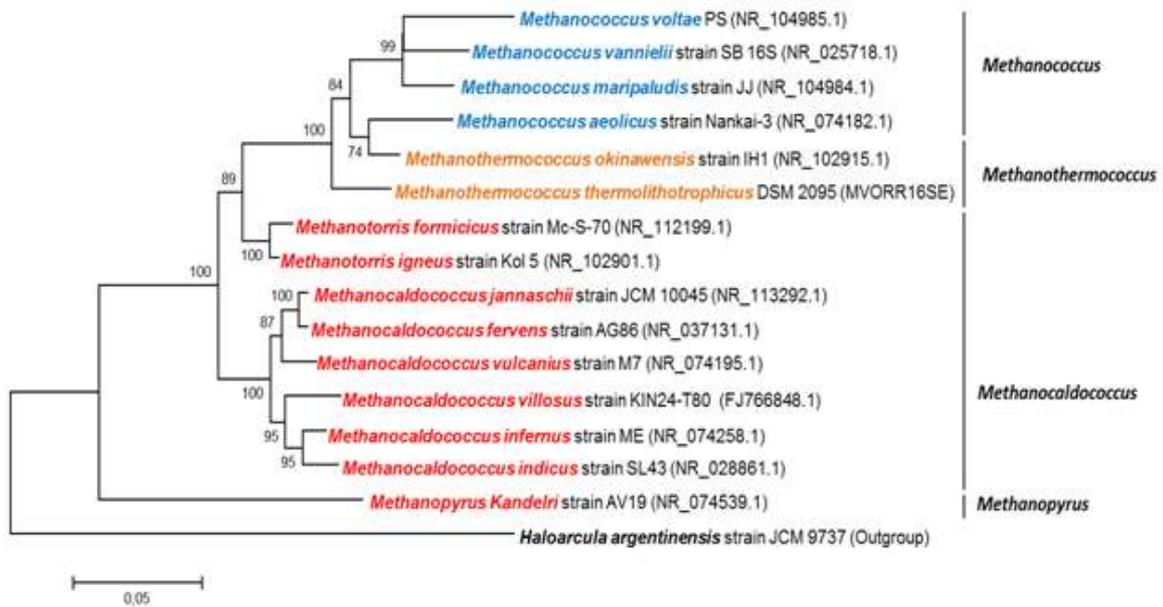


Figure 76 : Arbre phylogénétique situant les méthanogènes hyperthermophiles terrestres et océaniques. En bleu : les espèces mésophiles. En orange : les espèces thermophiles. En rouge : les espèces hyperthermophiles (d'après une présentation de S. Dupont).

Si aucun virus de méthanogène hyperthermophile n'a été décrit à ce jour, la présence de provirus dans plusieurs génomes de *Methanococcales* indique l'existence de virus infectant ces microorganismes. Les provirus de *M. jannaschii* et *M. fervens* révèlent une synténie au niveau de l'organisation de leurs gènes et diffèrent de façon significative de l'organisation de du provirus de *M. vulcanius*. Les gènes codant pour la MCP, qui est la protéine majeure de la capsid virale, et la TMP, qui est la protéine majeure de la queue du virus, sont retrouvés pour ces trois provirus. Ces trois provirus présentent des analogies avec les provirus de *Methanococcus maripaludis* C6 et *Methanococcus voltae* A3 qui sont des espèces mésophiles (Figure 77) (Krupovic *et al* 2010). Les provirus de *Methanocaldococcus fervens*, *Methanocaldococcus jannaschii* et *Methanocaldococcus vulcanius* font l'objet de la présente étude (Chapitre 1 et 2).

Introduction générale

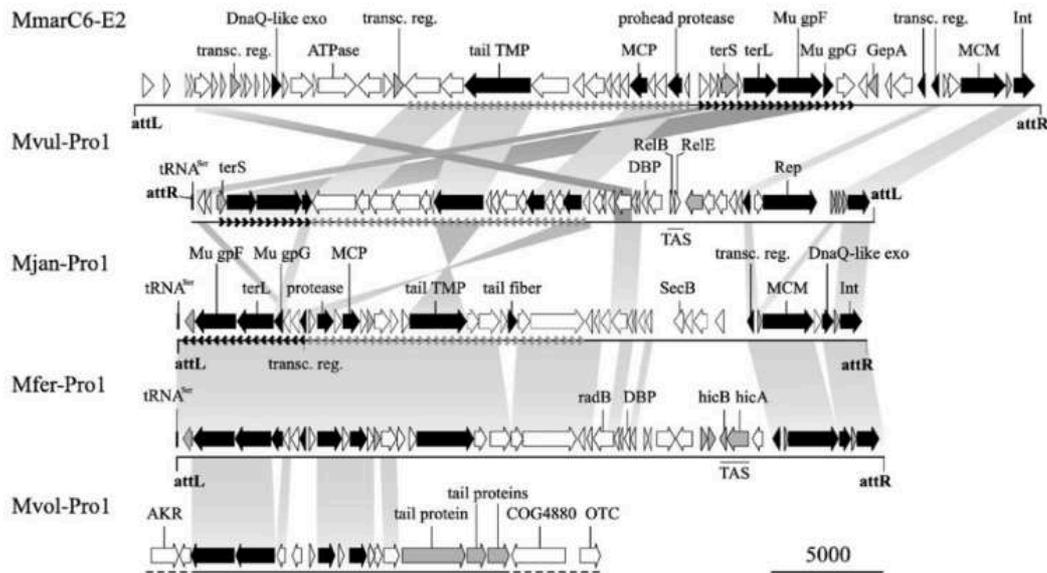


Figure 77 : Représentation comparative de l'organisation de différents génomes proviraux de *Methanococcales* (D'après (Krupovic *et al* 2010)).

4. Les éléments génétiques mobiles des méthanogènes

L'étude des **éléments génétiques mobiles** des méthanogènes n'est pas très développée, et peu de plasmides de méthanogènes sont disponibles. Les plasmides de méthanogènes étudiés se révèlent cependant intéressants puisque certains semblent être impliqués dans des phénomènes de transferts horizontaux de gènes.

Le mode de répllication des **plasmides de méthanogènes** reste pour la plupart inconnu mais a été élucidé pour quelques plasmides comme pML, isolé d'une *Methanohalophilus* et qui peut se répliquer par cercle roulant (Lipps and Trends 2008). pFV1 et pFZ1, issus de *Methanobacterium formicum*, codent pour protéine de répllication de type ORC1/CDC6 qui est également présente dans les génomes archéens (Wang *et al* 2015a).

Il est à noter que pFV1 et pFZ1 codent également pour un système de restriction-modification tout comme les plasmides de *Methanocaldococcus jannaschii*, ECE1 et ECE2 (Bult *et al* 1996). Les systèmes de restriction-modification sont des systèmes de défense généralement employé par les bactéries pour faire face aux attaques des bacteriovirus.

Au niveau des **sources hydrothermales**, 7 plasmides portés par des méthanogènes ont été décrits (Tableau 13). De façon plus générale, la majorité des plasmides isolés de sources hydrothermales océaniques profondes sont portés par des espèces hyperthermophiles de l'ordre *Thermococcales* ou de l'ordre *Methanococcales* (Lossouarn *et al* 2015a).

Introduction générale

Tableau 13 : Plasmides portés par des méthanogènes issues de sources hydrothermales océaniques profondes (repris de Lossouarn *et al* 2015a).

Plasmides	Taille du génome	Hôte	Réplication	Caractéristiques
PMETVU01	10,7kb	<i>Methanocaldococcus vulcanius M7</i>	Type Theta	Protéine hélicase (SFI) Protéines homologues aux protéines des plasmides de la sous-famille de pEXT9a-like
PMETVU02	4,7kb	<i>Methanocaldococcus vulcanius M7</i>	Type Theta	Protéine putative de la famille MCM
pFS01	12,2kb	<i>Methanocaldococcus sp. FS406-22</i>	Type Theta	Protéine putative de la famille MCM Domaine ADN polymérase
ECE1	58,4kb	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Type Theta	Protéine putative de la famille MCM et ParA Système de restriction-modification
ECE2	16,5kb	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	Type Theta	Système de restriction-modification
pMEFER01	22,2kb	<i>Methanocaldococcus fervens AG86</i>	Type Theta	Protéine putative de la famille MCM
pMETOK01	14,9kb	<i>Methanothermococcus okinawensis IH1[†]</i>	Type Theta	Domaines hélicase et nucléase

Les *Thermococcales* et *Methanococcales* cohabitent au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes portent des plasmides qui partagent de fortes homologies de séquences. Le **plasmide pT26-2** qui est le premier élément génétique intégré isolé de *Thermococcales* est très proche d'autres éléments génétiques intégrés retrouvés dans les génomes des souches : *Thermococcus kodakarensis*, *Pyrococcus horrikoshii*, *Thermococcus gammatolerans*, *M. maripaludis S2, C2 et C7*, *M. voltae* ou encore *M. fervens*. De façon générale la famille pT26-2 contient des homologues chez les *Thermococcales* et les *Methanococcales* (Figure 78 et Figure 79) (Soler *et al* 2011). pMETVU01 isolé de *Methanocaldococcus vulcanius M7* et pAMT7 retrouvé chez *Thermococcus sp. AMT7* possèdent 10 gènes conservés qui codent pour des protéines présentant 53 à 97 % d'identités de séquences. Les deux souches partagent le même environnement puisqu'elles ont été isolées de la même cheminée hydrothermale océanique profonde (Krupovic *et al* 2013, Wang *et al* 2015a). pMETVU01 partage également des protéines homologues avec des plasmides

Introduction générale

appartenant la sous-famille des pEXT9a-like, pEXT9a étant un plasmide porté par une *Thermococcus* (Lossouarn *et al* 2015a).

Les **plasmides de la famille pT26-2** sont impliqués dans une coévolution avec leurs hôtes suggérant une divergence à partir d'un ancêtre commun au sein des archées avant la divergence des *Methanococcales* et des *Thermococcales*. Les **pEXT9a-like** semblent impliqués dans des phénomènes de transferts horizontaux de gènes (Krupovic *et al* 2013).

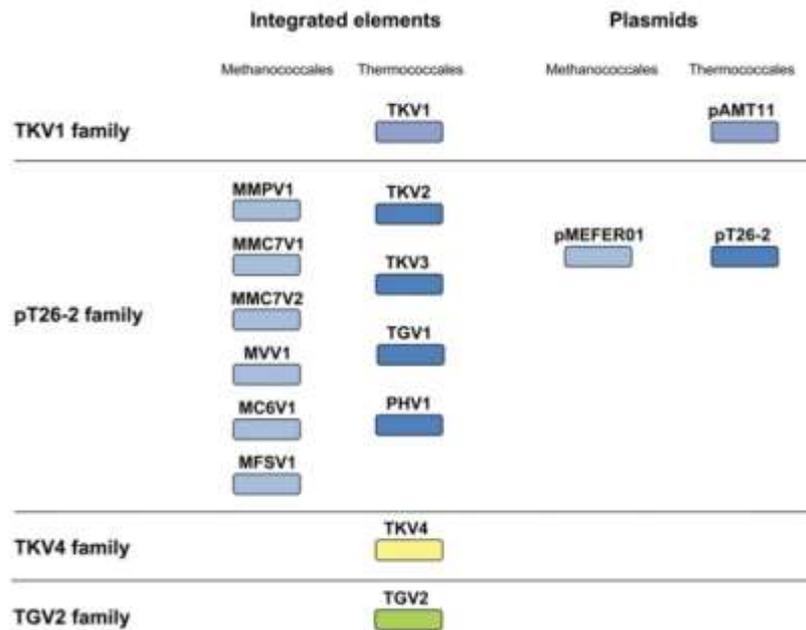


Figure 78 : Éléments génétiques intégrés et plasmides libres homologues chez les *Thermococcales* et les *Methanococcales* (Soler *et al* 2011).

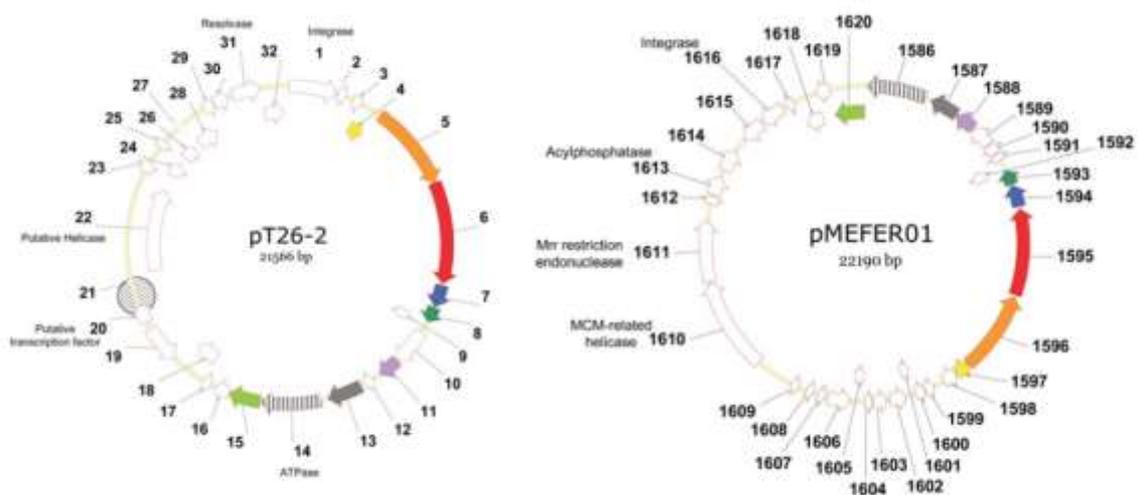


Figure 79 : Représentation schématique des génomes des plasmides pT26-2 issu de *Thermococcus sp.* 26-2 et de pMEFER01 issu de *Methanocaldococcus fervens* (Soler *et al* 2011).

Présentation générale des travaux de thèse

Les virus, entités biologiques les plus abondantes sur Terre, sont présents dans tous les écosystèmes. Ce sont de puissants acteurs de la diversité, de l'adaptation et de l'évolution, des communautés microbiennes y compris au niveau des environnements les plus extrêmes. Les connaissances concernant la virosphère associée aux écosystèmes hydrothermaux océaniques restent à ce jour très limitées. En effet, si les sources hydrothermales ont été découvertes en 1977, ce n'est que 26 ans plus tard, en 2003, que le premier virus isolé d'une archée issue de cet environnement fut décrit au LM2E. Ce virus, PAV1, infecte *Pyrococcus abyssi*, une hyperthermophile de l'ordre des *Thermococcales* (Geslin *et al* 2003a). A ce jour, 10 virus ont été décrits dont 8 bacteriovirus et 2 archaeovirus (Lossouarn *et al* 2015a, Mercier *et al* 2018).

Les efforts de recherche menés par le LM2E se sont focalisés sur l'ordre des *Thermococcales*, des archées hyperthermophiles, anaérobies et hétérotrophes métabolisant le soufre et sur l'ordre des *Thermotogales*, comprenant des bactéries thermophiles anaérobies et chimio-organotrophes dont le métabolisme est assez proche de celui des *Thermococcales*. Ces ordres sont bien représentés au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes et font l'objet de nombreuses études. L'étude de ces microorganismes a permis non seulement de caractériser de nouveaux systèmes hôte-virus mais également de mettre en évidence l'existence de relations complexes entre différents partenaires incluant les plasmides et les vésicules membranaires.

Ces différents éléments génétiques mobiles ont été rassemblés sous l'appellation « mobilome abyssal » comprenant tous les éléments génétiques mobiles associés à l'écosystème abyssal (Lossouarn *et al* 2015a).

Présentation générale des travaux de thèse

Dans le but d'élargir et compléter les connaissances de la diversité virale et plus généralement du mobilome hydrothermal océanique, la part autotrophe de cet écosystème a été ciblée. Pour cela, l'étude de nouveaux éléments génétiques mobiles isolés de méthanogènes hyperthermophiles, un autre grand groupe important de cet habitat, a été menée. Ces méthanogènes appartiennent à l'ordre *Methanococcales*. Elles sont hydrogénotrophes et utilisent le CO₂ comme source de carbone et l'H₂ comme source d'énergie, en condition anaérobies, pour réaliser la méthanogénèse, dont le produit final est le CH₄. Peu de virus de méthanogènes sont décrits et aucun n'est associé à un écosystème abyssal à ce jour. Ils ont été isolés de digesteurs de boues anaérobies en conditions thermophiles, ou de sédiments estuariens anoxiques en conditions mésophiles (Meile *et al* 1989, Nölling *et al* 1993, Weidenbach *et al* 2017, Wood *et al* 1989). Cependant, des séquences provirales ont été détectées dans le génome de certaines *Methanocaldococcus* hyperthermophiles : *Methanocaldococcus fervens*, *Methanocaldococcus jannaschii* et *Methanocaldococcus vulcanius* (Krupovic *et al* 2010).

C'est dans ce contexte que l'exploration de la diversité virale des méthanogènes hyperthermophiles, au cœur de ce projet de thèse, a débuté.

Tout d'abord, ces travaux ont permis la caractérisation du premier virus tête-queue hyperthermophile, initiée lors de la mission post-doctorale de Samuel Dupont au LM2E. MFV1 (*Methanocaldococcus fervens* virus 1) infecte la méthanogène hyperthermophile *Methanocaldococcus fervens* AG86 dans une relation de lysogénie particulière. C'est un siphovirus avec un génome de 31 kb qui est intégré au génome de son hôte. Sa capacité à rester infectieux en conditions hyperthermophiles a été démontrée sur des souches de *Methanocaldococcus* phylogénétiquement proche de *M. jannaschii*. Il a été montré que les capsides transportaient le plasmide pMEFERO1 porté par *M. fervens* et qu'il était également transmis aux souches de *Methanocaldococcus* lors des tests d'infection. Ces infections virales et ces transferts de plasmides sont d'importants moteurs de transferts horizontaux de gènes au sein de l'écosystème abyssal. Enfin, l'induction d'une production de vésicules membranaires par l'ajout de cuivre dans le milieu de culture de *M. fervens* a été observée. Ces travaux feront prochainement l'objet d'une publication et constituent le premier chapitre de ce manuscrit.

Présentation générale des travaux de thèse

Le second chapitre de ce manuscrit s'inscrit dans l'effort de recherche et caractérisation d'éléments génétiques mobiles de méthanogènes hyperthermophiles. Pour cela, une collection de 46 souches de méthanogènes a fait l'objet d'un criblage. Le but premier de ce criblage était de rechercher de nouveaux systèmes hôte-virus. De plus, les souches de *Methanocaldococcus* non porteuses de provirus ou virus ont servi de gamme d'hôtes pour des tests d'infections.

Par ailleurs, les souches de référence de *M. jannaschii* JAL-1 et de *M. vulcanius* M7^T portant des séquences provirales ont été étudiées. Ces travaux ont permis d'observer des particules de type viral présentant une morphologie originale en forme de tige surmontée de boucles à chaque extrémité pour *M. jannaschii*. L'étude de *M. vulcanius* a permis l'observation d'un nouveau virus tête-queue hyperthermophile. De façon plus générale, la production de vésicules par les *Methanocaldococcus* étudiées laisse suggérer un phénomène répandu chez ces archées. L'ensemble des informations rassemblées à partir de l'étude des éléments génétiques mobiles de méthanogènes hyperthermophiles ainsi que les informations obtenues de la littérature feront l'objet d'une revue.

En parallèle, j'ai pu participer à la caractérisation d'un nouveau virus de *Thermococcales*, le Thiovirus. Ce virus en forme de citron infecte *Thermococcus thioeducens* UBOCC-M-2423 selon un cycle chronique. Ainsi, la caractérisation de ce Thiovirus, 3^e virus isolé de l'ordre des *Thermococcales*, semble confirmer la prédominance de cette morphologie pour cet ordre. Ce virus est composé d'un génome à ADN de 20 kb. Thiovirus, PAV1 et TPV1, les deux autres virus « citron » de *Thermococcales*, n'ont en commun que deux gènes potentiellement impliqués dans l'adhésion de ces virus à leurs hôtes.

De façon inattendue, l'infectiosité du Thiovirus a pu être démontrée sur des souches de *Methanocaldococcus*. Ce virus isolé d'une *Thermococcale* semble donc capable d'infecter des archées hyperthermophiles appartenant à deux ordres différents. L'infection de méthanogènes hyperthermophiles par ce virus de *Thermococcales* ouvre l'hypothèse d'un système de transfert de l'information génétique du Thiovirus par un autre véhicule que la capsid. En effet, les virions purifiés sont la plupart du temps observés attachés à des vésicules membranaires. Le Thiovirus pourrait hypothétiquement utiliser ce véhicule, ces vésicules, pour se propager. Les travaux de caractérisation de ce virus qui constituent le troisième chapitre de ce manuscrit feront prochainement l'objet d'une publication.

Matériels et Méthodes

I. Techniques de culture

A. Culture des *Methanococcales*

B. Culture des *Thermococcales*

II. Techniques de virologie

A. Préparation de solutions virales concentrées et purifiées

B. Microscopie électronique en transmission

C. Estimation de l'abondance de l'hôte et son virus

III. Techniques de biologie moléculaire

A. Extractions d'acide nucléiques (hôte, virus et plasmide)

B. Réactions d'amplifications par PCR et QPCR

I. Techniques de culture

A. Culture des *Methanococcales*

Les *Methanococcales* utilisées dans ces travaux de thèse ont été cultivées dans un milieu pour autotrophe « DSMZ 141 » modifié (Tableau 1). La température d'incubation des différentes souches est de 80 °C avec agitation (100 RPM). Les cultures ont été réalisées en bouteille de 1 l avec 250 ml de milieu de culture ou en fioles de 125 ml avec 25 ml de milieu de culture.

Tableau 1: Milieu pour autotrophe "DSMZ 141" modifié.

Produits	Concentration
NaCl	20 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	4 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	3,45 g/l
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,14 g/l
NH ₄ Cl	0,25 g/l
KCl	0,34 g/l
Eléments traces	1 ml (Widdel and Bak 1992)
NaHCO ₃	1 g/l
Extrait de levure	0,2 g/l
K ₂ HPO ₄	0,14 g/l
Résazurine (1 %)	2 gouttes
pH ajusté à 6,5 avec de l'HCl 3 N et le milieu est ajusté à 1 l avec de l'eau distillée	
Chauffer sous flux N ₂ /CO ₂ et ajouter 0,5 g/l de cystéine-HCl.H ₂ O, puis laisser refroidir sous flux N ₂ /CO ₂	
Ajout de solutions supplémentaires avant autoclavage et sous flux N ₂ /CO ₂ :	
1 ml de polyvitamines (Widdel and Bak 1992)	
1 ml de solution de sélénate-tungstate (NaOH 10 mM, Na ₂ SeO ₃ .5H ₂ O 0,02 mM, Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O 0,02 mM)	
Répartir en bouteilles (250 ml pour une bouteille 1 l) ou en fioles scellées (25 ml pour une fiole 125 ml)	
Autoclavage 20 min à 121 °C	
La phase gazeuse est remplacée par du H ₂ /CO ₂ (80:20) à 1,7 bar	
Ajout de solutions supplémentaires après autoclavage :	
Pour ajuster le pH à 6,3 : tampon carbonate (concentration finale de 0,08 % m/v de Na ₂ CO ₃)	
Pour réduire l'oxygène restant dans le milieu : 0,1 ml de Na ₂ S (5 %) pour 10 ml de milieu	

B. Culture des *Thermococcales*

Les souches de *Thermococcales* ont été cultivées dans un milieu pour hétérotrophe, « TRM » (*Thermococcales* Rich Medium), additionné de soufre tyndallisé (2 g/l) (Tableau 2). La température d'incubation des différentes souches est de 85 °C sans agitation. Les cultures ont été réalisées en fioles de 50 ml avec 20 ml de milieu de culture.

Tableau 2: Milieu pour hétérotrophe "TRM".

Produits	Concentration
NaCl	23 g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	5 g/l
PIPES disodium salt	3,46 g/l
Tryptone	4 g/l
Extrait de levure	1 g/l
KCl	0,7 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/l
NaBr	0,05 g/l
SrCl ₂ .6H ₂ O	0,01 g/l
Résazurine (1 %)	2 gouttes
pH ajusté à 6,8 avec de l'HCl 3 N et le milieu est ajusté à 1000 ml avec de l'eau distillée	
Répartir en bouteilles (500 ml par bouteille de 1 l)	
Autoclavage 20 min à 121 °C	
Ajout de solutions supplémentaires après autoclavage :	
1 ml de K ₂ HPO ₄ (5 %) ; 1 ml de KH ₂ PO ₄ (5 %)	
1 ml de CaCl ₂ .2H ₂ O (2 %), 1 ml de Na ₂ O ₄ W.2H ₂ O (10 mM)	
1 ml de FeCl ₃ .6H ₂ O (25 mM)	
Ajout de soufre tyndallisé à 2 g/l	
Répartir en fioles (20 ml de milieu pour une fiole de 50 ml)	
Pour réduire l'oxygène restant dans le milieu : 0,1 ml de Na ₂ S (5 %) pour 10 ml de milieu	

II. Techniques de virologie

A. Préparation de solutions virales concentrées et purifiées

1. Solution virale concentrée

Les cultures des hôtes étudiés (1 l) sont concentrées par ultracentrifugation.

Pour les virus de *Methanocaldococcales* : Les cultures sont placées dans des flacons à centrifugation (Nalgène) préalablement stérilisés, puis les flacons sont centrifugés à 7500 g pendant 20 min à 4 °C. Les surnageants sont récupérés dans des tubes à ultracentrifugation (Centrifuge tubes polycarbonate Thickwall, Beckman Coulter) équilibrés deux à deux avec une précision de 5 mg (12 tubes par ultracentrifugation, 8 ml de surnageant par tube). Les tubes sont ensuite centrifugés à très haute vitesse à 155 000 g pendant 1 h à 10 °C en rotor fixe (Beckman Optima LE-80 K, 70.1 Ti rotor). Pour chaque ultracentrifugation, les culots sont récupérés en série avec 150 µl de tampon « TPV1 » filtré sur une membrane millipore 0,02 µm (composition du tampon pour 1 l : Tris-HCL 1 M : 10ml ; NaCl 1 M : 100 ml ; MgCl₂ 1 M : 20 ml ; CaCl₂ 0,5 M : 1ml ; pH 7,5), la solution concentrée finale est de 2 ml. Les surnageant de cultures sont donc concentrés 500 fois et sont stockés à 4 °C.

Pour les virus de *Thermococcales* : Les cultures sont placées dans des flacons à centrifugation (Nalgène) préalablement stérilisés, puis les flacons sont centrifugés à 7500 g pendant 20 min à 4 °C. Les surnageants sont récupérés dans des tubes à ultracentrifugation (Centrifuge tubes polycarbonate Thickwall, Beckman Coulter) équilibrés deux à deux avec une précision de 5 mg (6 tubes par ultracentrifugation, 68 ml de surnageant par tube). Les tubes sont ensuite centrifugés à très haute vitesse à 155 000 g pendant 1h30 à 10 °C en rotor fixe (Beckman Optima LE-80 K, 45 Ti rotor). Pour chaque ultracentrifugation, les culots sont récupérés en série sans ajout de tampon, à l'aide quelques gouttes de surnageant restantes. La solution concentrée finale est de 2 ml. Les surnageant de cultures sont donc concentrés 500 fois et sont stockés à 4 °C.

Traitement des solutions virales concentrées : Lorsque les solutions virales concentrées sont utilisées sans purification, il faut se débarrasser des cellules, débris cellulaires et ADN exogène libre. Pour cela, les solutions virales de concentrées de MFV1 ont subi des traitements chaud-froid (1 h à 80 °C en agitation puis stock à 4 °C) et/ou un traitement avec de la benzonase, qui dégrade l'ADN libre (double brin et simple brin), à une concentration finale de 1 U/μl. Le traitement utilisé pour les solutions virales du Thiovirus est une filtration sur 0,45 μm (membrane turffyn, filtres seringues, VWR).

2. Solution virale purifiée

La préparation de solution virale purifiée se fait par dépôt d'une solution virale concentrée sur gradient de densité à l'iodixanol (Optiprep, Sigma-Aldrich) (15 % → 45 %).

Préparation des gradients de densité à l'iodixanol : quatre solutions d'iodixanol (15 %, 25 %, 35 %, 45 %) sont préparées en parallèle à partir d'une solution mère d'iodixanol à 60 % en diluant dans du tampon TPV1 filtré à 0,02 μm (Pour 1 l : Tris-HCL 1 M : 10ml ; NaCl 1 M : 100 ml ; MgCl₂ 1 M : 20 ml ; CaCl₂ 0,5 M : 1ml ; pH 7,5). Les couches sont déposées successivement dans des tubes à ultracentrifugation d'une capacité de 12,5 ml (Tubes, Thickwall, Polycarbonate, 16 x 76mm Beckman Coulter), en partant de la solution la plus concentrée vers la moins concentrée. Le volume total du gradient est estimé à 10,5 ml afin de laisser une marge de 2 ml pour pouvoir déposer la solution virale concentrée. Le tube est équilibré, deux à deux, avec un tube référence (la différence entre deux tubes doit être inférieure à 5 mg). Les tubes sont placés dans les nacelles du rotor SW41 Ti, puis centrifugés à haute vitesse à 285 000 g pendant 16 h à 10 °C.

Récupération des bandes d'intérêts : Suite à la purification sur gradient de densité d'iodixanol, des bandes pouvant représenter une suspension virale purifiée sont récupérées. Pour cela, à l'obscurité, le gradient est observé à l'aide d'un faisceau lumineux afin de repérer les différentes bandes blanchâtres présentes. Les suspensions contenant chaque bande d'intérêt sont ensuite récupérées en piquant les tubes à ultracentrifugation avec des seringues de 1 ml munies d'aiguilles (récupération de 250 μl à 500 μl de suspension par bande en fonction de la taille de celle-ci). Chaque bande collectée est déposée dans un tube de 2 ml stérile. Les échantillons sont conservés à 4 °C. À partir de ces suspensions, des observations en microscopie électronique en transmission (MET) sont effectuées pour confirmer l'obtention d'une suspension virale purifiée.

B. Microscopie électronique en transmission

Préparation des grilles de MET : 5 μ l de solution virale concentrée ou purifiée sont déposés sur une grille en cuivre recouverte de carbone Formvar (adaptée à l'observation en MET) et l'absorption se fait pendant 2 min à température ambiante. L'excès de liquide est éliminé par capillarité à l'aide de papier Whatman. La grille est contrastée avec l'ajout de 5 μ l d'acétate d'uranyle (2 %) pendant 45 s. Une fois l'excès de liquide absorbé comme précédemment, les grilles de MET sont conservées dans des cupules jusqu'à observation de celles-ci avec le microscope électronique en transmission (JEOL 100 CXII, à 120 kV).

C. Estimation de l'abondance de l'hôte et son virus

1. Microscopie à épifluorescence

Les solutions virales sont diluées dans du tampon TPV1 filtré. Plusieurs dilutions sont réalisées dans le but d'optimiser le comptage des virus ou plutôt des VLPs (« Virus Like Particles ») car en épifluorescence il est impossible de distinguer les virus d'acide nucléique double brin libre dans les suspensions virales ou encore d'autres éléments génétiques contenant de l'acide nucléique comme les vésicules membranaires. Un témoin est aussi réalisé avec du tampon TPV1 filtré. Les dilutions sont ensuite filtrées sur 0,45 μ m (membrane turffyn, filtres seringues, VWR) pour éliminer les restes cellulaires. Les dilutions préfiltrées sont déposées sur une colonne de filtration avec un filtre disque de 25 mm de diamètre et une porosité de 0,02 μ m afin de retenir les VLPs sur ce même filtre. Les filtres sont placés sur papier absorbant (Kimtech) dans une boîte avec du silicagel afin de les sécher. À l'obscurité, 100 μ l de SYBR Green I (10X) sont déposés dans des boîtes de Pétri stériles puis les filtres sont déposés dessus en laissant la face comportant les VLPs vers le haut. Les filtres sont incubés à l'obscurité 15 min à température ambiante. Le SYBR Green I colore les acides nucléiques (ADN double brin) et fluoresce vert sous UV (excitation à 497 nm et émission à 520 nm). Les filtres sont séchés avec du papier Whatman. Sur des lames, 15 μ l d'« antifading » (*p*-phenylenediamine (10 %), Sigma-Aldrich) sont déposés, les filtres sont placés sur les lames puis recouvert de nouveau de 15 μ l d'« antifading ». L'« antifading » permet d'éviter le « bleaching » (perte d'intensité du signal due à des expositions trop longues à certaines

Matériels et Méthodes

longueurs d'ondes) pendant les observations. Les filtres sont recouverts d'une lamelle et observés au microscope à épifluorescence (Olympus BX60), filtre WIB, à l'objectif *60 et *100 (ajout d'une goutte d'huile à immersion). Le comptage des VLPs se fait à l'aide d'un oculaire qui est muni d'un quadrillage. La concentration en VLPs (en VLPs/ml) de la solution virale est déterminée à l'aide du calcul suivant (Noble and Fuhrman 1998, Suttle and Fuhrman 2010) :

$$[VLPs] = \frac{N \times A \times D}{V}$$

Avec :

- N : Nombre moyen de VLPs par carré
- A : Surface du filtre / surface comptée (soit: $\frac{\pi \times R^2}{l^2} = \frac{\pi \times 12.5^2}{0.05^2}$)
- D : Dilution utilisée
- V : Volume fraction

2. Cytométrie en flux

Les abondances archéennes et virales sont analysées en cytométrie en flux avec le cytomètre FACS Canto II (BD Bioscience) équipé d'un laser avec une longueur d'onde d'excitation de 488 nm (15 mW). Les échantillons ont été dilués 10 à 10 000 fois dans du tampon TE (10 :1 Tris-EDTA, pH 8,0) autoclavé et filtré sur 0,2 µm. Les acides nucléiques de chaque échantillon sont marqués avec un colorant spécifique, le SYBR Green I (Invitrogen-Molecular Probes). Cette étape nécessite une incubation de 15 min à température ambiante pour les cellules ou 10 min à 80 °C pour les virus. La cible du laser est la fluorescence verte. L'échantillon passe devant le laser à un débit de 50 µl/min et est analysé pendant au moins 1 min. Le tampon TE cité précédemment est utilisé comme contrôle négatif.

III. Techniques de biologie moléculaire

A. Extractions d'acide nucléiques (hôte, virus et plasmide)

1. Extraction d'ADN total

Les extractions d'ADN total sont effectuées sur des volumes de culture de 20-25 ml ou des échantillons de cultures de 2 ml, 5 ml ou 10 ml.

Les cultures sont tout d'abord centrifugées 20 min à 7500 g à 4 °C. Les surnageants sont éliminés et les culots repris dans 700 µl de TNE. Après transfert en tubes de 2 ml stériles, 2 µl de RNase (50 mg/ml) sont ajoutés et les tubes sont laissés à incuber 15 min à température ambiante. 100 µl de SDS (10 %) et 100 µl de sarkozyl (10 %) sont ensuite ajoutés, les tubes sont homogénéisés et incubés 15 min à température ambiante. Après ajout de 50 µl de protéinase K (20 mg/ml), les tubes sont placés 1 h à 55 °C. Un volume (1 ml) de Phénol-Chloroforme-Alcool Isoamylique (PCI) est ajouté et les tubes sont ensuite agités vigoureusement à la main pendant 45 s. Une émulsion jaune doit se former. Les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse (phase supérieure) est récupérée. 1 volume de PCI est de nouveau ajouté, les tubes sont agités vigoureusement à la main pendant 45 s. Les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 15 min à 4 °C. La phase aqueuse (phase supérieure) est prélevée, 1 volume de chloroforme est ajouté et les tubes sont agités vigoureusement pendant 45 s. Les tubes sont alors centrifugés à 14 000 g pendant 5 min à 4 °C et la phase aqueuse est encore une fois récupérée et 700 µl d'isopropanol y sont ajoutés. Après 10-15 min à température ambiante, les tubes sont placés à -20 °C pendant 1 à 2 h. Puis les tubes sont centrifugés 20 min à 14 000 g à 4 °C. Le culot d'ADN doit être visible au fond du tube. Le surnageant est éliminé délicatement. Le culot est lavé avec de l'éthanol à 75 % puis les tubes sont centrifugés à 14 000 g pendant 20 min à 4 °C. L'éthanol est éliminé et le culot est laissé à sécher à l'air pendant 1 h au minimum. Enfin, le culot est repris dans 80 µl d'eau milliQ et sont ensuite laissés 1 h à température ambiante puis placés une nuit à 4 °C.

2. Extraction d'ADN viral

Les extractions d'ADN viral sont réalisées à partir de solution virale purifiée.

La solution virale purifiée est traitée avec de la DNase I (concentration finale de 50 µg/ml), du MgCl₂ (concentration finale de 10 mM) et de la RNase A (concentration finale de 100 µg/ml) pendant 1 h à 37 °C. La DNase I est ensuite inactivée pendant 10 min à 70 °C. De la protéinase K (concentration finale 200 µg/ml) et du SDS 1 % final sont ajoutés et la préparation est incubée 1 h à 56 °C. Un volume de PCI (25/24/1) est ensuite ajouté. La préparation est agitée vigoureusement à la main puis centrifugée à 14000 g 10 min à 4 °C. La phase supérieure est récupérée délicatement. Un volume de chloroforme est ajouté. La préparation est agitée vigoureusement à la main puis, de nouveau, centrifugée à 14000 g 10 min à 20 °C. La phase supérieure est encore une fois récupérée délicatement. De l'acétate de Sodium pH 5,3 (3 M) (1/10^{ème} du volume) est ajouté à la préparation ainsi que 0,8 volume d'isopropanol. La préparation est mélangée en renversant plusieurs fois le tube. La préparation est laissée à incuber 15 min à température ambiante puis elle est centrifugée à 14000 g 20 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé. Le culot est lavé avec 100 µl d'éthanol 75 % puis centrifugé à 14000 g 15 min à 4 °C. Le surnageant est éliminé. Le culot est séché au Speed-Vac (DNA Speed Vac – DNA 120 (Savant)) et repris dans 20 µl de tampon TPV1. Une fois le culot dissout (15 min à température ambiante), la préparation d'ADN viral est conservée à 4 °C.

3. Extraction d'ADNccc

Les extractions d'ADNccc ou « covalently closed circular DNA » ont été réalisées selon une méthode de lyse alcaline classique (Bimboim and Doly 1979, Geslin *et al* 2003a). L'ADNccc en est conservé à -20 °C.

B. Réactions d'amplifications par PCR et QPCR

1. Réactions d'amplifications par PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

La PCR a pour but d'amplifier une région d'ADN d'intérêt dans les échantillons d'acides nucléiques. Pour cela, différents couples d'amorces, déterminés à l'aide du logiciel « primer 3 » (<http://primer3.ut.ee/>), sont utilisés dans ces travaux de thèse (Tableau 3).

Tableau 3 : Liste des couples d'amorces utilisés dans ces travaux de thèse pour les réactions de PCR.

Amorce	Séquence (5'-3')	Cible	Tm (°C)	Taille du produit
MCP Fer F	CGCAAAATTAACAAGACCGA	Protéine majeure de la capsid (MCP)	56	519 pb
MCP Fer R	CCACTCAATACAATTACCGC	Protéine majeure de la capsid (MCP)	58	
TMP Fer F	AACTGCATACATGGGGATTT	Protéine majeure de la queue (TMP)	56	536 pb
TMP Fer R	ATCCCATCTGTCTTGCCATTT	Protéine majeure de la queue (TMP)	56	
Pro Fer F	GAATGATGACCTGCACATG	Protéine hypothétique du prophage	58	167 pb
Pro Fer R	GGGGTTGTATGTGTGGTATT	Protéine hypothétique du prophage	56	
ProtHypPlas Fer F	TGGCTCATACTTGCTGAAT	Protéine hypothétique du plasmide	58	599 pb
ProtHypPlas Fer R	TTGGAGAAATGGGAATCAGG	Protéine hypothétique du plasmide	60	
Arc8F	TCCGGTTGATCCTGCC	ADNr 16S	57	900 pb
1492R	GGCTACCTTGTTACGACTT	ADNr 16S	57	

Pour la réalisation de la PCR, la composition du mélange réactionnel pour un volume final de 50 µL est donnée dans le Tableau 4. Le programme du thermocycleur est donné dans le Tableau 5.

Tableau 4 : Mélange réactionnel utilisé pour les réactions de PCR.

Produits	Concentration
Amorce Forward	0,4 µM
Amorce Reverse	0,4 µM
Tampon	5 X
dNTPs	0,8 mM
Taq Polymérase	0,024 U
Ajout d'1 µl d'ADN matrice au mélange réactionnel	
Ajuster à 50 µl avec de l'eau stérile	

Matériels et Méthodes

Tableau 5 : Programme utilisé pour les réactions de PCR.

Température	Temps
94 °C	2 min
94 °C	1 min
56 °C	30 s
72 °C	1 min 30
72 °C	7 min
4 °C	Température finale
Le thermocycleur est réglé de cette manière pour 30 cycles	

2. Essais d'infection suivis en PCR quantitative avec la technologie SYBR Green

L'infectiosité des virus étudiés dans ces travaux de thèse a été testée sur différentes souches qui seront énumérées dans chacun des chapitres. Pour cela, des suivis de l'évolution de gènes caractéristiques ont été réalisés en Q-PCR au cours de cinétiques où des solutions virales concentrées et des hôtes potentiels ont été mis en contact. Pour cela les couples d'amorces listées dans le Tableau 6 ont été utilisés. Ces couples ont été déterminés à l'aide du logiciel "primer 3" (<http://primer3.ut.ee/>). Des cinétiques de croissance des hôtes potentiels non infectés ont servi de contrôle négatif lors de ces expériences. Le déroulement précis de la cinétique est détaillé pour chacun des chapitres.

Tableau 6 : Liste des couples d'amorces utilisés dans ces travaux de thèse pour les réactions de Q-PCR.

Amorce	Séquence (5'-3')	Cible	Tm (°C)	Taille du produit
Mcc495F	TAAGGGCTGGGCAAGT	Groupe des Methanococcales	61	186 pb
McocR	GGATCAACACATTTCAACGC	Groupe des Methanococcales	61	
MCP F	TGCTGCTACGCCGAAAGATA	Protéine majeure de la capsid (MCP)	60	239 pb
MCP R	ACACAACTGTAGGGTCTGCA	Protéine majeure de la capsid (MCP)	60	
Plas F	TAAGCTCGGCCTAAACCACA	Protéine hypothétique du plasmide	59	183 pb
Plas R	AACGGTTGGAGGAGGAAAGA	Protéine hypothétique du plasmide	59	
P025 F	GGCTGCAAAGTGGCTAAGAC	Protéine majeure de la capsid (MCP)	60	239 pb
P025 R	AGGCGATCATGACCAGAGAC	Protéine majeure de la capsid (MCP)	60	

Des échantillons prélevés pendant les cinétiques d'infectiosité ont fait l'objet d'extraction d'ADN total comme décrit p. 142. La concentration en ADN de chaque échantillon a été déterminée à l'aide du kit de quantification par marquage au PicoGreen (Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit). Une fois la concentration déterminée, chaque échantillon a été dilué pour être ajusté à une concentration finale de 0,2 ng/μl. Les réactions d'amplification en

Matériels et Méthodes

temps réel ont été réalisées en utilisant le SYBR Green ROX MIX et l'appareil Step-One Plus instrument (Applied Biosystems). Les réactions de Q-PCR ont été réalisées dans un volume de mélange réactionnel de 25 µl contenant 1 ng d'ADN matrice (5 µl d'ADN matrice de chaque échantillon). Pour la réalisation de la Q-PCR, la composition du mélange réactionnel pour un volume final de 25 µL est donnée dans le Tableau 7. Le programme utilisé pour les réactions de Q-PCR est donné dans le Tableau 8.

Tableau 7 : Mélange réactionnel utilisé pour les réactions de Q-PCR.

Produits	Concentration
SYBR Green ROX MIX 2X	1 X
Amorce archée F 100 µM	700 nM
Amorce archée R 100 µM	700 nM
OU (en fonction du gène ciblé)	
Amorce virus F 100 µM	500 nM
Amorce virus R 100 µM	500 nM
Ajout de 5 µl d'ADN matrice au mélange réactionnel	
Ajuster à 25 µl avec de l'eau stérile	

Tableau 8 : Programme utilisé pour les réactions de Q-PCR.

Température	Temps / nombre de cycles
95 °C	10 min / 1 cycle
95 °C	15 s / 40 cycle
60 °C	1 min / 40 cycle

Finalement, le nombre de copies de gène par ml pour chaque cible a été déterminé à l'aide du calcul suivant (Vigneron 2012) :

$$\text{Nombre de copie de gène par ml} = \frac{(\text{Nombre d'Avogadro} \times [\text{ADN gène (g/l)}])}{(\text{Masse molaire de l'ADNdb} \times (\frac{\text{taille genome (pb)}}{\text{nombre de copie de gène par génome}}))}$$

La quantité d'ADN de chaque échantillon a été déterminée par comparaison avec la gamme étalon standard construite à partir d'ADN génomique. Chaque point de la gamme standard a une quantité connue d'ADN. Les gammes standards ont montré des efficacités entre 90 % et 110 % et un R² supérieur à 0,99 ce qui indique une bonne efficacité de la réaction d'amplification.

Chapitre I

Caractérisation de MFV1, premier virus tête-queue hyperthermophile, isolé d'une méthanogène hydrothermale

- I. Présentation générale des travaux
- II. The first head and tail virus, MFV1, produced by a hyperthermophilic deep sea methanogen

I. Présentation générale des travaux

MFV1 (*Methanocaldococcus fervens* virus 1) est le premier virus tête-queue hyperthermophile isolé et décrit. Son hôte, *Methanocaldococcus fervens*, est une méthanogène hyperthermophile (température optimale de croissance de 85 °C) isolée de sédiments (30 premier centimètres) près d'une cheminée hydrothermale océanique située dans le bassin de Guaymas dans le Golfe de Californie à une profondeur de 2003 m (Zhao *et al* 1988). MFV1 est un siphovirus dont les virions ont une taille de 200 nm et sont composés d'une tête icosaédrique d'environ 50 nm et d'une queue flexible non contractile d'environ 150 nm de long.

Suite à de nombreux essais d'induction avec des agents de stress physiques (UV, variation de température de croissance) et chimiques (chloramphénicol, mitomycine C, métaux lourds, bromoéthane sulfonate) ou encore physiologiques (carence en H₂), MFV1 s'est révélé être non inductible. Cependant, il est produit par son hôte en grande quantité tout au long de sa croissance (3,5.10⁸ virions par ml) sans lyse de celui-ci. Si aucune induction n'a pu être obtenue, une certaine stimulation de la production virale a été observée dans des cas de variations de températures de culture. La concentration maximale de virions a ainsi pu être obtenue plus rapidement sans pour autant dépasser celle obtenue en conditions optimales de culture, ni engendrer la lyse de l'hôte. La relation de lysogénie existant entre MFV1 et son hôte ne correspond pas à ce qui est classiquement décrit dans la littérature. Il semble qu'une partie de la population cellulaire maintient le génome viral sous forme de provirus intégré, lui assurant une certaine stabilité. Une autre partie de la population produit des virions qui ont le rôle de virions explorateurs qui vont se propager dans le but d'infecter de nouveaux hôtes. Cette relation laisse suggérer une coévolution mutualiste entre MFV1 et son hôte.

Le génome viral de MFV1, un ADN double brin de 31 kb, est identique au provirus intégré au chromosome de son hôte. Il est composé de 44 ORFs dont 27 trouvent des homologies de séquences dans les bases de données. MFV1 possède un panel d'ORFs typiques des virus tête-queue. Il possède également des identités de séquence avec des halovirus, ainsi qu'avec le virus tête-queue NrS-1, un bactériophage abyssal. Certains ORFs montrent des implications dans la lysogénie ainsi que dans des fonctions de maintenance de l'intégrité du génome viral essentielles à hautes températures pour éviter la thermodégradation. Ces ORFs sont

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

notamment importants au vu de la relation de lysogénie particulière qui existe entre MFV1 et son hôte. Plus généralement, plusieurs ORFs trouvent des homologies avec des fonctions retrouvées chez des archées, bactéries et des eucaryotes ce qui montre bien le rôle clé des virus dans l'évolution *via* les transferts horizontaux de gènes.

La capacité de MFV1 à rester infectieux en conditions hyperthermophiles a été démontrée, à l'aide la technique de la QPCR, sur des souches de *Methanocaldococcus sp.* phylogénétiquement proches de *Methanocaldococcus jannaschii* isolées de sources hydrothermales océaniques profondes. Par ailleurs, *M. fervens* porte le plasmide pMEFER01 de 22,1 kb qui est transmis aux mêmes souches de *Methanocaldococcus* via les capsides de MFV1. *M. fervens* et ces souches proviennent de sites relativement proches dans l'océan Pacifique. Ces phénomènes d'infection et de transfert de plasmide pourraient donc se produire dans le milieu naturel.

Ces travaux seront très prochainement soumis à la revue ISME (« International Society of Microbial Ecology »).

The first head and tail virus, MFV1, produced by a hyperthermophilic deep sea methanogen

Sarah Thiroux¹, Samuel Dupont¹, Camilla L. Nesbo^{2,3}, Nadège Bienvenu¹, Mart Krupovic⁴, Stéphane L'Haridon¹, Dominique Marie⁵, Patrick Forterre^{6,7}, Anne Godfroy¹ and Claire Geslin¹

1. Univ Brest, CNRS, IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, F-29280 Plouzané, France

2. CEES, Department of Biology, University of Oslo, 0316, Oslo, Norway 11

3. Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, AB, T6G2R3, 12 Canada

4. Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrêmophiles (BMGE), Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, France

5. Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06, INSU-CNRS, UMR 7144, Station Biologique de Roscoff, 29680 Roscoff, France

6. Université Paris-Saclay, Institut de biologie intégrative de la cellule, Laboratoire de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrêmophiles (LBMGE), UMR8621/CNRS, 91405 Orsay Cedex, France

7. Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrêmophiles (BMGE), Département de Microbiologie, Institut Pasteur, Paris, France

Corresponding author: claire.geslin@univ-brest.fr

[Univ Brest, CNRS, IFREMER, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, F-29280 Plouzané, France](#)

Tel. +33 (0)2 98 49 88 58 ; Fax : +33 (0)2 98 49 87 05

Running title: Virus of a hyperthermophilic methanogen

Abstract

Despite the importance of viruses in the diversity, adaptation and evolution of microbial communities, the virosphere of extreme ecosystems, such as deep sea hydrothermal vents, remains poorly characterized. To date, only eight bacterial viruses and two archaeal viruses, isolated from deep sea hydrothermal vents have been described. In this context, our efforts focused on gain insight into the viral interaction with deep-sea autotrophic archaeal component. Only a few viruses infecting methanogens have been discovered and none of them from abyssal ecosystems. With the description of MFV1 (*Methanocaldococcus fervens* virus 1), we provide the first evidence of an infection of a hyperthermophilic archaea by a head-tailed virion. MFV1 is a siphovirus with a size of 200 nm in length. Virions are released continuously during host growth, in high quantity (3.49×10^8), without a sudden host lysis. The infectivity of MFV1 was demonstrated on *Methanocaldococcus* species. The viral genome is a double stranded linear DNA of 31 kb. Significantly, MFV1 virions package not only the viral DNA but also a plasmid of 22.1 kb (pMEFER01) carried by *M. fervens*. Our results open a new window on the understanding of the abyssal mobilome.

Key words: Viruses, Archaea, Hyperthermophile, Methanogen, Deep sea hydrothermal vents

Introduction

Deep-sea hydrothermal environments were described as extreme habitats but also as “oasis of life” (Flores and Reysenbach 2011, Marteinsson *et al* 1997, Prieur 1997). These ecosystems are characterized by steep physicochemical and temperature gradients, high hydrostatic pressures and darkness. Some of these parameters can change quickly on both time and spatial scale (Flores and Reysenbach 2011). These ecosystems are home to eukaryotes and a vast diversity of *Bacteria* and *Archaea* which harbor a large panel of mobile genetics elements such as viruses, plasmids, and membrane vesicles (Gaudin *et al* 2013, Gaudin *et al* 2014, Geslin *et al* 2003, Gorlas *et al* 2012, Gorlas *et al* 2015, Lossouarn *et al* 2015a, Marguet *et al* 2013, Soler *et al* 2011). In 2015, some of us published a review on the abyssal mobilome concluding that *Bacteria* and *Archaea* inhabiting deep-sea hydrothermal vents could be driven by mobile genetic elements involving in DNA exchanges (Lossouarn *et al* 2015a).

Most archaeal viruses have been thus far isolated from hyperthermophilic or extreme halophilic terrestrial hosts belonging to the *phyla* *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota*, respectively (Krupovic *et al* 2018). To date, only two viruses, PAV1 and TPV1, have been isolated and described from *archaea* living in deep-sea hydrothermal vents, both infecting hyperthermophilic *Euryarchaeota* of the order *Thermococcales* (Geslin *et al* 2003, Geslin *et al* 2007, Gorlas *et al* 2012). PAV1 and TPV1 are lemon shaped virions isolated from *Pyrococcus abyssi* and *Thermococcus prieurii*, respectively. Viruses isolated from hyperthermophilic archaea, present morphologies more diverse than their mesophilic counterparts. This diversity extends to the genes they encode, with a majority of genes without or only few homologs in public databases (Krupovic *et al* 2018). No head-tail viruses infecting hyperthermophilic *archaea* have been isolated and described. Only, suspicion of head-tail virus like particles have been noted in terrestrial hydrothermal environments from Yellowstone National Park samples (Rachel *et al* 2002).

To date, four head-tail viruses were isolated from thermophilic methanogens isolated from fermenting sludges, and one spherical virus was isolated from a mesophilic methanogen. **ψM1**, a virulent siphovirus, and its mutant **ψM2** were both isolated from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg strain (Meile *et al* 1989, Pfister *et al* 1998). **ΦF1** and **ΦF3** were two virulent caudoviruses capable of infecting different thermophilic members of the genus

Methanobacterium. In addition, **MetSV**, a virulent spherical virus, was isolated from the mesophilic methanogen *Methanosarcina mazei* Gö1 colonizing anaerobic sludge digester (Weidenbach *et al* 2017). Methanogens are major components and key drivers of microbial carbon cycling in deep-sea hydrothermal vents. They play an important role in the global carbon cycle by the production of methane. In the *Euryarchaeota* phylum, to date 10 species of hyperthermophilic methanogens were classified into 4 genera, *Methanocaldococcus*, *Methanopyrus*, *Methanotorrus* and *Methanothermococcus* (Huber *et al* 1982, L'Haridon *et al* 2003, Takai *et al* 2004). All strains classified into the genus *Methanocaldococcus* have been isolated and described from deep-sea environments such as hydrothermally heated sediments (Zhao *et al* 1988) or hydrothermal chimneys (Bellack *et al* 2011, Jeanthon *et al* 1998, Jeanthon *et al* 1999, Jones *et al* 1983, L'Haridon *et al* 2003).

The presence of clustered, regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) systems has been reported in the genomes of several marine hyperthermophilic methanogens indicating that these species have been or are subject to viral infections (Anderson *et al* 2011). The CRISPR system is an antiviral immunity mechanism that integrates small DNA sequences of virus and/or plasmids into the genome of their hosts (Horvath and Barrangou 2010). They are an indicator of recent or ancestral viral infections.

Moreover, proviruses were identified in the genomes of hyperthermophilic deep sea *Methanocaldococcus* species: *M. jannaschii* DSM2661 (Mjan-Pro1, NC_000909), *M. vulcanius* M7 (Mvul-Pro1, NC_013407) and *M. fervens* AG86 (Mfer-Pro1, NC_013156). The genome size of these proviruses ranges from 30.16 kb to 31.26 kb and gene analysis suggest that these viruses have head-tail morphologies (Krupovic *et al* 2010).

However, prior to this study, no virus infecting hyperthermophilic methanogens have been isolated. The newly discovered virus, MFV1, described here infects *Methanocaldococcus fervens* AG 86. The virions-producing strain was isolated from a 30 cm top layer of deep-sea sediment close to a hydrothermal vent in Guaymas basin, Gulf of California, at a depth of 2000 m (Zhao *et al* 1988). MFV1 is a non-inducible siphovirus with a high basal viral production ($\sim 3.5 \times 10^8$ virions/ml). Its dsDNA genome of 31 kb is identical to the provirus integrated in *M. fervens* AG86. We demonstrate its infectivity, and MFV1 infects phylogenetically related strains of *Methanocaldococcus* which are hyperthermophilic methanogens isolated from deep-sea hydrothermal vents.

Additionally, we discovered interactions between MFV1 and a second mobile genetic element, the plasmid pMEFER01, also carried by *M. fervens*. Thus, the hyperthermophilic methanogen is the home of a phenomenon of molecular piracy where the plasmid uses the MFV1 capsid to propagate. These studies reveal close interactions within a mobilome exposed to extreme conditions.

Experimental procedures

Culture condition

Culturing of *Methanocaldococcales* was performed in modified DSM141 medium containing NaCl (20 g.l⁻¹), MgCl₂.6H₂O (4 g.l⁻¹), MgSO₄.7H₂O (3.45 g.l⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0.14 g.l⁻¹), NH₄Cl (0.25 g.l⁻¹), KCl (0.34 g.l⁻¹), K₂HPO₄ (0.14 g.l⁻¹), NaHCO₃ (1 g.l⁻¹), Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.7H₂O (2 mg.l⁻¹), resazurin (1 mg.l⁻¹) and cysteine-HCl (0.5 g.l⁻¹). The pH was adjusted at 6.5 using 3 M HCl. After autoclaving the medium was reduced by addition of Na₂S.9H₂O at a final concentration of 0.05 % w/v. Supplementary solutions were added to the medium; for 1 l : 1 ml of element traces mixture (Widdel and Bak 1992), 1 ml of vitamins mixture (Widdel and Bak 1992), 1 ml of selenite tungstate solution (10 mM NaOH, 0.02 mM Na₂SeO₃.5H₂O and 0.02 mM Na₂WO₄.2H₂O). The gas phase was replaced by a mixture of H₂/CO₂ (80:20; 1.7 bar) and then the pH was adjusted at 6.5 by adding carbonate buffer (0.08 % w/v final concentration of Na₂CO₃). Cultures were incubated with shaking (100 rpm) at 80-85 °C according to their *optima* of growth in bottle of 1l with 250ml of medium or in bottle of 125 ml with 25 ml of medium.

Concentration and purification of virions

1 l of culture of *M. fervens* was stopped in the last part of log-phase of growth. A first centrifugation at 7500 g (20 min, 4 °C) was performed in order to eliminate cells and debris. Supernatants were ultracentrifuged at 110,000 g during 1 h at 10 °C (Beckman Optima LE-80 K, 70.1 ti rotor). Viral pellets were resuspended in 1-2 ml of buffer (10 ml Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM CaCl₂.5H₂O and 20 mM MgCl₂, pH 8) in order to obtain a concentrated solution of viral particles. In some cases, the viral suspension was purified by ultracentrifugation in a linear iodixanol gradient [OptiPrep, 15–45 % diluted in a buffer (see above)] at 285 000 g and 10 °C for 16 h (Beckman Optima LE-80 K SW 41 ti rotor). Following ultracentrifugation, the

opaque virus band was recovered and stored at 4 °C until use. These steps occur under aerobic conditions. In other cases, to maximize the viral quantity, the purification step was not carried out. Instead, the concentrated viruses were exposed to oxygen at high temperature (80 °C) to inactivate the metabolism of the remaining cells and kill them. Moreover, to exclude the possibility of cellular nucleic acids contamination, the concentrated virions suspensions were treated with benzonase, at a final concentration of 1 U per μl , to destroy all forms of free DNA. Viral suspensions (purified or concentrated) were stained with 2 % (wt/vol) uranyl acetate and observed using a JEOL JEM 100 CX II transmission electron microscope as previously described (Geslin *et al* 2003, Gorlas *et al* 2012).

Extraction of chromosomal, viral and plasmid DNA

16S rRNA of the strains used in this study (FS 438-32; PH24A, PH24B and PH3) were compared with sequences available on NCBI database. They share more than 99 % of similarities with *Methanocaldococcus bathoardescens* JH146 and *Methanocaldococcus jannaschii* DSM2661. They are considered as *Methanocaldococcus* strains (Table 1).

Table 1: List of *Methanococcales* strains used in this study

Strain	Origin	Growth temperature	Oceanographic cruise	Ref.
<i>Methanocaldococcus fervens</i> AG86	Guaymas Basin	80-85 °C	-	Zhao et al 1988
<i>Methanocaldococcus sp.</i> FS 438-32	Juan de Fuca 45 °N	80-85 °C	-	This study
<i>Methanocaldococcus sp.</i> PH24 A	East Pacific Ridge 13 °N	80-85 °C	Phare	This study
<i>Methanocaldococcus sp.</i> PH24 B	East Pacific Ridge 13 °N	80-85 °C	Phare	This study
<i>Methanocaldococcus sp.</i> PH3	East Pacific Ridge 13 °N	80-85 °C	Phare	This study

Before DNA extraction, viral fractions were treated with DNase (Promega, mixture of endo- and exo-nuclease at a final concentration of 50 $\mu\text{g.l}^{-1}$) and RNase (Promega, 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) to avoid extracellular DNA contaminations, followed by DNase inhibition at 75 °C for 10 min. Benzonase, at a final concentration of 1 U per μl , was also used to destroy all forms of free DNA.

Total DNA from *Methanococcales* strains listed in Table 1 was prepared as previously described (Geslin *et al* 2003, Gorlas *et al* 2012). Viral DNA from concentrated or purified MFV1

virions was prepared as previously described (Geslin *et al* 2003, Gorlas *et al* 2012). Plasmid DNA was extracted from cells by alkaline lysis method (Bimboim and Doly 1979). To confirm the nature of the DNA packaged in the viral capsids and to check potential chromosomal contamination, PCR amplifications were performed using primer sets for 16S rDNA gene (*M. fervens* chromosomal DNA marker), major capsid protein encoding gene (*mcp* code gene, provirus and virus marker) and hypothetical protein encoding gene (*hypothetical protein* code gene, pMEFER01 plasmid marker). The primers and PCR protocol are described in supporting information.

Viral titration by epifluorescence microscopy

Viral particles were titrated using epifluorescence microscopy. Viral fraction was first filtered through a 0.45 µm pore size filter (membrane turffyn, syringe filter, VWR) and then collected on a 0.02 µm pore size filter (Whatman, Anodisc 25). After a staining with Sybr Green I (10 X), viral particles were counted under an Olympus microscope BX60 (WIB filter) according to Noble and Fuhrman (Noble and Fuhrman 1998).

Flow cytometry counts of archaea and virions

Archaeal and viral abundances were monitored by flow cytometry using a FACS Canto II flow cytometer (BD Bioscience) equipped with a laser with an excitation wave-length of 488 nm (15 mW). Samples were fixed with glutaraldehyde (0.5 % final concentration, electron microscopy grade). The thawed samples were diluted from 100- to 10,000-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 archaea and viruses respectively. The trigger was set on green fluorescence. The sample was delivered at a rate of 50 µl.min⁻¹ and analyzed during at least 1 min. Tris-EDTA (TE)-buffer with autoclaved 0.22 µm filtered seawater was used as a negative control.

Viral induction assays

Attempts were made to increase the viral production using different treatments as physiological stresses (variation of the growth temperature, metabolic limitation: H₂ deficiency; physical (ultraviolet exposure) or chemical stresses (antibiotics exposure: chloramphenicol (10 µg/ml) and mitomycin C (4 µg/ml); metals exposure: copper and

cadmium (0,1 mM, 0,05 mM and 0,025 mM); bromoethane sulfonate exposure (1 mM) (as an inhibitor of the methanogenesis). All stresses were applied on cultures of *M. fervens* at the beginning of the log growth phase. For temperature assays, variation of growth temperatures (4 °C, room temperature, 75 °C and 90 °C) were applied for 30 min, 1 h or 2 h. Then the cultures were moved to optimal growth temperature at 80 °C with shaking for 24 h. In parallel, control cultures were conducted at 80 °C with shaking. Detailed information on the other stress treatments are given in the supporting data.

The different induction conditions were compared based on the number of virions released. All viral counts were performed by epifluorescence microscopy and flow cytometry (see above).

Infection assays monitored by Q PCR

The infectivity of MFV1 was evaluated on a pool of 4 strains of *Methanocaldococcus*, listed in Table 1, that had no evidence of prior viral production nor harbor any provirus in their genomes. The use of a pool of strains enhances the probability of infection of one of these them, at one time. MFV1, at a final concentration of 5×10^8 virions per ml (estimated by epifluorescence microscopy), were incubated in the DSM141 modified medium at 80 °C. After 10 hours of incubation of the virions at high temperature, a pool of *Methanocaldococcus* cells (4 strains) was inoculated at a final concentration of 5×10^6 cells per ml.

A culture of the pool of non-infected *Methanocaldococcus* strains was used as negative control, and a culture of *M. fervens* producing MFV1 virions was used as positive control. For these controls, cells were inoculated at the beginning of the experiment (0 h).

Total DNAs were extracted, as previously described, from 10 ml samples collected at different times of the experiment: 0 h, 10 h, 15 h and 36 h for all the conditions tested (infection conditions and positive and negative controls). The DNA concentration from each sample was determined by Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit and diluted to a final concentration of 0.2 ng/μl. Real-time PCR amplifications were performed using SYBR Green ROX MIX with the Step-One Plus Instrument (Applied Biosystems). The QPCR reactions were performed in a volume of 25 μl containing 1ng template (5 μl of DNA samples). The thermal cycling protocol was as follows: 10 min at 95 °C then 40 cycles of 15 sec at 95 °C, 1 min at 60 °C and 10 sec at 72 °C. Primers sets target: MCP (Major Capsid Protein) gene of MFV1, a hypothetical gene of

the plasmid pMEFER01 and 16S rDNA of *Methanococcales*. The primers and PCR protocol are described in supporting information. The copy number of each target gene was obtained from cultures of *M. fervens* and from infected and non-infected cultures of *Methanocaldococcus strains*. The following formula was used (Vigneron 2012):

$$\begin{aligned} & \text{Copy number of gene per ml} \\ &= \frac{(\text{Avogadro number} \times [\text{ADN gene (g/l)}])}{(\text{Molar mass of dbDNA} \times (\frac{\text{genome size (pb)}}{\text{copy number of gene per genome}}))} \end{aligned}$$

The quantity of DNA for each sample was determined by comparison with standard curve constructed with genomic DNA (each plot of the standard curve had a known quantity of DNA). The standard curves (for viral and chromosomal fragments) showed effectivity between 90 % and 110 % and a R² superior to 0.99 indicating high effectiveness of PCR.

Sequencing and assembly of MFV1 genome

DNA extracted from purified MFV1 was sequenced at The Applied Genomics Core (<http://tagc.med.ualberta.ca/>) using the Nextera kit on an Illumina MiSeq (Bentley *et al* 2008) as 1/8 of a run. The sequences were assembled in CLC Genomics Workbench version 7.0.1 using default trimming option, word and bubble size. One contig of 31,202 bp with very high coverage (3800 fold) was identified as the virus genome.

Results

Virions isolation and purification

Culture supernatants of more than 50 hyperthermophilic methanogens strains were screened by epifluorescence microscopy. These strains, comprising reference strains and strains from our laboratory culture collection, were isolated from deep-sea hydrothermal vents on the East Pacific Rise (EPR 9 °N and 13 °N and Guaymas basin) and Mid Atlantic Ridge. Cultures scored positive were checked for the presence of virions by transmission electron microscopy. In this way, the virus MFV1 was isolated from *Methanocaldococcus fervens* AG 86. This virions' producing strain was isolated from a 30 cm top layer of deep-sea sediment close to a hydrothermal vent in Guaymas basin, Gulf of California, at a depth of 2003 m (Zhao *et al* 1988). The methanogenic strain was cultivated at 80-85 °C in the DSM141 medium depleted in iron to avoid virions adsorption and precipitation during the purification process. MFV1 had a density of 1.15 g/ml, as determined by a linear iodixanol density gradient used in the process of purification. It is worth noting that during the purification process and all subsequent experiments, virions can be exposed to oxygen and a wide range of temperatures from 4 °C to 80 °C.

Virions morphology

MFV1 is a head-tail virus, with a hexagonal head of 50 nm in diameter and a non-contractile and flexible tail of approximately 150 nm in length (Figure 1). These observations led to the classification of MFV1 in the *Siphoviridae* family from the order *Caudovirales*. Virions were obtained from cultures of *M. fervens* performed under anaerobic and hyperthermophilic conditions (80 °C). Most of the archaeal viruses isolated from hot environments display diverse and original morphotypes. Due to the lack of a description of hyperthermophilic viruses with tail-head morphology, this type of shape seems to be unsuitable for very high temperatures. Thus, MFV1 represents the first head-tailed virus observed in hyperthermophilic condition.

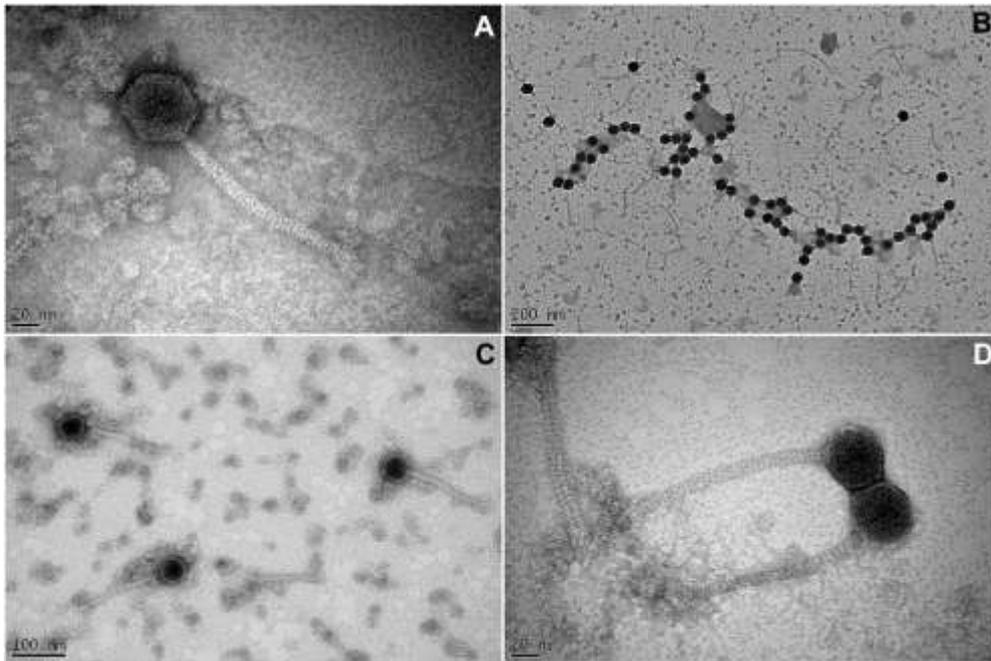


Figure 1: Electron micrographs of MFV1 particles negatively stained with 2 % uranyl acetate.

Virus host relationship and induction assays

Virions were produced throughout log growth phase and were spontaneously released in the medium. Cultures of *M. fervens*, with no addition of stressors, show a high basal production of virions after 6 hours of culture, until 3.49×10^8 virions per ml concomitant with 1.57×10^8 cells per ml. During growth of the infected host, there was not a decrease of cellular density, indicating that viral production was not accompanied by a sudden lysis of the host cells (Figure 2).

Viral induction assays

Attempts were made to increase the viral production by induction using different chemical or physical treatments and physiological stresses (exposure to chloramphenicol ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), mitomycin C ($10 \mu\text{g.ml}^{-1}$), bromoethane sulfonate (BES at 1 mM), metals (copper at $30 \mu\text{M}$), variations of growth temperature, ultraviolet exposure (30 min) and metabolic limitation (H_2 deficiency during 1 h and 2 h). Most of the stresses tested gave the same results: no induction of the viral production but a slight stimulation of this production when the stress is applied. The increase of the viral production is concomitant with cellular growth retardation.

For example, variations of growth temperature were tested on cultures during the log growth phase. Notably, when a cold stress (4 °C) was applied for 30 min, slight cellular growth retardation was observed (6.3×10^7 cells/ml after 2 h 30 min of culture; 7.8×10^7 cells/ml without stress). The viral production began almost immediately after cold stress, and reached about 3.53×10^8 virions per ml after 4 h 30 min of culture. Without stress, the maximal viral concentration reached 3.49×10^8 but later after 6 h 30 min of culture. Thus, under stresses, we did not observe a true viral induction; the maximum viral titer is not higher but reached earlier (Figure 2).

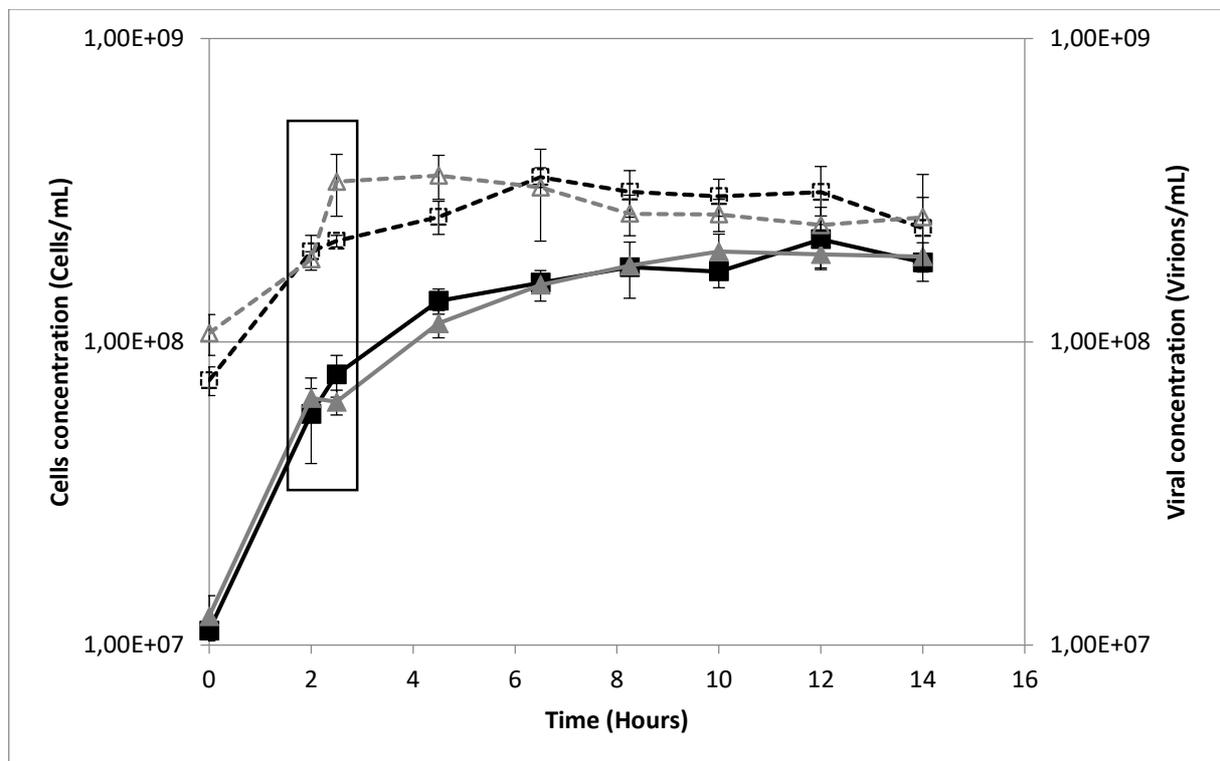


Figure 2: Virus-host kinetics monitored by flow cytometry. Typical growth curve of the host *M. fervens* is shown as filled squares on continuous black line. The production of MFV1 particles, reaching 3.49×10^8 virions per mL after 6 h 30 of culture, is shown as empty squares on dotted black line. The growth curve under stress condition of the host *M. fervens* is shown as filled triangles on continuous grey line. The production of MFV1 particles under stress condition, reaching 3.53×10^8 virions per mL after 4 h 30 of culture, is shown as empty triangles on dotted grey line. The moment of induction by a cold stress (4 °C during 30 min) is surrounding by a black frame.

In nature, interactions between viruses and their hosts can take multiple forms that cannot always be classified into the 3 main viral cycles too commonly considered (lytic, lysogenic, or chronic cycles). Under the influence of environmental factors, such as temperature variations, the infectious cycle may vary. Hydrothermal vents are known to be environment with fluctuating physicochemical conditions. To cope with an environment with so many potential stressors, viruses and hosts must probably adopt several strategies to survive. In non-extreme

marine habitats, it was observed for algae viruses that a minor change of the temperature (+1 °C) have an impact on viral infection strategy (switch from lytic cycle to carrier state) or even the development of resistance by algae against the viral infection (Demory *et al* 2017).

TPV1, an archaeal virus that infects *Thermococcus prieurii* and was isolated from a hydrothermal vent, does not present a classical lysogenic cycle (Gorlas *et al* 2012). TPV1 is present in the host cells as a provirus and a free extra-chromosomal DNA. A high basal level of the viral production was observed (2×10^8 virions/ml). This viral production can be induced by exposure to ultraviolet (10^{11} virions/ml), without causing sudden cell lysis.

In these particular cases, population of viruses and hosts likely do not have a single unique way to interact. The absence of visible host lysis correlated with a high viral production suggests spontaneous induction phenomenon. The excision of the provirus is not triggered by an external element such as a stressor (Howard-Varona *et al* 2017). A part of the microbial population is lysed and a part continues to grow to maintain the hosts' population.

We suggest that for MFV1 a fraction of the infected microbial population maintains the integrated viral genome within it, thus ensuring its stability, while another fraction produces virions that will have a role as "explorers" to ensure dispersion. In this configuration, a mutualist co-evolutionary relationship would have been established between the virus and its host.

We also investigated the effect of metals on viral production at different times after addition of metals. After 3 hours of exposure to 10 – 50 µM copper, cultures were less turbid than cultures non exposed, suggesting a cell lysis. After 24 hours of incubation, we observed a total lysis of cells exposed to 20-50 µM copper. These cultures were analyzed by TEM and Cryo-EM and showed an increase of the membrane vesicles (MVs) concentration (Figure 3). This result demonstrates that copper probably causes a stress for cells without induction of the viral production. During the annotation of *M. fervens* genome in RAST pipeline (<http://rast.nmpdr.org>), we observed that this strain possesses resistance or tolerance genes for cobalt, zinc, copper and cadmium.

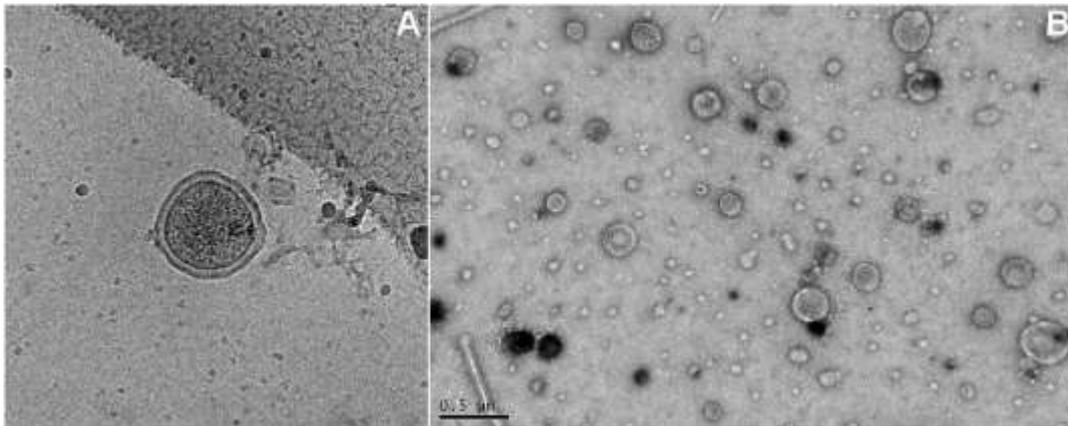


Figure 3: Electron micrographs of membrane vesicles produced by *M. fervens* exposed to copper. Cryo-EM (A) and TEM (B).

Infectivity of virions in hythermophilic condition

Host range

The infectivity of MFV1 was tested on a pool of 4 strains of *Methanocaldococcus spp.* which do not carry provirus nor produce virions (listed in Table 1). These potential hosts were selected based on their close phylogenetic position and the absence of provirus in their genomes. The host range of MFV1 was tested in liquid medium by adding purified virions at different concentrations (Virus/Cells ratio of 1, 5, 10, 30 and 100) in the early time of host growth phase. After 36 hours of cultures, a viral signal was detected by PCR in a culture of the pool of *Methanocaldococcus* strains, when the virus was added at a concentration 100 fold that of the cells concentration. This result indicates that MFV1 is able to infect those strains isolated in the Pacific from different sampling sites (Figure 4).

In order to confirm the infectivity of MFV1 against strains of *Methanocaldococcus*, an analysis of the kinetic of the infection was performed. After 10 hours of incubation of the MFV1 virions at high temperature (80 °C) in the DSM141 modified medium, the *Methanocaldococcus* cells (4 strains) were inoculated at 1×10^6 cells per ml. A culture of the pool of non-infected strains of *Methanocaldococcus* was used as negative control. A culture of *M. fervens* producing MFV1 virions was used as positive control. For these controls, cells were inoculated at the beginning of the experiment (0 h).

During all the experiment (36 h), *M. fervens* showed a stable copy number of the 16S rDNA gene (10^8 copies per mL), the viral gene MCP (Major Capsid Protein gene – 10^{10} copies per mL) and the plasmid gene (10^{10} copies per mL). As expected for the negative control, the pool of *Methanocaldococcus* strains expressed the 16S rDNA gene (10^8 to 10^9 copies per mL after 10 h of culture) but no expression for the MCP gene and the plasmid gene. After infection of the *Methanocaldococcus* strains, an increase in the copy number of the MCP was observed. The copy number of MCP was about 3.36×10^5 at 10 h of experiment (virions alone in hot medium) and reached 1.17×10^7 at 15 h of experiment (virions in presence of potential hosts cells for 5 h). After 36 h of experiment, the copy number of MCP remained higher than at 10 h of experiment with 4.07×10^6 copies per mL (Figure 4). This increase of MCP copies points out an infection of *Methanocaldococcus* strains with MFV1. Moreover, these in vitro experiments showed that MFV1 virions are stable in hyperthermophilic condition and keep their infectious potential at 80 °C.

Unexpectedly, a similar rise of the copy number of a hypothetical plasmid gene was observed when *Methanocaldococcus* strains were infected with MFV1 virions: 1.34×10^6 copies of the plasmid gene per ml at 10 h of experiment reaching $1,53.10^7$ copies per mL at 15 h of experiment and 6.64×10^6 copies per mL after 36 h of experiment. This gene is encoded by the plasmid pMEFER01 carried by *M. fervens* (Soler *et al* 2011). To investigate if this plasmid is carried by the virus particles, PCR amplification of a 599 bp fragment was performed on DNA extracted from viral suspension of MFV1 treated by benzonase (data not shown). Benzonase is used to destroy all forms of free DNA in the viral suspension. The observation of a plasmid band by PCR confirmed that the plasmid can be protected inside viral capsid.

These results suggest a potential survival strategy adopted by the plasmid pMEFER01 to maintain itself (Figure 4). The plasmid can be packaged in the viral capsids and can be propagated in the environment when the virions are released by the cells. Then, the plasmid can be transferred to new cells by a type of transduction. The plasmid size (22.1 kb) does not permit the packaging of multiple copies in MFV1 capsids, however we did not observe smaller capsids that are likely to contain a single copy of pMEFER01.

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

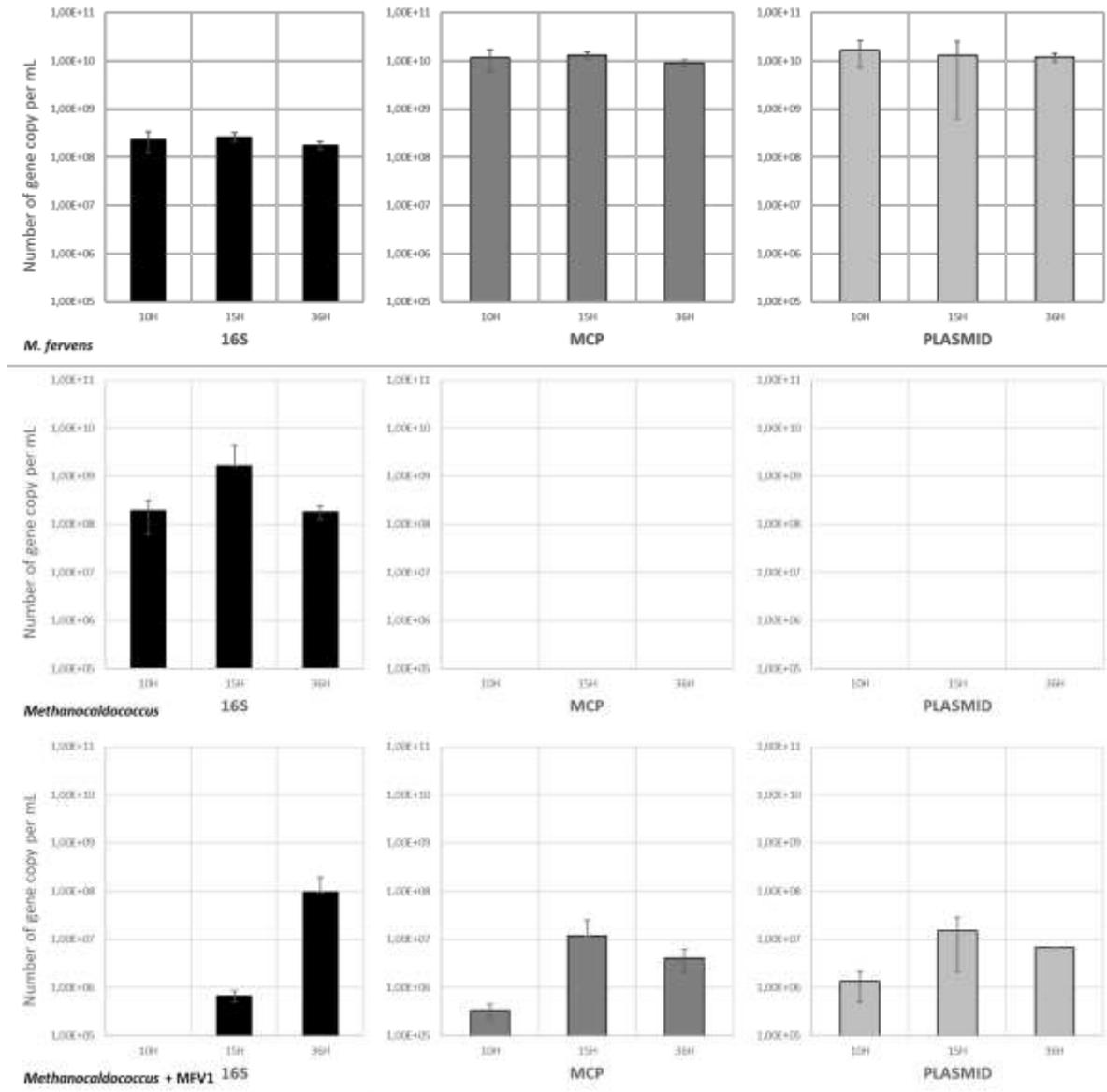


Figure 4: QPCR assays to assess changes in copy number of chromosomal, viral and plasmid DNA target genes of *M. fervens*, a pool of *Methanocaldococcus* strains, a pool of *Methanocaldococcus* strains infected with MFV1. The evolution of the number of 16S copy is shown with black bars. The evolution of the number of MCP (Major Capsid Plasmid) is shown with dark grey bars. The evolution of the number of plasmid gene is shown with light grey bars.

A phenomenon of molecular piracy was described for another virus of methanogen Ψ M1, which infects *Methanothermobacter marburgensis*. The capsids of Ψ M1 package multimers of pME2001, a plasmid of 4,4 kb carried by *M. marburgensis*, with a total size identical to the size of the viral genome. In this case, the packaging system of the capsid are extremely precise whereas there is no homology between Ψ M1 and pME2001. 10 to 15 % of the capsids contain plasmid DNA (Meile *et al* 1989).

In 2015, a high jacking strategy was observed with a bacteriophage isolated from a hydrothermal vent, MPV1 which infects *Marinitoga piezophila* (Lossouarn *et al* 2015b). The MPV1 viral capsids were shown to predominately package a plasmid of 13,3 kb (pMP1). This was the first reported example of molecular piracy in deep-sea hydrothermal vents. These examples illustrate an intricate network of interactions in the mobilome dedicated to horizontal transfer of genes with potential to drive cellular hosts adaptations and evolution.

More generally, this type of relationship between several mobile genetic elements has been described for all tree domains of life (Christie and Dokland 2012).

From an ecological point of view, the *Methanocaldococcus* strains that we successfully infected by MFV1 *in vitro*, were isolated from Pacific Ocean (East Pacific Ridge 13 °N and from Juan de Fuca 45 °N). *M. fervens* AG86, the natural infected host, was isolated from the Guaymas basin located also in Pacific Ocean. Juan de Fuca and the Guaymas basin are geographically close. Furthermore, *Methanocaldococcus* strains have also been isolated from Guaymas basin. The infection described in our study therefore seems to be possible in natural environments. Interestingly, the reference strain of *M. jannaschii* (JAL-1), closely related to *M. fervens* with an average nucleotide identity of 83,89%, not used in our infection experiments, contain a provirus integrated to its genome. MFV1 and the provirus from *M. jannaschii* (JAL-1) share 63,8 % of sequence similarity (Krupovic *et al* 2010).

DNA content of MFV1 and viral genome analysis

The viral genome was extracted from purified particles and was compared to the provirus integrated in *M. fervens*' chromosome. Based on the 30.26 kb provirus sequence available on NCBI database, *in silico* digestions were performed by EcoRV using Restriction Mapper software (<http://www.restrictionmapper.org>). The viral DNA extracted from capsids was also digested by EcoRV. Fragments lengths obtained on electrophoresis gel compared with those obtained *in silico* digestion are identical. To confirm that the DNA packaged in MFV1 corresponds to the proviral sequence, the viral DNA genome extracted from purified virions, was sequenced and analyzed. After assembly, viral DNA is a double stranded linear genome of 30.99 kb (Figure 5). The viral DNA sequence obtained was identical, except to one deletion and one inversion, to the provirus sequence on *M. fervens*' chromosome, previously described

by Krupovic *et al.* in 2010. The viral genome was composed of 44 predicted ORFs (see Table 2), with 27 predicted functions.

MFV1 genome possesses typical ORFs found in head-tailed virus' genomes. Particularly, it contains the three essential components of packaging machines (Sun *et al* 2012) (ORF1, 2, 3): the portal protein, the large and the small subunit terminases. The portal protein is located at the special fivefold vertex of the capsid through which the DNA is threaded into the head. The large terminase provides energy for packaging with its ATPase activity and also has a nuclease activity for packaging initiation and termination. The small subunit terminase recognizes viral DNA and brings it to the large terminase for the initial cleavage (Sun *et al* 2012). ORF4 and ORF20 code for protein predicted to be involved in the assembly of the tail. ORF4 is implied in the formation of the connector which enables the tail to bind to the head. ORF 20 codes for a base plate protein typical for caudovirus (Kitazawa *et al* 2005). The major capsid protein is coded by ORF11 which shows homology with a HK97-like major capsid protein.

Based on BlastP searches, there are indications for identities with haloviruses infecting halophilic archaea and an abyssal bacteriophage Nitratiruptor phage NrS-1. ORF9 is similar to a protein from a caudovirus of a halophilic archaeon with a predicted function for maturation protein (PF04586). Halophilic *archaea* are phylogenetically close to methanogens. One interesting observation is that ORF17 of MFV1, corresponding to tape measure protein, is most similar to the tape measure protein of Nitratiruptor phage NrS-1, a bacteriovirus isolated from a deep-sea thermophilic *Epsilonproteobacteria*. ORF41 codes for a MCM helicase implied in the DNA replication and maintenance of genome integrity (Forsburg 2008). It is homologous to a MCM helicase found in BJ1 virus, a halophage. None similarities were detected between MFV1 and two viruses isolated from *Thermococcales* deep-sea strains (PAV1 and TPV1).

Some ORFs may give us information about the relation between the virus and its host, particularly about lysogenic interactions. ORF10 is predicted to function as a pre-neck appendage protein also found in *Bacillus* phage phi29. For phi29, this protein can have a role in degradation of host cell envelope components during virus entry and viral attachment to host adhesion receptor (Villanueva and Salas 1981). ORF21 is also implicated in virus-host recognition with a predicted function for a putative receptor-binding protein. ORF44 codes for XerC/D-like integrase which are important enzymes for the integration of viral DNA in the host

genome by recombination. These enzymes mediate unidirectional site-specific recombination between two DNA recognition sequences (Grainge and Jayaram 1999).

Functions assigned for several ORFs (ORF7, 8, 28 and 39) are interesting for their transcriptional regulator functions. ORF 7 shows similarity to Cro and CI, two key repressor proteins which act via a “genetic switch” and control alternative viral lifestyles (lysis or lysogeny). ORF28 codes for a LytTR domain which is a DNA-binding motif found within the AlgR/AgrA/LytR family of transcription factors that regulate virulence factor and toxin gene expression in pathogenic bacteria (Sidote et al 2008). ORF39 is similar to the transcriptional regulator MarR-like involved in detoxification of aromatic components in *Sulfolobus solfataricus* (Fiorentino et al 2007).

ORF35 and 36 present predicted function for proteins involved in TA system: HicA toxin and HicB antitoxin notably found in bacteria (Winter et al 2018).

Other ORFs have a role in the maintenance of genome integrity. These functions are particularly important at high temperatures for protection against thermo-degradation. ORF24 may be involved in essential DNA reparation mechanism with a predicted function for recombination proteins (RecA/ RadA /Rad51-like). Homologous recombination is involved in repairing double-strand DNA breaks, the restart of stalled replication forks and maybe the initiation of replication (Hogrel et al 2018). RecA-family recombinases are conserved across the 3 domains of life. Indeed, the central step of homologous recombination is base-pairing and strand exchange, which are catalysed by RecA-family recombinases: Rad51/Dmc1 in eukaryote, RecA in bacteria and RadA in archaea (Hogrel et al 2018). ORF27 codes for a histone protein involved in the DNA structure and particularly for a homologue of the histone H3 found in eukaryotes. ORF42, which has an insertion of 1 nt compared to the provirus, has a predicted function of exonuclease.

Finally, ORF 33, 34, 40 and 43 code for protein with a domains of unknown functions (DUF). Many DUFs are highly conserved in all three domains, indicating an important role.

We showed that MFV1 capsids can package pMEFER01, a plasmid of 22.1 kb harbored by *M. fervens*. In literature, it has been shown that the frequency of these plasmid containing particles is enhanced when there is DNA similarity between the plasmid and the virus (Bravo and Alonso, 1990). We have not detected any homology between MFV1 and pMEFER01. The

same is true for Ψ M1 and pME2001, no homology between these two genetic elements isolated from a transduction mediating methanogen (Meile *et al* 1989, Meile *et al* 1990).

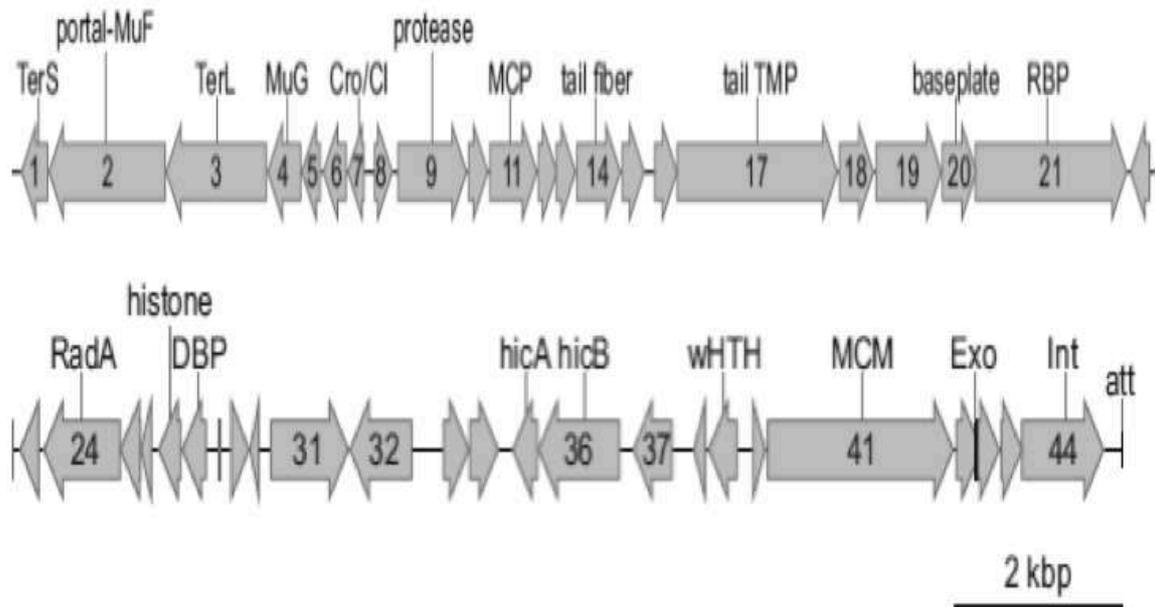


Figure 5: Genome organization of MFV1 genome. Arrows in grey with number (1 to 44) indicate predicted ORFs. The scale bar represents 2000 bp.

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

Table 2: Annotation of MFV1 genome.

ORF number	Genome position	Function	HHpred	BlastP
ORF1	Complement (231..662)	Terminase, small subunit	phage Mu gp27-like (PF11985, P=99,4); N-terminal HTH domain (PF13565; P=97,3)	
ORF2	Complement (664..2511)	Portal-Mu gpF fusion	N-terminal portal protein domain (4zjn, P=98,6; PF06074, P=98,9); C-terminal Mu gpF-like minor capsid protein domain (PF04233, 99,9)	C-terminal domain: Fusobacterium phage Funu2 (AKC57587)
ORF3	Complement (664..2511)	Terminase, large subunit	Terminase, large subunit (PF03354, P=100; 3cpe, P=99,9)	Thermus phage TMA (YP_004782268)
ORF4	Complement (4103..4639)	Tail completion protein and head joining, Mu gpG-like	Phage tail S (PF05069, P=100); phage homologs: gpS of P2, gp10 of HK97, gpG of Mu	Vibrio phage martha (YP_007877515)
ORF5	Complement (4639..4950)			
ORF6	Complement (4977..5357)		DUF3290 (PF11694, P=93)	
ORF7	Complement (5362..5637)	cro/C1-type DNA-binding protein, transcriptional regulator	HTH domain (PF01381, P=99,5)	
ORF8	5785..6081	coiled-coil domain		
ORF9	6152..7249	maturation protease	Caudovirus pro head serine protease U35 (PF04586, P=97,7)	Environmental Halophage eHP-30 (AFH22606)
ORF10	7259..7585	Pre neck appendage protein	C-terminal domain: pre neck appendage protein, beta barrel, Bacillus phage phi29 (3gqh, P=94,9)	
ORF11	7599..8357	Major capsid protein, HK97-like	HK97-like major capsid protein (2e0z, P=100; 1ohg, P=98,2)	
ORF12	8361..8672			
ORF13	8641..8964			
ORF14	8964..9668	tail fibre protein	N-terminal domain: Phage T7 tail fibre protein (PF03906, P=97,8)	Nitratiruptor phage NrS-1 (BAN05353)
ORF15	9678..10043			
ORF16	10188..10559			
ORF17	10540..13080	Tape measure protein	Bacteriophage bIL285, Orf52, tape measure protein (PF10145, P=96,7)	Brevibacillus phage Emery (AGR47359)
ORF18	13092..13649			
ORF19	13668..14717			
ORF20	14714..15268	Base plate protein, Mu gp44	bacteriophage MU, baseplate, gene product 44 (3cdd, P=93,8)	
ORF21	15232..17631	putative receptor-binding protein		Cell adhesion protein (2wd6, P=81,1); Phage TP901-1 ORF49 RBP (2f0c, P=50,1); Carbohydrate-binding module (PF03370, P=49,1)

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

ORF22	Complement (17674..17991)			
ORF23	Complement (18059..18301)			
ORF24	Complement (18341..19273)	RecA/RadA/Rad51-like recombination protein	Rad51 (PF08423, TIGR02238, P=100); RecA/RadA (COG0468, P=100)	
ORF25	Complement (19251..19514)			
ORF26	Complement (19498..19641)			
ORF27	Complement (19708..19992)	Histone H3-like protein	Histone H3 (2hue_B, 3nqj, P=99,8)	
ORF28	Complement (19989..20291)	AgrA-like DNA-binding protein	Lyt TR-like DNA-binding domain (3d6w, P=93,6)	
ORF29	20575..20802			
ORF30	Complement (20799..20924)			
ORF31	21041..21988			
ORF32	Complement (21985..22743)			
ORF33	23102..23425	DUF4258	DUF4258 (PF14076, P=98,5)	
ORF34	23412..23774	DUF2283	DUF2283 (PF10049, P=99,8)	
ORF35	Complement (23933..24247)	HicA toxin	HicA toxin (PF07927, 4c26, P=99,6)	
ORF36	Complement (24240..25226)	HicB3 antitoxin	nuclease of the RNase H fold, HicB family (4p78, P=91,1)	
ORF37	Complement (25368..25856)			
ORF38	Complement (26096..26251)			
ORF39	Complement (26272..26628)	Transcriptional regulator, MarR-like	winged-helix binding motif (2rdp, 1z7u, P=99,7)	
ORF40	26797..26964	DUF2080	DUF2080 (PF09853, P=99,9)	
ORF41	26974..29205	MCM helicase	Replicative MCM helicase (COG1241, 4fdg, 3ja8, P=100)	Archaeal BJ1 virus (YP_919062)
ORF42	29224..29538	DnaQ-like 3'-5' exonuclease	DNA_polB_B3_exo DEDDy 3'-5' exonuclease (cd05781, PF10108, P=99,9)	
ORF42*	29474..29755	frameshift, 1 nt insertion		
ORF43	29755..30024	DUF2540	DUF2540 (PF10802, 2efv, P=100)	
ORF44	30005..30997	XerC/D-like integrase	XerC/XerD-like recombinase (COG4973, COG4974, 2a3v, 1a0p, P=100)	Leptospira phage vb_LkmZ_Bejolso9-LE1 (AGS80657)

Concluding remarks

Little is known about viruses in deep oceans which make them one of the least understood biological entities on Earth. However, studying viruses, that infect all three domains of life, is likely to shed light on diversity, adaptation and evolution of microbial communities impacted by mobile genetic elements. Our global knowledge of virus-host relationships remains limited and this is particularly true for deep-sea hydrothermal ecosystems. To date, only 2 archaeal viruses have been isolated from two *Thermococcales* strains (Geslin *et al* 2003, Gorlas *et al* 2012). The discovery of MFV1, isolated from a hydrothermal methanogen, adds to this small list. MFV1 is the first hyperthermophilic head-tailed virus isolated and described. The viral genome presents a typical panel of predicted genes found for head-tailed viruses. It includes genes implied in the regulation of the viral cycle (Cro/C1: lysis versus lysogeny) and for the maintenance and integrity of the genome (RecA family), which support that MFV1 is well adapted to a fluctuating environment. Notably, it presents homologies with haloviruses and an abyssal head-tailed bacteriophage (NrS-1). Archaeal viruses can present morphologies, genomic content and interactions with their hosts that differ from viruses isolated from *Bacteria* and *Eukarya*. Therefore, it has been assumed that the great diversity and uniqueness of these viral morphotypes was an adaptation to the extreme physicochemical conditions that their hosts may face (Kim *et al* 2019, Krupovic *et al* 2018, Prangishvili *et al* 2017). However, MFV1 is a hyperthermophilic siphovirus with the most classical morphology observed for viruses. Display original morphotype therefore does seem to not be an obligate feature for archaeal viruses in hot environments.

MFV1 is a temperate virus with a particular lysogenic cycle. Lysogeny has been suggested to be common in hydrothermal deep sea vents (Anderson *et al* 2013), i.e. integrated states represent a means to avoid the harsh conditions. However, MFV1 is also produced at a high basal concentration without leading to sudden lysis of its host. From the cellular point of view, carrying a virus could increase the host fitness by enhancing, via introduced novel genes and/or mutations, survivability and adaptation to fluctuating environmental conditions (Anderson *et al* 2011). From the viral point of view, MFV1 possesses different strategies to maintain itself. It can stay integrated in its host in a stable lysogenic relationship. It can also be produced in high concentrations and released in the deep sea hydrothermal environment where it is resistant to infect other methanogenic species. The relation between MFV1 and its

host seems to result from a co-mutualist evolutionary and does not correspond to the examples conventionally described. To add to this complex relationship, MFV1 possesses genes encoding a TA system (HicA / HicB), ordinarily a host's defense system, and the host has genes which code for Argonaute proteins involved in defense against exogenous DNA (Chong *et al*, 2019). MFV1 and *M. fervens* thus use different strategies to interact with each other. Further analyses will be necessary to better understand the MFV1 viral cycle (entry and release mechanisms for example). Moreover, it is important to note that virions are stable and remain infectious even if they have been exposed to aerobic or anaerobic conditions, to low (4 °C) or high temperatures (80-90 °C). These conditions can naturally be encountered in the deep sea hydrothermal environment. Study the structure of MFV1, by an atomic force microscopy approach for example, may permit to highlight particular adaptations for these large fluctuations in temperature.

Interestingly capsids of MFV1 contain pMEFER01, a plasmid of 22.1 kb harbored by *M. fervens* suggesting a phenomenon of molecular piracy. If carrying a provirus confers resistance against related viruses, molecular piracy increases the survival of the host population, due to lesser exposure to the viral DNA (Christie and Dokland 2012). In this context, the plasmid interferes with viral helper to favor the packing of its own pirate genome in capsids. In this case, the plasmid uses the viral capsid as a vehicle to propagate itself in order to be transferred to new cells. In the case of another plasmid, pR1SE carried by a *Haloarchaea*, the plasmid uses membrane vesicles as a vehicle for infecting new cells. pR1SE encodes proteins that are found in regularly shaped membrane vesicles, and the vesicles enclose the plasmid DNA (Erdmann *et al* 2017). *M. fervens* produce membrane vesicles and pMEFER01 can also be transported by these vesicles. Plasmids seem to adopt several strategies to maintain themselves. They use cells, viral capsids and membrane vesicles which can be protections to face harsh environmental conditions.

In deep-sea hydrothermal vents, most of the plasmids isolated and described are carried by hyperthermophilic species from *Methanococcales* or *Thermococcales* orders. These two important groups of microorganisms share the same habitat and evidences for horizontal transfer of genes are available thanks to the study of their plasmids. pMETVU01-like plasmids found in *Methanococcales* result of a relatively recent horizontal transfer from *Thermococcales* (Krupovic *et al* 2013). For the pT26-2 plasmid family which contains

pMEFER01, transfer of plasmids between *Thermococcales* and *Methanococcales* occurred before their divergence (Lossouarn *et al* 2015a, Soler *et al* 2011). Indeed, for this particular plasmids family, there is no evidence for recent transfers between *Thermococcales* and *Methanococcales* (Badel *et al* 2019). Co-cultures of infected species of *Thermococcales* or *Methanococcales* should be the next step to highlight potential phenomenon of viral infection or plasmid transfers between these microorganisms, *Thermococcales* and *Methanococcales*, sharing the same extreme environment.

MFV1 and pMEFER01 are mobile genetic elements which interact with hyperthermophilic methanogens that are key to the carbon biogeochemical cycle. Important impacts on the life cycle of these microorganisms can result in more global feedbacks (Danovaro *et al* 2016). Indeed, methanogens are autotrophic producers. They play a vital ecological role in anaerobic environments by removing excess hydrogen and fermentation products to produce CH₄ (Lyu *et al* 2018). Viral infections are able to dynamically alter the composition and metabolic potential of these infected methanogens. Indeed, viral infections can conduct to a shift in methanogens populations with a direct impact on other prokaryotic community compositions (Anderson *et al* 2014). More globally, the potentially cascading effects caused by possible shifts in viral life-cycle strategies (lysogenic versus lytic) in respond to stressors naturally encountered in deep sea hydrothermal vents, could have important effects on global biogeochemical cycles.

Acknowledgements

This work was financially supported by the French Ministry of Higher Education and the Brittany region to ST and the ERC project Evomobil to ST, CG, PF. We thank A. Gorlas for assistance in electron cryo-microscopy. We thank J. Lossouarn for the preliminary screening of the methanogens. The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

- Anderson RE, Brazelton WJ, Baross JA (2011). Using CRISPRs as a metagenomic tool to identify microbial hosts of a diffuse flow hydrothermal vent viral assemblage. *FEMS Microbiology Ecology* **77**: 120-133.
- Anderson RE, Brazelton WJ, Baross JA (2013). The deep virosphere: assessing the viral impact on microbial community dynamics in the deep subsurface. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* **75**: 649-675.
- Anderson RE, Sogin ML, Baross JA (2014). Evolutionary strategies of viruses, *bacteria* and *archaea* in hydrothermal vent ecosystems revealed through metagenomics. *PLoS One* **9**: e109696.
- Badel C, Erauso G, Gomez A, Catchpole R, Gonnet M, Oberto J *et al* (2019). The global distribution and evolutionary history of the pT26-2 archaeal plasmid family. *Environmental Microbiology*.
- Bellack A, Huber H, Rachel R, Wanner G, Wirth R (2011). *Methanocaldococcus villosus* sp nov., a heavily flagellated archaeon that adheres to surfaces and forms cell-cell contacts. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **61**: 1239-1245.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, Smith GP, Milton J, Brown CG *et al* (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* **456**: 53.
- Bimboim H, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bravo A, Alonso JC (1990). The generation of concatemeric plasmid DNA in *Bacillus subtilis* as a consequence of bacteriophage SPP1 infection. *Nucleic Acids Res* **18**: 4651-4657.
- Chong Y, Liu Q, Huang F, Song D, Feng Y (2019). Characterization of a recombinant thermotolerant Argonaute protein as an endonuclease by broad guide utilization. *Bioresources and Bioprocessing* **6**: 21.
- Christie GE, Dokland T (2012). Pirates of the *Caudovirales*. *Virology* **434**: 210-221.
- Danovaro R, Dell'Anno A, Corinaldesi C, Rastelli E, Cavicchioli R, Krupovic M *et al* (2016). Virus-mediated archaeal hecatomb in the deep seafloor. *Science Advances* **2**: e1600492.
- Demory D, Arsenieff L, Simon N, Six C, Rigaut-Jalabert F, Marie D *et al* (2017). Temperature is a key factor in *Micromonas*-virus interactions. *ISME J* **11**: 601-612.

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

Erdmann S, Tschitschko B, Zhong L, Raftery MJ, Cavicchioli R (2017). A plasmid from an Antarctic haloarchaeon uses specialized membrane vesicles to disseminate and infect plasmid-free cells. *Nature Microbiology* **2**: 1446.

Fiorentino G, Ronca R, Cannio R, Rossi M, Bartolucci S (2007). MarR-like transcriptional regulator involved in detoxification of aromatic compounds in *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* **189**: 7351-7360.

Flores GE, Reysenbach A-L (2011). Hydrothermal Environments, Marine. In: Reitner J, Thiel V (eds). *Encyclopedia of Geobiology*. Springer Netherlands: Dordrecht. pp 456-467.

Forsburg SL (2008). The MCM helicase: linking checkpoints to the replication fork. *Biochem Soc Trans* **36** :114-9

Gaudin M, Gaudiard E, Schouten S, Houel-Renault L, Lenormand P, Marguet E *et al* (2013). Hyperthermophilic *archaea* produce membrane vesicles that can transfer DNA. *Env Microbiol Rep* **5**: 109-116.

Gaudin M, Krupovic M, Marguet E, Gaudiard E, Cvirkaite-Krupovic V, Le Cam E *et al* (2014). Extracellular membrane vesicles harbouring viral genomes. *Environ Microbiol* **16**: 1167-1175.

Geslin C, Le Romancer M, Erauso G, Gaillard M, Perrot G, Prieur D (2003). PAV1, the First Virus-Like Particle Isolated from a Hyperthermophilic Euryarchaeote, "*Pyrococcus abyssi*". *Journal of Bacteriology* **185**: 3888-3894.

Geslin C, Gaillard M, Flament D, Rouault K, Le Romancer M, Prieur D *et al* (2007). Analysis of the first genome of a hyperthermophilic marine virus-like particle, PAV1, isolated from *Pyrococcus abyssi*. *J Bacteriol* **189**: 4510-4519.

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

Gorlas A, Marguet E, Gill S, Geslin C, Guigner JM, Guyot F *et al* (2015). Sulfur vesicles from *Thermococcales*: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie* **118**: 356-364.

Grainge I, Jayaram M (1999). The integrase family of recombinases: organization and function of the active site. *Mol Microbiol* **33**: 449-456.

Hogrel G, Lu Y, Laurent S, Henry E, Etienne C, Phung DK *et al* (2018). Physical and functional interplay between PCNA DNA clamp and Mre11–Rad50 complex from the archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids Res* **46**: 5651-5663.

Horvath P, Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the immune system of *bacteria* and *archaea*. *Science* **327**: 167-170.

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J* **11**: 1511-1520.

Huber H, Thomm M, König H, Thies G, Stetter KO (1982). *Methanococcus Thermolithotrophicus*, a Novel Thermophilic Lithotrophic Methanogen. *Archives of Microbiology* **132**: 47-50.

Jeanthon C, L'Haridon S, Reysenbach AL, Vernet M, Messner P, Sleytr UB *et al* (1998). *Methanococcus infernos* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 913-919.

Jeanthon C, L'Haridon S, Reysenbach AL, Corre E, Vernet M, Messner P *et al* (1999). *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213(T) as *Methanococcus fervens* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 583-589.

Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983). *Methanococcus Jannaschii* Sp-Nov, an Extremely Thermophilic Methanogen from a Submarine Hydrothermal Vent. *Archives of Microbiology* **136**: 254-261.

Kim J-G, Kim S-J, Cvirkaite-Krupovic V, Yu W-J, Gwak J-H, López-Pérez M *et al* (2019). Spindle-shaped viruses infect marine ammonia-oxidizing *Thaumarchaea*. *PNAS* **116**: 15645-15650.

Kitazawa D, Takeda S, Kageyama Y, Tomihara M, Fukada H (2005). Expression and characterization of a baseplate protein for bacteriophage Mu, gp44. *J Biochem* **137**: 601-606.

Krupovic M, Forterre P, Bamford DH (2010). Comparative analysis of the mosaic genomes of tailed archaeal viruses and proviruses suggests common themes for virion architecture and assembly with tailed viruses of *bacteria*. *J Mol Biol* **397**: 144-160.

Krupovic M, Gonnet M, Hania WB, Forterre P, Erauso G (2013). Insights into dynamics of mobile genetic elements in hyperthermophilic environments from five new *Thermococcus* plasmids. *PLoS One* **8**: e49044.

Krupovic M, Cvirkaite-Krupovic V, Iranzo J, Prangishvili D, Koonin EV (2018). Viruses of *archaea*: structural, functional, environmental and evolutionary genomics. *Virus Res* **244**: 181-193.

L'Haridon S, Reysenbach AL, Banta A, Messner P, Schumann P, Stackebrandt E *et al* (2003). *Methanocaldococcus indicus* sp nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1931-1935.

Lossouarn J, Dupont S, Gorlas A, Mercier C, Bienvenu N, Marguet E *et al* (2015a). An abyssal mobilome: viruses, plasmids and vesicles from deep-sea hydrothermal vents. *Res Microbiol* **166**: 742-752.

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

Lossouarn J, Nesbo CL, Mercier C, Zhaxybayeva O, Johnson MS, Charchuck R *et al* (2015b). 'Menage a trois': a selfish genetic element uses a virus to propagate within *Thermotogales*. *Environ Microbiol* **17**: 3278-3288.

Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB (2018). Methanogenesis. *Curr Biol* **28**: R727-R732.

Marguet E, Gaudin M, Gaudiard E, Fourquaux I, du Plouy SL, Matsui I *et al* (2013). Membrane vesicles, nanopods and/or nanotubes produced by hyperthermophilic *archaea* of the genus *Thermococcus*. *Biochemical Society Transactions* **41**: 436-442.

Marteinsson VT, Birrien JL, Prieur D (1997). In situ enrichment and isolation of thermophilic microorganisms from deep-sea vent environments. *Can J Microbiol* **43**: 694-697.

Meile L, Jenal U, Studer D, Jordan M, Leisinger T (1989). Characterization of Psi-M1, a Virulent Phage of *Methanobacterium-Thermoautotrophicum* Marburg. *Archives of Microbiology* **152**: 105-110.

Meile L, Abendschein P, Leisinger T (1990). Transduction in the archaebacterium *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J Bacteriol* **172**: 3507-3508.

Noble RT, Fuhrman J (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and *bacteria*. *aquat microb ecol vol* **14**: 113-118.

Pfister P, Wesserfallen A, Stettler R, Leisinger T (1998). Molecular analysis of *Methanobacterium* phage Psi M2. *Molecular Microbiology* **30**: 233-244.

Prangishvili D, Bamford DH, Forterre P, Iranzo J, Koonin EV, Krupovic MJNRM (2017). The enigmatic archaeal virosphere. *Nat Rev Microbiol* **15**: 724.

Prieur D (1997). Microbiology of deep-sea hydrothermal vents. *Trends in Biotechnology* **15**: 242-244.

Rachel R, Bettstetter M, Hedlund BP, Haring M, Kessler A, Stetter KO *et al* (2002). Remarkable morphological diversity of viruses and virus-like particles in hot terrestrial environments. *Arch Virol* **147**: 2419-2429.

Sidote DJ, Barbieri CM, Wu T, Stock AM (2008). Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding. *Structure* **16**: 727-735.

Soler N, Gaudin M, Marguet E, Forterre P (2011). Plasmids, viruses and virus-like membrane vesicles from *Thermococcales*. *Biochem Soc Trans* **39**: 36-44.

Sun S, Gao S, Kondabagil K, Xiang Y, Rossmann MG, Rao VB (2012). Structure and function of the small terminase component of the DNA packaging machine in T4-like bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 817-822.

Chapitre I – Caractérisation de MFV1

Suzuki Y, Kelly SD, Kemner KM, Banfield JF (2003). Microbial populations stimulated for hexavalent uranium reduction in uranium mine sediment. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1337-1346.

Takai K, Nealson KH, Horikoshi K (2004). *Methanotorris formicicus* sp nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 1095-1100.

Teske A, Hinrichs K-U, Edgcomb V, de Vera Gomez A, Kysela D, Sylva SP *et al* (2002). Microbial diversity of hydrothermal sediments in the Guaymas Basin: evidence for anaerobic methanotrophic communities. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1994-2007.

Vigneron A (2012). Phylogenic and functional diversity of uncultured microbial communities from the Sonora Margin cold seep sediments, Guaymas Basin (Gulf of California), Université de Bretagne occidentale - Brest.

Villanueva N, Salas MJ *et al* (1981). Adsorption of bacteriophage phi 29 to *Bacillus subtilis* through the neck appendages of the viral particle. *J Virol* **38**: 15-19.

Weidenbach K, Nickel L, Neve H, Alkhnabashi OS, Kunzel S, Kupczok A *et al* (2017). *Methanosarcina* Spherical Virus, a Novel Archaeal Lytic Virus Targeting *Methanosarcina* Strains. *J Virol* **91**.

Widdel F, Bak F (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing *bacteria*. *The prokaryotes*. Springer. pp 3352-3378.

Winter AJ, Williams C, Isupov MN, Crocker H, Gromova M, Marsh P *et al* (2018). The molecular basis of protein toxin HicA-dependent binding of the protein antitoxin HicB to DNA. *J Biol Chem* **293**: 19429-19440.

Yu Y, Lee C, Kim J, Hwang S (2005). Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Bioeng* **89**: 670-679.

Zhao HX, Wood AG, Widdel F, Bryant MP (1988). An Extremely Thermophilic *Methanococcus* from a Deep-Sea Hydrothermal Vent and Its Plasmid. *Archives of Microbiology* **150**: 178-183.

Supporting Informations

SI Materials and Methods

Screening of *Methanococcales* strains for mobile genetic elements. A total of 46 strains of *Methanococcales* were retrieved from the UBO culture collection “UBOCC” (www.univ-brest.fr/UBOCC) and from our laboratory cultures collections. These strains were isolated from East Pacific Ridge 13 °N; East Pacific Ridge 17°S; East Pacific Ridge 9°N; Juan de Fuca 45°N; Guaymas basin 27°N.

Induction assays

For mitomycin C induction, after 2 hours of growth, corresponding to the beginning of growth log phase, cultures of *M. fervens* were placed at room temperature for 30 minutes in order to decrease the temperature. Then, mitomycin C was added into culture flask at a final concentration of 4 µg/mL and cultures were incubated at 70 °C for 24 hours. In parallel, a negative control was made in the same conditions by adding water instead of mitomycin C. As described by Jeanthon *et al* in 1999, the growth of *Methanocaldococcus fervens* AG86 was inhibited by chloramphenicol at 75 µg/ml. We have evaluated the impact of addition of chloramphenicol at 10 µg/ml considered as a non-lethal dose. BES which is known to be an inhibitor of the methanogenesis was also tested at 1 mM. Finally, metals naturally present in the deep sea vent systems, like copper ($\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) was added at 30 µM. After the addition of BES or these metals, cultures were placed at 80°C with a shaking of 100 rpm during 24 hours. The induction assays by chloramphenicol, BES and metals were conducted as described for mitomycin C.

For H₂ deficiency, after 2 hours of growth, corresponding to the beginning of growth log phase, the H₂/CO₂ (80:20) gas phase of cultures of *M. fervens* was replaced by N₂ gas phase during 1 or 2 hours. Then, N₂ gas phase was replaced by H₂/CO₂ (80:20) at 1,7 bars for the rest of the experiment (24 h). In parallel, a negative control was made in the same conditions but without changing the gas phase.

UV experiments were carried out in an anaerobic chamber under 93% N₂ – 7% H₂ atmosphere and in semi-darkness to avoid possible photoreactivation. after 2 hours of growth,

Chapitre I – Supporting informations

corresponding to the beginning of growth log phase, cultures of *M. fervens* were transferred in

glass Petri dishes. UV irradiation (254 nm) was performed with an ultraviolet lamp (typical small short wave UV light, model UVGL-25, UVP, Upland, CA, emitting essentially monochromatic 254-nm UV at a maximal intensity less than 750 mW cm⁻²) at a distance of 3 cm from the cell suspension at exposure time 30 min. After irradiation, the cell suspension was placed in sterile vials with a H₂/CO₂ phase gas at 1,7 bars and incubated at 80°C with agitation. A non-irradiated culture, treated identically, was used as control.

Primers design and PCR protocol

To confirm the nature of the DNA packaged in the viral suspensions and to check potential chromosomal contamination, PCR amplifications were performed. Three primer sets were designed by using the Primer 3 software. PCR amplifications were performed using primer sets for 16S rRNA gene (*M. fervens* chromosomal DNA marker), major capsid protein encoding gene (*mcp* code gene, provirus and virus marker) and “hypothetical protein” encoding gene (*hypothetical protein* code gene, pMEFER01 plasmid marker). Primer sets are described in table S1. The PCR reactions were carried out in a volume of 50 µL containing 1 µl 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).

Table S1: Sequences of primers, designed for PCR, targeting viral, plasmid and chromosomal genes

Name	sequence (5'-3')	Target	Tm (°C)	Size products	Ref.
MCP Fer F	CGCAAATAACAAGACCGA	Major capsid protein (MCP)	57,36	519 bp	This study
MCP Fer R	CCACTCAATACAATTACCGC	Major capsid protein (MCP)	54,21		This study
TMP Fer F	AACTGCATACATGGGGATT	Tail major protein (TMP)	55,38	536 bp	This study
TMP Fer R	ATCCCATCTGTCTTGCAAT	Tail major protein (TMP)	51,51		This study
Pro Fer F	GAATGATGACCTTGACATG	Provirus hypothetical protein	55,81	167 bp	This study
Pro Fer R	GGGGTTGTATGTGTGGTATT	Provirus hypothetical protein	53,08		This study
Plas F	TGGCTCATACTTGTCTGAAT	Plasmid hypothetical protein	58	599 bp	This study
Plas R	TTGGAGAAATGGGAATCAGG	Plasmid hypothetical protein	60		This study
Arc8F	TCCGGTTGATCCTGCC	rDNA 16S	57	900 bp	Teske <i>et al</i> 2002
1492R	GGCTACCTTGTACGACTT	rDNA 16S	57		Suzuki <i>et al</i> 2003

Chapitre I – Supporting informations

QPCR assays

QPCR analyses were performed to assess changes in growth culture, viral production and plasmid production, after MFV1 infection of a pool of strains of *Methanocaldococcus*. The first set is specific to *Methanococcales*: 16S rDNA gene, the second set is specific to the major capsid protein gene (MFV1), the last set is specific to “hypothetical protein” gene encoded on pMEFER01 plasmid. Primer sets are described in table S2.

Table S2: Sequences of primers, designed for qPCR, targeting viral, plasmid and chromosomal genes

Name	Sequence (5'-3')	Target	Tm (°C)	Size products	Ref.
Mcc495F	TAAGGGCTGGGCAAGT	Methanococcales group	61	186 bp	Yu <i>et al</i> 2005
McocR	GGATCAACACATTTACCGC	Methanococcales group	61		Vigneron <i>et al</i> 2012
MCP F	TGCTGCTACGCCGAAAGATA	Major Capsid Protein (MCP)	60	239 bp	This study
MCP R	ACACAACGTAGGGTCTGCA	Major Capsid Protein (MCP)	60		This study
PF	TAAGCTCGGCCTAAACCACA	Hypothetical Protein	59	183 bp	This study
PR	AACGGTTGGAGGAGGAAAGA	Hypothetical Protein	59		This study

Total DNA from culture of *M. fervens* were extracted as previously described. The concentration of DNA was determined by Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit and diluted to a final concentration of 10ng.µl⁻¹ in order to construct standard curves by half serial dilution ranging from 10 ng.µl⁻¹ to 0.3125 ng.µl⁻¹. The R^2 of standard curves obtained were up to 0.997 and efficiency of the reactions between 90 % and 110 %.

Preparation of template DNA for QPCR analysis.

Two cultures inoculated at the beginning of the experiment were established as controls of the experiment: culture of *M. fervens* producing MFV1 virions was used as positive control and non-infected *Methanocaldococcus* pool cultures were used as negative control. For the infection condition, MFV1 virions were incubated in the DSM141 modified medium at 80°C at a final concentration of 5.10⁸ VLPs per ml (estimated by epifluorescence microscopy). After 10h of incubation of the virions at high temperature, *Methanocaldococcus* cells were inoculated at 5.10⁶ cells per ml. Total DNAs were extracted, as previously described, from 10

Chapitre I – Supporting informations

ml samples collected at different times of the experiment: 0h, 10h, 15h and 36h for all the conditions tested (controls and infection condition). The DNA concentration from each sample was determined by Quant-iT PicoGreen® dsDNA Assay Kit and diluted to a final concentration of 0,2 ng.µl⁻¹.

QPCR assays by using Sybr Green I dye.

Real-time PCR amplifications were performed with Sybr Green ROX MIX using a Step-One Plus Instrument (Applied Biosystem). The QPCR reactions were performed in a volume of 25 µl containing 1ng template, 12.5 µl of Sybr Green ROX MIX and 700 nM for *16S* gene and plasmid gene primers and 500 nM for *mcp* gene primers. Primers sets target *mcp* (major capsid protein) of MFV1, a hypothetical protein of the plasmid pMEFER01 and *Methanococcales* group (16s rDNA gene) (see table S2) The thermal cycling protocol was as follows: 10 min at 95 °C then 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C.

Estimation of the copy number of each gene monitored by QPCR.

The copy numbers of each target gene were calculated for all the samples collected from cultures of *M. fervens* and from infected and non-infected cultures of *Methanocaldococcus* (Vigneron 2012). The following formula was used:

$$\begin{aligned} & \text{Copy number of gene per } \mu\text{l} \\ & = \frac{(\text{Avogadro number} \times [\text{ADN gene (g/l)}])}{(\text{Molar mass of dsDNA} \times (\frac{\text{genome size (pb)}}{\text{copy number of gene per genome}}))} \end{aligned}$$

The quantity of DNA for each sample was determined by comparison with standard curve.

Supporting figures

Fig. S1: Benzonase effect on free DNA preparation at different concentrations.



Fig. S2: MFV1 induction assays performed with BES on *M. fervens* and checked by flow cytometry. Typical growth curve of the host *M. fervens* is shown as filed circles on continuous black line. The production of MFV1 particles is shown as filed circles on dotted grey line. The growth curve under stress condition of the host *M. fervens* is shown as filed circles on continuous blue line. The production of MFV1 particles under stress condition is shown as filed circles on dotted blue line.

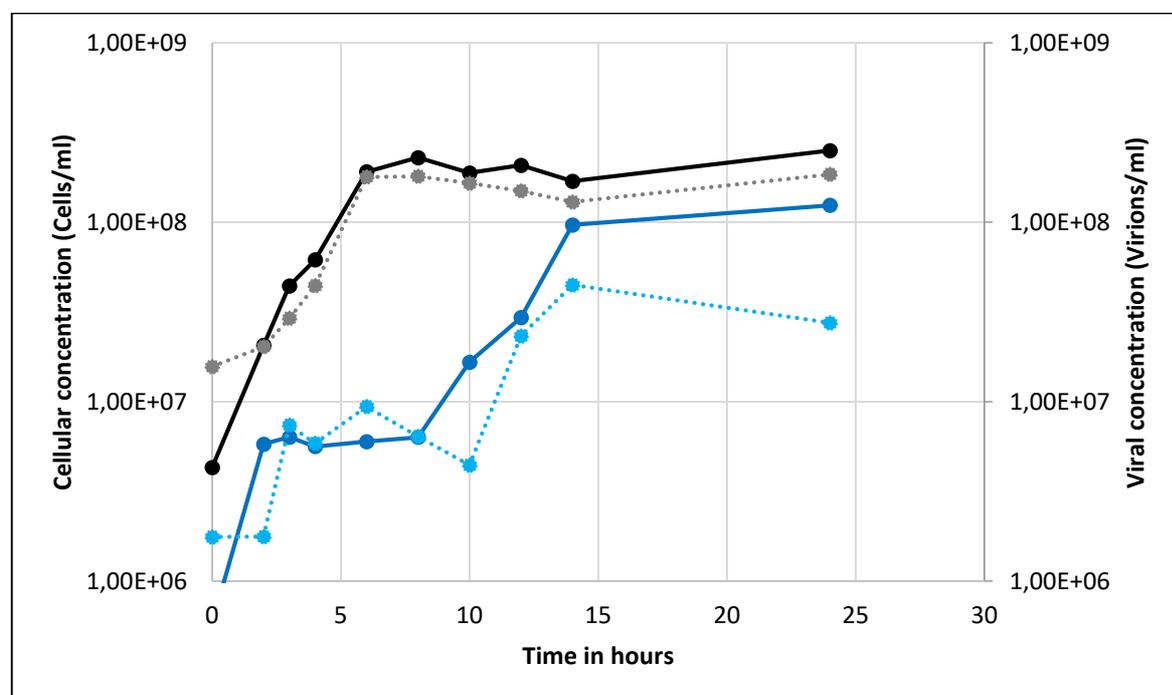


Fig. S3: MFV1 induction assays performed with copper on *M. fervens* and checked by flow cytometry. Typical growth curve of the host *M. fervens* is shown as filed triangles on continuous black line. The production of MFV1 particles is shown as filed squares on dotted grey line. The growth curve under stress condition of the host *M. fervens* is shown as filed squares on continuous red line. The production of MFV1 particles under stress condition is shown as filed circles on dotted orange line.

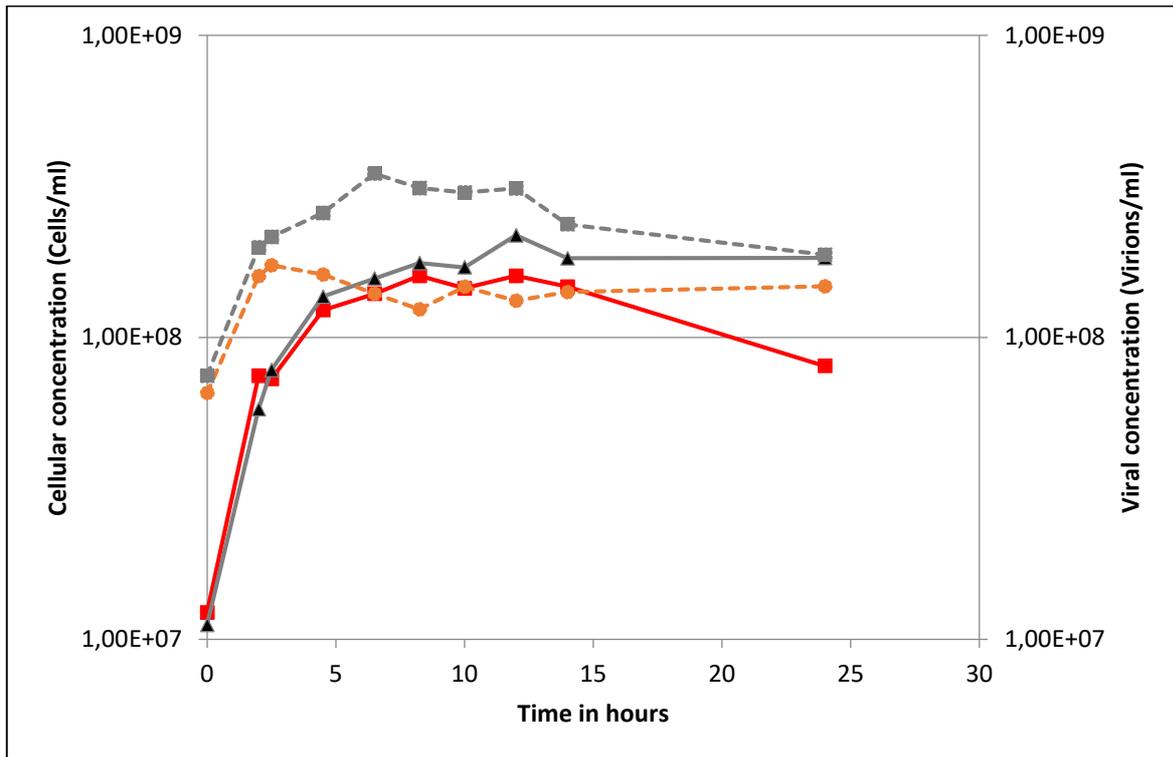


Fig. S4: MFV1 induction assays performed with H₂ deficiency on *M. fervens* and checked by flow cytometry. Typical growth curve of the host *M. fervens* is shown as filed diamond on continuous black line. The production of MFV1 particles is shown as filed squares on dotted grey line. The growth curve under stress condition of the host *M. fervens* is shown as filed triangles on continuous green line. The production of MFV1 particles under stress condition is shown as filed circles on dotted yellow line.

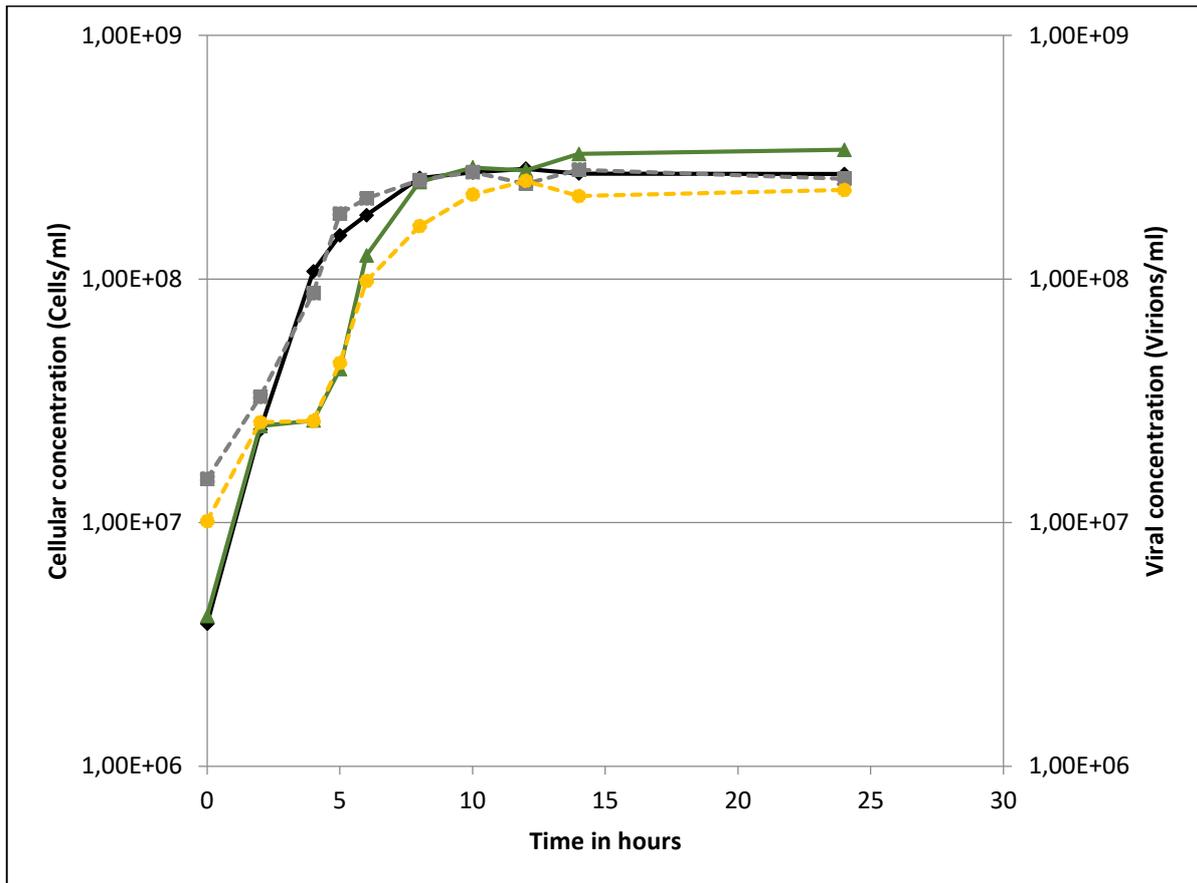
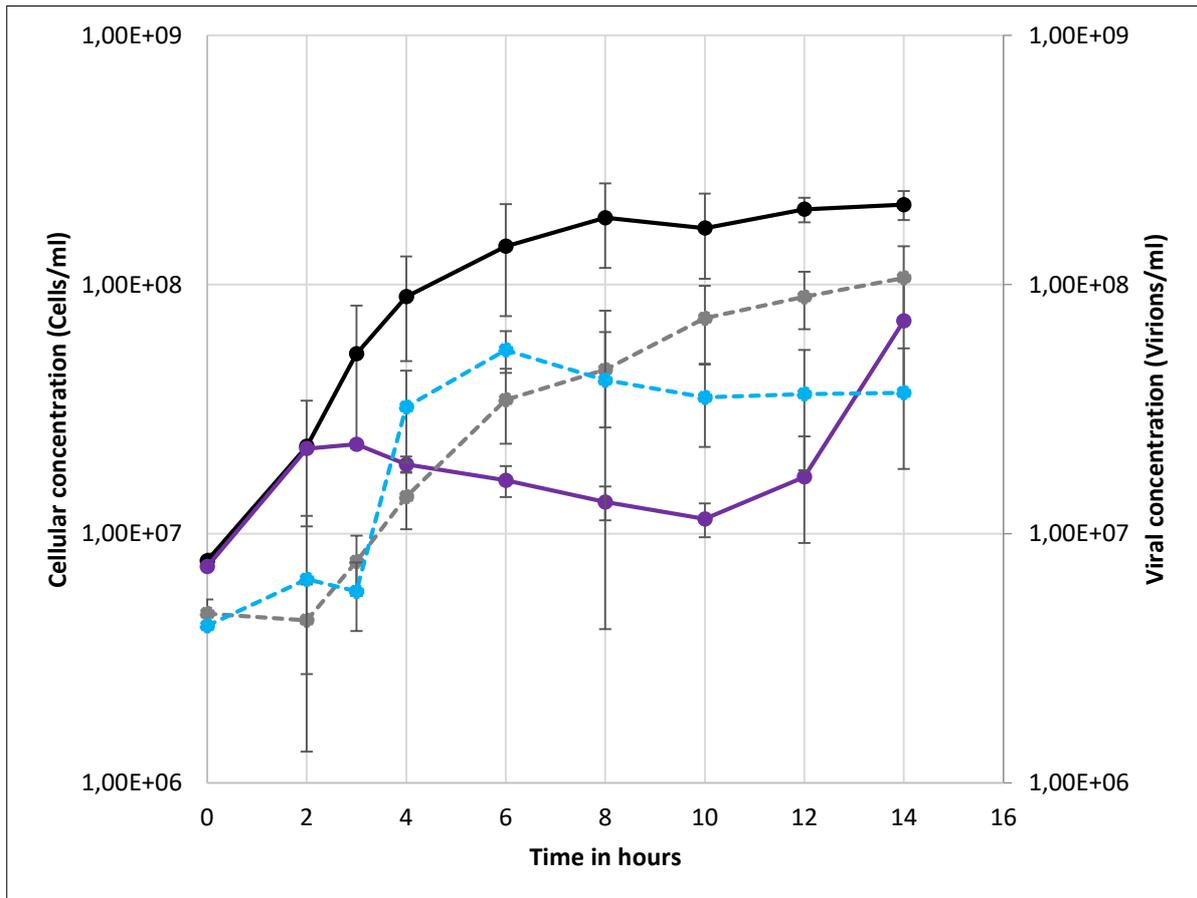


Fig. S5: MFV1 induction assays performed with UVs exposition on *M. fervens* and checked by flow cytometry. Typical growth curve of the host *M. fervens* is shown as filed circles on continuous black line. The production of MFV1 particles is shown as filed circles on dotted grey line. The growth curve under stress condition of the host *M. fervens* is shown as filed circles on continuous violet line. The production of MFV1 particles under stress condition is shown as filed circles on dotted blue line.



Chapitre II

Recherche de nouveaux systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

I. Présentation des travaux

II. Matériels et méthodes

A. Tests d'induction

B. Identification des souches de *Methanococcales*

III. Résultats

A. Recherche de virus chez des archées méthanogènes hyperthermophiles

B. *Methanocaldococcus jannaschii* JAL-1

C. *Methanocaldococcus vulcanius* M7^T

IV. Discussion et conclusions

A. Un réservoir de nouvelles espèces et de nouveaux éléments génétiques mobiles

B. De nouveaux couples méthanogènes hyperthermophiles-virus

I. Présentation des travaux

Ce deuxième chapitre découle du premier portant sur la caractérisation de virus de méthanogènes hyperthermophiles.

Suite aux différentes campagnes océanographiques auxquelles le laboratoire participe, de nombreuses souches isolées de différents sites hydrothermaux sont à disposition (Figure 2). Notamment, une étude de la structure des populations de *Methanocaldococcus jannaschii* a été réalisée sur une collection riche de 46 souches disponibles au laboratoire (UBOCC et collection IFREMER) et appartenant potentiellement à cette espèce. Un criblage en a été réalisé pour identifier des éléments génétiques mobiles, et plus particulièrement des virus. Le but premier de ce criblage était de rechercher de nouveaux systèmes hôte-virus. De plus, les souches non porteuses de provirus ou virus pourront servir de gamme d'hôtes pour des tests d'infections ultérieurs à mener sur des virus étudiés au laboratoire.

Par ailleurs, l'étude de Krupovic et ses collaborateurs en 2010 concerne plusieurs provirus détectés au sein de génomes de *Methanocaldococcus* et plus précisément les souches de référence : *Methanocaldococcus jannaschii* JAL-1 et *Methanocaldococcus vulcanius* M7^T (Krupovic *et al* 2010).

La première souche d'archée dont le génome a été séquencé est la souche de référence, *Methanocaldococcus jannaschii* JAL-1 (Jones *et al* 1983). Elle a été ainsi nommée en hommage à Holger Jannasch, le pionnier de la microbiologie des sources hydrothermales profondes. Cette souche de référence a été isolée d'un échantillon de cheminée hydrothermale collecté sur la ride Est-Pacifique (20° 50'N de latitude et 109° 06'W de longitude) à une profondeur de 2600 m. *M. jannaschii* est une archée appartenant au phylum *Euryarchaeota*, classée dans la famille *Methanocaldococcaceae*, et à l'ordre *Methanococcales*. C'est une archée anaérobie stricte, chimiolithotrophe, utilisant l'H₂ comme source d'énergie et le CO₂ comme source de carbone. Elle réalise la méthanogénèse en condition hyperthermophile. Les cellules de *M. jannaschii* sont en forme de coques irrégulières (environ 1,5 µm de diamètre), mobiles grâce à de multiples flagelles (Figure 1 - A). Ses *optima* de croissance sont une température de 85 °C (temps de doublement de 26 min), un pH de 6, une salinité de 2 à 3 % (m/v). La souche est piezotolérante. Enfin la croissance de cette souche est

stimulée par le sélénate-tungstate. Cette souche est phylogénétiquement la plus de proche de *M. fervens* AG86 (Bult *et al* 1996, Jones *et al* 1983). Elle possède également deux plasmides ECE1 et ECE2 (Lossouarn *et al* 2015a).

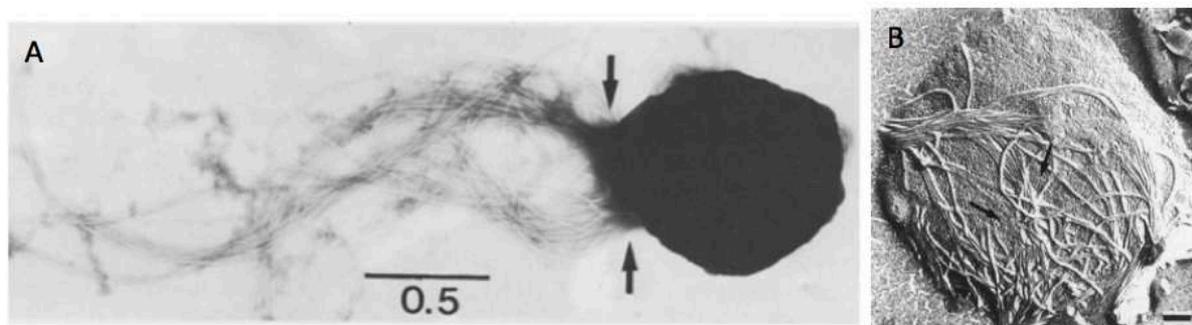


Figure 1 : A : *Methanocaldococcus jannaschii* JAL-1 en MET. Les flèches indiquent les deux lots de multiples flagelles situés à un pôle de la cellule. L'échelle représente 0,5 µm (Jones *et al* 1983). B : *Methanocaldococcus vulcanius* M7^T en MET. Les flèches indiquent les flagelles de la cellule. L'échelle représente 100 nm (Jeanthon *et al* 1999b).

La souche de référence, *Methanocaldococcus vulcanius* M7^T, a été isolée d'un échantillon de cheminée hydrothermale collecté sur la ride Est-Pacifique (13 °N) à une profondeur de 2600 m (Jeanthon *et al* 1999b). Très similaire à *M. jannaschii* JAL-1, c'est également une *Methanocaldococcus* hyperthermophile hydrogénotrophe. Les cellules de *M. vulcanius* M7^T sont en forme de coques (avec un diamètre de 1-3 µm) mobiles grâce à de multiples flagelles (Figure 1 - B). Ses *optima* de croissance sont une température de 80 °C (temps de doublement de 45 min), un pH de 6,5 et une salinité de 25 g/l. La souche est piezotolérante. Sa croissance est également stimulée par l'ajout d'extrait de levure et de sélénate tungstate, et inhibée par le chloramphénicol à une concentration de 75 µg/ml et la rifampicine à une concentration de 50 µg/ml. Cette souche est également phylogénétiquement proche de *M. jannaschii* JAL-1 et *M. fervens* AG86.

La recherche de particules virales a été menée sur ces deux souches de référence, dans le but d'étudier leurs morphologies, leurs cycles, leurs relations avec leur hôte et leur capacité d'infection. La caractérisation de ces nouveaux virus de méthanogènes hyperthermophiles associés aux sources hydrothermales océaniques profondes permettra d'améliorer les connaissances limitées de la virosphère abyssale et de les comparer aux virus déjà décrits pour cet écosystème.

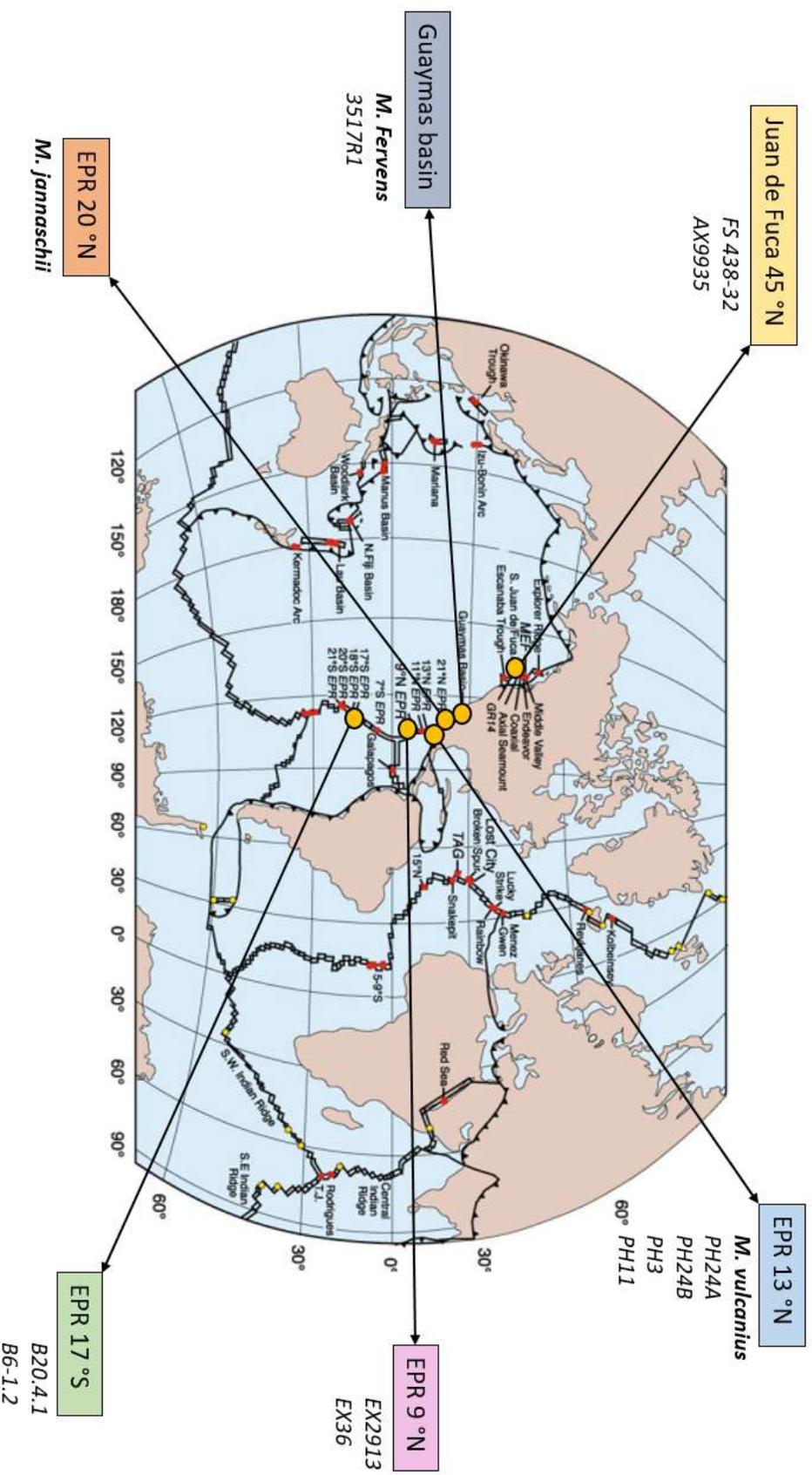


Figure 2 : Répartition géographique des sites d'échantillonnages de différentes souches plus particulièrement étudiées dans les travaux de thèse, les points jaunes représentent la localisation des sites d'échantillonnages. Carte reprise de (Flores and Reyssenbach 2011).

II. Matériels et méthodes

Les méthodes utilisées pour la plupart des expériences sont décrites dans la partie « Matériels et méthodes » (p. 135). Certaines techniques utilisées particulièrement pour ce volet du travail de thèse sont détaillées dans ce chapitre.

A. Tests d'induction

Des essais ont été réalisés dans le but d'induire la production virale par les souches *M. jannaschii* JAL-1 et *M. vulcanius* M7^T. Pour cela, des traitements physiologiques et chimiques ont été réalisés. *M. jannaschii* JAL-1 a subi deux tentatives d'induction de son potentiel virus à l'aide d'un agent chimique, la mitomycine C, et d'un agent physique basé sur des variations de températures de culture. *M. vulcanius* M7^T n'a subi qu'une tentative d'induction à l'aide de la mitomycine C. Tous les agents de stress testés ont été appliqués une fois le premier quart de la phase exponentielle de croissance atteint. Ce premier quart de la phase exponentielle de croissance se déroule en conditions optimales de culture pour chaque souche : 80 °C en étuve agitante (100 RPM).

- Pour l'**induction par des variations de températures de culture**, une fois le premier quart de la phase exponentielle atteint, les cultures sont incubées à température ambiante pendant 1 h puis elles sont replacées en conditions d'agitation à une température de culture sub-optimale (70 °C).
- Pour l'**induction à la mitomycine C**, une fois le premier quart de la phase exponentielle de croissance atteint, les cultures sont incubées à température ambiante pendant 30 min avant l'ajout de la mitomycine C à 10 µg/ml en concentration finale. Puis les cultures sont replacées en conditions d'agitation mais à 70 °C car la mitomycine C est un antibiotique généralement utilisé à des températures plus basses. De façon général, les antibiotiques sont peu stables à hautes température. Il a été choisi de faire un compromis entre la potentielle sensibilité de l'antibiotique aux hautes températures et la température de croissance optimale des souches étudiées. En effet, abaisser trop fortement la température de croissance des souches ajouterait un stress supplémentaire et ne leur permettrait pas de reprendre une croissance efficace après ajout de l'antibiotique.

- Des **cultures contrôles** sont réalisées en parallèle. Ces cultures se déroulent en conditions optimales de culture pendant 24 h : 80 °C avec agitation (100 RPM).

Des prélèvements de 250 µl de culture ont été réalisés tout au long des cinétiques de croissance et ce pendant 24 h. Ces échantillons ont été fixés au glutaraldéhyde (concentration finale de 0,5 %). Les prélèvements sont ensuite placés 15 min à 4 °C et plongés dans de l'azote liquide (« flashfreeze ») pour enfin être stockés à - 80 °C. Ces échantillons ont par la suite été analysés en cytométrie en flux comme décrit dans le matériels et méthodes général (p. 141).

B. Identification des souches de *Methanococcales*

1. Analyses en RFLP

Des analyses en RFLP (« Restriction Fragment Length Polymorphism ») ont été réalisées sur des préparations d'ADN total extrait des souches étudiées comme décrit dans l'étude de Jeanthon et collaborateurs (Jeanthon et al, 1999). L'enzyme de restriction utilisée dans ce chapitre est HhaI (Promega). L'ADN est ajouté à du tampon de restriction, de la BSA à des concentrations finales de 1 X et 2 U d'enzyme de restriction pour un volume réactionnel de 25 µl. La réaction 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 1 h 30 dans du tampon TAE 1 X.

2. Séquençage 16S par la société Genewiz

A partir des ADN extraits des souches d'intérêt, une réaction de PCR ciblant le gène ADNr 16S a été réalisée comme décrit dans le matériels et méthodes général (p.144). Le couple d'amorce utilisé est la suivant :

- **4F : TCCGGTTGATCCTGCCRG**
- **1492R : TACCTTGTTACGACTT**

Les produits de la réaction de PCR ont été envoyés à la société de séquençage Genewiz. Les séquences obtenues ont été comparées avec les séquences disponibles dans les banques de données (Genbank de NCBI) à partir des algorithmes d'alignement de séquences.

III. Résultats

A. Recherche de virus chez des archées méthanogènes hyperthermophiles

1. Criblage d'éléments génétiques mobiles chez des souches de méthanogènes hyperthermophiles

a. Les extractions d'ADN total et analyses PCR

Les 46 souches à disposition, regroupées dans le Tableau 1, ont chacune fait l'objet d'une extraction d'ADN total. La qualité de l'extraction d'ADN a été contrôlée pour chaque souche sur gel d'agarose (Figure 3). Les ADN extraits ont ensuite fait l'objet d'amplifications par PCR à l'aide des couples d'amorces MCP (protéine majeure de la capsid) et TMP (protéine virale impliquée dans la formation de la queue du virus) mises au point pour l'étude de MFV1. Le but était de déterminer, dans un premier temps, des souches négatives pour ces couples d'amorces afin de réaliser des essais d'infection de ces souches par MFV1. Dans un second temps, les souches se révélant positives pour les couples d'amorces utilisés ont fait l'objet d'études plus poussées pour vérifier une potentielle production de particules virales. La souche de référence de *M. jannaschii* a également fait l'objet d'une analyse PCR avec les mêmes couples d'amorces et elle s'est montrée négative pour la MCP et positive pour la TMP (Figure 4). La Figure 5, correspondant à l'un des gels de contrôle des produits PCR réalisés pour les souches étudiées, montre des exemples de résultats PCR obtenus. Après analyse PCR de l'ADN de chaque souche à disposition :

- 33 se sont révélées négatives pour la MCP et la TMP
- 2 se sont révélées positives pour la MCP et la TMP
- 5 se sont révélées négatives pour la MCP et positives pour la TMP (comme la souche de référence de *M. jannaschii*)
- 3 se sont révélées positives pour la MCP et négatives pour la TMP
- 1 reste sans résultat définitif.

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

Tableau 1 : Listes des souches utilisées pour le criblage PCR. En orange : les souches négatives pour la MCP et la TMP. En rouge : les souches positives pour la MCP et la TMP. En jaune : les souches négatives pour la TMP et positives pour la MCP. En vert : Les souches positives pour la MCP et négatives pour la TMP.

Souches	ADN	Amorces	Résultats	Campagne	Sites d'isolement
1461	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1462	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1463	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1464	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1466	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1467	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1468	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1469	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1472	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1473	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1474	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1475	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus 38</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus 5.2</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus 56</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH24 A</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH24 B</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH26</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH3</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH30</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus 23</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus 33</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH12</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH23</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH56</i>	OK	MCP/TMP	Nd	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH41</i>	OK	MCP/TMP	Pos/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH42</i>	OK	MCP/TMP	Pos/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH28</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Pos	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus PH11</i>	OK	MCP/TMP	Pos/Pos	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus B20.4.1</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus B6-1.2</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus 18.2</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus 16.1</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Pos	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus 17Meth20</i>	OK	MCP/TMP	Pos/Nég	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus B14-1.2</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Pos	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus EX28 140</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Extreme	East Pacific Ridge 9°N
<i>Methanocaldococcus EX2913</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Extreme	East Pacific Ridge 9°N
<i>Methanocaldococcus EX36</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	Extreme	East Pacific Ridge 9°N
<i>Methanocaldococcus EX06 143</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Pos	Extreme	East Pacific Ridge 9°N

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

Souches	ADN	Amorces	Résultats	Campagne	Sites d'isolement
<i>Methanocaldococcus MEF18</i>	NON	-	-	nd	Pacific ocean / Main Endeavour Fieldt / Juan de Fuca 45°N
<i>Methanocaldococcus MEF32</i>	NON	-	-	nd	Pacific ocean / Main Endeavour Fieldt / Juan de Fuca 45°N
<i>Methanocaldococcus FS 438-32</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	nd	Pacific ocean / Juan de Fuca 45°N
<i>Methanocaldococcus AX9935</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	nd	Pacific ocean /Axial Seamount / Juan de Fuca 45°N
<i>Methanocaldococcus 3517R1</i>	OK	MCP/TMP	Pos/Pos	nd	Pacific ocean / Gulf of California / Guaymas bassin 27°N
<i>Méthanogène 1357A</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Nég	nd	nd
<i>Méthanogène 1357B</i>	OK	MCP/TMP	Nég/Pos	nd	nd

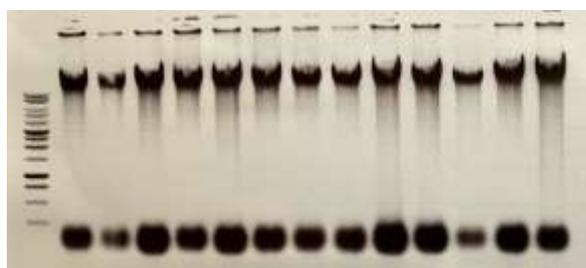


Figure 3 : Exemple d'ADN totaux extraits à partir des souches de méthanogènes hyperthermophiles criblés. De gauche à droite : Marqueur de taille 1 kb DNA ladder, Promega, souche 1461, souche 1462, souche 1463, souche 1464, souche 1466, souche 1467, souche 1468, souche 1469, souche 1472, souche 1473, souche 1474, souche 1475, *M. jannaschii* JAL-1 (souche de référence).

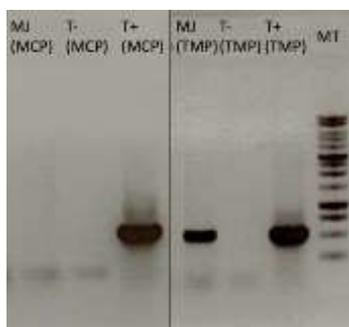


Figure 4 : Résultats PCR obtenus pour la souche de référence *M. jannaschii* JAL-1 pour les amorces MCP et TMP ciblant MFV1. Le marqueur de taille = 1 kb DNA ladder, Promega. Taille attendue des produits PCR pour la MCP = 519 pb et pour la TMP = 536 pb.



Figure 5 : Exemples de résultats PCR pour la TMP pour les souches EX 06, EX 28 140, 3517R1, 17Meth20 et B14-1.2.

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

Les souches se révélant négatives pour la MCP et la TMP ont servi d'hôtes potentiels pour des tests d'infection. Deux lots de souches double-négatives ont été réalisés et testés en infection. Chaque lot contient les souches mises en commun en une co-culture (Tableau 2 et Tableau 3). Certaines de ces souches ayant été utilisées lors de test d'infection du virus MFV1 ont fait l'objet d'un séquençage 16S pour déterminer leur genre (Cf p. 200). Les souches se révélant positives pour la MCP et la TMP ont fait l'objet d'un séquençage 16S et complet pour déterminer à quelle espèce elles appartenait. De plus, la recherche de particules virales a été menée.

Tableau 2 : Souches négatives pour la MCP et la TMP regroupées dans le lot n° 1.

Souches du lot n° 1	Amorces	Résultats PCR	Campagne	Localisation
1461	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1462	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1463	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1464	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1466	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1467	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1468	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1469	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1472	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1473	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1474	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N
1475	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N

Tableau 3 : Souches négatives pour la MCP et la TMP regroupées dans le lot n° 2. En jaune : les souches positives pour les amorces ciblant le plasmide pMERFER01 porté par la souche *M. fervens*.

Souches du lot n° 2	Amorces	Résultats PCR	Campagne	Localisation	Amorces	Résultats PCR
1357A	MCP/TMP	Nég/Nég	nd	nd	Protéine plasmidique hypothétique	-
<i>Methanocaldococcus</i> 56	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N	Protéine plasmidique hypothétique	-
<i>Methanocaldococcus</i> AX9935	MCP/TMP	Nég/Nég		Pacific Ocean /Axial Seamount / Juan de Fuca 45°N	Protéine plasmidique hypothétique	-
<i>Methanocaldococcus</i> B20.4.1	MCP/TMP	Nég/Nég	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S	Protéine plasmidique hypothétique	-
<i>Methanocaldococcus</i> B6-1.2	MCP/TMP	Nég/Nég	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S	Protéine plasmidique hypothétique	+
<i>Methanocaldococcus</i> EX2913	MCP/TMP	Nég/Nég	Extreme	East Pacific Ridge 9°N	Protéine plasmidique hypothétique	+
<i>Methanocaldococcus</i> FS 438-32	MCP/TMP	Nég/Nég		Pacific ocean /Juan de Fuca 45°N	Protéine plasmidique hypothétique	-
<i>Methanocaldococcus</i> PH24 A	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N	Protéine plasmidique hypothétique	-
<i>Methanocaldococcus</i> PH24 B	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N	Protéine plasmidique hypothétique	-
<i>Methanocaldococcus</i> PH3	MCP/TMP	Nég/Nég	Phare	East Pacific Ridge 13°N	Protéine plasmidique hypothétique	-

b. Analyses RFLP des souches d'intérêts

L'étude du Dr Jeanthon, et ses collaborateurs, publiée en 1999 a permis de mettre au point une méthode rapide pour l'identification de *Methanococcales* hyperthermophiles isolées de sources hydrothermales océaniques profondes (Jeanthon *et al* 1999a). Cette méthode est basée sur des analyses en RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et sur la comparaison de profils de restriction. A partir de cette étude, l'utilisation de l'enzyme de restriction HhaI a pu être déterminée pour obtenir des profils de restriction distinctifs. Nous avons utilisé cette approche pour chacune de nos souches d'intérêts afin de les comparer.

Parmi les 46 méthanogènes hyperthermophiles, certaines ont présenté un intérêt. En effet les différences observées lors du criblage PCR avec la souche *M. jannaschii* JAL-1 suggèrent que celles-ci pourraient être de nouvelles espèces à caractériser et à étudier dont certaines pourraient être impliqués dans des systèmes hôte-virus :

- PH11 et 3517R1 qui sont deux souches doubles positives pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1
- 1357A et 1357B qui sont deux souches non assignées à une espèce de méthanogène hyperthermophile connue.

Ainsi, les souches *M. jannaschii* JAL-1 et *M. fervens* AG86 servant de témoins positifs, les souches 3517R1 et 1357B ont montré un profil de restriction identique à celui de *M. jannaschii* JAL-1. Les souches PH11 et 1357A ont révélé des profils différents de *M. jannaschii* JAL-1 et *M. fervens* AG86. PH11 ne montre pas de profil de restriction typique des souches connues et étudiées dans le travail de Jeanthon et son équipe. 1357A semble présenter un profil similaire à celui que l'on pourrait obtenir avec la souche *Methanotorris igneus* (Figure 6). L'identification par le séquençage est nécessaire à ce stade pour déterminer si ces souches sont de potentielles nouvelles espèces de méthanogènes hyperthermophiles. Les souches 1357A, PH11 et 3517R1 ont notamment fait par la suite l'objet d'un séquençage 16S par la société Genewiz et d'un séquençage complet par le Génoscope.

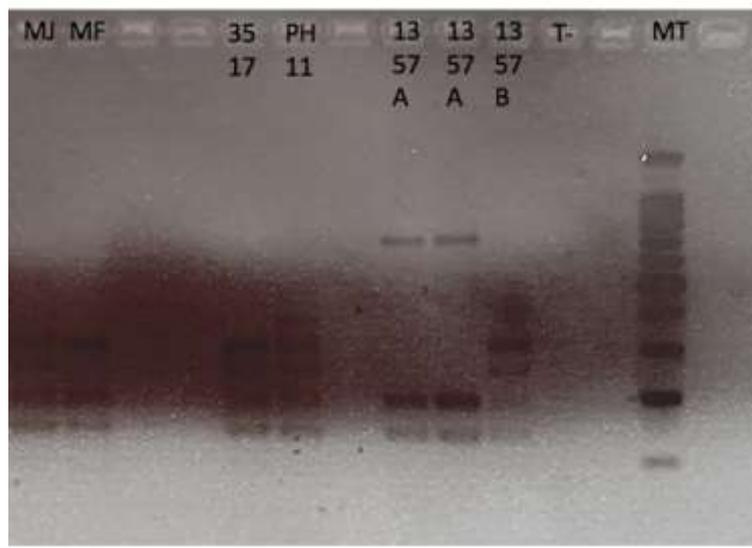


Figure 6 : Profils RFLP obtenus après digestion avec HhaI pour les souches MJ = *M. jannaschii* JAL-1 ; MF = *M. fervens* ; 3517R1, PH11, 1357A et 1357B. Le marqueur de taille est le 100 bp DNA ladder de Promega.

c. Séquençage

Les profils RFLP de certaines souches parmi les 46 souches à disposition semblent différer de la souche de référence *M. jannaschii* JAL-1. Parmi elles se trouvent donc de potentielles souches d'intérêt, et notamment de potentiels hôtes à infecter voire de nouvelles espèces à caractériser.

Séquençage 16S

Certaines souches ont fait l'objet d'un séquençage du gène ADNr 16S par la société Genewiz (Tableau 4):

- Les 4 souches ayant servi aux tests d'infectiosité de MFV1 (cf. Chapitre 1 p.150) (gris dans le tableau)
- La souche 1357A, dont le profil de restriction diffère de celui de la souche de référence JAL-1 et qui représente potentiellement une nouvelle espèce (jaune dans le tableau)
- PH11 et 3517R1, qui sont deux souches doubles positives pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1 (rouge dans le tableau)

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

Tableau 4 : Souches transmises à Genewiz pour un séquençage 16S.

Souche	Campagne	Site d'isolement	Intérêts
FS 438-32	-	Juan de Fuca 45°N	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1 et faisant partie du lot n° 2 de souches utilisées pour les tests d'infection
PH3	PHARE	East Pacific Ridge 13°N	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1 et faisant partie du lot n° 2 de souches utilisées pour les tests d'infection
PH24A	PHARE	East Pacific Ridge 13°N	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1 et faisant partie du lot n° 2 de souches utilisées pour les tests d'infection
PH24B	PHARE	East Pacific Ridge 13°N	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1 et faisant partie du lot n° 2 de souches utilisées pour les tests d'infection
1357A	-	-	Profil de restriction différent de celui de <i>M. jannaschii</i> – potentielle nouvelle espèce ?
PH11	PHARE	East Pacific Ridge 13°N	Double positive pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1
3517R1	-	Guaymas bassin	Double positive pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1 / Même site d'isolement que <i>M. fervens</i>

Les souches **FS 438-32** et **PH3** possèdent des séquences 16S trouvant une correspondance dans les bases de données à plus de 99 % de similarités avec les souches (du plus au moins similaire) : FS426-22, *Methanocaldococcus bathoardescens* JH146 et *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661.

Les souches **PH24A** et **PH24B** possèdent des séquences 16S trouvant une correspondance dans les bases de données à plus de 99 % de similarités avec les souches (du plus au moins similaire) : *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661(T), *Methanocaldococcus fervens* AG86 et *Methanocaldococcus bathoardescens* JH146.

Ce lot de souches ayant servi à l'infection contient donc différentes espèces de *Methanocaldococcus* hyperthermophiles.

1357A, représentant une potentielle nouvelle espèce à caractériser, trouve une correspondance dans les bases de données à plus de 98 % de similarités avec les souches (du plus au moins similaire) : *Methanotorris igneus* Kol 5 et *Methanotorris formicicus* Mc-S-70.

Cette souche appartient au genre *Methanotorris*, qui contient des espèces hyperthermophiles.

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

Pour la souche **3517R1**, il n'a pas été possible de lier les séquences « forward » et « reverse » suggérant que la culture ne serait pas pure. La séquence « forward » trouve une correspondance à 95 % avec des archées incultivées et *Methanocaldococcus bathoardescens*. La séquence « reverse » n'a pas pu être amplifiée correctement. La souche **PH11** présente des séquences qui trouvent des similarités à seulement 91 % avec des *Methanocaldococcus*. Les résultats du séquençage 16S n'a donc pas permis de déterminer l'appartenance de ces souches à un genre en particulier.

Les données de séquençage 16S ont permis de trouver des similarités fortes (supérieures à 98 %) entre nos souches et des espèces connues de *Methanocaldococcus* et *Methanotorrus*. Si ces similarités permettent d'affirmer que ces souches appartiennent bien à ces deux genres, l'espèce de ces souches ne peut pas être déterminée sur ces seules données. Des similarités de séquence inférieures à 98 % indiquent des espèces différentes, mais des similarités de séquence supérieures à 98 % ne sont pas suffisantes pour affirmer que deux souches appartiennent à la même espèce (Lyu and Liu 2018). Un séquençage complet de ces souches est nécessaire pour confirmer l'appartenance à une espèce.

Séquençage complet

Certaines souches présentant un intérêt parmi les 46 à disposition ont également fait l'objet d'un séquençage par le Génoscope (Tableau 5) dans le cadre de l'ERC Evomobil porté par P. Forterre. Ce sont notamment :

- 2 souches positives pour la MCP et la TMP de MFV1 (rouge sur le tableau)
- 2 souches présentant le même profil PCR que la souche de référence de *M. jannaschii* et isolées de différents sites et de campagnes différentes (vert sur le tableau)
- 4 souches négatives pour la MCP et la TMP de MFV1 qui proviennent de différents sites et de campagnes différentes (gris dans le tableau)
- 1 souche présentant un profil de restriction différent de celui de la souche de référence de *M. jannaschii* et qui pourrait représenter une nouvelle espèce potentielle (jaune dans le tableau)

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

Tableau 5 : Souches envoyées à séquencer au Génoscope.

Souche	Campagne	Site d'isolement	Intérêts
EX06 143	Extreme	East Pacific Ridge 9°N	Mêmes résultats PCR pour les amorces MCP et TMP ciblant MFV1 que la souche de référence de <i>M. jannaschii</i>
EX36	Extreme	East Pacific Ridge 9°N	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1
PH11	PHARE	East Pacific Ridge 13°N	Double positive pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1
3517R1	-	Guaymas bassin	Double positive pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1 / Même site d'isolement que <i>M. fervens</i>
B20.4.1	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1
1357A	-	-	Profil de restriction différent de celui de <i>M. jannaschii</i> – potentielle nouvelle espèce ?
16.1	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S	Mêmes résultats PCR pour les amorces MCP et TMP ciblant MFV1 que la souche de référence de <i>M. jannaschii</i>
5.2	PHARE	East Pacific Ridge 13°N	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1
1461	PHARE	East Pacific Ridge 13°N	Double négative pour les amorces ciblant la MCP et la TMP de MFV1

Les résultats de séquençage sont en cours et devraient aboutir avant la fin de l'année. Ces résultats devraient mettre en évidence de nouvelles espèces de méthanogènes voire de nouveaux systèmes hôte-virus. Ces nouveaux systèmes hôte-virus présentent un intérêt dans nos études d'exploration de la diversité virale des sources hydrothermales océaniques profondes. Des études préliminaires de ces potentiels nouveaux couple hôte-virus ont été réalisés à l'aide d'observations microscopique en MET et d'estimation de l'abondance des cellules et des VLPs en cytométrie en flux.

d. Observation en microscopie électronique à transmission

Des fractions concentrées ont été réalisées à partir de cultures des deux souches s'étant révélées positives pour la MCP et la TMP : 3517R1 et PH11. Ces fractions ont été observées en microscopie électronique en transmission pour rechercher de potentielles particules de type viral.

Les fractions concentrées obtenues à partir de cultures des souches 3517R1 et PH11 n'ont pas permis de mettre en évidence une production de particules de type viral (Figure 7).

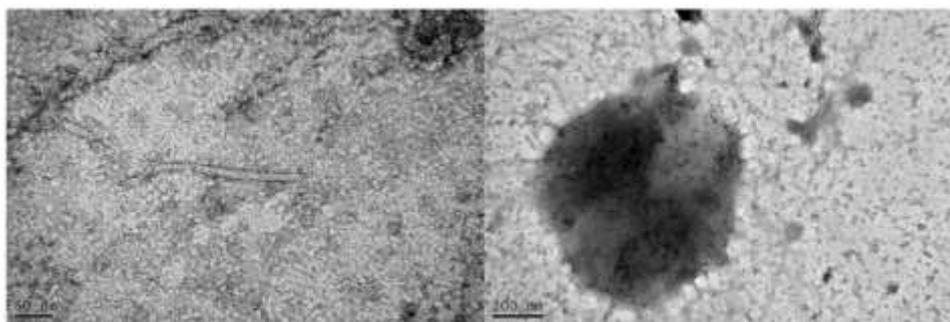


Figure 7 : Observation en MET d'une fraction concentrée obtenue à partir de cultures de la souche 3517R1.

e. Cytométrie en flux

Les souches 3517R1 et PH11 ont également fait l'objet d'analyse en cytométrie en flux. 3517R1 permet l'observation d'une fenêtre virale bien visible sur les cytogrammes (Figure 8). Les courbes obtenues pour la souche et son potentiel virus en condition classique de culture montrent une croissance rapide de la souche qui atteint un plateau à partir de 5 h d'incubation, avec une concentration cellulaire de $1,82 \cdot 10^8$ cellules/mL. La concentration virale maximale semble élevée puisqu'elle atteint $1,24 \cdot 10^8$ virions/mL à 15 h de culture (Figure 9).

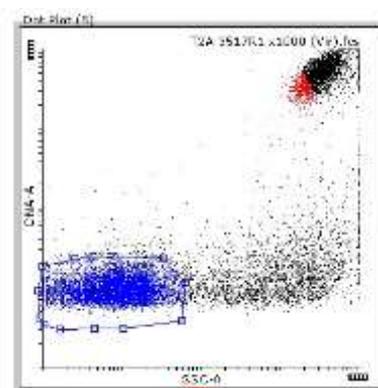


Figure 8 : Cytogramme obtenu en cytométrie en flux à partir d'échantillon de culture de 3517R1. En bleu : fenêtre virale. Les archées sont visibles en haut à droite du cytogramme.

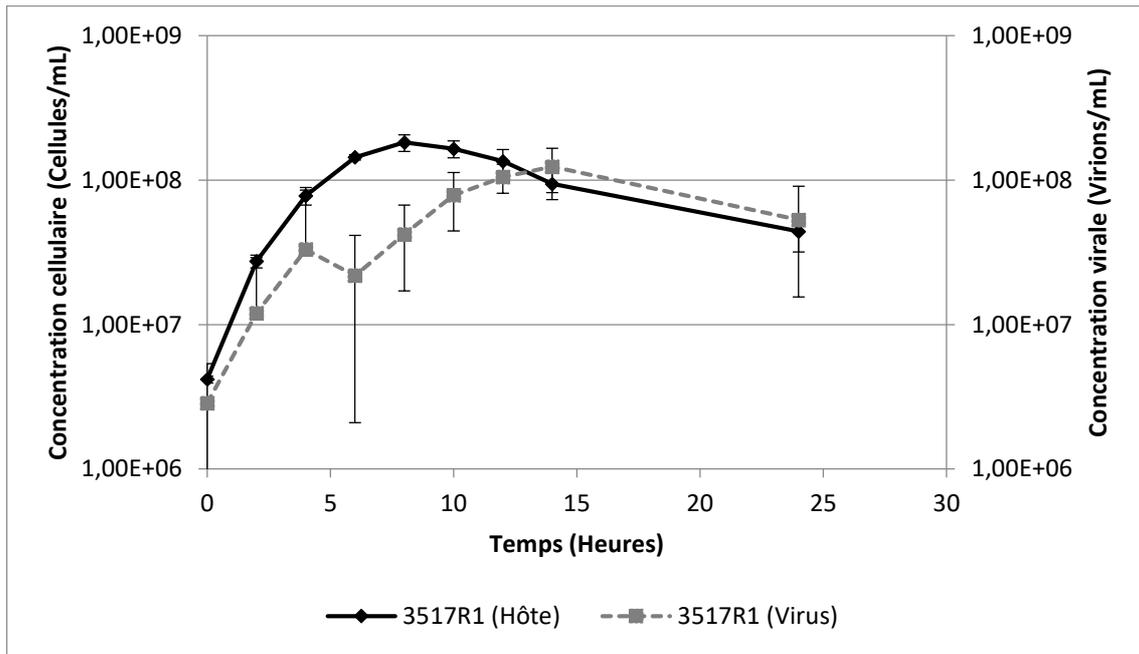


Figure 9 : Cinétique de croissance hôte-virus en condition classique de culture de la souche 3517R1 analysée en cytométrie en flux.

L'analyse en cytométrie de la souche PH11 ne permet pas l'observation d'une fenêtre virale caractéristique (Figure 10). Les courbes obtenues pour cette souche et son potentiel virus en conditions optimales de culture montrent une croissance rapide de la souche qui atteint un plateau à partir de 6 h de culture avec une concentration cellulaire de $1,59 \cdot 10^8$ cellules/mL. La concentration virale maximale semble stable avec $1,25 \cdot 10^7$ virions/mL à 10 h de culture ce qui est similaire à la concentration de départ ($9,31 \cdot 10^6$) (Figure 11). Le comportement des VLPs détectées est chaotique tout au long de la cinétique.

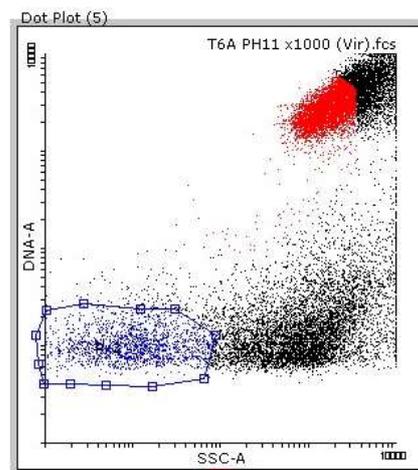


Figure 10 : Cytogramme obtenu en cytométrie en flux à partir d'échantillon de culture de PH11. En bleu : fenêtre virale. Les archées sont visibles en haut à droite du cytogramme

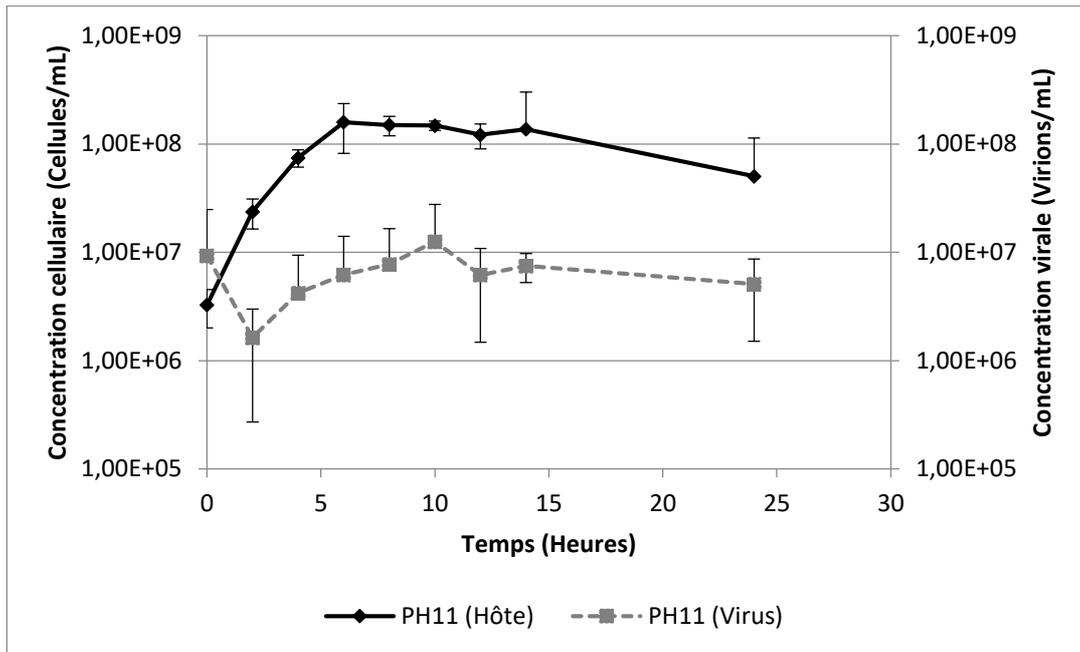


Figure 11 : Cinétique de croissance hôte-virus en condition classique de culture de la souche PH11 analysée en cytométrie en flux.

Les résultats préliminaires obtenus suite au criblage moléculaire (séquençage du gène ADNr 16S et amplification des gènes codant la MCP et TMP) de souches de méthanogènes suggèrent de potentielles nouvelles espèces et de nouveaux systèmes hôtes-virus à caractériser et étudier. Néanmoins, les résultats obtenus après cultures, essais de concentration de particules virales et suivi de cinétiques hôtes-virus n'ont pas permis de confirmer la présence de virions. Les fenêtres « virales » observées en cytométrie peuvent en effet correspondre à d'autres types de particules comme des vésicules membranaires par exemple.

Ces données représentent une base d'informations et une ressource matérielle intéressante pour l'étude de systèmes hôte-virus potentiels impliquant des souches de méthanogènes.

B. *Methanocaldococcus jannaschii* JAL-1

La souche de référence, *M. jannaschii* JAL-1, possède un provirus intégré à son génome. L'analyse de la séquence génomique (Krupovic *et al* 2010) de cet élément génétique sous sa forme intégrée indique une synténie forte avec les provirus de *M. fervens* et *M. jannaschii* JAL-1. Ces deux provirus, nommés Mjan-Pro1 et Mfer-Pro1, possèdent deux régions, révélant une forte homologie, séparées par une région très variable. Ils partagent la plupart des gènes codant pour des protéines de structure virale et pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN. Ces gènes sont retrouvés dans les régions homologues chez ces deux provirus. L'identité moyenne entre les gènes de Mjan-Pro1 et Mfer-Pro1 est de 63,8 %. Les gènes de structure retrouvés au sein de ces deux provirus laissent suggérer la production de caudovirus. En effet, l'étude du virus de *M. fervens* a confirmé la morphologie tête-queue prédite lors de l'analyse faite par Mart Krupovic et ses collaborateurs. Des résultats similaires sont raisonnablement attendus pour ce nouveau virus de *Methanocaldococcus*. Cependant, les amorces ciblant la MCP de MFV1, le virus de *M. fervens*, n'ont pas permis d'obtenir un signal en PCR à partir de l'ADN total extrait de *M. jannaschii* JAL-1. Il semble donc qu'il existe des différences dans la séquence codant pour la MCP de MFV1 et du virus de *M. jannaschii*. Ces différences pourraient se répercuter sur la morphologie de la capsid de ce dernier.

1. Culture de la souche et comptage en cellule de Thoma

Des cultures inoculées à différents pourcentages (1, 2 et 4 %) ont été réalisées afin d'optimiser les cultures de *M. jannaschii* JAL-1. Le pourcentage d'inoculation ne semble pas influencer la qualité de la croissance cellulaire qui dépasse rapidement des concentrations de 10^8 cellules/ml (6 h de culture) (Figure 12).

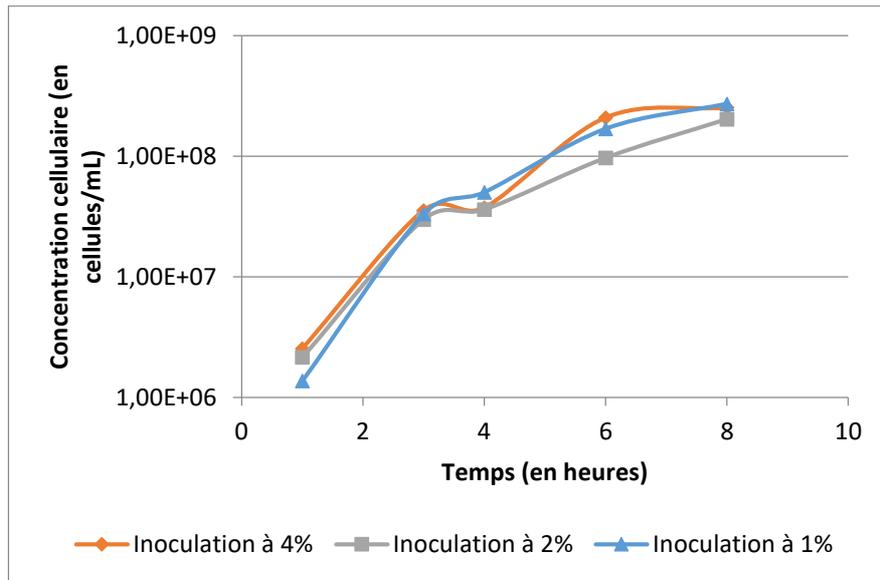


Figure 12 : Cinétique de croissance en condition optimale de culture de la souche *M. jannaschii* JAL-1 obtenue par un comptage sur cellule de Thoma.

2. Purification de particules de type viral en gradient d'iodixanol

A partir de culture de *M. jannaschii* JAL-1, plusieurs tentatives de purification de particules de type viral ont été effectuées en gradient d'iodixanol. Les fractions qui ont fait l'objet d'observation en microscopie électronique en transmission et qui ont donné des résultats intéressants se situent entre 25 % et 35 % d'iodixanol (Figure 13).

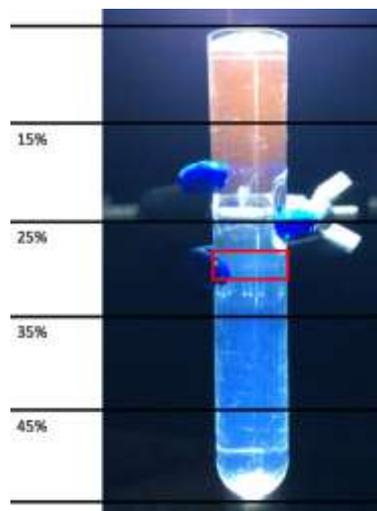


Figure 13 : Gradient de purification obtenu suite au dépôt d'une solution virale concentrée réalisé à partir de culture de *M. jannaschii* JAL-1. Le pourcentage d'iodixanol est indiqué par les lignes noires et la fraction correspondant à la fraction virale purifiée est indiquée avec un cadre rouge.

a. Observation de particules virales en microscopie électronique en transmission

Les fractions purifiées obtenues en gradient d'iodixanol ont été déposées sur des grilles adaptées à l'observation en microscopie électronique en transmission. Des particules en faibles quantités ont pu être détectées. Elles présentent une morphologie tige-boucles avec une tige flexible s'apparentant à une queue de siphovirus d'environ 200 nm prolongée d'une boucle à chaque extrémité (Figure 14). La taille homogène et la flexibilité de la tige laisse suggérer que cette morphologie pourrait s'apparenter à des virus filamenteux d'archées appartenant à la famille *Tristromaviridae* (Figure 15 - (Rensen *et al* 2016)). Ces structures tige-boucles que nous avons observées pourraient également être une caractéristique unique et permettrait d'envisager une morphologie virale d'un nouveau type. Des tentatives de concentration et de purification de ces particules de type viral en plus grande quantité semblent nécessaires pour confirmer cette nouvelle morphologie.

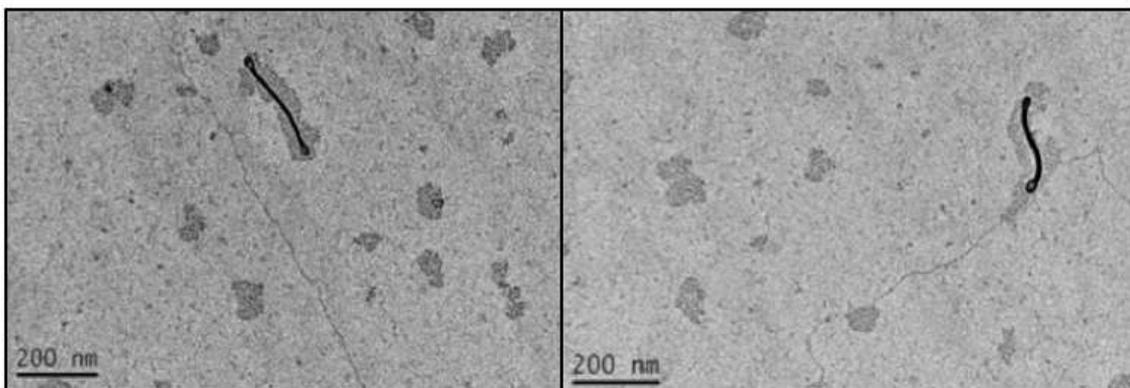


Figure 14 : Observations en MET de solutions purifiées de particules de type viral obtenues à partir de *M. jannaschii* JAL-1.

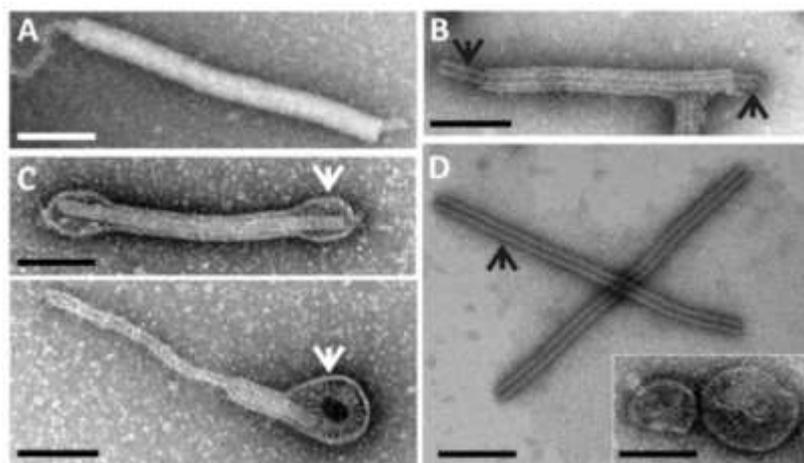


Figure 15 : PFV1 en microscopie électronique en transmission. A : Morphologie des virions natifs. B : Virion endommagé par lors de la purification. C : Virions traités avec du Tween-20, les flèches blanches indiquent une enveloppe. D : Virions traités avec du Triton X-100. Les flèches noires indiquent une capsid nucléaire en hélice (Rensen *et al* 2016).

b. Estimation de la production virale en microscopie à épifluorescence

La faible quantité de particules virales observées en MET laisse suggérer une production virale basale plutôt faible par *M. jannaschii* JAL-1. Une première estimation de cette production a été réalisée en microscopie à épifluorescence à partir de fractions concentrées issues de cultures en grands volumes. Une concentration de $7 \cdot 10^{10}$ VLPs/ml a été déterminée (Figure 16). En comparaison, une fraction concentrée issue de cultures de *M. fervens* permet l'observation d'une concentration de $2 \cdot 10^{12}$ VLPs/ml. De plus, cette technique génère des faux positifs puisque certains points (les acides nucléiques marqués au SYBR Green) peuvent révéler la présence de vésicules membranaires contenant de l'ADN chromosomique, plasmidique ou encore viral.

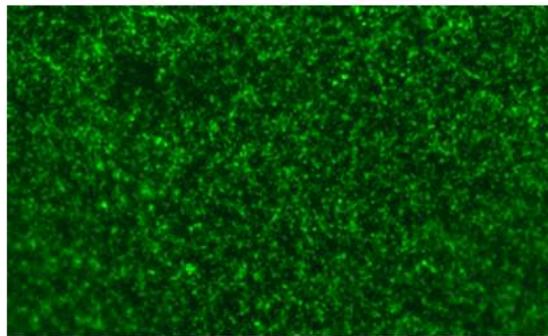


Figure 16 : Observation d'une solution virale concentrée de VLPs obtenue à partir de cultures de *M. jannaschii* JAL-1 en microscopie à épifluorescence. Dilution 1000.

3. Relation hôte-virus : cytométrie en flux

Une estimation plus précise de la production basale de virions par *M. jannaschii* JAL-1 a été réalisée par des analyses en cytométrie en flux. Celles-ci permettent également de mieux comprendre le type de relation établie entre le virus et son hôte.

Une première cinétique de croissance hôte-virus en conditions optimales, a permis de montrer une croissance de l'hôte rapide avec une phase stationnaire atteinte dès 8 h de culture avec une concentration cellulaire de $1,39 \cdot 10^8$ cellules/ml. La production virale semble assez élevée puisqu'elle atteint au maximum $2,40 \cdot 10^8$ virions/ml à 12 h de culture (Figure 17).

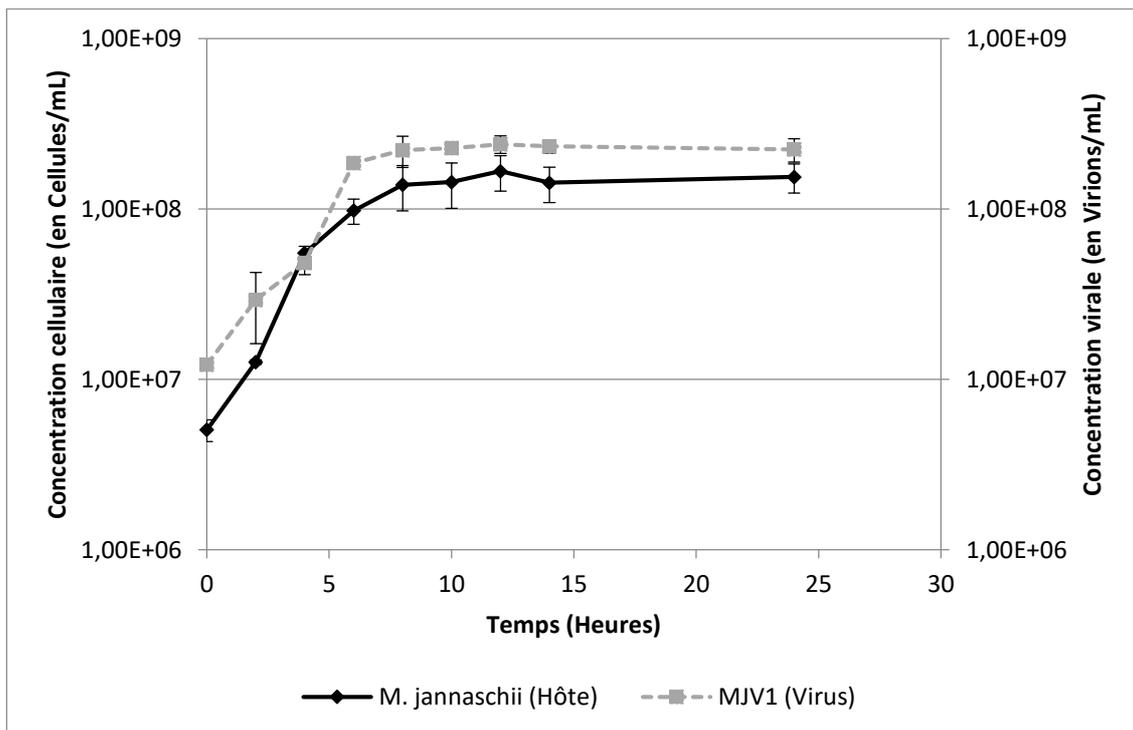


Figure 17 : Cinétique de croissance hôte-virus en conditions optimales de culture de *M. jannaschii* JAL-1 analysée en cytométrie en flux.

Des essais d'induction de la production virale ont été réalisés à l'aide de stress physiologique, avec des variations de températures de culture, et chimique, avec l'utilisation de la mitomycine C. Cependant, les résultats ne semblent pas pouvoir être corrélés avec ceux obtenus lors de la première analyse en cytométrie en flux (Figure 17). Les cinétiques en conditions de stress réalisées présentent, en effet, des productions basales très basses et dont l'évolution est « chaotique ».

Les **variations de températures** appliquées sur les cultures de *M. jannaschii* JAL-1 semblent légèrement impacter la croissance cellulaire. Des concentrations d'environ 10^8 cellules/ml sont obtenues plus tardivement (10h30 de culture). La production virale n'est pas induite par le stress et est comparable à celle observée pour les conditions optimales (Figure 18).

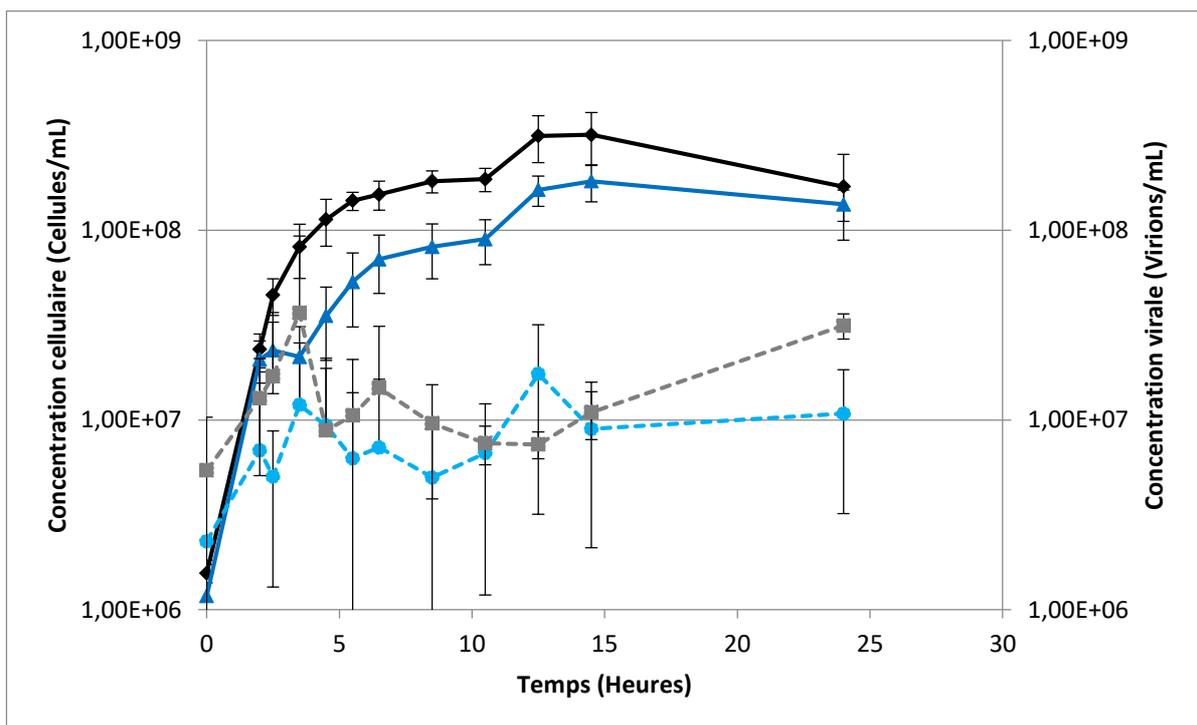


Figure 18 : Comparaison de cinétiques de croissance hôte-virus en condition optimale de culture (hôte en noir et virus en gris) et en condition de stress induit par des variations de températures de culture (hôte en bleu foncé et virus en bleu clair) de *M. jannaschii* JAL-1. Les analyses sont réalisées en cytométrie en flux.

Des résultats similaires sont observés pour le **stress à la mitomycine C**. Les cultures sont plus impactées et l'effet de la mitomycine C semble avoir lieu après la reprise de croissance cellulaire (incubation des cultures à 70 °C à partir de 2h30 de culture). Il est raisonnable de penser que la mitomycine C agit pendant ce temps puisque cette reprise de croissance (métabolisme cellulaire actif) est suivie par une lyse. Cette lyse est d'ailleurs suivie d'une reprise de la croissance quelques heures plus tard. Cette lyse cellulaire est observée entre 5h30 et 6h30 de culture. La concentration cellulaire passe de $1,79 \cdot 10^8$ cellules/ml à $5,02 \cdot 10^7$ cellules/ml et reste stable par la suite (Figure 19).

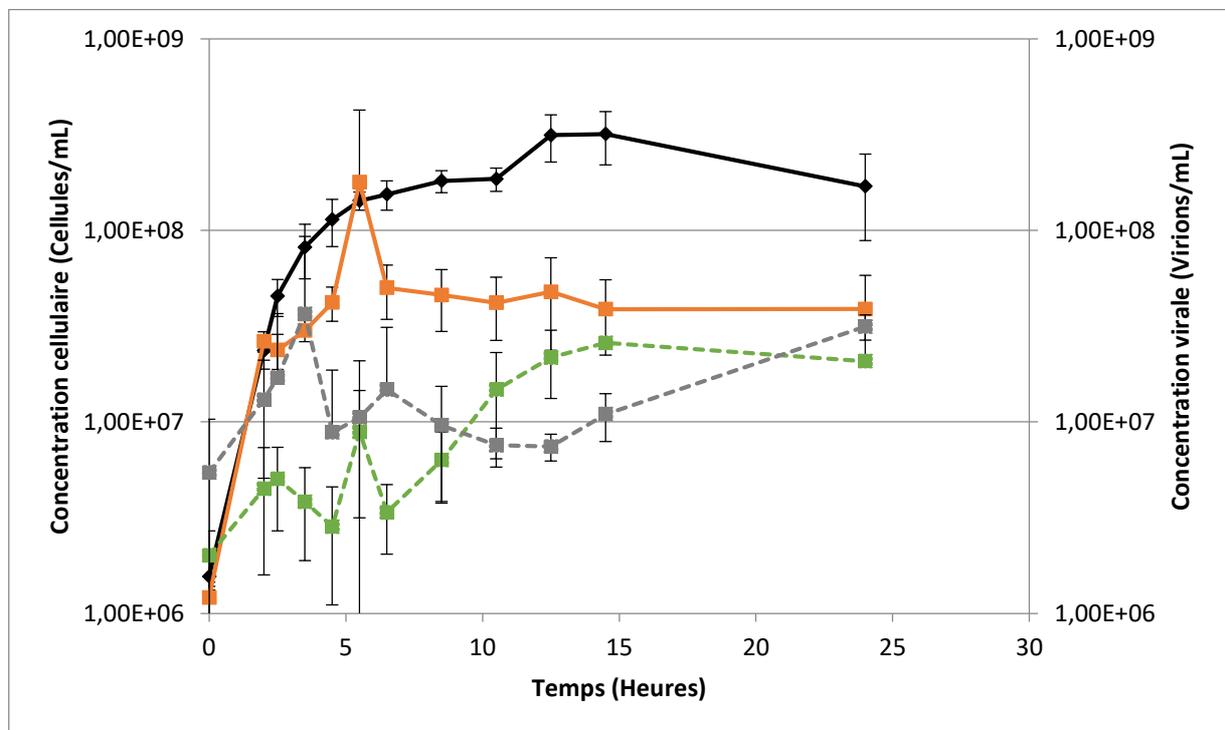


Figure 19 : Comparaison de cinétique de croissance hôte-virus en conditions optimales de culture (hôte en noir et virus en gris) et en condition de stress induit par la mitomycine C (hôte en orange et virus en vert) de *M. jannaschii* JAL-1. Les analyses sont réalisées en cytométrie en flux.

Classiquement, cette réponse à un stress chez l'hôte permet l'induction de la production virale. Ce n'est pas ce qui a été observé pour ces premières tentatives d'induction.

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

L'interprétation de ces résultats n'est pas évidente. En effet, la cinétique utilisée comme contrôle de expérience, donc le témoin pour les tentatives d'induction à la mitomycine C et par des variations de température qui est une cinétique obtenue en conditions optimales, ne montre pas les mêmes résultats que la cinétique hôte-virus précédente obtenue, également en conditions optimales (Figure 17). La croissance cellulaire de ce contrôle semble s'être déroulée correctement puisque des concentrations de 10^8 cellules/ml sont obtenues dès 4h30 de culture. *A contrario*, la production virale de ce contrôle est « chaotique » tout au long de la cinétique. Elle semble augmenter au début de la cinétique jusqu'à un maximum de $3,67 \cdot 10^7$ virions/ml à 3h30 de culture mais chute rapidement à la concentration de départ qui est d'environ 5×10^6 virions/ml (Figure 18 ; Figure 19).

La production virale de la première cinétique effectuée atteint un maximum de $2,40 \cdot 10^8$ virions/ml à 12 h de culture et suit une tendance plus classique (Figure 17).

Il est à prendre en compte que le cytomètre qui a permis ces analyses a connu des défaillances sur la période correspondant aux analyses des cinétiques en conditions d'induction. Il a depuis été mis hors service. Un des lasers s'est, en effet, révélé défaillant et cela pourrait potentiellement expliquer des résultats non concordants entre deux analyses sur la même souche productrice de particules virales à des périodes différentes. La détection de particules de type viral nécessite un cytomètre avec de hautes performances. Une telle qualité n'est pas obligatoire pour la détection des cellules. Ainsi, le comportement de l'hôte est encore assez fiable pour ces analyses. Une comparaison de ces résultats avec une analyse à l'aide d'un autre appareil opérationnel permettrait de vérifier les résultats obtenus.

C. *Methanocaldococcus vulcanius* M7^T

La souche de référence *M. vulcanius* M7^T possède un provirus intégré à son génome. L'étude de la séquence génomique (Krupovic *et al* 2010) de cet élément intégré montre des réarrangements notables entre celui-ci et les provirus portés par *M. fervens* AG86 et *M. jannaschii* JAL-1. Le provirus semble plus proche de celui détecté dans le génome d'une archée mésophile *Methanococcus maripaludis* C6. Ces différents provirus codent pour des virus de type tête-queue. Ainsi, l'étude de *M. vulcanius* M7^T permettrait de décrire un nouveau caudovirus associé à une archée hyperthermophile. De façon intéressante, la séquence provirale de *M. vulcanius* M7^T possède des gènes codant pour un système TA (RelE/RelB) qui sont situés à une position équivalente à celle des gènes codant pour le système TA (HicA/HicB) dans la séquence provirale de *M. fervens* AG86. Ces deux systèmes pourraient être impliqués dans le maintien d'une relation de lysogénie stable.

1. Culture de la souche et comptage en cellule de Thoma

Des cultures inoculées à différents pourcentages (1, 2 et 4 %) ont été réalisées afin d'optimiser les cultures de *M. vulcanius* M7^T. Là encore, le pourcentage d'inoculation ne semble pas influencer la croissance cellulaire qui dépasse rapidement des concentrations de 10⁸ cellules/ml (3h30 de culture) (Figure 20).

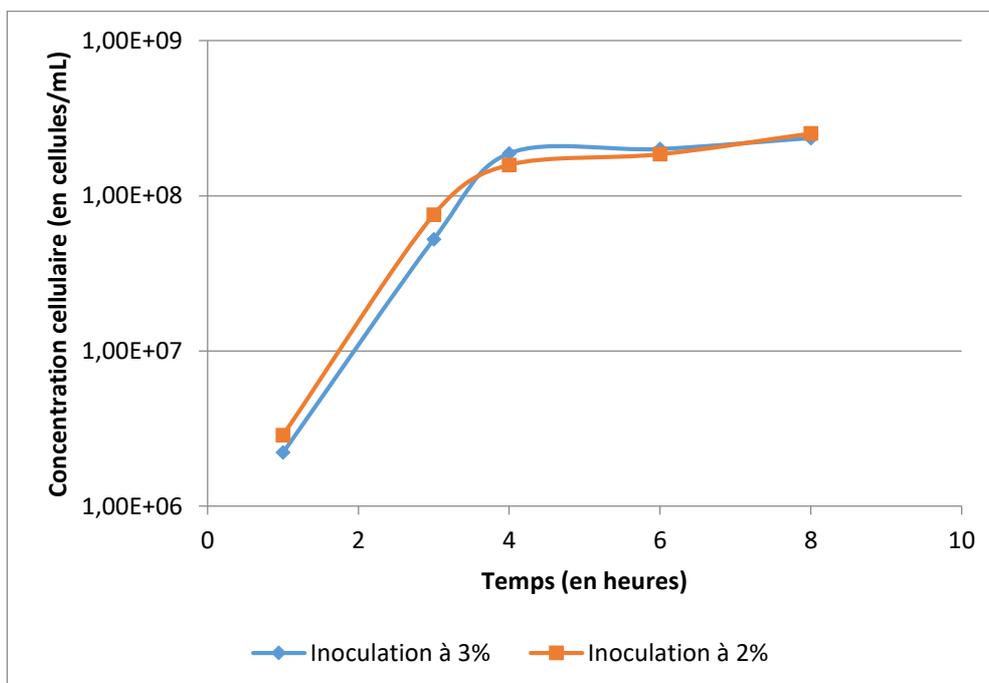


Figure 20 : Cinétique de croissance en condition classique de culture de la souche *M. vulcanius* M7^T obtenue en comptage sur cellule de Thoma.

2. Purification de particules de type viral en gradient iodixanol

A partir de culture de *M. vulcanius* M7^T, plusieurs tentatives de purification de particules de type viral ont été effectuées en gradient iodixanol. Les fractions qui ont fait l'objet d'observation en microscopie électronique en transmission et qui ont donné des résultats intéressants se situent entre 35 % et 45 % d'iodixanol (Figure 21).

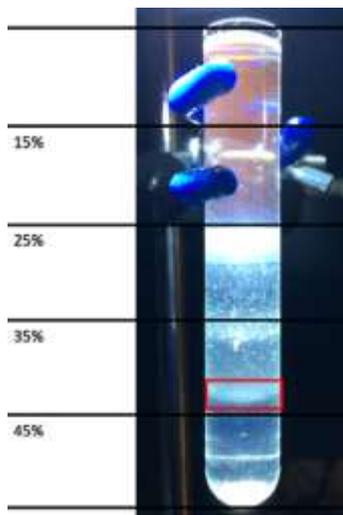


Figure 21 : Gradient de purification obtenu suite au dépôt d'une solution virale concentrée réalisée à partir de culture de *M. vulcanius* M7^T. Le pourcentage d'iodixanol est indiqué et la fraction correspondant à la fraction virale purifiée est indiquée avec un cadre rouge.

Observation de particules virales en microscopie électronique en transmission

Les fractions purifiées obtenues en gradient d'iodixanol ont été observées en microscopie électronique en transmission. Des particules en faibles quantités ont été détectées. Elles présentent une morphologie tête-queue avec une queue flexible s'apparentant à une queue de siphovirus d'environ 150 nm et une capsid icosaédrique d'environ 50 nm (Figure 22). Ces particules de type viral sont très similaires à MFV1. L'étude du provirus détecté dans le génome de *M. vulcanius* M7^T suggérait déjà cette morphologie.

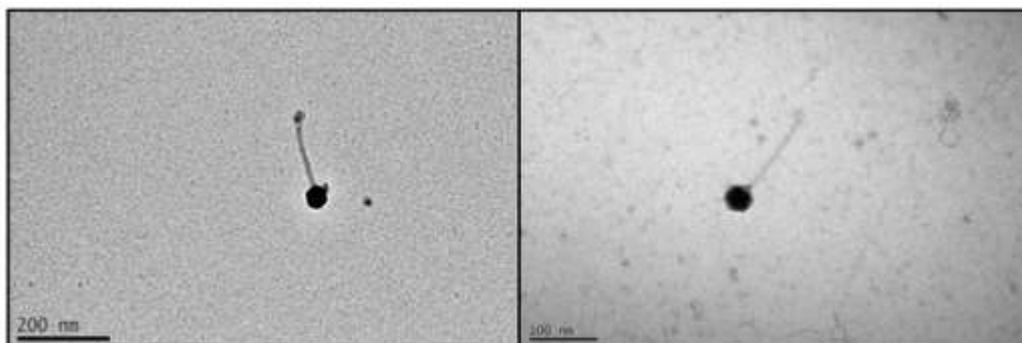


Figure 22 : Observation en MET d'une fraction purifiée de particules de types virales obtenues à partir de *M. vulcanius* M7^T.

c. Comparaison de différentes souches de *Methanococcales* en microscopie à épifluorescence

La production de VLPs de différentes souches de *Methanocaldococcus* a été comparée en microscopie à épifluorescence à partir de fractions concentrées obtenues à partir de cultures des différentes souches. Les souches utilisées sont :

- *Methanocaldococcus fervens* AG86 qui produit le virus MFV1 en grande quantité et qui produit des vésicules membranaires dans certaines conditions (face à un excès de cuivre dans son milieu de culture par exemple). (Figure 23)
- *Methanocaldococcus vulcanius* M7^T qui possède un provirus intégré à son génome et qui produit des particules virales de type tête-queue. (Figure 24)
- *Methanocaldococcus villosus* et *Methanocaldococcus infernus* sont deux souches ne possédant ni provirus et ne produisant pas de particules virales. (Figure 25)

Les productions de VLPs de *M. fervens* AG86 et *M. vulcanius* M7^T sont comparables : les fractions concentrées diluées 1000 fois présentent un tapis vert dû à la présence de VLPs en grande quantité. Diluées 10 000 fois, les points représentant chaque VLPs restent difficilement comptables mais sont bien visibles et en grande quantité (Figure 23 et Figure 24).

Les productions de VLPs de *M. infernus* et *M. villosus* sont également comparables et sont très faibles. Les fractions concentrées sont comptables dès la dilution 1000. Attention ces signaux peuvent être attribués à des vésicules membranaires contenant de l'acide nucléique (Figure 25).

La différence de production de VLPs est flagrante entre des souches de *Methanocaldococcus* produisant des particules virales et des souches de *Methanocaldococcus* n'en produisant pas. Ces résultats laissent suggérer une production de virions similaire entre *M. fervens* AG86 et *M. vulcanius* M7^T. Si la production de vésicules membranaires est commune aux différentes souches de *Methanocaldococcus*, il est raisonnable de penser que les VLPs détectées pour *M. fervens* AG86 et *M. vulcanius* M7^T sont un mélange de virions et de vésicules.

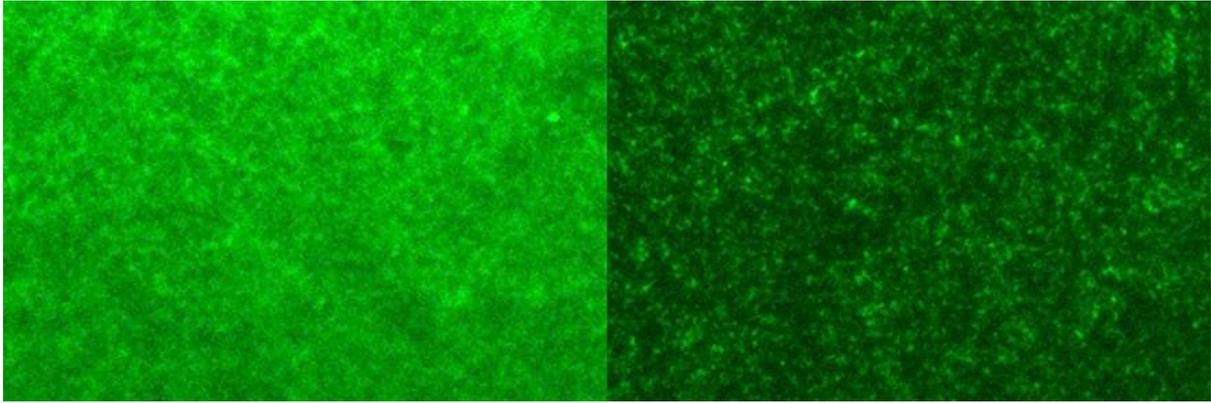


Figure 23 : Observation d'une solution concentrée de VLPs obtenu à partir de cultures de *M. fervens* AG86 en microscopie à épifluorescence. A gauche : Dilution 1000, à droite : dilution 10 000.

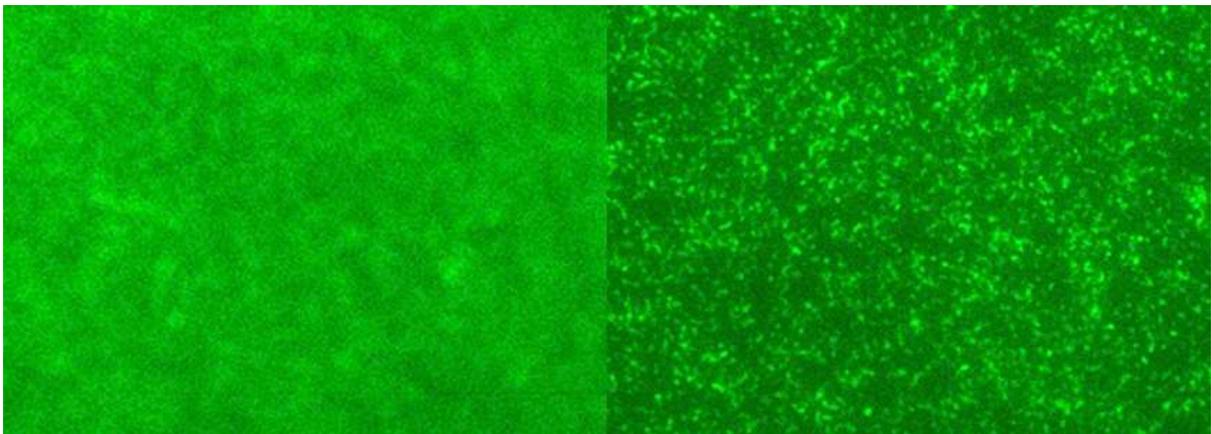


Figure 24 : Observation d'une solution concentrée de VLPs obtenus à partir de cultures de *M. vulcanius* M7^T en microscopie à épifluorescence. A gauche : Dilution 1000, à droite : dilution 10 000.

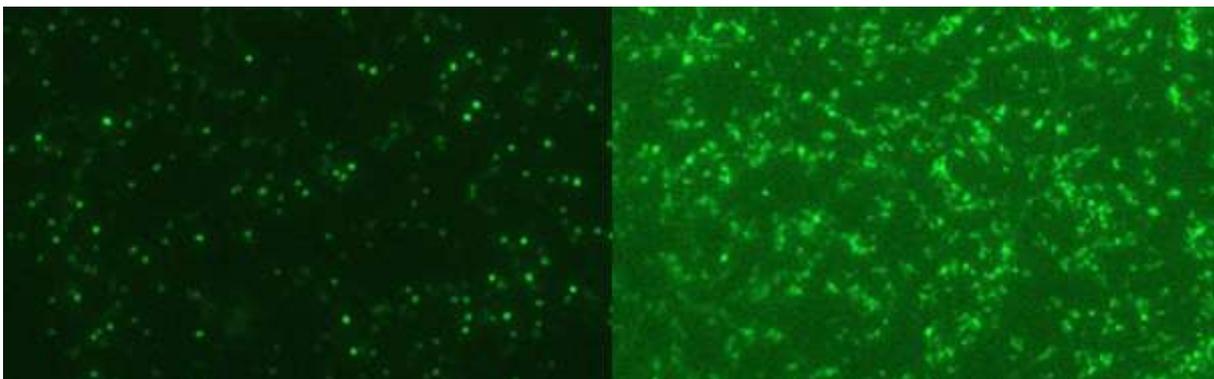


Figure 25 : Observation d'une solution concentrée de VLPs obtenu à partir de cultures de *M. infernus* à gauche et *M. villosus* à droite en microscopie à épifluorescence. Dilution 1000.

3. Relation hôte-virus : cytométrie en flux

Une estimation plus précise de la production basale de virions par *M. vulcanius* M7^T a été réalisée par des analyses en cytométrie en flux.

Une première cinétique de croissance hôte-virus en condition optimale a permis de montrer une croissance rapide de l'hôte avec une phase stationnaire atteinte après 8 h de culture avec une concentration cellulaire maximale de $9,44 \cdot 10^7$ cellules/ml qui est atteinte à 12 h de cultures. La concentration cellulaire décroît lentement jusqu'à atteindre $1,96 \cdot 10^7$ cellules/ml au bout de 24 h de culture. Une culture trop longue semble néfaste pour les cellules. La production virale semble assez basse puisqu'elle atteint au maximum $1,34 \cdot 10^7$ virions/ml à 24 h de culture (Figure 26). Lors de la décroissance cellulaire indiquant une mortalité cellulaire non négligeable, la production virale semble meilleure, stimulée. Cette première observation laisse envisager qu'un stress court et intense pourrait induire la production virale.

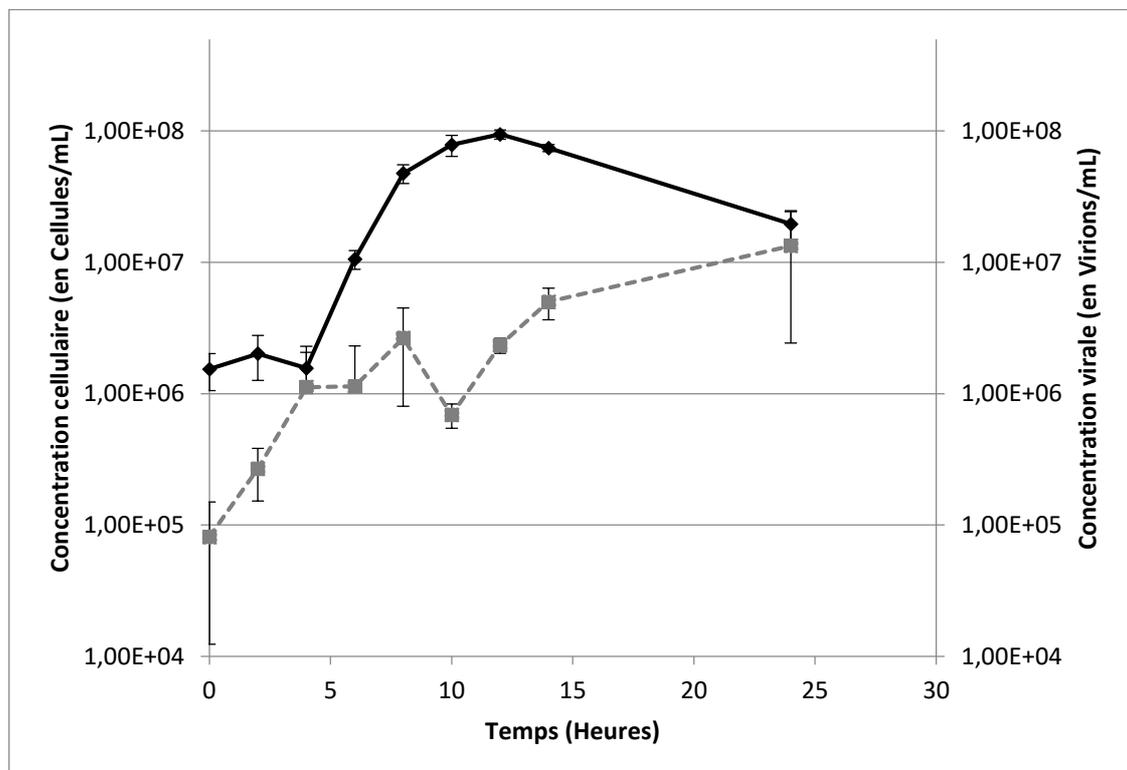


Figure 26 : Cinétique de croissance hôte-virus en condition optimale de culture de *M. vulcanius* M7^T analysée en cytométrie en flux. L'hôte est en trait plein noir et le virus en pointillés gris.

Des essais d'induction de la production virale chez *M. vulcanius* M7^T ont été menés à l'aide de la mitomycine C. La mitomycine C est injectée lorsque le premier quart de la phase exponentielle est atteinte en conditions de culture optimale, et ce, à une concentration finale de 10 µg/ml. Les résultats obtenus sont assez comparables avec ceux obtenus lors des essais d'induction de la production virale chez *M. jannaschii* JAL-1. En effet, les cultures semblent impactées par l'ajout de l'antibiotique et l'effet de la mitomycine C semble également nécessiter une reprise de la croissance cellulaire (incubation des cultures à 70 °C à partir de 3 h 30 d'expérience). Une lyse cellulaire est alors observée entre 6 h et 8 h de culture. La concentration cellulaire passe de 1,04.10⁸ cellules/ml à 3,05.10⁷ cellules/ml et reste stable par la suite (Figure 27). Cependant, la production virale ne semble pas induite et est comparable à celle observée pour les conditions de cultures classiques.

Les analyses ont été réalisées sur le même appareil et à la même période que les analyses de la relation hôte-virus en condition de stress chez *M. jannaschii* Jal-1. Le même biais dû à l'appareil est envisageable quant aux résultats sur le suivi du signal viral.

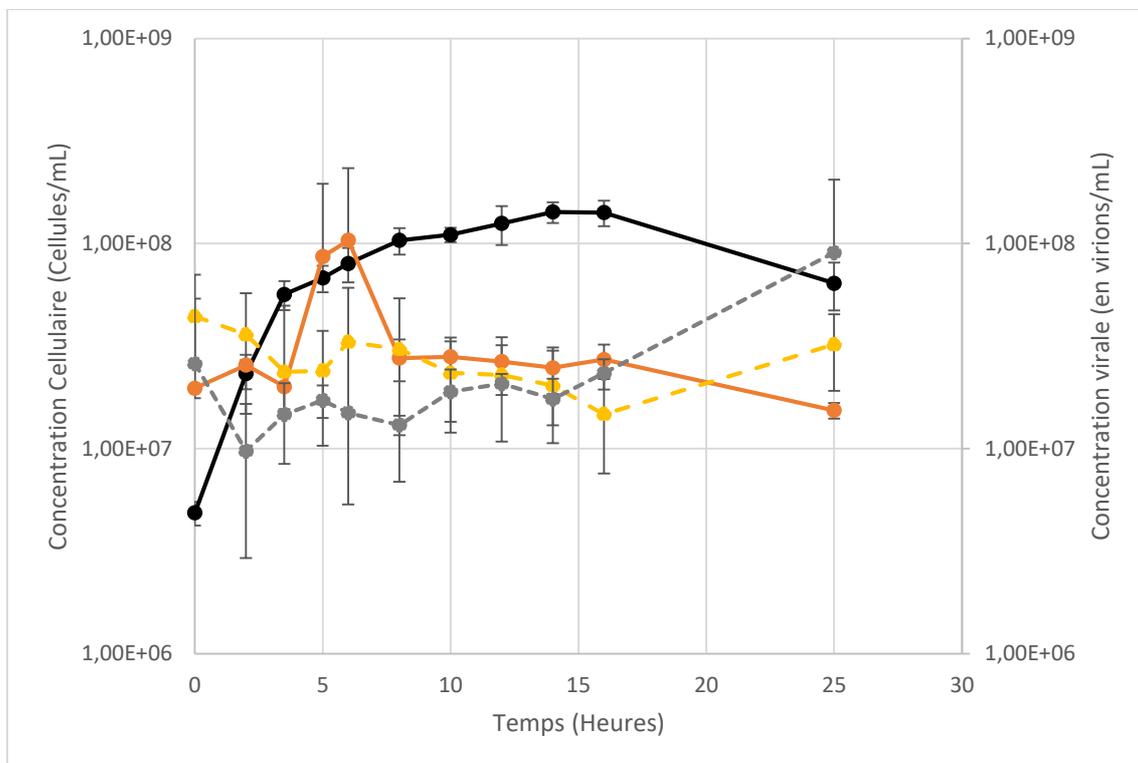


Figure 27 : Comparaison de cinétique de croissance hôte-virus en condition classique de cultures (hôte en noir et virus en gris) et en condition de stress induit par mitomycine C (hôte en orange et virus en jaune) de *M. vulcanius* M7^T. Les courbes ont été obtenues par analyse en cytométrie en flux.

IV. Discussion et conclusions

A. Un réservoir de nouvelles espèces et de nouveaux éléments génétiques mobiles

L'étude de **46 souches** appartenant potentiellement à l'espèce *M. jannaschii* a permis de mettre en place une base de travail pour l'étude de la virosphère associée aux méthanogènes issues des sources hydrothermales. Ces souches à disposition sont une source éventuelle de nouvelles espèces de méthanogènes hyperthermophiles (1357A par exemple). Le séquençage complet de souches d'intérêts est en cours et pourrait confirmer la présence de nouvelles espèces au sein des 46 souches étudiées. Parmi ces nouvelles espèces, PH11 et 3517R1 portent possiblement des virus. L'étude de ces potentiels nouveaux systèmes hôte-virus étendrait nos connaissances concernant les virus des sources hydrothermales océaniques profondes. La souche EX2913 est notamment positive en PCR pour les amorces ciblant le plasmide de *M. fervens* mais elle est négative pour les amorces ciblant MFV1. L'étude des éléments génétiques mobiles portés par ces souches pourrait permettre la mise en évidence d'événements de transferts horizontaux de gènes entre des souches partageant le même écosystème.

Certaines souches non porteuses de provirus ou non productrices de virions, sont proches phylogénétiquement de nos hôtes viraux. Ces souches ont d'ailleurs permis de tester l'infectiosité de MFV1 et restent des souches de choix pour de futurs essais d'infection pour les virus de *M. jannaschii* JAL-1 et *M. vulcanius* M7^T ou encore de nouveaux virus de *Methanocaldococcales* hyperthermophiles.

B. De nouveaux couples méthanogènes hyperthermophiles-virus

Les souches de référence ont permis l'observation de particules de type viral. *M. jannaschii* JAL-1 produit des particules dont la morphologie est originale. Cette morphologie particulière tige-boucles reste à confirmer. Pour cela, une production virale plus élevée semble nécessaire pour obtenir une fraction virale de qualité permettant des analyses plus poussées. Pour obtenir une meilleure production de particules virales, de nouveaux tests d'induction du provirus pourraient être réalisés. Notamment à l'aide de la mitomycine C qui semble impacter la croissance de *M. jannaschii* JAL-1. L'exposition aux UV pourrait également être testée puisque cet agent de stress a déjà montré des résultats intéressants pour TPV1, un archaeovirus hydrothermal. Les variations de températures de croissance ont montré des résultats intéressants pour l'induction de MFV1 et pourrait être tentées. *M. vulcanius* M7^T produit des particules virales présentant une morphologie tête-queue typique des siphovirus.

Des analyses complémentaires seront nécessaires pour caractériser ce nouveau virus tête-queue hyperthermophile. Des cultures en fioles, et non en grande bouteille, pourraient être une première amélioration pour l'obtention de solution virale concentrée de qualité. Des méthodes alternatives de purification limitant la perte de matériel pourraient également être tentées par la suite.

La suite des analyses sur ces deux potentiels nouveaux virus de méthanogènes hyperthermophiles isolées de sources hydrothermales océaniques profondes concernent : l'étude des relations hôte-virus, la comparaison du génome viral encapsidé avec la séquence du provirus et prouver le caractère infectieux des virions produits par ces méthanogènes.

Les analyses des cinétiques de croissance hôte-virus déjà réalisées suggèrent des relations ne correspondant pas aux exemples de lysogénie classiquement décrits. De plus, *M. fervens* AG86 et *M. jannaschii* JAL-1 possèdent des gènes codant pour des protéines argonautes qui sont impliquées dans la défense de l'hôte face à l'ADN exogène. Ces souches sont pourtant porteuses de provirus et productrices de virions. MFV1 et le provirus de *M. vulcanius* M7^T possèdent des séquences codantes pour des systèmes TA également impliqués dans la relation de course à l'armement entre virus et hôte. Ce sont des indices d'une relation de lysogénie complexe entre les virus et leurs hôtes.

Chapitre II – Systèmes hôtes-virus chez des méthanogènes hyperthermophiles

Par ailleurs, d'autres éléments génétiques mobiles sont associés à *M. jannaschii* JAL-1 et *M. vulcanius* M7^T. Les *Methanococcales* hyperthermophiles semblent former des vésicules membranaires. La présence d'acide nucléique au sein de ces vésicules suggère la possibilité de transferts horizontaux de gènes médiés par celles-ci. A cela s'ajoute une potentielle implication de ces vésicules dans des phénomènes de détoxification de métaux lourds observés chez *M. fervens* AG86 ou encore le transfert du plasmide pMEFER01 porté par *M. fervens* AG86 *via* ces vésicules. *M. jannaschii* JAL-1 et *M. vulcanius* M7^T portent respectivement les plasmides ECE1 et ECE2 pour la première et pMETVU01 pour la seconde qui pourraient être impliqués dans des phénomènes similaires à ceux observés lors de l'étude de MFV1 : encapsidation et transport par les virions ou *via* des vésicules.

L'étude du mobilome associé aux méthanogènes hydrothermales s'inclue dans la compréhension plus globale des rôles et impacts des éléments génétiques mobiles dans ces écosystèmes. Aucune information concernant les virus de méthanogènes hyperthermophiles n'était disponible avant ces travaux de thèse. Les chapitres 1 et 2 ont permis de rassembler de nombreuses informations concernant les virus de méthanogènes. L'ensemble de ces informations feront l'objet d'une revue traitant de l'état de l'art actuel concernant ceux-ci.

Chapitre III

Caractérisation d'un virus isolé de *Thermococcus thio-reducens* UBOCC-M-2423 nommé Thiovirus

I. Présentation des travaux

II. Matériels et méthodes

A. Les souches des *Thermococcales* étudiées

B. Suivi PCR et QPCR

C. Analyse génétique du Thiovirus

II. Résultats

A. Morphologie du virus de *Thermococcus thio-reducens* UBOCC-M-2423

B. Relations hôte-virus : cytométrie en flux

C. Caractère infectieux

D. Génome viral

III. Discussion et conclusions

A. Un nouveau virus de *Thermococcales*

B. Le Thiovirus et ses hôtes

I. Présentation des travaux

Il y a plus de 40 ans, le troisième domaine du vivant regroupant les archées était découvert (Woese and Fox 1977). Depuis, l'étude des virus d'archées a permis l'isolement et la description d'environ 80 virus associés à ces microorganismes. Ce nombre est dérisoire comparé aux près de 6000 virus de bactéries décrits à ce jour. Les virus d'archées décrits sont le plus souvent isolés d'environnements dits extrêmes. Ce sont notamment les environnements terrestres chauds et/ou très salés. Les hôtes de ces virus appartiennent principalement aux *phyla Crenarchaeota* et *Euryarchaeota* (Krupovic *et al* 2018).

Les sources hydrothermales océaniques profondes, considérées comme l'un des environnements les plus extrêmes sur Terre, sont caractérisées par des conditions physico-chimiques instables (notamment gradients de température), une pression hydrostatique élevée, une absence d'énergie lumineuse ou encore la présence de composés chimiques réduits comme l'hydrogène sulfuré, et de métaux lourds. Pourtant, la vie dans ces écosystèmes particuliers y est prospère avec la présence d'eucaryotes et d'une grande diversité de microorganismes partageant cet habitat (Dick 2019, Jebbar *et al* 2015). Interagissant avec ces communautés microbiennes des grands fonds, le mobilome abyssal (représenté par les virus, les plasmides ou encore les vésicules membranaires) influence ces communautés à différents niveaux *via* des échanges horizontaux de gènes (Lossouarn *et al* 2015a).

Avant 2003, aucun virus isolé de sources hydrothermales océaniques profondes n'avait été décrit. Aujourd'hui, donc 16 ans plus tard, 8 bacteriovirus et 2 archaeovirus ont fait l'objet de publication (Lossouarn *et al* 2015a). Ces virus d'archées hydrothermales infectent des *Euryarchaeota* hyperthermophiles de l'ordre *Thermococcales* (Geslin *et al* 2003a, Geslin *et al* 2007, Gorlas *et al* 2012).

L'ordre des *Thermococcales* fait partie du phylum *Euryarchaeota* et est divisé en trois genres : *Pyrococcus*, *Thermococcus* et *Palaeococcus*. Les *Thermococcales* sont des microorganismes hyperthermophiles majoritairement isolés de sources hydrothermales océaniques profondes. Ces microorganismes chimio-organo hétérotrophes en forme de coques sont anaérobies stricts et sont capables de fermenter une grande variété de composés organiques (amidon, peptone, extrait de levure, caséine, ...). Ils utilisent le soufre comme accepteur

Chapitre III – Caractérisation de Thiovirus

terminal d'électrons et produisent du sulfure d'hydrogène. L'ordre *Thermococcales* regroupe des espèces modèles comme *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus kodakarensis* et *Thermococcus barophilus* pour lesquelles des outils génétiques de choix sont disponibles. Les *Thermococcales* constituent une part très importante (en termes d'abondance et d'activité) et très diversifiée, de la composante microbienne hétérotrophe au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes (Leigh *et al* 2011, Schut *et al* 2014, Thiel *et al* 2014).

PAV1 et TPV1 sont deux virus en forme de citron isolés respectivement de *Pyrococcus abyssi* et *Thermococcus prieurii*. PAV1 et TPV1 présentent la même morphologie mais n'ont que deux gènes en commun. Ces gènes appartiennent à la famille des lectines / glucanases potentiellement impliquées dans l'adhésion de ces virus à leurs hôtes.

Ce troisième chapitre présente la caractérisation d'un nouveau virus en forme de citron isolé d'une *Thermococcales*. Ce virus, nommé Thiovirus, infecte la souche hyperthermophile (température optimale de croissance de 85 °C) *Thermococcus thioeducens* UBOCC-M-2423 qui a été isolée d'un morceau de cheminée hydrothermale du site Rainbow situé sur la ride médio-Atlantique. L'étude de ce nouveau virus répondait aux objectifs de recherche et caractérisation de nouveaux systèmes hôtes-virus associés aux sources hydrothermales profondes.

Ce travail s'est fait en étroite collaboration avec Nadège Bienvenu, assistante ingénieure au LM2E, dans le cadre du projet ERC EVOMOBIL porté par Patrick Forterre avec la participation de Violette Da-Cunha, Institut Pasteur.

II. Matériels et méthodes

A. Les souches des *Thermococcales* étudiées

Les différentes souches de *Thermococcales* utilisées dans cette étude ont été fournies par la collection de l'Université de Bretagne Occidentale (UBOCC). Elles sont regroupées dans le Tableau 1. Ces souches sont proches de la souche de référence *Thermococcus thioeducens* DSM14981 (Pikuta *et al* 2007) d'après des analyses de l'ADNr 16S.

Tableau 1 : Liste des souches utilisées dans cette étude. En jaune : *T. thioeducens* de référence DSM14981 et *T. thioeducens* UBOCC-M-2423 : la souche porteuse du Thiovirus

Souche	Site d'échantillonnage
UBOCC-M-2223	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2222	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2244	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2226	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2237	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2228	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2224	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2239	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2227	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2233	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2242	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2235	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2263	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2247	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2441	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2442	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2291	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2290	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2025	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2422	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2288	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2298	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2301	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2292	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2295	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2289	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2257	Rainbow - Ride médio-Atlantique
UBOCC-M-2423	Rainbow - Ride médio-Atlantique
<i>Thermococcus thioeducens</i> DSM14981 (Pikuta <i>et al</i> 2007)	Rainbow - Ride médio-Atlantique

1. Culture des *Thermococcales* en condition optimale

Les souches de *Thermococcales* ont été cultivées dans le milieu de culture pour hétérotrophe « TRM (*Thermococcales* Rich Medium) » additionné de soufre tyndallisé (2 g/l). La température d'incubation des différentes souches est de 85 °C sans agitation. Les cultures ont été réalisées en fioles de 50 ml avec 20 ml de milieu de culture. Le détail du milieu de culture est donné dans le matériel et méthode général (p. 137).

2. Culture des *Thermococcales* en condition de stress

Des essais ont été réalisés dans le but d'induire la production virale par *Thermococcus thio-reducens* UBOCC-M-2423. Pour cela, des traitements physiologiques et chimiques ont été réalisés à l'aide d'un agent chimique, la mitomycine C, et d'un agent physique avec des variations de température de culture. Tous les agents de stress testés ont été appliqués une fois le premier quart de la phase exponentielle de croissance atteint. Ce premier quart de la phase exponentielle de croissance se déroule en conditions optimales de culture pour chaque souche : 85 °C sans agitation.

- Pour l'**induction par des variations de température de culture**, une fois le premier quart de la phase exponentielle atteint, les cultures sont incubées à température ambiante pendant 1 h puis elles sont replacées en conditions d'agitation à une température de culture sub-optimale (70 °C) sans agitation.
- Pour l'**induction à la mitomycine C**, une fois le premier quart de la phase exponentielle de croissance atteint, les cultures sont incubées à température ambiante pendant 30 min avant l'ajout de la mitomycine C à 10 µg/ml en concentration finale. Puis les cultures sont replacées à 70 °C sans agitation.
- Des **cultures contrôles** sont réalisées en parallèle. Ces cultures se déroulent en conditions optimales de culture pendant 24 h : 85 °C sans agitation.

Des prélèvements de 250 µl de culture ont été réalisés tout au long des cinétiques de croissance et ce pendant 24 h. Ces échantillons ont été fixés au glutaraldéhyde (concentration finale de 0,5 %). Les prélèvements sont ensuite placés 15 min à 4 °C et plongés dans de l'azote liquide (« flashfreeze ») pour enfin être stockés à - 80 °C. Ces échantillons ont par la suite été analysés en cytométrie en flux comme décrit dans le matériel et méthodes général (p. 141).

B. Suivi PCR et Q-PCR

1. Infection de *Methanocaldococcus*

Des tests de la capacité infectieuse du Thiovirus ont été réalisés sur les *Methanocaldococcus* listées dans le Tableau 2. Ces souches ont été cultivées une en co-culture dans le milieu de culture « DSMZ 141 » modifié comme décrit dans le matériel et méthode général (p. 136). Une suspension virale concentrée du Thiovirus a été ajoutée aux cultures de *Methanocaldococcus* au premier quart de la phase exponentielle à une concentration finale de 5.10^8 virions/ml (estimée par microscopie à épifluorescence). Une culture de souches de *Methanocaldococcus* non infectée a été utilisée comme contrôle négatif de l'expérience. L'ADN total a été extrait, comme décrit dans le matériel et méthode général (p. 142), à partir d'échantillons de 2 ml prélevés tout au long de la cinétique d'infection. La concentration en ADN de chaque échantillon a été déterminée avec la méthode de quantification par le marquage au PicoGreen et chaque échantillon a été dilué à une concentration de 0,2 ng/μl comme décrit dans le matériel et méthode général (p.145).

Tableau 2 : Liste des *Methanocaldococcus* utilisées dans cette étude

Souches du lot n°2	Campagne	Localisation
1357A	nd	nd
<i>Methanocaldococcus</i> 56	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus</i> AX9935	nd	Pacific Ocean / Axial Seamount / Juan de Fuca 45°N
<i>Methanocaldococcus</i> B20.4.1	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus</i> B6-1.2	Biospeedo	East Pacific Ridge 17°S
<i>Methanocaldococcus</i> EX2913	Extreme	East Pacific Ridge 9°N
<i>Methanocaldococcus</i> FS 438-32	nd	Pacific ocean /Juan de Fuca 45°N
<i>Methanocaldococcus</i> PH24 A	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus</i> PH24 B	Phare	East Pacific Ridge 13°N
<i>Methanocaldococcus</i> PH3	Phare	East Pacific Ridge 13°N

Les amplifications PCR et Q-PCR ont été réalisées dans le but de quantifier le nombre de copies des gènes ADNr 16S pour les hôtes et MCP pour le virus comme décrit dans le matériel et méthodes général (p. 144 - 146). Le couple d'amorces utilisé cible la séquence codant pour la MCP de Thiovirus avec une taille attendue du produit de 239 pb :

- **P025 F : GGCTGCAAAGTGGCTAAGAC**
- **P025 R : AGGCGATCATGACCAGAGAC**

2. Infection de *Thermococcus*

Des cinétiques d'infection similaires ont été réalisées sur un lot de *Thermococcales* ainsi que sur *T. thioireducens* DSM14981. Les résultats préliminaires des amplifications PCR sont en cours. Des analyses en Q-PCR sont prévues avant la fin de l'année.

C. Analyse génétique du Thiovirus

1. Extraction et analyse de l'ADNccc

Les extractions d'ADNccc (ou covalently closed circular DNA) ont été réalisées selon une méthode de lyse alcaline classique (Bimboim and Doly 1979, Geslin *et al* 2003a). Au cours des analyses en RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les ADNccc extraits ainsi que les préparations de solutions virales purifiées ont été digérés par l'enzyme de restriction: HindIII (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 1 X et 2 U 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 1h30 dans du tampon TAE 1 X.

2. Détermination de la séquence nucléotidique du Thiovirus

Dans le cadre du projet ERC Evomobil, le génome complet de *Thermococcus thioireducens* UBOCC-M-2423, comprenant un élément extra-chromosomique, a été séquencé. Les résultats de ce séquençage ont fait l'objet d'une analyse préliminaire des 26 ORFs ; analyse basée sur la recherche de similarités *via* des BLASTP à partir de la base de données de NCBI.

Par ailleurs, l'ADN viral extrait de virions purifiés, issus de cultures de *Thermococcus thioireducens* UBOCC-M-2423, a été séquencé *via* l'Institut Pasteur grâce à Laurent Debarbieux.

III. Résultats

A. Morphologie du virus de *Thermococcus thioeducens* UBOCC-M-2423

1. Purification des virions

A partir de cultures de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423, des purifications de particules virales ont été effectuées en gradient d'iodixanol. Les fractions qui ont fait l'objet d'observation en microscopie électronique en transmission et qui ont permis l'observation de virions en MET se situent entre 35 % et 40 % d'iodixanol (Figure 1). Ces résultats indiquent une densité d'environ 1,2 g/ml pour le Thiovirus (Ford *et al* 1994).

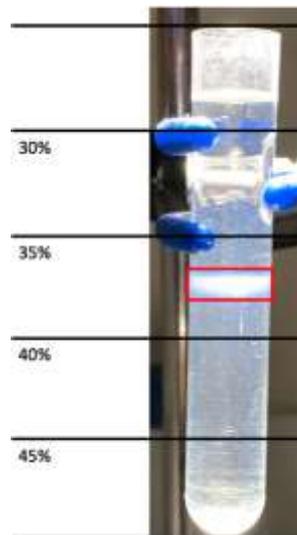


Figure 1 : Gradient de purification obtenu suite au dépôt d'une fraction virale concentrée réalisée à partir de culture de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423. Le pourcentage d'iodixanol est indiqué et la fraction correspondant à la fraction virale purifiée est indiquée avec un cadre rouge.

2. Observation de particules virales en microscopie électronique en transmission

Les fractions purifiées obtenues en gradient d'iodixanol ont été déposées sur des grilles adaptées à l'observation en microscopie électronique en transmission. Des particules en grandes quantités ont été détectées. Elles présentent une morphologie en forme de citron d'une taille d'environ 120 nm de long, 80 nm de largeur avec une extrémité d'environ 15 nm représentant le point d'attachement des virions à leur hôte. Les virions observés sont pour la plupart attachés à des vésicules membranaires (Figure 2 – A, B, C, D et F). Cette morphologie est typique des virus appartenant à la famille *Fuselloviridae*. Les virions isolés de *T.*

Chapitre III – Caractérisation de Thiovirus

thioreducens UBOCC-M-2423 présentent le même morphotype que PAV1 et TPV1, les deux seuls autres virus décrits isolés de *Thermococcales* hyperthermophiles issues de sources hydrothermales océaniques profondes. Plus rarement, les virions présentent une forme plus allongée d'une taille d'environ 200 nm (Figure 2 - A). Cette forme, qui indique une certaine plasticité des virions, pourrait correspondre à l'état du virion au moment de l'éjection de son ADN. La stabilité structurale des virions ne semble pas sensible aux étapes de purification : centrifugation à grande vitesse et suspension dans une solution d'iodixanol. Les virions sont également exposés à une large gamme de température (de 4 à 85 °C) et à l'oxygène au cours des différentes étapes de purification sans être dénaturés.

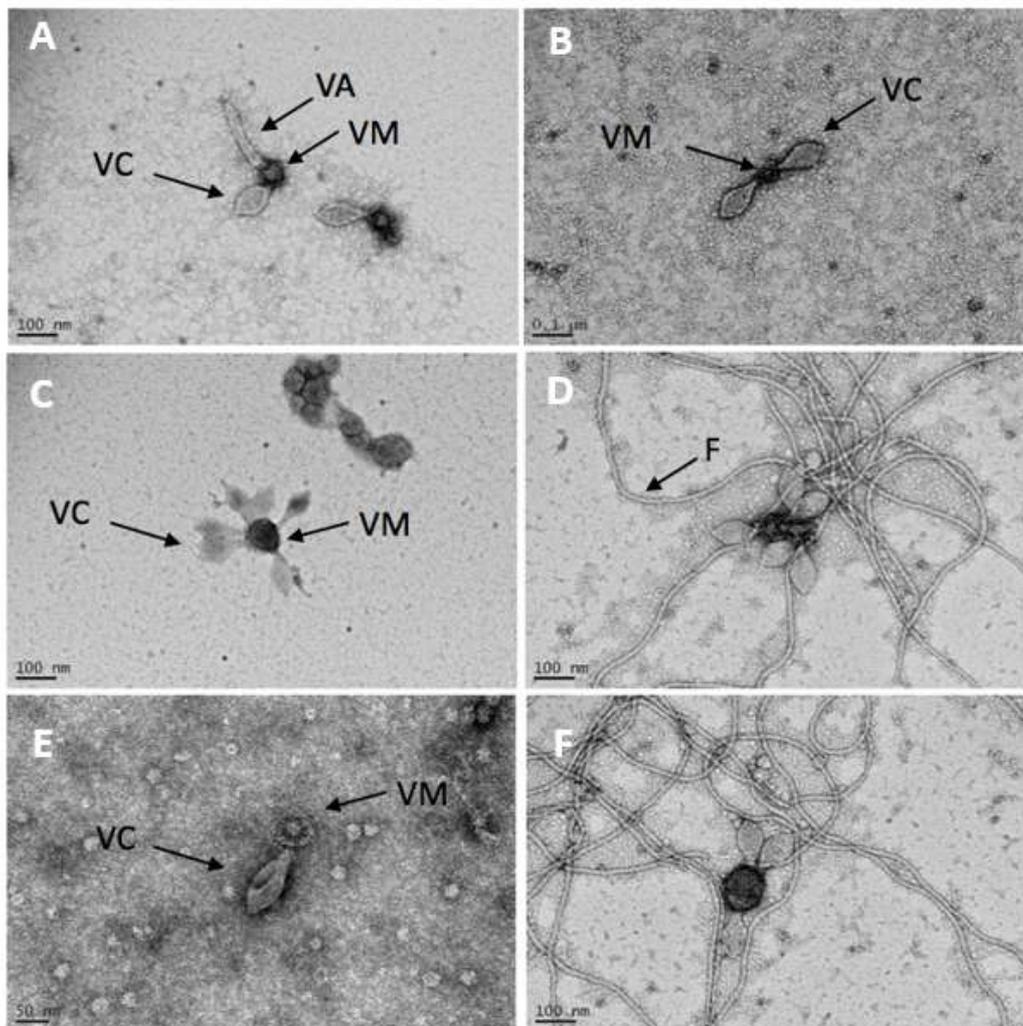


Figure 2 : Observation en MET d'une fraction purifiée de particules de type viral obtenues à partir de *T. thioreducens* UBOCC-M-2423. VC = Virus citron ; VA = Virus allongé ; VM = Vésicules membranaires ; F = Flagelles de l'hôte.

A. Relations hôte-virus : cytométrie en flux

Une estimation de la production basale de virions par *T. thioeducens* UBOCC-M-2423 a été réalisée par des analyses en cytométrie en flux. Ces analyses permettent également de mieux comprendre la relation établie entre le virus et son hôte.

Une cinétique de croissance hôte-virus en condition optimale de culture, a permis de mettre en évidence une croissance de l'hôte rapide avec une phase stationnaire atteinte dès 8h30 de culture, aboutissant à une concentration cellulaire de $1,25 \cdot 10^8$ cellules/ml. La production virale semble assez élevée puisqu'elle atteint au maximum $4,94 \cdot 10^9$ virions/ml à 12h30 de culture. Une légère baisse de la concentration cellulaire est observée entre 10h30 et 12h30 de culture passant de $1,43 \cdot 10^8$ cellules/ml à $8,37 \cdot 10^7$ cellules par ml tandis que de façon concomitante la concentration virale, qui est de $3,58 \cdot 10^9$ virions/ml à 10h30 de culture, augmente légèrement jusqu'à $4,94 \cdot 10^9$ virions/ml à 12h30 de culture. Entre 12h30 et 14h30 de culture, la concentration virale chute drastiquement d'un log passant de $4,94 \cdot 10^9$ virions/ml à $4,29 \cdot 10^8$ virions/ml. Aucune lyse drastique de l'hôte n'est observée tout au long de la cinétique (Figure 3).

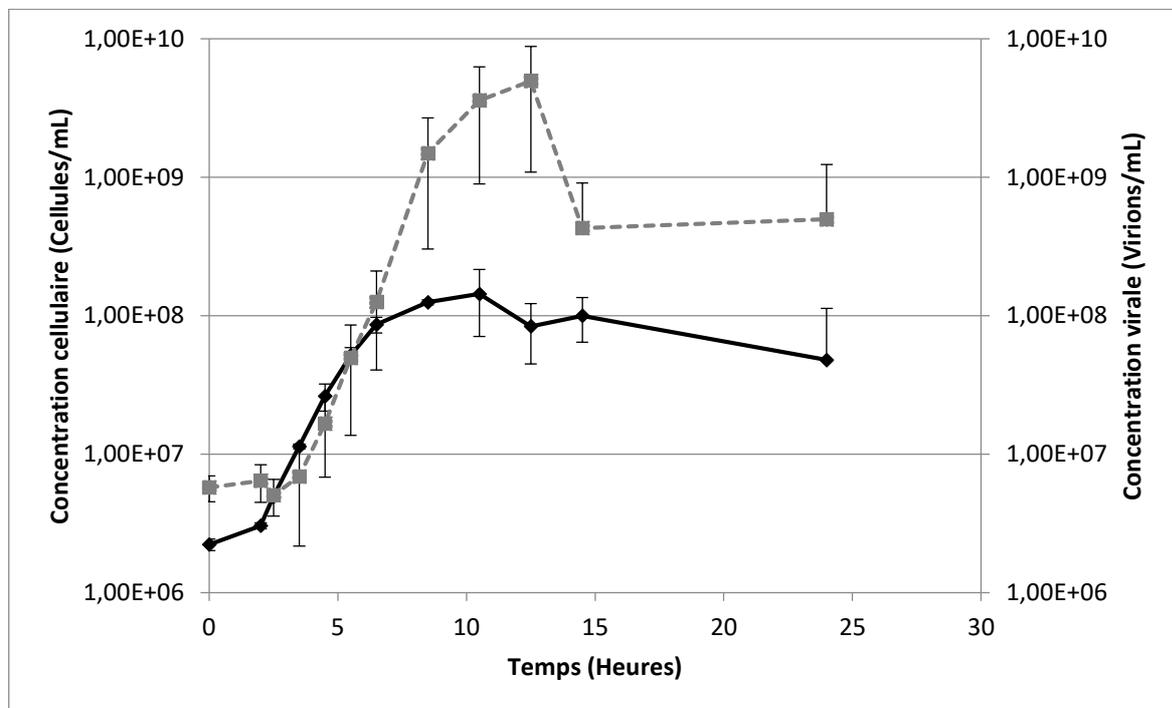


Figure 3 : Cinétique de croissance hôte-virus en conditions optimales de culture de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423 analysée en cytométrie en flux. En noir : croissance cellulaire de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423. En gris : Production virale basale du Thiovirus.

Chapitre III – Caractérisation de Thiovirus

Des cinétiques en conditions de stress ont été réalisées par ajout de mitomycine C, ou *via* des variations de température de culture (Figure 4). Seule la mitomycine C semble impacter la croissance cellulaire. Lors de l'ajout de mitomycine C à une concentration finale de 10 µg/ml, la concentration cellulaire atteint $2,47 \cdot 10^7$ cellules/ml au bout de 24 h de culture, soit presque un log de moins qu'en condition optimale de culture. Avec l'application d'un choc froid (1 h à 4 °C) et le maintien des cultures en température de croissance sub-optimale (70 °C), la croissance cellulaire est légèrement retardée et la concentration cellulaire atteint $1,66 \cdot 10^8$ cellules par ml à 15 h de culture. La production virale n'est pas induite et suit la même tendance que la croissance de son hôte. Les concentrations virales maximales (de l'ordre de 10^8 virions/ml) ne dépassent pas la concentration virale maximale obtenue en condition optimale de culture (Figure 4) .

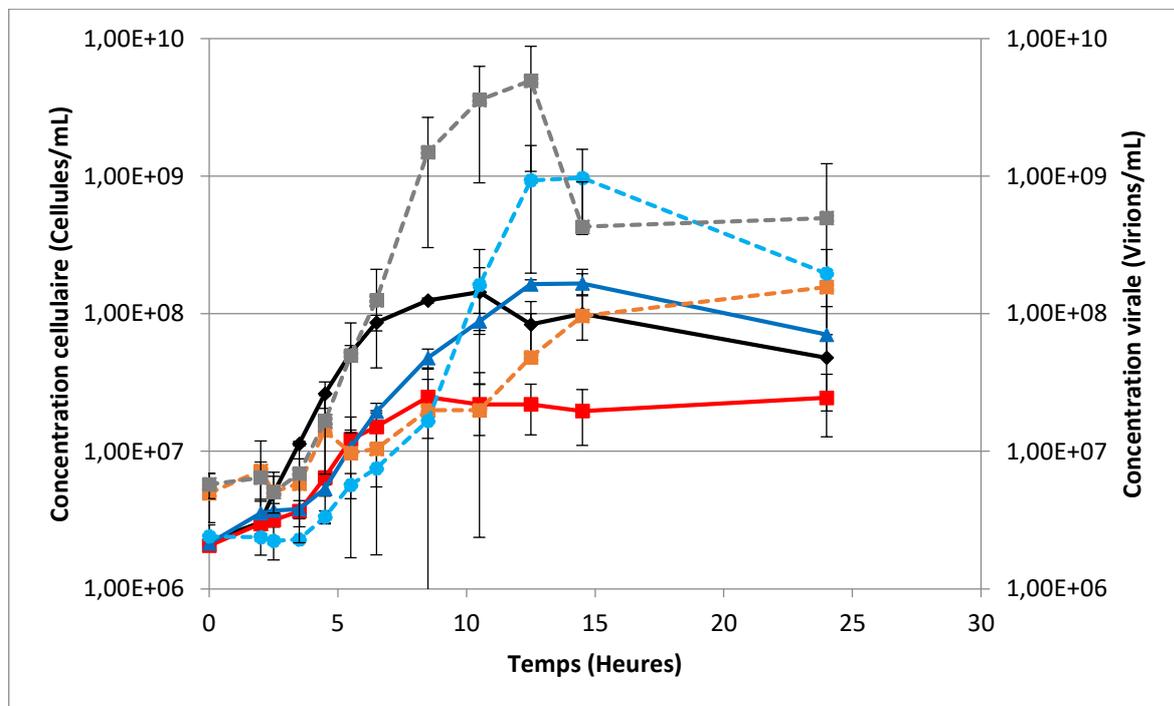


Figure 4 : Cinétique de croissance hôte-virus en conditions optimales de culture et en conditions de stress de *T. thioireducens* UBOCC-M-2423 analysée en cytométrie en flux. En noir : croissance cellulaire de l'hôte. En gris : Production virale basale du Thiovirus. En bleu foncé : croissance cellulaire de l'hôte en conditions de température de croissance sub-optimale. En bleu clair : Production virale du Thiovirus en conditions de température de croissance sub-optimale de l'hôte. En rouge : croissance cellulaire de l'hôte en conditions de stress à la mitomycine C. En orange : Production virale du Thiovirus en conditions de stress à la mitomycine C de l'hôte.

Le Thiovirus n'est pas retrouvé sous forme de provirus intégré au génome de son hôte et il semble y avoir un équilibre entre la multiplication cellulaire et la production de virions, sans possibilité d'induction de cette dernière. Les résultats suggèrent une relation hôte-virus de type chronique.

B. Caractère infectieux

La capacité d'infection du Thiovirus a été testée sur différents hôtes potentiels. Pour cela, une fraction concentrée du virus a été ajoutée à des cultures de *Thermococcales* mais également à des cultures de *Methanocaldococcus*. La production du Thiovirus par les souches infectées a d'abord été vérifiée en PCR puis confirmée en Q-PCR.

1. Infection de *Thermococcales*

a. Criblage d'éléments génétiques mobiles chez des *Thermococcus*

L'UBOCC est une collection de l'Université de Bretagne Occidentale regroupant plus de 3000 souches d'archées et bactéries issues des différentes campagnes océanographiques auxquelles le LM2E participe. C'est une ressource biologique précieuse pour mener à bien les études effectuées au laboratoire. Plus particulièrement, les nombreuses souches disponibles ont permis de réaliser un criblage d'éléments génétiques mobiles dans notre démarche d'exploration de la diversité virale des sources hydrothermales océaniques profondes.

Les 27 souches de *Thermococcus* regroupées dans le Tableau 3 ont chacune fait l'objet d'une extraction d'ADN total. Chaque ADN extrait a fait l'objet d'une quantification au Nanodrop. Toutes les extractions se sont révélées en quantité suffisante pour la suite de l'étude (concentrations d'ADN entre 33,89 ng/μl et 855,3 ng/μl). Les ADN extraits ont fait l'objet d'une amplification par PCR à l'aide du couple d'amorces ciblant la capsid (MCP) du Thiovirus. Le but était de sélectionner les souches négatives pour ce couple d'amorce afin de réaliser des essais d'infection sur des souches non infectées par le Thiovirus. Par ailleurs, les souches se révélant positives pour ce couple d'amorce représentent de potentiels nouveaux systèmes hôte-virus à caractériser. La Figure 5, correspondant à l'un des gels de contrôle des produits PCR réalisés pour les souches étudiées, montre des exemples de résultats PCR obtenus. Après analyse des résultats de PCR :

- 2 se sont révélées positives pour la MCP : UBOCC-M-2227 et UBOCC-M-2442, deux souches issues de deux sites d'échantillonnage différents (Menez Gwen et Rainbow) situés sur la ride médio-Atlantique.
- 25 se sont révélées négatives pour la MCP.

Chapitre III – Caractérisation de Thiovirus

Les **souches se révélant négatives pour la MCP** ont servi à la réalisation d'un lot de souches à infecter. Ainsi, ce lot contient les souches mises en commun en une co-culture utilisée pour les tests d'infection par le Thiovirus. Les souches n'ont pas été testées en culture pure pour optimiser les tests et augmenter la probabilité d'infection d'au moins une de ces souches. Ces expériences sont encore en cours de réalisation. Les résultats seront disponibles pour la fin de l'année et pourront être intégrés à la publication portant sur la caractérisation du Thiovirus. Les **souches positives** ont quant à elle été cultivées dans le but d'obtenir des solutions virales concentrées qui seront prochainement observées en MET.

Tableau 3 : Liste des souches utilisées pour le criblage PCR. En bleu clair: les souches collectées au niveau du site de Menez Gwen. En bleu plus foncé : la souche positive pour la MCP issue du site Menez Gwen. En orange clair : les souches collectées au niveau du site de Rainbow. En orange plus foncé : la souche positive pour la MCP issue du site Rainbow.

Souche (UBOCC)	Site d'échantillonnage	Résultats PCR (MCP)
UBOCC-M-2223	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2222	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2244	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2226	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2237	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2228	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2224	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2239	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2227	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	+
UBOCC-M-2233	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2242	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2235	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2263	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2247	Menez Gwen - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2441	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2442	Rainbow - Ride médio-Atlantique	+
UBOCC-M-2291	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2290	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2025	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2422	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2288	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2298	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2301	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2292	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2295	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2289	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-
UBOCC-M-2257	Rainbow - Ride médio-Atlantique	-

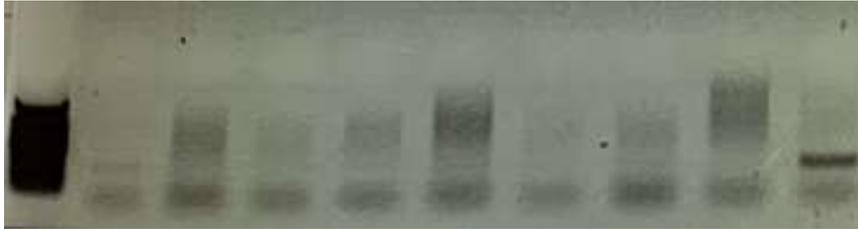


Figure 5 : Exemples de résultats PCR pour les couples d'amorces ciblant la MCP du Thiovirus pour les souches : UBOCC-M-2239, UBOCC-M-2242, UBOCC-M-2228, UBOCC-M-2292, UBOCC-M-2288, UBOCC-M-2233, UBOCC-M-2226, UBOCC-M-2257, UBOCC-M-2227 (souche positive pour les amorces MCP ciblant le Thiovirus).

b. Infection de la souche de référence : *Thermococcus thio-reducens* DSM14981 (Pikuta *et al* 2007)

La souche de référence de *Thermococcus thio-reducens* ne produisant pas de virions et ne portant pas de provirus intégré à son génome est également disponible. Elle fait également l'objet de test d'infection par le Thiovirus encore en cours de réalisation. De même que pour le lot de *Thermococcus*, les résultats seront disponibles pour la fin de l'année. Des résultats préliminaires en PCR avec les amorces ciblant la MCP du Thiovirus indiquent une infection pour le lot de *Thermococcus* et pour *T. thio-reducens* DSM14981 avec un signal stable tout au long de la cinétique d'infection qui a duré 34 h. Ces résultats seront confirmés en analyses Q-PCR.

2. Infection de *Methanocaldococcus*

Le caractère infectieux du Thiovirus a été testé sur des souches de *Methanocaldococcus* rassemblées en une co-culture. Ces souches ont été sélectionnées car elles ne portent pas de provirus et ne produisent pas de virions. Les tests ont été réalisés en milieu de culture liquide DSM141 modifié adapté à la culture de *Methanococcales*. Les virions (Thiovirus) concentrés ont été ajoutés au premier quart de la phase exponentielle de croissance à une concentration de 1.10^8 virions/ml (déterminée en microscopie à épifluorescence). Des cultures non infectées ont été réalisées en parallèle pour servir de contrôle négatif à l'expérience.

Après 34 h d'incubation, un signal viral est détecté en PCR pour les souches infectées. Aucun signal viral n'est détecté pour les contrôles négatifs (Figure 6).

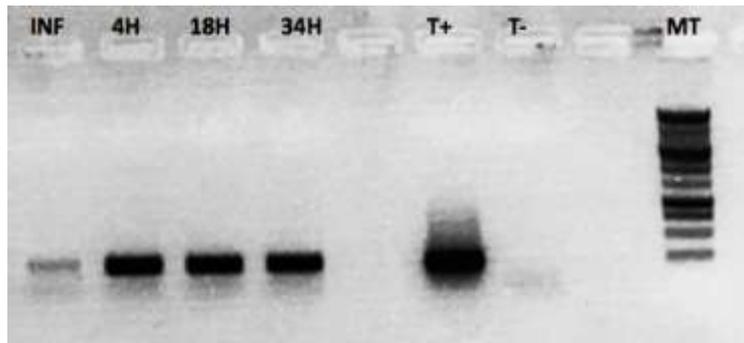


Figure 6 : Résultats PCR obtenus pour les *Methanocaldococcus* infectées avec les amorces MCP ciblant le Thiovirus. INF : moment de l'infection. 4H, 18H, 34H : différents temps de l'expérience. MT : marqueur de taille = 1 kb DNA ladder, Promega

Pour confirmer la production de Thiovirus par les *Methanocaldococcus*, une quantification en Q-PCR des gènes ADNr 16S (pour l'hôte) et MCP (Protéine majeure de la capsidie pour le Thiovirus) a été réalisée. Au moment de l'infection, après 2 h de croissance des *Methanocaldococcus*, le gène ADNr 16S des hôtes potentiels est de $1,62 \cdot 10^7$ copies de gène par ml. Après infection, la croissance des *Methanocaldococcus* n'est pas impactée puisque le nombre de copies du gène 16S augmente jusqu'à $1 \cdot 10^9$ copies de gène par ml à 4 h d'expérience. Ce nombre décroît par la suite légèrement jusqu'à $1,20 \cdot 10^8$ copies de gène par ml (Figure 7). Durant toute l'expérience (34 h), comme attendu pour un contrôle négatif, les souches de *Methanocaldococcus* présentent un signal pour le gène ADNr 16S (10^8 à 10^9 copies par ml après 4 h de culture) mais pas de signal pour la MCP du Thiovirus et ce durant toute l'expérience.

Au moment de l'infection, le nombre de copies du gène par ml de la MCP du Thiovirus est de $6,24 \cdot 10^9$. Ce nombre de copies de gène par ml augmente significativement par la suite et atteint un maximum de $2,09 \cdot 10^{11}$ copies de gène par ml à 4 h d'expérience après 2 h de contact avec l'hôte potentiel. Ce nombre de copies de MCP décroît par la suite légèrement jusqu'à $7,74 \cdot 10^9$ copies de gène par ml. Après 34 h d'expérience, le nombre de copies de MCP reste légèrement supérieur à la quantité ajoutée au moment de l'infection. Cette augmentation du nombre de copies du gène de la MCP du Thiovirus, suite à l'ajout de la suspension virale aux cultures de *Methanocaldococcus*, montre une infection de ces souches de méthanogènes par le Thiovirus (Figure 7).

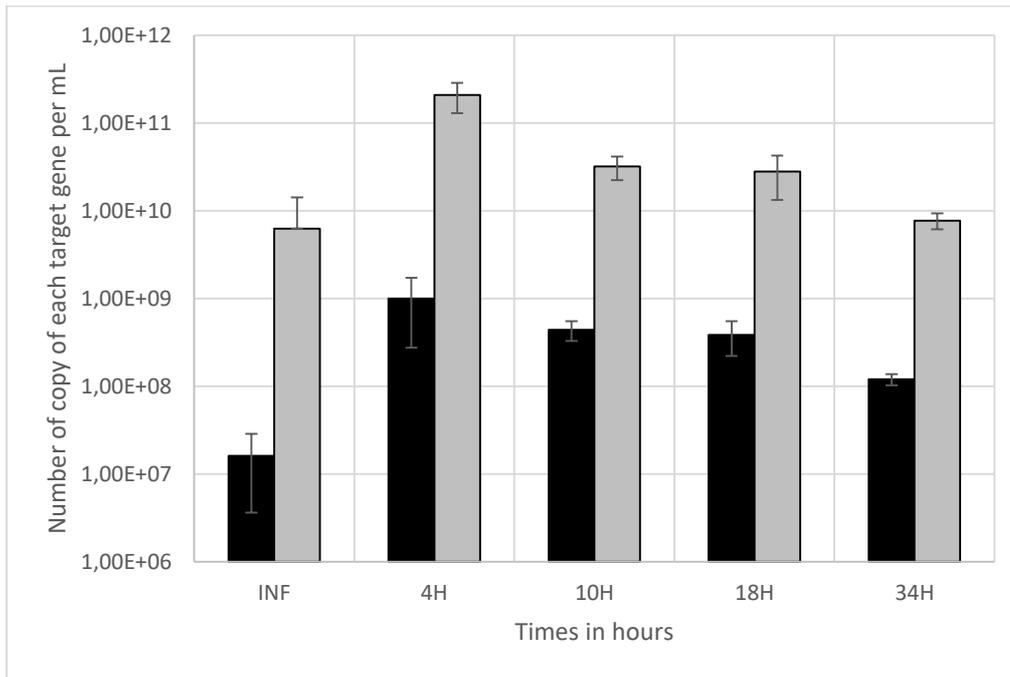


Figure 7 : Suivi Q-PCR du nombre de copies du gène 16S ciblant les *Methanocaldococcus* et le gène viral de la MCP ciblant le Thiovirus. En noir : évolution du gène 16S. En gris : évolution du gène de la MCP.

C. Génome viral

1. Comparaison profil ADNccc

Un élément extra-chromosomique a été isolé de *T. thioireducens* UBOCC-M-2423 par la méthode de la lyse alcaline qui permet d'obtenir de l'ADNccc (ADN circulaire clos de façon covalente). L'ADN viral extrait à partir d'une fraction purifiée de virions issus de cultures de *T. thioireducens* UBOCC-M-2423 a été comparé avec cet ADNccc isolé de cette même souche (Figure 8). Dans les deux cas, le même profil de restriction est observé. L'élément extra-chromosomique isolé à partir de cette souche est la forme circulaire libre du génome du Thiovirus.



Figure 8 : Comparaison des profils de restriction obtenus à partir de l'ADNccc isolé de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423 et de l'ADN viral obtenu à partir d'une fraction purifiée de virions issus de culture de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423. MT : Le marqueur de taille = 1 kb DNA ladder, Promega.

2. Analyse du génome viral

La séquence nucléotidique complète du génome de Thiovirus a été déterminée. Son génome circulaire à ADN double brin a une taille de 20 kb et parmi les 26 ORFs prédits à partir de la séquence génomique, il a été déterminé que 17 étaient communs avec PAV1 et 1 seul avec TPV1 (Figure 9). Ce Thiovirus, PAV1 et TPV1 partagent deux gènes (famille des lectines/glucanases de type concanavoline) potentiellement impliqués dans l'adhésion de ces virus à leurs hôtes. Le domaine lectine aurait un rôle dans les mécanismes d'adhésion cellulaire et pourrait être impliqué dans la mobilité des virus durant leur pénétration et leur libération de la cellule infectée. Ces gènes pourraient être considérés comme des marqueurs de ce groupe de virus (Tableau 4). La protéine majeure de capsid de Thiovirus, MCP (ORF25), a été identifiée ; c'est une protéine avec deux domaines transmembranaires (Tableau 4).

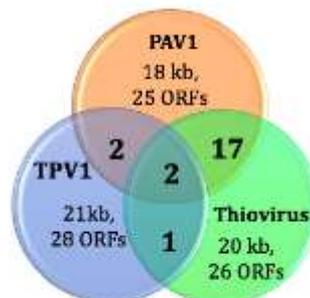


Figure 9 : ORFs partagés par les virus PAV1, TPV1 et le Thiovirus.

Chapitre III – Caractérisation de Thiovirus

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des ORFs du Thiovirus et leurs fonctions prédites.

Protéine	Résultats	Max score	Total score	Query cover	Identité
IRI-05c - cds1	CopG family transcriptional regulator [<i>Thermococcus cleftensis</i>]				
IRI-05c - cds2	type I secretion system permease/ATPase [<i>Congregibacter litoralis</i>]34,7	34,3	34,7	39 %	39 %
	toxin secretion ABC transporter permease and ATP-binding protein [gamma proteobacterium NOR5-3	34,3	34,3	39 %	39 %
	type I secretion system permease/ATPase [gamma proteobacterium NOR5-3]	34,3	34,3	39 %	39 %
IRI-05c - cds3	hypothetical protein [<i>Pyrococcus</i> sp. JT1]	152	152	92 %	49 %
IRI-05c - cds4	hypothetical protein [<i>Thermococcus</i> sp. AMT11]	55,1	55,1	96 %	42 %
IRI-05c - cds5	hypothetical protein [<i>Thermococcus thio-reducens</i>]	339	339	97 %	74 %
IRI-05c - cds6	hypothetical protein [<i>Thermococcus gammatolerans</i>]	120	120	79 %	52 %
	Hypothetical protein TGAM_0671 [<i>Thermococcus gammatolerans</i> EJ3]	120	120	79 %	52 %
	unnamed protein product [<i>Thermococcus prieurii</i> virus 1]	100	100	77 %	45 %
IRI-05c - cds7	winged helix [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	671	671	99 %	63 %
IRI-05c - cds8	hypothetical protein PAV1_ORF87 [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	58,2	58,2	100 %	40 %
IRI-05c - cds9	ribbon-helix-helix protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	111	111	100 %	92 %
IRI-05c - cds10	leucine zipper and winged helix DNA-binding domain [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	171	171	77 %	72 %
IRI-05c - cds11	hypothetical protein PAV1_ORF190 [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	64,7	64,7	94 %	30 %
IRI-05c - cds12	membrane protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	73,6	73,6	87 %	36 %
IRI-05c - cds13	hypothetical protein PAV1_ORF898 [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	442	498	64 %	43 %
IRI-05c - cds14	p12-10p [<i>Pyrococcus</i> sp. 12/1]	236	236	98 %	37 %
	ABC transporter ATPase [<i>Thermococcus</i> sp. IRI48]	226	226	98 %	36 %
	tn2-8p [<i>Thermococcus nautilii</i>]	223	223	98 %	36 %
IRI-05c - cds15	No significant similarity found				
IRI-05c - cds16	hypothetical protein PAV1_ORF137 [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	62,8	62,8	80 %	30 %
	Chain A, Structure Of Pav1-137, A Protein From The Virus Pav1 That Infects <i>Pyrococcus abyssi</i>	57,4	57,4	71 %	30 %
	Chain B, Structure Of Pav1-137, A Protein From The Virus Pav1 That Infects <i>Pyrococcus abyssi</i>	57	57	71 %	30 %
IRI-05c - cds17	hypothetical protein PAV1_ORF180b [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	92,4	92,4	94 %	35 %
IRI-05c - cds18	No significant similarity found				
IRI-05c - cds19	membrane protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	89,7	89,7	93 %	43 %
IRI-05c - cds20	concanavalin A-like lectin/glucanase [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	346	412	59 %	41 %
	unnamed protein product [<i>Thermococcus prieurii</i> virus 1]	299	299	55 %	41 %
IRI-05c - cds21	concanavalin A-like lectin/glucanase [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	389	389	79 %	38 %
	membrane protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	134	134	17 %	45 %
IRI-05c - cds22	membrane protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	185	185	97 %	46 %
IRI-05c - cds23	membrane protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	191	181	91 %	37 %
IRI-05c - cds24	hypothetical protein PAV1_ORF158 [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	89,4	89,4	67 %	39 %
IRI-05c - cds25	membrane protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	67,4	67,4	78 %	36 %
IRI-05c - cds26	membrane protein [<i>Pyrococcus abyssi</i> virus 1]	92,4	92,4	76 %	42 %

IV. Discussion et conclusion

A. Un nouveau virus de *Thermococcales*

De nombreuses souches de *Thermococcales* ont été isolées de sources hydrothermales océaniques profondes et sont ainsi à disposition pour explorer la virosphère associée à cet ordre archéen. Lors de précédentes études de la diversité virale au laboratoire, des cultures d'enrichissements obtenues à partir d'échantillons bruts (morceaux de cheminées hydrothermales, sédiments, ...) favorisant la croissance de *Thermococcales* ont permis d'apprécier la diversité morphologique des particules virales observées ainsi que d'entrevoir leur distribution géographique. Le morphotype citron, notamment, était prédominant parmi des VLPs observées (Geslin *et al* 2003b). De plus, PAV1 et TPV1, les deux seuls virus d'archées décrits à ce jour comme infectant des *Thermococcales* présentent cette morphologie. Ainsi, la caractérisation de ce Thiovirus, 3^e virus isolé de l'ordre des *Thermococcales*, semble confirmer la prédominance de cette morphologie pour cet ordre. Plus généralement, la forme citron est retrouvée chez les *Salterprovirus* et *Fusellovirus*. Plus récemment, des virus, les NSVs, isolés de *Thaumarchaeota* marines mésophiles présentent également cette forme (Kim *et al* 2019).

Une particularité intéressante que le Thiovirus semble partager avec PAV1 et TPV1 est la plasticité de la capsid. En effet, la capsid habituellement en forme de citron peut parfois prendre la forme d'un tube. Cette transformation des virions en tubes a également été observée pour le virus His1 qui infecte une euryarchée halophile et mésophile. Ce changement de morphologie observé chez ce virus est concomitant avec le relargage du génome viral (Hong *et al* 2015). Il est donc raisonnable de penser que cette forme allongée résulte du relargage du génome viral et que ce mécanisme est répandu au sein des virus en forme de citron. Des études de la structure des virions permettraient de mettre en évidence ce mécanisme et de mieux le comprendre. Est-ce un réarrangement programmé ou un effet dû à la pression interne relâchée ? En effet, dans la capsid virale, l'ADN est sous pression ce qui est nécessaire pour l'éjection de l'ADN. Une fois l'ADN viral injecté, la pression interne de la capsid serait diminuée et sa conformation pourrait en être affectée. La capsid en forme de citron serait comme un ballon gonflé lorsque le génome viral s'y trouve empaqueté, après éjection la capsid est « dégonflée » et présente une morphologie allongée. Cependant, d'autres mécanismes complémentaires entre en jeu lors de l'éjection de l'ADN viral (Molineux

and Panja 2013). Par exemple, le virus His1 n'éjecte que partiellement son ADN *in vitro* suggérant des processus cellulaires nécessaires pour compléter le transfert de l'ADN viral (Hong *et al* 2015).

B. Le Thiovirus et ses hôtes

Le Thiovirus est produit continuellement et en grande quantité (Jusqu'à 4.10^9 virions par ml) par son hôte qui ne subit pas de lyse due à l'infection. Il n'est pas retrouvé sous forme de provirus intégré dans le génome de son hôte. Il existe une relation stable de type chronique entre le Thiovirus et son hôte.

De façon inattendue, l'infectiosité du Thiovirus a pu être démontrée sur des souches de *Methanocaldococcus*. Ce virus isolé d'une *Thermococcales* semble donc capable d'infecter des archées appartenant à deux ordres différents.

Ce résultat doit être confirmé par des observations complémentaires. Dans un premier temps, isoler la souche (ou les souches) sensible à l'infection, parmi le lot de *Methanocaldococcus* testé, permettrait d'étudier plus particulièrement les relations que le Thiovirus et ce nouvel hôte entretiennent. Notamment, contrôler la croissance de l'hôte pendant l'infection par des suivis de DO (Densité Optique) ou des comptages sur cellules de Thoma. Ce suivi permettrait de détecter un éventuel retard de croissance de l'hôte résultant de l'infection virale. La production virale pourrait, elle, être suivie en comptage en microscopie à épifluorescence. En effet, dans le chapitre 2 de ce manuscrit, de réelles différences de production de VLPs étaient observées entre une *Methanocaldococcus* infectée par un virus et une non infectée. Enfin, des observations en microscopie électronique en transmission de solutions virales concentrées obtenues à partir de cultures de *Methanocaldococcus* infectée par le Thiovirus confirmeraient la production de virions en forme de citrons par les méthanogènes. Des analyses en cytométrie en flux pour le suivi de la population virale ne sont pas envisageables. En effet, des tests préliminaires n'ont pas permis de définir une fenêtre virale précise lors de l'analyse des cytogrammes.

Se pose la question sur le mode d'infection de ce virus face à un nouvel hôte très différent. Notamment, une particularité de nombreuses espèces de *Thermococcus* est la présence d'une double S-layer (« Surface layer ») (Klingl *et al* 2019). Les méthanogènes sont un groupe divers avec des structures et compositions de parois et d'enveloppes cellulaires

tout aussi variées. La pseudomuréine, des S-layers spécifiques ou encore le méthanocondrotine sont des spécificités des enveloppes et parois des méthanogènes. Cependant, le genre *Methanocaldococcus* ne possède pas ces spécificités et possède des gènes codant pour la S-layer qui trouvent des homologues avec des gènes codant pour la S-layer chez des *Thermococcales* (*Pyrococcus abyssi* et *Pyrococcus horrikoshii*) (Albers and Meyer 2011, Claus and König 2010, Klingl *et al* 2019).

Par ailleurs, les tests d'infection sur ces souches de méthanogènes ont été réalisés à partir d'une solution virale concentrée non traitée par des enzymes dégradant l'ADN libre. Ainsi, de l'ADN viral libre en contact avec les *Methanocaldococcus* a pu engendrer un phénomène de transformation naturelle. C'est peut-être ce que nous avons observé lors du suivi de la MCP par Q-PCR. Pour qu'il y ait production de virions il faudrait que le génome viral soit transmis dans son intégralité, sous une forme plasmidique linéarisée peut-être, afin qu'il puisse ensuite se répliquer.

A noter que, les fractions concentrées du Thiovirus observées en MET montrent le plus souvent des virions attachés à des vésicules membranaires. L'ADN viral pourrait donc être injecté puis protégé au sein de vésicules et être ainsi propagé dans l'environnement. Les vésicules membranaires sont connues pour être impliquées dans les transferts horizontaux de gènes et ce notamment au sein des archées, bien que peu d'informations soient disponibles sur le mécanisme de transfert au niveau de la surface de la cellule réceptrice. Des transferts de plasmides *via* des vésicules membranaires entre souches de *Thermococcus kodakarensis* ont notamment été démontrés (Domingues and Nielsen 2017, Wagner *et al* 2017). De façon intéressante, la souche *Thermococcus nautilus* porte un plasmide, pTN3, qui semble être un génome viral et qui peut être transféré au sein de vésicules membranaires (Gaudin *et al* 2014, Soler *et al* 2008, Soler *et al* 2011).

Les virus peuvent utiliser d'autres alternatives pour se propager et notamment utiliser les vésicules membranaires comme véhicules (Deatherage and Cookson 2012, Gaudin *et al* 2014). Ainsi, le génome de viral du Thiovirus pourrait être transféré à d'autres cellules en utilisant des vésicules membranaires.

Chapitre III – Caractérisation de Thiovirus

Les résultats des tests d'infectiosité sur la souche de référence de *T. thioeducens* DSM14981, non virosée, ainsi que sur un lot de plusieurs *Thermococcales* sont en attente. Des tests préliminaires, par suivi de la MCP par PCR, laissent suggérer que le Thiovirus pourrait infecter ces potentiels hôtes très proches d'un point de vue phylogénétique de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423, son hôte.

De plus, le criblage réalisé sur cette collection de *Thermococcales* a révélé deux potentiels nouveaux couples hôte-virus pour les souches UBOCC-M-2227 et UBOCC-M-2442 issues de deux sites d'échantillonnage différents (Menez Gwen et Rainbow) situés sur la ride médio-Atlantique. Les observations en MET de solutions virales concentrées, ainsi que le séquençage complet des génomes de ces deux souches permettrait de confirmer cette hypothèse.

D'un point de vue écologique, les différents acteurs de cette étude (Thiovirus, *Thermococcales* et *Methanococcales*) partagent le même type d'habitats que sont les sources hydrothermales océaniques profondes. Certaines souches proviennent de sites géographiquement proches comme les souches de *Thermococcales* qui sont toutes issues de la ride médio-Atlantique et peuvent en conditions naturelles reproduire les échanges observés en laboratoire. Les *Methanococcales* proviennent quant à elles du Pacifique. Cependant *Thermococcales* et *Methanococcales* peuvent partager le même type d'habitat favorisant les échanges génétiques entre ces deux ordres et ceci en condition naturelle. Ainsi, la prochaine étape serait de suivre des co-cultures de ces différents partenaires, réalisées en bioréacteurs permettant de faire varier différentes conditions physico-chimiques d'incubation, afin d'ouvrir de nouvelles perspectives dans la compréhension des relations hôtes-virus.

Ces travaux seront exploités et mis en forme pour être publiés dans une revue de rang A, à comité de lecture.

Discussion et Perspectives

I. Découverte d'archaeovirus hydrothermaux

A. De nouveaux virus hyperthermophiles

B. Diversité morphologique et stabilité des virus hyperthermophiles

II. Les cycles viraux au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes

III. Transferts d'éléments génétiques mobiles entre archées hydrothermales

A. Le mobilome de *M. fervens*

B. La gamme d'hôte de *T. thioeducens*

IV. Le mobilome abyssal : point de vue écologique

A. Poursuivre l'étude du mobilome associé aux méthanogènes hydrothermales

B. Interactions entre divers partenaires

I. Découverte d'archaeovirus hydrothermaux

A. De nouveaux virus hyperthermophiles

1. Des nouveaux virus de méthanogènes hyperthermophiles

Ces travaux de thèse se sont notamment portés sur la composante microbienne autotrophe hyperthermophile de sources hydrothermales océaniques profondes, en s'intéressant plus particulièrement au mobilome des méthanogènes du genre *Methanocaldococcus* qui sont abondantes au niveaux de ces écosystèmes (Ver Eecke *et al* 2012). 46 souches appartenant à ce genre, isolé de sites hydrothermaux divers, ont été passées au crible à la recherche de d'éléments génétiques mobiles (virus, vésicules et plasmides). Ces méthanogènes représentent en effet un modèle d'étude intéressant en tant que producteurs primaires colonisant ces écosystèmes océaniques extrêmes, et pour lesquels aucun virus n'avait été décrit. Globalement, peu de données sont disponibles concernant les virus associés aux méthanogènes thermophiles et hyperthermophiles avec seulement 4 caudovirus isolés de digesteurs de boues. Ψ M1 et Ψ M2, isolés du genre thermophile *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg (Meile *et al* 1989, Pfister *et al* 1998) et Φ F1 et Φ F3 isolés du genre *Methanobacterium thermoformicum* (Nölling *et al* 1993).

L'isolement, qui a été réalisé, de nouveaux systèmes hôte-virus de méthanogènes hyperthermophiles confirme l'existence de virus tête-queue infectant notamment le genre *Methanocaldococcus*. L'étude de *Methanocaldococcus vulcanius* M7^T a notamment permis d'observer des virions tête-queues très similaires à MFV1. Il est à noter que le provirus de *M. vulcanius* M7^T diffère dans son organisation de ceux de *M. fervens* AG86 et *M. jannaschii* JAL-1 et semble plus proche de celui de *Methanococcus maripaludis* C6, une méthanogène mésophile (Krupovic *et al* 2010).

Methanocaldococcus jannaschii JAL-1 a, par ailleurs, conduit à l'observation d'une morphologie particulière en forme de tige surmontée de boucles à chaque extrémité. Ce morphotype reste à confirmer par des observations complémentaires. Néanmoins, la morphologie observée rappelle celle de virus filamenteux de la famille *Tristromaviridae* (Rensen *et al* 2016). Cette forme pourrait aussi représenter celle d'un siphovirus mal structuré. En effet, l'étude du provirus associé à *M. jannaschii* JAL-1 suggère une morphologie plus

classique de caudovirus. Les séquences provirales retrouvées chez *M. fervens* et chez *M. jannaschii* JAL-1 présentent 63,8% de similarités (Krupovic *et al* 2010).

Les provirus des hyperthermophiles, *M. fervens* AG86 et *M. jannaschii* JAL-1, sont très proches tandis que celui de *M. vulcanius* M7^T est plus proche du provirus retrouvé chez les mésophile *M. maripaludis* C6. Ceci laisse supposer une diversification des têtes-queue de méthanogènes précédant celle des *Methanococcus* et des *Methanocaldococcus* (Krupovic *et al* 2010)

2. MFV1, premier siphovirus hyperthermophile

L'étude de la souche *M. fervens* AG86 a permis la caractérisation du virus MFV1 (*Methanocaldococcus fervens* virus 1) qui constitue à ce jour le premier virus hyperthermophile décrit présentant la morphologie tête-queue. Il a une taille d'environ 200 nm avec une tête icosaédrique d'environ 50 nm et une queue flexible, non contractile d'environ 150 nm. Il s'agit d'un virus tempéré pouvant être classé dans la famille *Siphoviridae*. C'est également le premier virus isolé et caractérisé pour le genre *Methanocaldococcus* qui comprend des méthanogènes hyperthermophiles, toutes isolées de sources hydrothermales océaniques profondes (Lyu and Liu 2018).

Ce virus a été isolé de l'hyperthermophile *Methanocaldococcus fervens* AG86 issue de sédiments (30 premiers centimètres) à proximité d'une cheminée hydrothermale (bassin de Guaymas, golfe de Californie) à une profondeur de 2000 m (Zhao *et al* 1988).

Les environnements abyssaux sont soumis à de fortes fluctuations physico-chimiques, imposant des conditions dites extrêmes. Lors des essais d'infection, les virions de MFV1 ont été incubés pendant 10 h seuls dans le milieu de culture, sans aucun contact avec un hôte potentiel, en conditions hyperthermophile et anaérobie, de manière à simuler certaines des situations environnementales que les virions pourraient rencontrer. Par la suite, des hôtes potentiels appartenant au genre *Methanocaldococcus* ont été mis en contact avec les virions. Le caractère infectieux de MFV1 a ainsi été prouvé. De plus, l'approche expérimentale utilisée, notamment lors des étapes de purification du virus, a permis de montrer que les virions sont stables face à divers traitements contraignants : variations de température allant de 4 à 80 °C, présence ou absence d'oxygène, centrifugation à haute vitesse encore traitement à la benzonase.

Le génome de MFV1 de 31 kb est composé de 44 ORFs dont 27 trouvent une annotation fonctionnelle dans les bases de données. L'analyse de ces ORFs a révélé un panel de gènes retrouvés typiquement chez les virus caudés. Des homologies avec des halovirus tête-queue ainsi qu'avec NrS-1, un bacteriovirus tête-queue hydrothermal, ont été détectées. Aucune homologie n'a été détecté avec les deux virus d'archées hydrothermaux déjà connus. Des gènes impliqués dans la maintenance et l'intégrité du génome (famille RecA) renforcent le fait que MFV1 est un virus adapté à l'environnement hydrothermal fluctuant (Hogrel *et al* 2018).

3. Thiovirus, un nouveau virus de *Thermococcales*

A ce jour, seuls trois virus de *Thermococcales* ont été isolés. Ce sont des virus en forme de citron isolés d'archées hyperthermophiles issues de systèmes hydrothermaux marins profonds. PAV1 isolé de *Pyrococcus abyssi* est le premier virus mis en évidence au niveau d'un écosystème hydrothermal marin (site White Lady dans le bassin nord-Fidjien) (Geslin *et al* 2003a). TPV1 infecte *Thermococcus prieurii* isolé de la dorsale Est-Pacifique (Gorlas *et al* 2012). A cette courte liste, s'ajoute grâce à ces travaux de thèse, un troisième virus que nous proposons de nommer Thiovirus. Ce travail s'est fait en étroite collaboration avec Nadège Bienvenu, assistante ingénieure au LM2E, dans le cadre du projet ERC EVOMOBIL porté par Patrick Forterre avec la participation de Violette Da-Cunha à l'Institut Pasteur.

Thiovirus qui infecte précisément *T. thioeducens* UBOCC-M-2423, une *Thermococcales* hyperthermophile hydrothermale (site Rainbow au niveau de la ride médio-Atlantique), présente également cette forme de citron. Cette morphologie est retrouvée chez des virus d'archées et plus particulièrement chez les *Fusellovirus* isolés de *Sulfolobus* et d'*Acidianus* et chez les *Salterprovirus* dont l'unique représentant (His1) infecte une euryarchée halophile extrême du genre *Haloarcula* (Krupovic *et al* 2018). Très récemment, des virus en forme de citron ont été isolés de *Thaumarchaeota* mésophiles (Figure 1 - (Kim *et al* 2019)). Les virus présentant cette forme citron sont donc régulièrement rencontrés et ce dans divers habitats comme les environnements hypersalins, les sources chaudes terrestres acides, les sources hydrothermales océaniques profondes ainsi que l'environnement marin de surface. Cette morphologie n'a jamais été rapportée pour des bacteriovirus. Cette forme citron n'est pas suffisante pour classer ces virus notamment au sein des *Fusellovirus* ou des *Salterprovirus* qui infectent des hôtes variés.

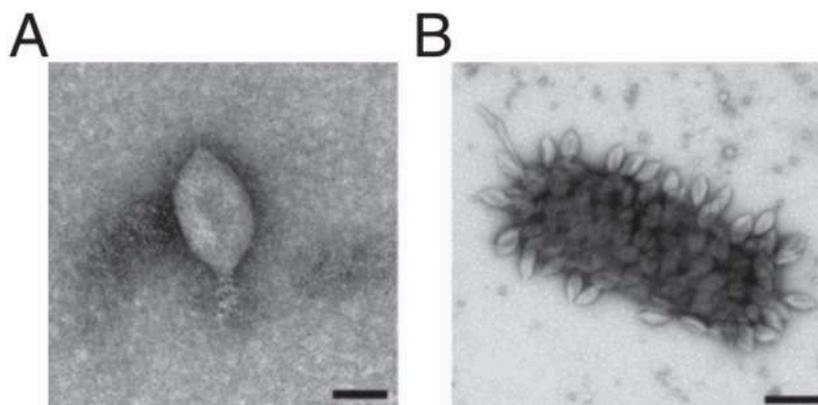


Figure 1: Les virions de NSV1 observés en MET. A. Le morphotype citron de NSV1. B : Les virions attachés à une cellule de *Nitrosopumilus* souche SW. La barre d'échelle représente 50 nm. (Kim *et al* 2019)

Dans le cas particulier de PAV1, TPV1 et de Thiovirus, le contenu génomique original de ces virus ne permet pas de les assigner à ces familles des *Fusellovirus* ou des *Salterprovirus*. Si la séquence codant pour la MCP (Protéine Majeur de la Capside virale) de PAV1 est homologue aux gènes codant les MCPs des *Fusellovirus*, celle de TPV1 trouve une homologie avec celle des MCPs du virus APSV1 d'*Aeropyrum pernix* et des VLPs de *Methanococcus voltae* A3 (Krupovic *et al* 2014). La MCP de Thiovirus trouve 36 % d'identité de séquence avec la MCP de PAV1. Par ailleurs, ces trois virus de *Thermococcales* ont seulement deux gènes en commun, portant des domaines LamGL appartenant à la famille des lectines/glucanases de type concanavaline A. Le domaine LamGL a une activité de liaison réversible aux polysaccharides pouvant intervenir à différents niveaux : stockage et transport, catalyse ou encore reconnaissance cellulaire et adhésion. Ainsi les deux gènes communs chez ces trois virus sont potentiellement impliqués dans la reconnaissance hôte-virus. Ces gènes pourraient être considérés comme des marqueurs de ce groupe de virus. Par ailleurs, le génome circulaire à ADN double brin de Thiovirus a une taille de 20 kb et parmi les 26 ORFs prédits, il a été déterminé que 17 étaient communs avec PAV1 et 1 seulement l'était avec TPV1. PAV1, TPV1 et Thiovirus, isolés du même type d'habitat, présentent la même morphologie et possèdent des gènes homologues. Ils pourraient donc être rassemblés dans une même nouvelle famille de virus avec sans doute différents genres. PAV1 et Thiovirus, semblant plus proches, pourraient être classés dans le même genre.

B. Diversité morphologique et stabilité des virus hyperthermophiles

Ces travaux de thèse ont permis d'étudier de nouveaux systèmes hôte-virus naturellement exposés à des conditions physico-chimiques extrêmes : fortes pressions hydrostatiques, températures oscillant entre 2 °C (pour l'eau de mer oxygénée) à plus de 100 °C au niveau des édifices hydrothermaux, exposition aux métaux et radiations ionisantes.

La morphologie tête-queue très « classique », largement reportée pour les bacteriovirus, a été observée dans ces travaux de thèse pour les virus de méthanogènes hyperthermophiles. Ce qui n'avait jamais été observée pour des virus d'archées hyperthermophiles. En effet, les hôtes archéens hyperthermophiles sont infectés par des virus aux morphologies diverses et originales dont certaines ne sont pas retrouvées pour des virus de bactéries ou d'eucaryotes (Krupovic *et al* 2018). Il semblait logique de penser que la grande diversité des morphotypes observée pour les virus d'archées hyperthermophiles était une adaptation aux environnements extrêmes qu'ils partagent avec leurs hôtes. De plus, le morphotype tête-queue peut sembler fragile notamment au niveau du point d'assemblage de la tête et de la queue surtout si l'on compare cette forme aux *Fusellovirus* hyperthermophiles qui présentent un morphotype plus compacte. C'est sans doute l'absence de virus tête-queue hyperthermophile jusqu'alors isolé et décrit qui a conduit à ce postulat. Nos travaux sur les caudovirus associés aux méthanogènes hyperthermophiles, nous permettent d'illustrer le fait que des morphologies binaires « classiques » sont adaptées aux conditions d'hyperthermophilie. Les paramètres influençant la structuration des archaeovirus ne sont pas encore déterminés (Prangishvili *et al* 2017).

La stabilité des virions et notamment de la capside virale est primordiale pour protéger le génome viral. Aucune information concernant la structure des capsides virales des virus abyssaux étudiés au laboratoire n'est pour l'instant disponible. Des techniques comme la cryo-microscopie électronique à transmission (cryo-EM) ou encore la microscopie à force atomique (AFM) permettraient d'étudier la structure de virus tête-queues abyssaux comme MFV1. La cryo-EM est couramment utilisée pour l'étude de structure de virus et ce notamment pour des siphovirus isolés d'environnements plus classiques comme le bacteriovirus T4 d'*E.coli* (Fokine *et al* 2004) ou le bacteriovirus TW1 isolé de *Pseudoalteromonas phenolica* (Wang *et al* 2018) (Figure 2 – A et B). Cette technique a également permis l'étude de la structure de capsides d'halovirus têtes-queues comme HVTV-1 et HSTV-2 (Pietila *et al* 2013a) (Figure 2 - C).

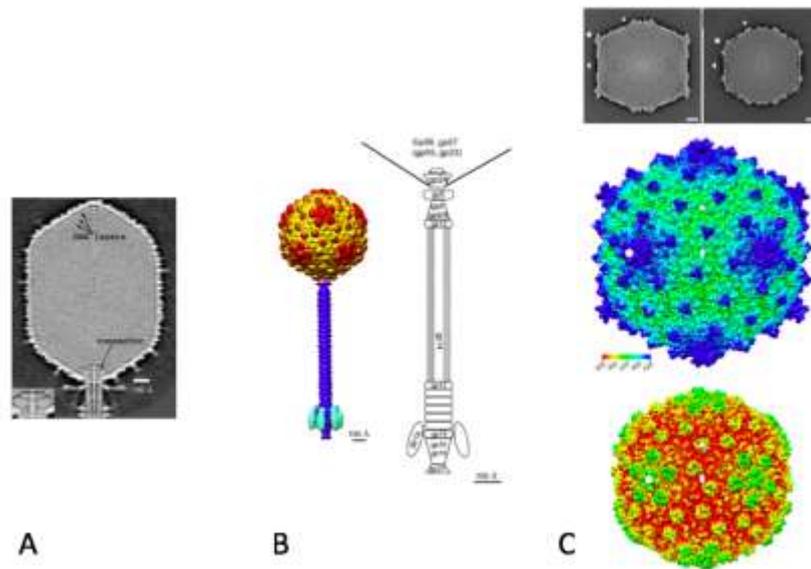


Figure 2: Exemples d'utilisation de la cryo-microscopie électronique en transmission pour étudier la structure de virus tête-queues. A: Bacteriophage T4 en cryo-EM (Fokine *et al* 2004). B: Reconstruction 3D de la structure du bacteriophage TW1 à l'aide de la cryo-EM (Wang *et al* 2018). C: Reconstructions 3D de la structure de la capside virale de HVTV-1 et HSTV-2, deux halovirus tête-queues (Pietila *et al* 2013a).

Au laboratoire, plusieurs siphovirus de bactéries thermophiles abyssales appartenant à l'ordre *Petrotogales* ont été isolés et décrits : MPV1, MCV1 et MCV2 (Lossouarn *et al* 2015b, Mercier *et al* 2018). La structure de ces bacteriophage thermophiles pourrait être comparée à celle de l'hyperthermophile MFV1 afin de mieux appréhender la résistance de ces virus aux hautes températures. De plus, des comparaisons pourraient également être menées avec des siphovirus de la colonne d'eau en collaboration avec le Dr. Anne-Claire Baudoux.

Les virus de *Thermococcales* en forme de citron ont d'autre part pu être observés sous une forme de tube allongé (Figure 3).

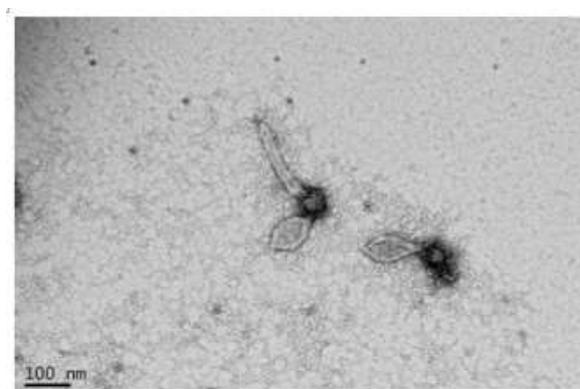


Figure 3: Observation en MET des virions du Thiovirus, en forme citron et en forme allongée accrochés, à des vésicules membranaires.

Ce changement de morphologie a également été observé pour le *Salterprovirus* His1 et ce phénomène est concomitant avec l'éjection du génome viral. De plus, l'étude de la structure des virions de His1 (Figure 4) montre la grande stabilité de ceux-ci. Ils restent infectieux même après des traitements chimiques forts. Par contre, une incubation à plus de 80 °C ou des traitements fortement alcalins semblent enclencher le relargage du génome viral et la modification de la morphologie des virions en tube (Hong *et al* 2015). Les virus de *Thermococcales* quant à eux sont soumis à des conditions de température de plus de 80 °C ou encore de fortes pressions hydrostatiques dans leur environnement naturel. Des études en cryo-EM et AFM de la structure des virions de *Thermococcales* permettraient d'étudier l'architecture et le mode d'assemblage des virions, et peut-être de montrer une certaine robustesse de ces virus extrêmophiles afin de mieux appréhender la stabilité de ces virions.

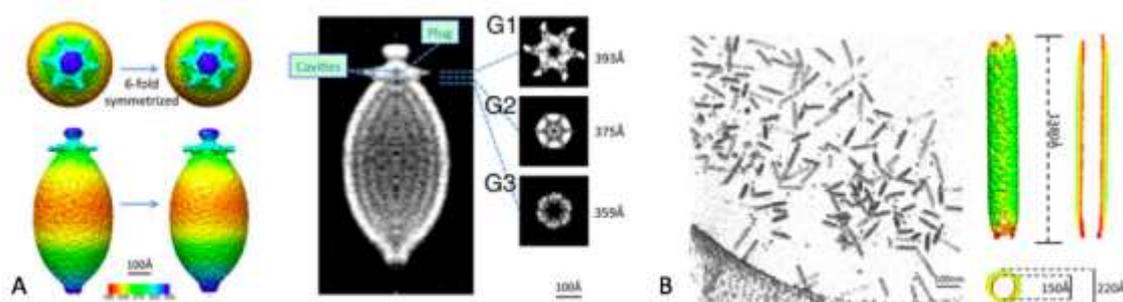


Figure 4: Analyses tomographiques du virion His1 sous sa forme citron (A) et sous sa forme de tube allongé (B) (Hong *et al* 2015).

La diversité virale au sein des sources hydrothermales océaniques profondes reste peu connue, et rassemble des virus aux morphologies classiques, comme les virus de *Methanocaldococcus*, et des virus aux morphologies plus spécifiques, comme les virus de *Thermococcales*. Les conditions extrêmes, notamment la température et la haute pression hydrostatique, des écosystèmes hydrothermaux ne semblent pas être un facteur de sélection influençant la morphologie des virus qui y sont associées. Des études de la structure de ces virus hyperthermophiles permettraient de comprendre leur stabilité lorsqu'ils sont soumis à des facteurs externes contraignants. Cette stabilité influence l'existence du virus à différents niveaux : choix du cycle viral, protection de l'information génétique et son relargage ou encore sa capacité d'infection de nouvelles cellules.

II. Les cycles viraux au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes

Les interactions entre les virus et leurs hôtes dans le milieu naturel peuvent s'avérer plus complexes que les cycles viraux modèles, classiquement décrits dans la littérature : cycle lytique, cycle lysogénique ou encore le cycle chronique. De multiples facteurs peuvent influencer le cycle viral. Les virus et leurs hôtes doivent parfois s'adapter, dans leurs stratégies de survie, à l'environnement qu'ils colonisent. Ils doivent également adopter des stratégies pour contrer l'attaque ou la défense de l'autre et parfois même semblent coopérer pour survivre.

Au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes, l'influence de la fluctuation des conditions physico-chimiques sur les relations hôte-virus pourrait être importante. Quelques études de viromes d'écosystèmes marins profonds sont disponibles. Ces études ont mis en évidence l'abondance et la diversité des génomes viraux dans ces écosystèmes. Plus globalement, l'analyse des métagénomes étudiés montre que la lysogénie semble être plus répandue au niveau des sources hydrothermales (Anderson *et al* 2014, Williamson *et al* 2008). Le virus sous sa forme intégrée est ainsi plus stable et évite les conditions contraignantes de son environnement. La dégradation des virions peut être importante dans les environnements marins profonds, le bacteriovirus MCV1 par exemple survit moins de 5 h dans l'environnement, limitant ainsi ses chances de rencontrer un nouvel hôte à infecter. Les relations de lysogénie peuvent également être bénéfiques pour l'hôte. L'infection virale peut conduire à des échanges de gènes qui peuvent améliorer l'adaptation de l'hôte. Porter un provirus peut également protéger la cellule en l'immunisant contre de nouvelles infections par des virus proches ou plus éloignés. Enfin, des virus hydrothermaux, tempérés et lytiques, découverts par des études de métagénomiques portent des gènes auxiliaires du métabolisme (AMG – « Auxiliary Metabolic Genes ») impliqués notamment dans le métabolisme énergétique du soufre et du méthane (Anderson *et al* 2011, Anderson *et al* 2014, Breitbart 2012, Rosenwasser *et al* 2016).

Discussion et Perspectives

L'étude du cycle viral de MFV1 a mis en évidence une relation de lysogénie particulière avec son hôte. En effet, ce virus tempéré est produit en grande quantité (de l'ordre de 10^8 virions/ml) tout au long de la croissance de son hôte sans conduire à une lyse visible de celui-ci. De nombreux essais d'induction n'ont pas abouti à une augmentation de la production virale. Il a simplement été possible d'obtenir les concentrations virales maximales plus rapidement sous certaines conditions. L'exposition de nos systèmes hôte-virus à des stress proches de ceux qu'ils pourraient rencontrer dans le milieu naturel (choc froid) semble tout de même avoir un impact sur la production virale avec une stimulation de cette production. Certains lysogènes exposés aux stress extérieurs semblent plus sensibles que d'autres puisqu'une lyse brutale n'est pas observée à l'échelle de la population.

Les virions de MFV1 sont également très stables face à diverses conditions physico-chimiques (présence d'oxygène, traitement à la benzonase, exposition à des températures allant de 4 à 80 °C). En conditions hyperthermophiles, les capacités d'infection ont notamment été démontrées sur des souches hydrothermales du genre *Methanocaldococcus*. En effet, après être restés dans le milieu de culture 10 h à 80 °C sans hôte à infecter, les virions ont conservé leur pouvoir infectieux comme nous l'avons montré par nos analyses QPCR de suivis de cinétiques virus-hôtes. Cette stabilité virale est en adéquation avec les conditions extrêmes rencontrées au niveau des sources hydrothermales.

Ainsi, les virions MFV1 restent capables après une longue période d'incubation en conditions hyperthermophiles, d'infecter in vitro des souches du genre *Methanocaldococcus* proches phylogénétiquement de l'espèce *M. jannaschii* notamment. Les *Methanocaldococcus* testées proviennent de sites hydrothermaux divers mais tous situés sur la ride Est-Pacifique et certaines proviennent du bassin de Guaymas d'où a été isolé *M. fervens*, l'hôte de MFV1. D'un point de vue écologique, la possibilité pour MFV1 d'infecter différentes *Methanocaldococcus* partageant la même niche écologique est donc envisageable dans le milieu naturel.

De plus, l'analyse des gènes de chaque partenaire nous informe également sur leurs relations. Notamment, L'ORF44 du génome de MFV1 code pour une intégrase du type XerC/D-like. Ce sont des enzymes importantes pour l'intégration de l'ADN viral dans le génome de l'hôte par recombinaison confirmant la capacité du virus à pouvoir intégrer efficacement son génome viral. L'ORF7 trouve une similarité avec deux répresseurs qui ont un rôle dans le

Discussion et Perspectives

« switch » entre le cycle lysogénique et le cycle lytique : CI et Cro, ce qui montre que les phénomènes d'induction du provirus de MFV1 sont régulés. MFV1 possède des gènes (ORF33 et ORF36) codant pour un système TA (HicA / HicB) suggérant une acquisition *via* un hôte.

Les systèmes toxine-antitoxine sont retrouvés chez beaucoup de bactéries. Les systèmes les mieux étudiés sont ceux où ces deux éléments sont des protéines. Le système HicA / HicB est l'un de ceux-ci. Les interactions entre HicA, la toxine, HicB, l'antitoxine et l'ADN en amont des gènes qui les codent régulent le système (Winter *et al* 2018). De façon intéressante, la séquence provirale de *M. vulcanius* M7^T possède des gènes codant pour un système TA impliquant les deux protéines RelE et RelB qui sont situés à une position équivalente à celle des gènes codant pour le système TA HicA / HicB dans la séquence provirale de *M. fervens*. Ces deux systèmes pourraient être impliqués dans le maintien d'une relation de lysogénie stable. Les systèmes TA font partie de l'arsenal de défense des microorganismes pour se protéger contre les infections virales. De plus, l'hôte, *M. fervens*, tout comme *M. jannaschii* JAL-1, possède des gènes qui codent pour une protéine argonaute à activité endonucléase (MfAgo) également impliquée dans la défense de l'hôte face à de l'ADN exogène (Chong *et al* 2019).

Une analyse de la séquence chromosomique de l'hôte, *M. fervens*, permettrait de déterminer la présence de gènes impliqués dans des systèmes de défense et notamment s'ils constituent des copies de ceux présents dans le génome viral (gènes codant pour le système TA). Les gènes viraux pourraient également être complémentaires des gènes de l'hôte. En complétant certains ORFs présents sur le chromosome, ils contribueraient à constituer des systèmes entiers et fonctionnels.

TPV1, un virus hydrothermal de *Thermococcales*, ne présente pas non plus une relation de lysogénie classique avec son hôte. La production basale non induite de TPV1 est élevée (de l'ordre de 10^9 virions/ml). Dans ce cas, la production virale peut être induite (production virale allant jusqu'à 10^{11} virions/ml) par les UV mais cette induction n'engendre pas de lyse cellulaire drastique de l'hôte (Gorlas *et al* 2012).

Ces virus et leurs hôtes semblent avoir adopté diverses stratégies pour se maintenir. L'absence de lyse visible chez l'hôte, corrélée à une production virale basale élevée suggère des phénomènes d'induction spontanée. L'excision du provirus n'est pas déclenchée par un

Discussion et Perspectives

élément de stress extérieur dans ce type d'induction (Howard-Varona *et al* 2017). En réalité, une partie de la population microbienne est lysée par ce phénomène d'induction spontanée tandis qu'une autre partie des cellules continue son développement conduisant à un état non homogène de la population cellulaire. Cette relation de lysogénie particulière, n'engendrant pas la lyse brutale de l'hôte, semble également bénéfique pour la survie de celui-ci. Les virus, eux, peuvent rester intégrés dans le génome de leur hôte dans une relation stable de lysogénie. Ils peuvent également être produits sous forme de virions en grande quantité dans l'environnement hydrothermal. Ces virions jouent alors le rôle d'explorateurs pour trouver de nouveaux hôtes à infecter. Une coévolution mutualiste semble s'être établie entre ces virus et leurs hôtes.

PAV1 et le Thiovirus, ne sont pas retrouvés sous forme de provirus intégré à leur hôte. Ils sont produits sous forme de virions dans le milieu de culture de leurs hôtes (de l'ordre de 10^6 virions/ml et 10^9 virions/ml respectivement). Cependant, la croissance de l'hôte ne semble pas affectée puisque, dans les deux cas, aucune lyse brutale n'est observée. Ainsi, ces deux virus entretiennent une relation d'infection chronique, c'est-à-dire un équilibre entre la production virale et la croissance cellulaire, qui permet une stabilité pour chacun des partenaires. Des virus étant produits en grandes quantités permettraient de multiplier les chances d'infection de nouvelles cellules. L'hôte est stable et reste accessible pour les virions. Là encore, une impression de coévolution mutualiste semble s'être mise en place pour ces systèmes hôte-virus.

Les virus d'archées abyssaux entretiennent donc des relations complexes avec leurs hôtes. L'étude de nouveaux viromes permettrait d'avoir des données en grandes quantités qui sont d'autant d'indices pour comprendre les relations existantes entre les virus hydrothermaux et leurs hôtes. Cependant, l'étude de systèmes hôte-virus isolés par des techniques culture-dépendante reste indispensable et complémentaire pour observer et caractériser ces relations qui peuvent se révéler complexes.

III. Transferts d'éléments génétiques mobiles entre archées hydrothermales

Les virus influencent l'équilibre des communautés microbiennes. Ce sont notamment de puissants agents de l'évolution et de l'adaptation de leurs hôtes à leur environnement et ce notamment *via* des phénomènes de transferts horizontaux de gènes (Salmond and Fineran 2015).

A. Le mobilome de *M. fervens*

En plus d'être infectée par le virus MFV1, *M. fervens* possède un second élément génétique mobile, le plasmide pMEFER01, de 22 kb (Soler *et al* 2011). Lors des tests d'infection, il s'est avéré que le plasmide était également transmis aux *Methanocaldococcus* à l'issue des tests d'infection par MFV1. Ces tests ont été réalisés soit avec des fractions virales concentrées traitées avec de la benzonase, permettant de s'affranchir de tout ADN exogène libre dans les solutions virales, soit avec des solutions virales purifiées mais non traitées à la benzonase. Dans les deux cas, un signal fort pour le plasmide était obtenu en PCR ou en Q-PCR. Le signal du plasmide est toujours corrélé au signal du virus dans ces expériences. Lorsque le signal du virus est perdu, notamment dans le cas de tests de la dégradation des virions (« viral decay ») ou de tests d'infectiosité non fructueux, le signal du plasmide est également perdu. Ces résultats semblent indiquer que les capsides virales de MFV1 peuvent empaqueter le plasmide, et ainsi le transférer à de nouvelles cellules.

Au niveau de l'écosystème abyssal, un phénomène similaire a été décrit au laboratoire par Julien Lossouarn lors de la caractérisation de MPV1, un bacteriovirus infectant une *Petrotogales* thermophile (Lossouarn *et al* 2015b). En effet, lors du passage du cycle lysogénique au cycle lytique par induction à la mitomycine C, le plasmide pMP1 est davantage répliqué par rapport au virus. Le nombre de copies du premier est multiplié par 10 comparé à des conditions de culture sans stress tandis que le nombre de copies du virus n'est multiplié que par 3. Le séquençage et l'analyse du contenu des capsides virales produites à l'issue du déclenchement du cycle lytique a d'ailleurs révélé une couverture 20 fois plus élevée pour les « reads » plasmidiques que pour les « reads » viraux. Tout ceci pourrait illustrer un exemple de piratage moléculaire, où le plasmide pMP1 pirate les capsides virales du virus « helper »

Discussion et Perspectives

MPV1. Le mécanisme précis qui régit l'encapsidation préférentielle du plasmide reste cependant encore non déterminé (Lossouarn *et al* 2015b).

Lors du séquençage du génome viral de MFV1, il n'a pas été observé un fort pourcentage de séquences plasmidiques, comme pour MPV1, ce qui suggère que très peu d'ADN plasmidique était empaqueté. Les analyses effectuées tant en PCR qu'en Q-PCR semblent néanmoins indiquer que le plasmide soit bel et bien transporté via certaines capsides de MFV1 libérées spontanément. L'ADN viral de MFV1 analysé n'a pas été obtenu en condition d'induction face à un stress comme l'ADN viral de MPV1. L'induction augmentant fortement la quantité de virions produite, elle influence potentiellement le phénomène de piratage et donc la quantité de plasmide empaqueté dans le cas de MPV1. En effet, si plus de capsides sont produites, c'est donc une augmentation de la possibilité d'empaquetage du plasmide. Par ailleurs, le suivi QPCR des expériences d'infectiosité se fait sur de l'ADN total et non sur de l'ADN viral concentré, ce qui peut également expliquer les différences de ratios avec ce qui a été observé pour l'analyse de l'ADN viral extrait à partir d'une solution purifiée de virions.

Ce phénomène de transfert de plasmide a déjà été observé pour un autre virus de méthanogène, Ψ M1. En effet, 10 à 15 % des capsides virales de ce virus contiennent des multimers du plasmide cryptique pME2001 de 4,5 kb. La taille totale de ces multimers est identique à la taille du génome viral, 30,4 kb, ce qui montre que le mécanisme d'empaquetage du virus est précis pour ces deux éléments sans nécessité de similarités de séquences entre ces deux éléments. L'étude de l'organisation du génome de Ψ M1 a permis d'identifier des sites pac suggérant un mécanisme d'empaquetage suivant le modèle du « headful » (Meile *et al* 1989, Streisinger *et al* 1967).

Dans le cas de MFV1, une seule copie du plasmide, d'une taille de 22 kb, pourrait être empaquetée par capside viral (le génome viral faisant 31 kb). Ces phénomènes de piratage moléculaire sont intéressants pour l'hôte puisque qu'ils limitent les expositions à une infection virale car une partie des virions contiennent un génome plasmidique et non viral.

Par ailleurs, *M. fervens*, et d'autres *Methanocaldococcus* étudiées produisent des vésicules membranaires. Il serait donc possible que le plasmide soit également contenu dans des vésicules membranaires, bien que lors de l'observation en MET des suspensions virales concentrées, peu voire aucune vésicule n'était observée.

Ainsi, pMEFER01 pourrait utiliser les capsides virales et les vésicules membranaires produites par son hôte pour se propager et se maintenir au sein de nouvelles cellules. Patrick Forterre et son équipe, en 2017, proposent le terme de « plasmidion » se référant au cas d'un plasmide se propageant dans l'environnement *via* des vésicules membranaires pour être transmis à d'autres cellules. Ce plasmide nommé pR1SE code notamment pour certaines des protéines des vésicules membranaires qu'il utilise comme véhicule pour se propager (Erdmann *et al* 2017, Forterre *et al* 2017).

B. La gamme d'hôte de *T. thioeducens*

Thiovirus semble pouvoir infecter des souches appartenant au genre *Thermococcus* proches phylogénétiquement de *T. thioeducens* UBOCC-M-2423, son hôte. Ces souches partageant le même type d'habitat, leur infection par le Thiovirus semble possible dans le milieu naturel.

De façon plus inattendue, Thiovirus semble capable d'infecter des souches du genre *Methanocaldococcus*. Cela suggère la possibilité pour ce virus d'infecter des souches appartenant à deux ordres archéens différents : *Thermococcales* et *Methanococcales*. Les archées de ces deux ordres partagent la même niche écologique et sont bien représentées au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes. Des échanges de gènes semblent probables entre ces deux groupes. A l'image de leurs plasmides qui partagent notamment de nombreuses homologues séquences avec l'exemple de la famille de plasmide pT26-2 qui rassemble des plasmides de *Thermococcales* et de *Methanococcales* (Badel *et al* 2019). Les plasmides pMETVU01-like trouvés chez les *Methanococcales* résultent d'un transfert horizontal à partir des *Thermococcales* (Krupovic *et al* 2013). Ces modèles suggèrent que des transferts de plasmides voire de génome viraux sont possibles entre *Thermococcales* et *Methanococcales*.

Cependant, le transfert du génome viral de Thiovirus aux *Methanocaldococcus* via sa capsid virale semble peu probable du fait de la spécificité des récepteurs viraux. En effet, de nombreuses espèces de *Thermococcus* ont la particularité de posséder une double S-layer (« Surface layer ») (Klingl *et al* 2019). Les méthanogènes peuvent présenter des spécificités de parois et d'enveloppe comme la pseudomuréine, des S-layers spécifiques ou encore le méthanochoondrotine. Le genre *Methanocaldococcus* ne possède pas ces spécificités et

Discussion et Perspectives

possède des gènes codant pour la S-layer qui trouvent des homologies avec des gènes codant pour la S-layer chez des *Thermococcales* (*Pyrococcus abyssi* et *Pyrococcus horrikoshii*) (Albers and Meyer 2011, Claus and König 2010, Klingl *et al* 2019).

Les suspensions virales utilisées pour ces tests d'infectiosité sont concentrées et non purifiées et n'ont pas été traitées à la benzonase. Ainsi, de l'ADN viral libre peut se retrouver dans ces suspensions suggérant des phénomènes de transformation naturelle. Des méthanogènes telles que *Methanococcus voltae* (Bertani and Baresi 1987) et *Methanococcus maripaludis* (Tumbula *et al* 1994) sont connues comme étant naturellement transformables.

Lors des observations en MET de ces suspensions, il a été constaté que les virions de Thiovirus sont attachés à des vésicules membranaires pour la grande majorité d'entre eux. De l'ADN viral pourrait donc être contenu dans ces vésicules membranaires qui serviraient de vecteurs au Thiovirus, pour infecter des *Methanocaldococcus* en s'affranchissant du même coup du spectre d'hôtes imposé par sa capsid virale. De façon plus générale, les vésicules membranaires jouent divers rôles pour les archées, qui ont notamment été mis en évidence pour les *Thermococcales* (Gaudin *et al* 2013, Gaudin *et al* 2014, Gill *et al* 2019, Gorlas *et al* 2015).

Les deux nouveaux virus associés aux sources hydrothermales, MFV1 et Thiovirus, se sont révélés comme étant capable d'infecter de nouveaux hôtes. D'autres éléments génétiques mobiles comme les plasmides et les vésicules membranaires pourraient contribuer aux transferts de gènes observés.

IV. Le mobilome abyssal : point de vue écologique

A. Poursuivre l'étude du mobilome associé aux méthanogènes hydrothermales

Il est estimé qu'un tiers du carbone microbien total (entre 50 et 90 Pg) se trouve dans les sédiments sous-marins (Ver Eecke *et al* 2012). L'impact biogéochimique des microorganismes abyssaux reste pourtant très peu évalué. Ceci résulte des limitations d'échantillonnage et des contraintes techniques liées à l'étude de ces environnements extrêmes (Stewart *et al* 2019). Des études culturales et moléculaires ont montré l'abondance des méthanogènes au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes. Les méthanogènes prédominantes dans ce type d'environnement sont les *Methanothermococcus* thermophiles et les *Methanocaldococcus* hyperthermophiles (Flores and Reysenbach 2011, Fortunato *et al* 2018, Ver Eecke *et al* 2012). La méthanogénèse est un métabolisme, dont le produit final est le méthane, et qui est souvent prédominant dans les sédiments marins de sub-surface. Le méthane est un puissant gaz à effet de serre (Anderson *et al* 2009, Hedderich *et al* 2013, Lyu *et al* 2018). Les *Methanocaldococcus* réalisant la méthanogénèse sont hydrogénotrophes. La disponibilité en H₂ influence la croissance des *Methanocaldococcus* et donc le taux de méthane produit. Des co-cultures suggèrent que des limitations en H₂ peuvent être partiellement contrées grâce à des syntrophies avec des hétérotrophes hyperthermophiles (Ver Eecke *et al* 2012).

L'impact des infections virales sur les cycles biogéochimiques est important notamment au niveau des flux de carbone. Au niveau de l'écosystème abyssal, il est estimé qu'un relargage d'environ 0,3 à 0.5 gigatonnes de carbone par an soit imputé aux infections virales (Danovaro *et al* 2016).

L'infection virale des méthanogènes influence la composition de la population de l'hôte ainsi que son potentiel métabolique (Anderson *et al* 2014, Danovaro *et al* 2016). Observer les effets directs de l'infection sur les méthanogènes hydrothermales à notre disposition et sur la production de méthane pourrait être une perspective d'étude permettant d'avoir un point de vue écologique plus global de nos systèmes hôte-virus. En effet, comparer une population infectée ou non infectée par MFV1 par des mesures de production de

Discussion et Perspectives

méthane, par exemple par chromatographie gazeuse (micro-GC disponible au laboratoire) serait une indication de l'importance des infections virales au niveau de la production du méthane.

Par ailleurs, les vésicules membranaires sont décrites comme impliquées dans le cycle du carbone dans l'environnement marin (Biller *et al* 2014) et les *Methanocaldococcus* produisent des vésicules membranaires. De plus, lorsque la production de vésicules est induite par l'ajout de cuivre en excès dans le milieu de culture, peu voire aucun virus n'est observé en MET pour des solutions virales concentrées tandis que de nombreuses vésicules sont visibles. Certaines présentent un aspect plein et sont plus foncées que la plupart des vésicules observées sans stress induit par l'ajout de cuivre. D'autres présentent une membrane plus foncée. Ces résultats suggèrent un système de détoxification du cuivre. Des résultats similaires ont été obtenus lors de la thèse de Coraline Mercier lors de la caractérisation de MCV1 et MCV2 (Mercier *et al* 2018). L'observation de l'effet de métaux lourds sur nos modèles s'inscrit dans un objectif d'utiliser des facteurs de stress environnementaux (pouvant être naturellement présent dans l'environnement des souches étudiées). Comprendre les conditions pour lesquelles elles sont produites (détoxification par exemple) et dans quelle proportion montrerait leurs rôles et leurs importances au niveau de l'écosystème abyssal.

Ces travaux de thèse ont mis en évidence des systèmes hôtes-mobilomes pour les *Methanocaldococcus* hyperthermophiles. Poursuivre les efforts de recherche et d'étude des éléments génétiques mobiles associés à ces microorganismes est primordial à différents niveaux. L'étude du mobilome des méthanogènes permettrait d'entrevoir un impact plus global, notamment sur les cycles biogéochimiques.

B. Interactions entre divers partenaires

Les systèmes hydrothermaux ont des conditions physico-chimiques fluctuantes, ce qui influence les cycles de vie des virus et leurs hôtes. Les interactions avec d'autres éléments génétiques mobiles impactent également leurs relations. Pour essayer de comprendre les phénomènes qui se déroulent dans le milieu naturel et mieux appréhender les rôles de chacun, il faut pouvoir recréer les conditions qui s'y trouvent, ou du moins s'en approcher. Ainsi, des études basées sur la culture de systèmes hôte-virus en bioréacteurs permettant de mieux contrôler et surtout de varier les conditions (température, pression, pH, concentration en matière organiques) semblent intéressantes. Un certain nombre de souches étudiées lors de ces travaux de thèse sont disponibles et seront également des outils de choix pour l'étude de futurs systèmes hôte-virus. Les effets des conditions fluctuantes sur l'infection et les cycles viraux pourraient être mieux appréhendés avec ce genre de suivi en bioréacteurs déjà utilisés au laboratoire (Landreau *et al* 2016, Postec *et al* 2007). Des co-cultures en bioréacteurs archées-bactéries ou encore entre archées de différents ordres portant des éléments génétiques mobiles, couplés à des suivis Q-PCR, sont possibles grâce à nos divers systèmes hôtes-virus et apporteront des informations complémentaires sur les relations entre ces divers partenaires : structure, dynamique des populations virales et microbiennes ou encore stratégies de survies de chacun. Ces études de co-cultures seront notamment menées par Jie Lyu au cours de sa thèse au LM2E.

Virus et plasmides utilisent des stratégies variées pour se maintenir au sein des cellules hôtes. Les phénomènes d'infection ou de transferts de plasmides qui en résultent ont un impact sur les communautés microbiennes. Ainsi, les systèmes hôte-virus sont souvent rejoints par un troisième partenaire plasmidique interférant dans leurs relations. Les vésicules s'ajoutent à ce schéma déjà complexe. D'un point de vue écologique, ces différents acteurs sont impliqués de façon plus globale dans les cycles biogéochimiques. Ce sont finalement des systèmes hôte-mobilome qu'il faut caractériser pour une compréhension globale des rôles de chacun et leurs relations. Se rapprocher des conditions du milieu naturel semble primordial pour raconter l'histoire de ces différents protagonistes.

Bibliographie

Ackermann H-W (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology* **152**: 227-243.

Ackermann H-W, Prangishvili D (2012). Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of virology* **157**: 1843-1849.

Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AM, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ *et al* (2017a). 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. *Arch Virol* **162**: 1441-1446.

Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ *et al* (2017b). Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol* **162**: 2505-2538.

Ahlgren NA, Fuchsman CA, Rocap G, Fuhrman JA (2019). Discovery of several novel, widespread, and ecologically distinct marine *Thaumarchaeota* viruses that encode amoC nitrification genes. *The ISME Journal* **13**: 618-631.

Ahn DG, Kim SI, Rhee JK, Kim KP, Pan JG, Oh JW (2006). TTSV1, a new virus-like particle isolated from the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*. *Virology* **351**: 280-290.

Alain K, Marteinsson VT, Miroshnichenko ML, Bonch-Osmolovskaya EA, Prieur D, Birrien J-L (2002). *Marinitoga piezophila* sp. nov., a rod-shaped, thermo-piezophilic bacterium isolated under high hydrostatic pressure from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1331-1339.

Albers SV, Meyer BH (2011). The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol* **9**: 414-426.

Anantharaman K, Duhaime MB, Breier JA, Wendt KA, Toner BM, Dick GJ (2014). Sulfur oxidation genes in diverse deep-sea viruses. *Science* **344**: 757-760.

Anderson I, Ulrich LE, Lupa B, Susanti D, Porat I, Hooper SD *et al* (2009). Genomic characterization of methanomicrobiales reveals three classes of methanogens. *PLoS One* **4**: e5797.

Bibliographie

Anderson RE, Brazelton WJ, Baross JA (2011). Using CRISPRs as a metagenomic tool to identify microbial hosts of a diffuse flow hydrothermal vent viral assemblage. *FEMS Microbiology Ecology* **77**: 120-133.

Anderson RE, Sogin ML, Baross JA (2014). Evolutionary strategies of viruses, bacteria and archaea in hydrothermal vent ecosystems revealed through metagenomics. *PLoS One* **9**: e109696.

Aravind L, Tatusov RL, Wolf YI, Walker DR, Koonin EV (1998). Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles. *Trends in Genetics* **14**: 442-444.

Arnold HP, Ziese U, Zillig W (2000a). SNDV, a novel virus of the extremely thermophilic and acidophilic archaeon *Sulfolobus*. *Virology* **272**: 409-416.

Arnold HP, Zillig W, Ziese U, Holz I, Crosby M, Utterback T *et al* (2000b). A novel *lipothrixvirus*, SIFV, of the extremely thermophilic crenarchaeon *Sulfolobus*. *Virology* **267**: 252-266.

Atanasova NS, Roine E, Oren A, Bamford DH, Oksanen HM (2012). Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environ Microbiol* **14**: 426-440.

Atanasova NS, Pietila MK, Oksanen HM (2013). Diverse antimicrobial interactions of halophilic *archaea* and *bacteria* extend over geographical distances and cross the domain barrier. *Microbiologyopen* **2**: 811-825.

Atanasova NS, Bamford DH, Oksanen HM (2016). Virus-host interplay in high salt environments. *Environ Microbiol Rep* **8**: 431-444.

Badel C, Erauso G, Gomez A, Catchpole R, Gonnet M, Oberto J *et al* (2019). The global distribution and evolutionary history of the pT26-2 archaeal plasmid family. *Environ Microbiol*.

Barker HA (1936). Studies upon the methane-producing bacteria **7**: 420-438. *Archiv für Mik* **7**: 420-438.

Baross JA, Holden JF (1996). Overview of Hyperthermophiles and Their Heat-Shock Proteins. In: Richards FM, Eisenberg DS, Kim PS (eds). *Advances in Protein Chemistry*. Academic Press. pp 1-34.

Barrangou R, Van Der Oost J (2015). Bacteriophage exclusion, a new defense system. *EMBO J* **34**: 134-135.

Bibliographie

- Basak S, Mukhopadhyay P, Gupta SK, Ghosh TC (2010). Genomic adaptation of prokaryotic organisms at high temperature. *Bioinformatics* **4**: 352-456.
- Bath C, Dyall-Smith ML (1998). His1, an Archaeal Virus of the *Fuselloviridae* Family That Infects *Haloarcula hispanica*. *Journal of Virology* **72**: 9392-9395.
- Bath C, Cukalac T, Porter K, Dyall-Smith ML (2006). His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, *Salterprovirus*. *Virology* **350**: 228-239.
- Bellack A, Huber H, Rachel R, Wanner G, Wirth R (2011). *Methanocaldococcus villosus* sp. nov., a heavily flagellated archaeon that adheres to surfaces and forms cell-cell contacts. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**: 1239-1245.
- Bergh Ø, Børshheim KY, Bratbak G, Heldal M (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* **340**: 467.
- Bernheim A (2017). Incontournables et pourtant rares: les déterminants de la distribution des systèmes CRISPR-Cas dans les génomes bactériens. *Biologie Auj* **211**: 255-264.
- Bertani G, Baresi L (1987). Genetic transformation in the methanogen *Methanococcus voltae* PS. *J Bacteriol* **169**: 2730-2738.
- Bettstetter M, Peng X, Garrett RA, Prangishvili D (2003). AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *acidianus*. *Virology* **315**: 68-79.
- Biller SJ, Schubotz F, Roggensack SE, Thompson AW, Summons RE, Chisholm SW (2014). Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science* **343**: 183-186.
- Bimboim H, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *J Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523.
- Bize A, Peng X, Prokofeva M, Maclellan K, Lucas S, Forterre P *et al* (2008). Viruses in acidic geothermal environments of the Kamchatka Peninsula. *Res Microbiol* **159**: 358-366.
- Bize A, Karlsson EA, Ekefjård K, Quax TEF, Pina M, Prevost M-C *et al* (2009). A unique virus release mechanism in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 11306-11311.
- Bize A, Sezonov G, Prangishvili D (2013). Enigmatic archaeal viruses. *Biol Aujourdhui* **207**: 169-179.

Bibliographie

Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of *archaea*, extending the upper temperature limit for life to 113°C. *Extremophiles* **1**: 14-21.

Boccaro M, Fedala Y, Bryan CV, Bailly-Bechet M, Bowler C, Boccaro AC (2016). Full-field interferometry for counting and differentiating aquatic biotic nanoparticles: from laboratory to Tara Oceans. *Biomed Opt Express* **7**: 3736-3746.

Bondy-Denomy J, Davidson AR (2014). When a virus is not a parasite: the beneficial effects of prophages on bacterial fitness. *J Microbiol* **52**: 235-242.

Borrel G, Colombet J, Robin A, Lehours A-C, Prangishvili D, Sime-Ngando T (2012). Unexpected and novel putative viruses in the sediments of a deep-dark permanently anoxic freshwater habitat. *The Isme Journal* **6**: 2119.

Borrel G, O'Toole PW, Harris HMB, Peyret P, Brugère J-F, Gribaldo S (2013). Phylogenomic Data Support a Seventh Order of Methylophilic Methanogens and Provide Insights into the Evolution of Methanogenesis. *Genome Biology and Evolution* **5**: 1769-1780.

Børsheim K, Bratbak G, Heldal M (1990). Enumeration and biomass estimation of planktonic bacteria and viruses by transmission electron microscopy. *Appl Environ Microbiol* **56**: 352-356.

Breitbart M, Rohwer F (2005). Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* **13**: 278-284.

Breitbart M (2012). Marine viruses: truth or dare. *Ann Rev Mar Sci* **4**: 425-448.

Brock TD (1967). Life at High Temperatures. *Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. Science* **158**: 1012-1019.

Brussaard CP, Thyraug R, Marie D, Bratbak G (1999). Flow cytometric analyses of viral infection in two marine phytoplankton species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and *Phaeocystis pouchetii* (Prymnesiophyceae). *Journal of Phycology* **35**: 941-948.

Buan NR (2018). Methanogens: pushing the boundaries of biology. *Emerg Top Life Sci* **2**: 629-646.

Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG *et al* (1996). Complete Genome Sequence of the Methanogenic Archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**: 1058-1073.

Bibliographie

Burggraf S, Fricke H, Neuner A, Kristjansson J, Rouvier P, Mandelco L *et al* (1990a). *Methanococcus igneus* sp. nov., a Novel Hyperthermophilic Methanogen from a Shallow Submarine Hydrothermal System. *Systematic and Applied Microbiology* **13**: 263-269.

Burggraf S, Jannasch HW, Nicolaus B, Stetter KO (1990b). *Archaeoglobus profundus* sp. nov., Represents a New Species within the Sulfate-reducing *Archaeobacteria*. *Systematic and Applied Microbiology* **13**: 24-28.

Campbell BJ, Smith JL, Hanson TE, Klotz MG, Stein LY, Lee CK *et al* (2009). Adaptations to Submarine Hydrothermal Environments Exemplified by the Genome of *Nautilia profundicola*. *PLOS Genetics* **5**: e1000362.

Catchpole R, Forterre P (2019). The evolution of Reverse Gyrase suggests a non-hyperthermophilic Last Universal Common Ancestor. *Mol Biol Evol*.

Cavicchioli R, Amils R, Wagner D, McGenity T (2011). Life and applications of extremophiles. *Environ Microbiol* **13**: 1903-1907.

Cayol J-L, Ollivier B, Alazard D, Amils R, Godfroy A, Piette F *et al* (2015). The Extreme Conditions of Life on the Planet and Exobiology. *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. pp 353-394.

Chien IC, Meschke JS, Gough HL, Ferguson JF (2013). Characterization of Persistent Virus-Like Particles in Two Acetate-Fed Methanogenic Reactors. *PLOS ONE* **8**: e81040.

Chong Y, Liu Q, Huang F, Song D, Feng Y (2019). Characterization of a recombinant thermotolerant argonaute protein as an endonuclease by broad guide utilization. *Bioresources and Bioprocessing* **6**: 21.

Chow CE, Suttle CA (2015). Biogeography of Viruses in the Sea. *Annu Rev Virol* **2**: 41-66.

Christie GE, Dokland T (2012). Pirates of the *Caudovirales*. *Virology* **434**: 210-221.

Cieřlik M, Dach J, Lewicki A, Smurzyńska A, Janczak D, Pawlicka-Kaczorowska J *et al* (2016). Methane fermentation of the maize straw silage under meso-and thermophilic conditions. *Energy* **115**: 1495-1502.

Claus H, König H (2010). Cell Envelopes of Methanogens. *Prokaryotic Cell Wall Compounds*. pp 231-251.

Bibliographie

Contursi P, Fusco S, Cannio R, She Q (2014). Molecular biology of *fuselloviruses* and their satellites. *Extremophiles* **18**: 473-489.

Coutinho FH, Silveira CB, Gregoracci GB, Thompson CC, Edwards RA, Brussaard CP *et al* (2017). Marine viruses discovered via metagenomics shed light on viral strategies throughout the oceans. *Nature com* **8**: 15955.

Da Cunha V, Gaia M, Gadelle D, Nasir A, Forterre P (2017). *Lokiarchaea* are close relatives of *Euryarchaeota*, not bridging the gap between prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Genet* **13**: e1006810.

Da Cunha V, Gaia M, Nasir A, Forterre P (2018). Asgard *archaea* do not close the debate about the universal tree of life topology. *PLoS Genet* **14**: e1007215.

Danovaro R, Dell'Anno A, Corinaldesi C, Magagnini M, Noble R, Tamburini C *et al* (2008). Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature* **454**: 1084.

Danovaro R, Corinaldesi C, Dell'anno A, Fuhrman JA, Middelburg JJ, Noble RT *et al* (2011). Marine viruses and global climate change. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 993-1034.

Danovaro R, Dell'Anno A, Corinaldesi C, Rastelli E, Cavicchioli R, Krupovic M *et al* (2016). Virus-mediated archaeal hecatomb in the deep seafloor. *Science Advances* **2**: e1600492.

Deatherage BL, Cookson BT (2012). Membrane vesicle release in *bacteria*, eukaryotes, and *archaea*: a conserved yet underappreciated aspect of microbial life. *Infect Immun* **80**: 1948-1957.

Dellas N, Snyder JC, Bolduc B, Young MJ (2014). Archaeal Viruses: Diversity, Replication, and Structure. *Annu Rev Virol* **1**: 399-426.

Demina TA, Pietila MK, Svirskaitė J, Ravantti JJ, Atanasova NS, Bamford DH *et al* (2016). Archaeal *Haloarcula californiae* Icosahedral Virus 1 Highlights Conserved Elements in Icosahedral Membrane-Containing DNA Viruses from Extreme Environments. *MBio* **7**.

Demory D, Arsenieff L, Simon N, Six C, Rigaut-Jalabert F, Marie D *et al* (2017). Temperature is a key factor in *Micromonas*-virus interactions. *ISME J* **11**: 601-612.

Dick GJ (2019). The microbiomes of deep-sea hydrothermal vents: distributed globally, shaped locally. *Nat Rev Microbiol* **17**: 271-283.

Bibliographie

Domingues S, Nielsen KM (2017). Membrane vesicles and horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **38**: 16-21.

Dyall-Smith M, Pfeifer F, Witte A, Oesterhelt D, Pfeiffer F (2018). Complete Genome Sequence of the Model Halovirus PhiH1 (Φ H1). *Genes (Basel)* **9**: 493.

Edwards RA, Rohwer F (2005). Viral metagenomics. *Nat Rev Microbiol* **3**: 504.

Eiserling F, Pushkin A, Gingery M, Bertani G (1999). Bacteriophage-like particles associated with the gene transfer agent of *Methanococcus voltae* PS **80**: 3305-3308.

Eme L, Spang A, Lombard J, Stairs CW, Ettema TJG (2017). *Archaea* and the origin of eukaryotes. *Nat Rev Microbiol* **15**: 711-723.

Enzmann F, Mayer F, Rother M, Holtmann D (2018). Methanogens: biochemical background and biotechnological applications. *AMB Express* **8**: 1.

Erauso G, Reysenbach A-L, Godfroy A, Meunier J-R, Crump B, Partensky F *et al* (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Archives of Microbiology* **160**: 338-349.

Erdmann S, Shah Shiraz A, Garrett Roger A (2013). SMV1 virus-induced CRISPR spacer acquisition from the conjugative plasmid pMGB1 in *Sulfolobus solfataricus* P2. *Biochemical Society Transactions* **41**: 1449-1458.

Erdmann S, Chen B, Huang X, Deng L, Liu C, Shah SA *et al* (2014). A novel single-tailed fusiform *Sulfolobus* virus STSV2 infecting model *Sulfolobus* species. *Extremophiles : life under extreme conditions* **18**: 51-60.

Erdmann S, Tschitschko B, Zhong L, Raftery MJ, Cavicchioli R (2017). A plasmid from an Antarctic haloarchaeon uses specialized membrane vesicles to disseminate and infect plasmid-free cells. *Nature* **2**: 1446.

Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, Peleg Y *et al* (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature* **541**: 488.

Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol* **13**: 641-650.

Bibliographie

Fiala G, Stetter KO, Jannasch HW, Langworthy TA, Madon J (1986). *Staphylothermus marinus* sp. nov. Represents a Novel Genus of Extremely Thermophilic Submarine Heterotrophic *Archaeobacteria* Growing up to 98 °C. *Systematic and Applied Microbiology* **8**: 106-113.

Flores GE, Reysenbach A-L (2011). Hydrothermal Environments, Marine. In: Reitner J, Thiel V (eds). *Encyclopedia of Geobiology*. Springer Netherlands: Dordrecht. pp 456-467.

Fokine A, Chipman PR, Leiman PG, Mesyanzhinov VV, Rao VB, Rossmann MG (2004). Molecular architecture of the prolate head of bacteriophage T4. *PNAS* **101**: 6003-6008.

Ford T, Graham J, Rickwood D (1994). Iodixanol: A Nonionic Iso-osmotic Centrifugation Medium for the Formation of Self-Generated Gradients. *Analytical Biochemistry* **220**: 360-366.

Forterre P (2010a). Defining life: the virus viewpoint. *Orig Life Evol Biosph* **40**: 151-160.

Forterre P (2010b). Giant viruses: conflicts in revisiting the virus concept. *Intervirology* **53**: 362-378.

Forterre P (2011). Manipulation of cellular syntheses and the nature of viruses: The virocell concept. *Comptes Rendus Chimie* **14**: 392-399.

Forterre P, Prangishvili D (2013). The major role of viruses in cellular evolution: facts and hypotheses. *Curr Opin Virol* **3**: 558-565.

Forterre P, Soler N, Krupovic M, Marguet E, Ackermann HW (2013). Fake virus particles generated by fluorescence microscopy. *Trends Microbiol* **21**: 1-5.

Forterre P, Krupovic M, Raymann K, Soler N (2015). Plasmids from *eurycarchaeota*. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*. American Society of Microbiology. pp 349-377.

Forterre P (2016). To be or not to be alive: How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* **59**: 100-108.

Forterre P, Da Cunha V, Catchpole R (2017). Plasmid vesicles mimicking virions. *Nat Microbiol* **2**: 1340-1341.

Forterre P, Raoult DJV (2017). The transformation of a *bacterium* into a nucleated virocell reminds the viral eukaryogenesis hypothesis **21**: 28-30.

Bibliographie

Forterre P (2017). Viruses in the 21st Century: From the Curiosity-Driven Discovery of Giant Viruses to New Concepts and Definition of Life. *Virology* **65**: S74-S79.

Fortunato CS, Larson B, Butterfield DA, Huber JA (2018). Spatially distinct, temporally stable microbial populations mediate biogeochemical cycling at and below the seafloor in hydrothermal vent fluids. *Environ Microbiol* **20**: 769-784.

Fu C-y, Johnson JE (2012). Structure and cell biology of archaeal virus STIV. *Current opinion in virology* **2**: 122-127.

Fukui T, Atomi H, Kanai T, Matsumi R, Fujiwara S, Imanaka T (2005). Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res* **15**: 352-363.

Gaia M, Da Cunha V, Forterre P (2018). The Tree of Life. *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution*. pp 55-99.

Gaudin M, Gaudiard E, Schouten S, Houel-Renault L, Lenormand P, Marguet E *et al* (2013). Hyperthermophilic archaea produce membrane vesicles that can transfer DNA. *Environ Microbiol Rep* **5**: 109-116.

Gaudin M, Krupovic M, Marguet E, Gaudiard E, Cvirkaite-Krupovic V, Le Cam E *et al* (2014). Extracellular membrane vesicles harbouring viral genomes. *Environ Microbiol* **16**: 1167-1175.

Geslin C, Le Romancer M, Erauso G, Gaillard M, Perrot G, Prieur D (2003a). PAV1, the First Virus-Like Particle Isolated from a Hyperthermophilic Euryarchaeote, "*Pyrococcus abyssi*". *Journal of Bacteriology* **185**: 3888-3894.

Geslin C, Le Romancer M, Gaillard M, Erauso G, Prieur D (2003b). Observation of virus-like particles in high temperature enrichment cultures from deep-sea hydrothermal vents. *Research in Microbiology* **154**: 303-307.

Geslin C, Gaillard M, Flament D, Rouault K, Le Romancer M, Prieur D *et al* (2007). Analysis of the first genome of a hyperthermophilic marine virus-like particle, PAV1, isolated from *Pyrococcus abyssi*. *J Bacteriol* **189**: 4510-4519.

Gill S, Catchpole R, Forterre P (2019). Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **43**: 273-303.

Goodman DA, Stedman KM (2018). Comparative genetic and genomic analysis of the novel *fusellovirus* *Sulfolobus* spindle-shaped virus 10. *Virus Evol* **4**: vey022.

Bibliographie

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

Gorlas A, Marguet E, Gill S, Geslin C, Guigner JM, Guyot F *et al* (2015). Sulfur vesicles from *Thermococcales*: A possible role in sulfur detoxifying mechanisms. *Biochimie* **118**: 356-364.

Goyal N, Zhou Z, Karimi IA (2016). Metabolic processes of *Methanococcus maripaludis* and potential applications. *Microb Cell Fact* **15**: 107.

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

Happonen LJ, Redder P, Peng X, Reigstad LJ, Prangishvili D, Butcher SJ (2010). Familial Relationships in Hyperthermo- and Acidophilic Archaeal Viruses. *Journal of Virology* **84**: 4747-4754.

Häring M, Peng X, Brügger K, Rachel R, Stetter KO, Garrett RA *et al* (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**: 233-242.

Häring M, Rachel R, Peng X, Garrett RA, Prangishvili D (2005a). 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*. *J Bacteriol* **79**: 9904-9911.

Häring M, Vestergaard G, Brügger K, Rachel R, Garrett RA, Prangishvili D (2005b). Structure and Genome Organization of AFV2, a Novel Archaeal *Lipothrixvirus* with Unusual Terminal and Core Structures. *J Bacteriol* **187**: 3855-3858.

Häring M, Vestergaard G, Rachel R, Chen L, Garrett RA, Prangishvili D (2005c). Independent virus development outside a host. *Nature* **436**: 1101.

Hedderich R, Whitman WB, Biochemistry (2013). Physiology and biochemistry of the methane-producing *Archaea*. *The Prokaryotes*: 635-662.

Heine M, Chandra SB (2009). The linkage between reverse gyrase and hyperthermophiles: a review of their invariable association. *J Microbiol* **47**: 229.

Hille F, Richter H, Wong SP, Bratovič M, Ressel S, Charpentier E (2018). The biology of CRISPR-Cas: backward and forward. *Cell* **172**: 1239-1259.

Bibliographie

Hochstein R, Bollschweiler D, Engelhardt H, Lawrence CM, Young M (2015). Large Tailed Spindle Viruses of genus-species *Archaea*: a New Way of Doing Viral Business. *J Virol* **89**: 9146-9149.

Höck J, Meister G (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol* **9**: 210.

Holmfeldt K, Odic D, Sullivan MB, Middelboe M, Riemann L (2012). Cultivated single-stranded DNA phages that infect marine *Bacteroidetes* prove difficult to detect with DNA-binding stains. *Appl Environ Microbiol* **78**: 892-894.

Hong C, Pietila MK, Fu CJ, Schmid MF, Bamford DH, Chiu W (2015). Lemon-shaped halo archaeal virus His1 with uniform tail but variable capsid structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 2449-2454.

Horvath P, Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the immune system of *bacteria* and *archaea*. *Science* **327**: 167-170.

Howard-Varona C, Hargreaves KR, Abedon ST, Sullivan MB (2017). Lysogeny in nature: mechanisms, impact and ecology of temperate phages. *ISME J* **11**: 1511-1520.

Huber R, Langworthy TA, König H, Thomm M, Woese CR, Sleytr UB *et al* (1986). *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic *eubacteria* growing up to 90 °C. *Archives of Microbiology* **144**: 324-333.

Huber R, Kristjansson J, Stetter KO (1987). *Pyrobaculum* gen. nov., a new genus of neutrophilic, rod-shaped archaeobacteria from continental solfataras growing optimally at 100 °C. *Archives of Microbiology* **149**: 95-101.

Huber R, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, König H *et al* (1992). *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., Represents a Novel Group of Marine Hyperthermophilic Hydrogen-Oxidizing *Bacteria*. *Systematic and Applied Microbiology* **15**: 340-351.

Huber H, Stetter KO (1998). Hyperthermophiles and their possible potential in biotechnology. *Journal of Biotech* **64**: 39-52.

Imachi H, Nobu MK, Nakahara N, Morono Y, Ogawara M, Takaki Y *et al* (2019). Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface: 726976.

Jaakkola ST, Penttinen RK, Vilén ST, Jalasvuori M, Rönholm G, Bamford JKH *et al* (2012). Closely Related Archaeal *Haloarcula hispanica* Icosahedral Viruses HHIV-2 and SH1 Have Nonhomologous Genes Encoding Host Recognition Functions. *J Virol* **86**: 4734-4742.

Bibliographie

Janekovic D, Wunderl S, Holz I, Zillig W, Gierl A, Neumann HJM *et al* (1983). TTV1, TTV2 and TTV3, a family of viruses of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur reducing archaeobacterium *Thermoproteus tenax*. *Molecular and General Genetics* **192**: 39-45.

Jeanthon C, L'Haridon S, Reysenbach AL, Vernet M, Messner P, Sleytr UB *et al* (1998). *Methanococcus infernus* sp. nov., a novel hyperthermophilic lithotrophic methanogen isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 913-919.

Jeanthon C, apos, Haridon S, Pradel N, Prieur D (1999a). Rapid identification of hyperthermophilic methanococci isolated from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 591-594.

Jeanthon C, apos, Haridon S, Reysenbach A-L, Corre E, Vernet M *et al* (1999b). *Methanococcus vulcanius* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from East Pacific Rise, and identification of *Methanococcus* sp. DSM 4213Tas *Methanococcus fervens* sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* **49**: 583-589.

Jebbar M, Franzetti B, Girard E, Oger P (2015). Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles* **19**: 721-740.

Jin M, Ye T, Zhang X (2013). Roles of bacteriophage GVE2 endolysin in host lysis at high temperatures. *Microbiology* **159**: 1597-1605.

Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983). *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Archives of Microbiology* **136**: 254-261.

Jorda J, Yeates TO (2011). Widespread disulfide bonding in proteins from thermophilic archaea. *Archaea* **2011**.

Jordan M, Meile L, Leisinger T, MGG GG (1989). Organization of *Methanobacterium thermoautotrophicum* bacteriophage ψ M1 DNA. *Mol Gen Genet* **220**: 161-164.

Juez G, Rodriguez-Valera F, Ventosa A, Kushner DJJS, Microbiology A (1986). *Haloarcula hispanica* spec. nov. and *Haloferax gibbonsii* spec, nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **8**: 75-79.

Kikuchi A, Asai K (1984). Reverse gyrase—a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA. *Nature* **309**: 677-681.

Kim J-G, Kim S-J, Cvirkaite-Krupovic V, Yu W-J, Gwak J-H, López-Pérez M *et al* (2019). Spindle-shaped viruses infect marine ammonia-oxidizing *thaumarchaea*. *PNAS* **116**: 15645-15650.

Bibliographie

- Klingl A, Pickl C, Flechsler J (2019). Archaeal Cell Walls. *Subcell Biochem* **92**: 471-493.
- Knowles B, Silveira CB, Bailey BA, Barott K, Cantu VA, Cobian-Guemes AG *et al* (2016). Lytic to temperate switching of viral communities. *Nature* **531**: 466-470.
- Koga Y (2012). Thermal adaptation of the archaeal and bacterial lipid membranes. *Archaea* **2012**.
- Koonin EV, Makarova KS, Wolf YI (2017a). Evolutionary Genomics of Defense Systems in *Archaea* and *Bacteria*. *Annu Rev Microbiol* **71**: 233-261.
- Koonin EV, Makarova KS, Zhang FJ, Coim (2017b). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* **37**: 67-78.
- Koonin EV, Makarova KS, evolution (2017c). Mobile genetic elements and evolution of CRISPR-Cas systems: all the way there and back. *Genome Biol Evol* **9**: 2812-2825.
- Kristensen DM, Mushegian AR, Dolja VV, Koonin EV (2010). New dimensions of the virus world discovered through metagenomics. *Trends Microbiol* **18**: 11-19.
- Krupovic M, Forterre P, Bamford DH (2010). Comparative analysis of the mosaic genomes of tailed archaeal viruses and proviruses suggests common themes for virion architecture and assembly with tailed viruses of *bacteria*. *J Mol Biol* **397**: 144-160.
- Krupovic M, Spang A, Gribaldo S, Forterre P, Schleper C (2011). A thaumarchaeal provirus testifies for an ancient association of tailed viruses with *archaea*. *Biochem Soc Trans* **39**: 82-88.
- Krupovic M, Gonnet M, Hania WB, Forterre P, Erauso G (2013). Insights into dynamics of mobile genetic elements in hyperthermophilic environments from five new *Thermococcus* plasmids. *PLoS One* **8**: e49044.
- Krupovic M, Quemin ERJ, Bamford DH, Forterre P, Prangishvili D (2014). Unification of the Globally Distributed Spindle-Shaped Viruses of the *Archaea*. *J Virol* **88**: 2354-2358.
- Krupovic M, Cvirkaite-Krupovic V, Iranzo J, Prangishvili D, Koonin EV (2018). Viruses of *archaea*: structural, functional, environmental and evolutionary genomics. *Virus Res* **244**: 181-193.
- Krupovic M, Makarova KS, Wolf YI, Medvedeva S, Prangishvili D, Forterre P *et al* (2019). Integrated mobile genetic elements in *Thaumarchaeota*. *Environ Microbiol* **21**: 2056-2078.

Bibliographie

Kuhn JH, Wolf YI, Krupovic M, Zhang Y-Z, Maes P, Dolja VV *et al* (2019). Classify viruses—the gain is worth the pain. *Nature Publishing Group*. **566**:318-320.

Kurr M, Huber R, König H, Jannasch HW, Fricke H, Trincone A *et al* (1991). *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110°C. *Archives of Microbiology* **156**: 239-247.

L'Haridon S, Reysenbach AL, Banta A, Messner P, Schumann P, Stackebrandt E *et al* (2003). *Methanocaldococcus indicus* sp. nov., a novel hyperthermophilic methanogen isolated from the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1931-1935.

L'Haridon S, Gouhier L, John ES, Reysenbach A-L (2019). *Marinitoga lauensis* sp. nov., a novel deep-sea hydrothermal vent thermophilic anaerobic heterotroph with a prophage. *Systematic and Applied Microbiology* **42**: 343-347.

La Scola B, Desnues C, Pagnier I, Robert C, Barrassi L, Fournous G *et al* (2008). The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* **455**: 100.

Laber CP, Hunter JE, Carvalho F, Collins JR, Hunter EJ, Schieler BM *et al* (2018). *Coccolithovirus* facilitation of carbon export in the North Atlantic. *Nat Microbiol* **3**: 537.

Lai MC, Chen SC (2001). *Methanofollis aquaemaris* sp. nov., a methanogen isolated from an aquaculture fish pond. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**: 1873-1880.

Landreau M, Duthoit F, Roussel E, Schönherr S, Georges M, Godfroy A *et al* (2016). Cultivation of an immobilized (hyper)thermophilic marine microbial community in a bioreactor. *FEMS Microbiology Letters* **363**.

Lang AS, Zhaxybayeva O, Beatty JT (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* **10**: 472-482.

Lauerer G, Kristjansson JK, Langworthy TA, König H, Stetter KO (1986). *Methanothermus sociabilis* sp. nov., a Second Species within the *Methanothermaceae* Growing at 97°C. *Systematic and Applied Microbiology* **8**: 100-105.

Lecoq H (2001). Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac : 1892 ou 1898 ? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **324**: 929-933.

Leigh JA, Albers SV, Atomi H, Allers T (2011). Model organisms for genetics in the domain *Archaea*: methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 577-608.

Bibliographie

Lemmens L, Baes R, Peeters E (2018). Heat shock response in *archaea*. *Emerg Top Life Sci* **2**: 581-593.

Li W-t, Grayling RA, Sandman K, Edmondson S, Shriver JW, Reeve JN (1998). Thermodynamic stability of archaeal histones. *Biochemistry* **37**: 10563-10572.

Lipps G (2008). Archaeal plasmids. *Current Research and Future Trends*: **27**.

Liu B, Wu S, Song Q, Zhang X, Xie L (2006). Two novel bacteriophages of thermophilic *bacteria* isolated from deep-sea hydrothermal fields. *Curr Microbiol* **53**: 163-166.

Liu B, Zhang X (2008). Deep-sea thermophilic *Geobacillus* bacteriophage GVE2 transcriptional profile and proteomic characterization of virions. *Appl Microbiol Biotechnol* **80**: 697-707.

Liu Y, Ishino S, Ishino Y, Pehau-Arnaudet G, Krupovic M, Prangishvili D (2017). A Novel Type of Polyhedral Viruses Infecting Hyperthermophilic *Archaea*. *J Virol* **91**: e00589-00517.

López-Pérez M, Haro-Moreno JM, de la Torre JR, Rodriguez-Valera F (2019). Novel Caudovirales associated with Marine Group I *Thaumarchaeota* assembled from metagenomes. *Environ Microbiol* **21**: 1980-1988.

Los M, Wegrzyn G (2012). Pseudolysogeny. *Adv Virus Res* **82**: 339-349.

Lossouarn J, Dupont S, Gorlas A, Mercier C, Bienvenu N, Marguet E *et al* (2015a). An abyssal mobilome: viruses, plasmids and vesicles from deep-sea hydrothermal vents. *Res Microbiol* **166**: 742-752.

Lossouarn J, Nesbo CL, Mercier C, Zhaxybayeva O, Johnson MS, Charchuck R *et al* (2015b). 'Menage a trois': a selfish genetic element uses a virus to propagate within *Thermotogales*. *Environ Microbiol* **17**: 3278-3288.

Luo Y, Pfister P, Leisinger T, Wasserfallen A (2001). The Genome of Archaeal Prophage Ψ M100 Encodes the Lytic Enzyme Responsible for Autolysis of *Methanothermobacter wolfeii*. *J Bacteriol* **183**: 5788-5792.

Lupa B, Hendrickson EL, Leigh JA, Whitman WB (2008). Formate-dependent H₂ production by the mesophilic methanogen *Methanococcus maripaludis*. *Applied environmental microbiology* **74**: 6584-6590.

Lwoff A (1957). The concept of virus. *Microbiology* **17**: 239-253.

Bibliographie

Lyu Z, Liu Y (2018). Diversity and taxonomy of methanogens. *Biogenesis of Hydrocarbons* : 1-59.

Lyu Z, Shao N, Akinyemi T, Whitman WB (2018). Methanogenesis. *Curr Biol* **28**: R727-R732.

Madigan MT, Clark DP, Stahl D, Martinko JM (2010). *Brock biology of microorganisms 13th edition*. Benjamin Cummings.

Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV (2013). Comparative genomics of defense systems in *archaea* and *bacteria*. *Nucleic Acids Res* **41**: 4360-4377.

Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ *et al* (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* **13**: 722.

Manning AJ, Kuehn MJ (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol* **11**: 258.

Marguet E, Forterre P (1998). Protection of DNA by salts against thermodegradation at temperatures typical for hyperthermophiles. *Extremophiles* **2**: 115-122.

Marie D, Brussaard CP, Thyraug R, Bratbak G, Vaulot DJAEM (1999). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **65**: 45-52.

Marraffini LA, Sontheimer EJ (2010). CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in *bacteria* and *archaea*. *Nature Reviews Genetics* **11**: 181.

Martin A, Yeats S, Janekovic D, Reiter W-D, Aicher W, Zillig W (1984). SAV 1, a temperate u.v.-inducible DNA virus-like particle from the archaebacterium *Sulfolobus acidocaldarius* isolate B12. *EMBO J* **3**: 2165-2168.

Martin I, Pidou M, Soares A, Judd S, Jefferson B (2011). Modelling the energy demands of aerobic and anaerobic membrane bioreactors for wastewater treatment. *Environ Technol* **32**: 921-932.

Mehta D, Satyanarayana T (2013). Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. In: Satyanarayana T, Littlechild J, Kawarabayasi Y (eds). *Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology: Biotechnology of Thermophiles*. Springer Netherlands: Dordrecht. pp 3-60.

Bibliographie

- Meile L, Jenal U, Studer D, Jordan M, Leisinger T (1989). Characterization of ψ M1, a virulent phage of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *Archives of Microbiology* **152**: 105-110.
- Mercier C, Lossouarn J, Haverkamp T, Bienvenu N, Godfroy A, Cueff-Gauchard V *et al* (2016). Draft Genome Sequences of Two *Marinitoga camini* Isolates Producing *Bacteriophages*. *Genome Announc* **4**.
- Mercier C, Lossouarn J, Nesbo CL, Haverkamp THA, Baudoux AC, Jebbar M *et al* (2018). Two viruses, MCV1 and MCV2, which infect *Marinitoga bacteria* isolated from deep-sea hydrothermal vents: functional and genomic analysis. *Environ Microbiol* **20**: 577-587.
- Merino N, Aronson HS, Bojanova DP, Feyhl-Buska J, Wong ML, Zhang S *et al* (2019). Living at the Extremes: Extremophiles and the Limits of Life in a Planetary Context. *Front Microbio* **10**: 780.
- Mochizuki T, Yoshida T, Tanaka R, Forterre P, Sako Y, Prangishvili D (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* **402**: 347-354.
- Mochizuki T, Sako Y, Prangishvili D (2011). Provirus induction in hyperthermophilic *archaea*: characterization of *Aeropyrum pernix* spindle-shaped virus 1 and *Aeropyrum pernix* ovoid virus 1. *J Bacteriol* **193**: 5412-5419.
- Mochizuki T, Krupovic M, Pehau-Arnaudet G, Sako Y, Forterre P, Prangishvili D (2012). Archaeal virus with exceptional virion architecture and the largest single-stranded DNA genome. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 13386-13391.
- Molineux IJ, Panja D (2013). Popping the cork: mechanisms of phage genome ejection. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 194-204.
- Munson-McGee JH, Snyder JC, Young MJ (2018). Archaeal viruses from high-temperature environments. *Genes* **9**: 128.
- Nanda AM, Thormann K, Frunzke J (2015). Impact of spontaneous prophage induction on the fitness of bacterial populations and host-microbe interactions. *J Bacteriol* **197**: 410-419.
- Noble RT, Fuhrman JA (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and *bacteria*. *aquat microb ecol vol* **14**: 113-118.

Bibliographie

Nölling J, Groffen A, de Vos WM (1993). ϕ F1 and ϕ F3, two novel virulent, archaeal phages infecting different thermophilic strains of the genus *Methanobacterium*. *Journal of General Microbiology* **139**: 2511-2516.

Oppenheimer CH, ZoBell CE (1952). The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *Journal of Marine Research* **11**: 10-18.

Oren A (2013). Life at high salt concentrations, intracellular KCl concentrations, and acidic proteomes. *Front Microbiol* **4**: 315.

Ortmann AC, Suttle CA (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**: 1515-1527.

Paez-Espino D, Eloë-Fadrosh EA, Pavlopoulos GA, Thomas AD, Huntemann M, Mikhailova N et al (2016). Uncovering Earth's virome. *Nature* **536**: 425-430.

Palm P, Schleper C, Grampp B, Yeats S, McWilliam P, Reiter W-D et al (1991). Complete nucleotide sequence of the virus SSV1 of the archaeobacterium *Sulfolobus shibatae*. *Virology* **185**: 242-250.

Patel GB, Sprott GD (1990). *Methanosaeta concilii* gen. nov., sp. nov. ("*Methanothrix concilii*") and *Methanosaeta thermoacetophila* nom. rev., comb. nov.†. *Int J of Syst Bact* **40**: 79-82.

Peng X, Basta T, Häring M, Garrett RA, Prangishvili D (2007). Genome of the *Acidianus* bottle-shaped virus and insights into the replication and packaging mechanisms. *Virology* **364**: 237-243.

Peng X (2008). Evidence for the horizontal transfer of an integrase gene from a *fusellovirus* to a pRN-like plasmid within a single strain of *Sulfolobus* and the implications for plasmid survival. *Microbiology* **154**: 383-391.

Peng X, Haering M, Garrett R, Prangishvili D (2010). Thermostable dna polymerase of the archaeal *ampullavirus* abv and its applications. Google Patents.

Pfister P, Wasserfallen A, Stettler R, Leisinger T (1998). Molecular analysis of *Methanobacterium* phage Ψ M2. *Mol Microbiol* **30**: 233-244.

Philosof A, Yutin N, Flores-Urbe J, Sharon I, Koonin EV, Béjà O (2017). Novel Abundant Oceanic Viruses of Uncultured Marine Group II *Euryarchaeota*. *Curr Biol* **9** : 1362-1368.

Bibliographie

Pietilä MK, Laurinavičius S, Sund J, Roine E, Bamford DH (2010). The single-stranded DNA genome of novel archaeal virus *Halorubrum* pleomorphic virus 1 is enclosed in the envelope decorated with glycoprotein spikes. *J Virol* **84**: 788-798.

Pietila MK, Laurinmaki P, Russell DA, Ko CC, Jacobs-Sera D, Butcher SJ *et al* (2013a). Insights into head-tailed viruses infecting extremely halophilic *archaea*. *J Virol* **87**: 3248-3260.

Pietila MK, Laurinmaki P, Russell DA, Ko CC, Jacobs-Sera D, Hendrix RW *et al* (2013b). Structure of the archaeal head-tailed virus HSTV-1 completes the HK97 fold story. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 10604-10609.

Pietila MK, Demina TA, Atanasova NS, Oksanen HM, Bamford DH (2014). Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. *Trends Microbiol* **22**: 334-344.

Pietilä MK, Roine E, Sencilo A, Bamford DH, Oksanen HM (2016). *Pleolipoviridae*, a newly proposed family comprising archaeal pleomorphic viruses with single-stranded or double-stranded DNA genomes. *Arch Virol* **161**: 249-256.

Pikuta EV, Marsic D, Itoh T, Bej AK, Tang J, Whitman WB *et al* (2007). *Thermococcus thio-reducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 1612-1618.

Porter K, Tang S-L, Chen C-P, Chiang P-W, Hong M-J, Dyall-Smith M (2013). PH1: an archaeovirus of *Haloarcula hispanica* related to SH1 and HHIV-2. *Archaea (Vancouver, BC)* **2013**: 456318-456318.

Postec A, Lesongeur F, Pignet P, Ollivier B, Querellou J, Godfroy A (2007). Continuous enrichment cultures: insights into prokaryotic diversity and metabolic interactions in deep-sea vent chimneys. *Extremophiles* **11**: 747-757.

Prangishvili D, Arnold HP, Götz D, Ziese U, Holz I, Kristjansson JK *et al* (1999). A Novel Virus Family, the *Rudiviridae*: Structure, Virus-Host Interactions and Genome Variability of the Sulfolobus Viruses SIRV1 and SIRV2. *Genetics* **152**: 1387-1396.

Prangishvili D (2003). Evolutionary insights from studies on viruses of hyperthermophilic archaea. *Research in Microbiology* **154**: 289-294.

Prangishvili D (2006). 14 Hyperthermophilic Virus-Host Systems: Detection and Isolation. *Methods in Microbiology*. Academic Press. pp 331-347.

Prangishvili D (2013). The wonderful world of archaeal viruses. *Annu Rev Microbiol* **67**: 565-585.

Bibliographie

Prangishvili D, Bamford DH, Forterre P, Iranzo J, Koonin EV, Krupovic M (2017). The enigmatic archaeal virosphere. *Nat Rev Microbiol* **15**: 724.

Price MT, Fullerton H, Moyer CL (2015). Biogeography and evolution of *Thermococcus* isolates from hydrothermal vent systems of the Pacific. *Front Microbiol* **6**: 968.

Prieur D, Erauso G, Jeanthon C (1995). Hyperthermophilic life at deep-sea hydrothermal vents. *Planetary and Space Science* **43**: 115-122.

Rajan R, Osterman AK, Gast AT, Mondragón A (2014). Biochemical characterization of the topoisomerase domain of *methanopyrus kandleri* topoisomerase V. *J Biol Chem* **289**: 28898-28909.

Rampelotto P (2013). Extremophiles and extreme environments. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. *Life* **3**: 482–485

Raoult D, Audic S, Robert C, Abergel C, Renesto P, Ogata H *et al* (2004). The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* **306**: 1344-1350.

Raoult D, Forterre P (2008). Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 315.

Redder P, Peng X, Brügger K, Shah SA, Roesch F, Greve B *et al* (2009). Four newly isolated *fuselloviruses* from extreme geothermal environments reveal unusual morphologies and a possible interviral recombination mechanism. *Environ Microbiol* **11**: 2849-2862.

Reed CJ, Lewis H, Trejo E, Winston V, Evilia C (2013). Protein adaptations in archaeal extremophiles. *Archaea* **2013**: 373275

Reeve JN, Shaw JE (1979). Lambda encodes an outer membrane protein: the lom gene. *Mol Gen Genet* **172**: 243-248.

Rensen EI, Mochizuki T, Quemain E, Schouten S, Krupovic M, Prangishvili D (2016). A virus of hyperthermophilic archaea with a unique architecture among DNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**: 2478-2483.

Rice G, Tang L, Stedman K, Roberto F, Spuhler J, Gillitzer E *et al* (2004). The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 7716-7720.

Bibliographie

- Rohwer F, Thurber RV (2009). Viruses manipulate the marine environment. *Nature* **459**: 207-212.
- Rosenwasser S, Ziv C, Creveld SGV, Vardi A (2016). Virocell Metabolism: Metabolic Innovations During Host-Virus Interactions in the Ocean. *Trends Microbiol* **24**: 821-832.
- Salmond GP, Fineran PC (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* **13**: 777-786.
- Sandman K, Reeve JN (2006). Archaeal histones and the origin of the histone fold. *Curr Opin Microbiol* **9**: 520-525.
- Scanlan D (2014). Ecology. Bacterial vesicles in the ocean. *Science* **343**: 143-144.
- Schnabel H, Zillig W, Pfäffle M, Schnabel R, Michel H, Delius H (1982). *Halobacterium halobium* phage øH. *EMBO J* **1**: 87-92.
- Schut GJ, Lipscomb GL, Han Y, Notey JS, Kelly RM, Adams MM *et al* (2014). The order *Thermococcales* and the family *Thermococcaceae*. *The Prokaryotes*: 363-383.
- Sencilo A, Roine E (2014). A Glimpse of the genomic diversity of haloarchaeal tailed viruses. *Front Microbiol* **5**: 84.
- Servín-Garcidueñas LE, Peng X, Garrett RA, Martínez-Romero E (2013). Genome Sequence of a Novel Archaeal *Rudivirus* Recovered from a Mexican Hot Spring. *Genome Announc* **1**: e00040-00012.
- Siliakus MF, van der Oost J, Kengen SW (2017). Adaptations of archaeal and bacterial membranes to variations in temperature, pH and pressure. *Extremophiles* **21**: 651-670.
- Sime-Ngando T (2014). Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems. *Front Microbiol* **5**: 355.
- Simmonds P, Adams MJ, Benko M, Breitbart M, Brister JR, Carstens EB *et al* (2017). Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nat Rev Microbiol* **15**: 161-168.
- Slesarev AI, Mezhevaya KV, Makarova KS, Polushin NN, Shcherbinina OV, Shakhova VV *et al* (2002). The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 4644-4649.

Bibliographie

Sleytr UB, Schuster B, Egelseer E-M, Pum D (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 823-864.

Smith KS, Ingram-Smith C (2007). *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? *Trends in Microbiology* **15**: 150-155.

Snyder JC, Brumfield SK, Kerchner KM, Quax TEF, Prangishvili D, Young MJ (2013). Insights into a Viral Lytic Pathway from an Archaeal Virus-Host System. *J Virol* **87**: 2186-2192.

Snyder JC, Bolduc B, Young MJ (2015). 40 Years of archaeal virology: Expanding viral diversity. *Virology* **479-480**: 369-378.

Soler N, Marguet E, Verbavatz JM, Forterre P (2008). Virus-like vesicles and extracellular DNA produced by hyperthermophilic archaea of the order *Thermococcales*. *Res Microbiol* **159**: 390-399.

Soler N, Gaudin M, Marguet E, Forterre P (2011). Plasmids, viruses and virus-like membrane vesicles from Thermococcales. *Biochem Soc Trans* **39**: 36-44.

Soucy SM, Huang J, Gogarten JP (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet* **16**: 472-482.

Spang A, Caceres EF, Ettema T (2017). Genomic exploration of the diversity, ecology, and evolution of the archaeal domain of life. *Science* **357**: eaaf3883.

Stedman KM, She Q, Phan H, Arnold HP, Holz I, Garrett RA *et al* (2003). Relationships between *fuselloviruses* infecting the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*: SSV1 and SSV2. *Research in Microbiology* **154**: 295-302.

Stedman KM, DeYoung M, Saha M, Sherman MB, Morais MC (2015). Structural insights into the architecture of the hyperthermophilic *Fusellovirus* SSV1. *Virology* **474**: 105-109.

Stern A, Sorek R (2011). The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. *Bioessays* **33**: 43-51.

Stetter KO, Thomm M, Winter J, Wildgruber G, Huber H, Zillig W *et al* (1981). *Methanothermus fervidus*, sp. nov., a novel extremely thermophilic methanogen isolated from an Icelandic hot spring. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I Abt Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* **2**: 166-178.

Bibliographie

Steward GF, Culley AI, Mueller JA, Wood-Charlson EM, Belcaid M, Poisson G (2013). Are we missing half of the viruses in the ocean? *ISME J* **7**: 672-679.

Stewart LC, Jung JH, Kim YT, Kwon SW, Park CS, Holden JF (2015). *Methanocaldococcus bathoardescens* sp. nov., a hyperthermophilic methanogen isolated from a volcanically active deep-sea hydrothermal vent. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1280-1283.

Stewart LC, Algar CK, Fortunato CS, Larson BI, Vallino JJ, Huber JA *et al* (2019). Fluid geochemistry, local hydrology, and metabolic activity define methanogen community size and composition in deep-sea hydrothermal vents. *ISME J* **13**: 1711-1721.

Stolt P, Grampp B, Zillig W (1994). Genes for DNACytosine Methyltransferases and Structural Proteins, Expressed during Lytic Growth by the Phage Φ H of the *Archaeobacterium Halobacterium salinarium*. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*. p 747.

Streisinger G, Emrich J, Stahl MM (1967). Chromosome structure in phage t4, iii. Terminal redundancy and length determination. *Proc Natl Acad Sci USA* **57**: 292.

Sumby P, Smith MC (2002). Genetics of the phage growth limitation (Pgl) system of *Streptomyces coelicolor* A3. *Mol Microbiol* (2) **44**: 489-500.

Suttle CA (2005). Viruses in the sea. *Nature* **437**: 356-361.

Suttle CA, Fuhrman JA (2010). Enumeration of virus particles in aquatic or sediment samples by epifluorescence microscopy. *Manual of Aquatic Viral Ecology*. pp 145-153.

Suttle CA (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol* **5**: 801.

Takai K, Nealson KH, Horikoshi K (2004). *Methanotorris formicicus* sp. nov., a novel extremely thermophilic, methane-producing archaeon isolated from a black smoker chimney in the Central Indian Ridge. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1095-1100.

Takai K, Nakamura K, Toki T, Tsunogai U, Miyazaki M, Miyazaki J *et al* (2008). Cell proliferation at 122°C and isotopically heavy CH₄ production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 10949-10954.

Takai K, Nakamura K (2011). Archaeal diversity and community development in deep-sea hydrothermal vents. *Curr Opin Microbiol* **14**: 282-291.

Bibliographie

- Thiel A, Michoud G, Moalic Y, Flament D, Jebbar M (2014). Genetic manipulations of the hyperthermophilic piezophilic archaeon *Thermococcus barophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 2299-2306.
- Thingstad T, Lignell R (1997). Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand. *aquat microb ecol* **13**: 19-27.
- Thingstad TF, Bratbak G (2016). Microbial oceanography: Viral strategies at sea. *Nature* **531**: 454-455.
- Torsvik T, Dundas ID (1974). Bacteriophage of *Halobacterium salinarium*. *Nature* **248**: 680-681.
- Touchon M, Bernheim A, Rocha EP (2016). Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in *bacteria*. *ISME J* **10**: 2744-2754.
- Tumbula DL, Makula RA, Whitman WB (1994). Transformation of *Methanococcus maripaludis* and identification of a Pst I-like restriction system. *FEMS Microbiology Letters* **121**: 309-314.
- Tuomela M, Vikman M, Hatakka A, Itävaara M (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* **72**: 169-183.
- Valentine DL, Reeburgh WS (2000). New perspectives on anaerobic methane oxidation: minireview. *Environmental Microbiology* **2**: 477-484.
- Valentine DL (2007). Opinion: Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the *archaea*. *Nat Rev Microbiol* **5**: 316.
- Van Houte S, Ekroth AK, Broniewski JM, Chabas H, Ashby B, Bondy-Denomy J *et al* (2016). The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. *Nature* **532**: 385.
- Van Valen L (1977). The red queen. *The American Naturalist* **111**: 809-810.
- Velimirov B, Hagemann S (2011). Mobilizable bacterial DNA packaged into membrane vesicles induces serial transduction. *Mob Genet Elements* **1**: 80-81.
- Ver Eecke HC, Butterfield DA, Huber JA, Lilley MD, Olson EJ, Roe KK *et al* (2012). Hydrogen-limited growth of hyperthermophilic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 13674-13679.

Bibliographie

Vestergaard G, Häring M, Peng X, Rachel R, Garrett RA, Prangishvili D (2005). A novel *rudivirus*, ARV1, of the hyperthermophilic archaeal genus *Acidianus*. *Virology* **336**: 83-92.

Vestergaard G, Aramayo R, Basta T, Häring M, Peng X, Brügger K *et al* (2008a). Structure of the *Acidianus* Filamentous Virus 3 and Comparative Genomics of Related Archaeal Lipothrixviruses. *J Virol* **82**: 371-381.

Vestergaard G, Shah SA, Bize A, Reitberger W, Reuter M, Phan H *et al* (2008b). SRV, a new rudiviral isolate from *Stygiolobus* and the interplay of crenarchaeal *rudiviruses* with the host viral-defence CRISPR system. *J Virol* **82**: 371-381.

Vieille C, Zeikus GJ (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 1-43.

Vigneron A (2012). Phylogenetic and functional diversity of uncultured microbial communities from the Sonora Margin cold seep sediments, Guaymas Basin (Gulf of California), Université de Bretagne occidentale - Brest.

Wagner A, Whitaker RJ, Krause DJ, Heilers JH, van Wolferen M, van der Does C *et al* (2017). Mechanisms of gene flow in *archaea*. *Nat Rev Microbiol* **15**: 492-501.

Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Dempsey DM, Dutilh BE *et al* (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Arch Virol* **164**: 2417-2429.

Wang H, Peng N, Shah SA, Huang L, She Q (2015a). Archaeal Extrachromosomal Genetic Elements. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**: 117-152.

Wang Q, Cen Z, Zhao J (2015b). The survival mechanisms of thermophiles at high temperatures: an angle of omics. *Physiology* **30**: 97-106.

Wang Y, Zhang X (2008). Characterization of a novel portal protein from deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2. *Gene* **421**: 61-66.

Wang Y, Zhang X (2010). Genome analysis of deep-sea thermophilic phage D6E. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7861-7866.

Wang Z, Hardies SC, Fokine A, Klose T, Jiang W, Cho BC *et al* (2018). Structure of the Marine *Siphovirus* TW1: Evolution of Capsid-Stabilizing Proteins and Tail Spikes. *Structure* **26**: 238-248.e233.

Bibliographie

Wasserfallen A, Nölling J, Pfister P, Reeve J, Conway de Macario E (2000). Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 43-53.

Wei D (2008). Identification and characterization of a single-stranded DNA-binding protein from thermophilic bacteriophage GVE2. *Virus genes* v. **36**: pp. 273-278-2008 v.2036 no.2001.

Weidenbach K, Nickel L, Neve H, Alkhnabashi OS, Kunzel S, Kupczok A *et al* (2017). *Methanosarcina* Spherical Virus, a Novel Archaeal Lytic Virus Targeting *Methanosarcina* Strains. *J Virol* **91**.

Weinbauer MG (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews* **28**: 127-181.

Weitz JS, Wilhelm SW (2012). Ocean viruses and their effects on microbial communities and biogeochemical cycles. *F1000 Biol Rep* **4**: 17.

Weitz JS, Beckett SJ, Brum JR, Cael BB, Dushoff J (2016). Lysis, lysogeny and virus–microbe ratios. *Nature* 549: E1-E3.

Weng CY, Chen SC, Lai MC, Wu SY, Lin S, Yang TF *et al* (2015). *Methanoculleus taiwanensis* sp. nov., a methanogen isolated from deep marine sediment at the deformation front area near Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**: 1044-1049.

Widdel F, Bak F (1992). Gram-negative mesophilic sulfate-reducing *bacteria*. *The prokaryotes*. Springer. pp 3352-3378.

Wiedenheft B, Stedman K, Roberto F, Willits D, Gleske A-K, Zoeller L *et al* (2004). Comparative Genomic Analysis of Hyperthermophilic Archaeal *Fuselloviridae* Viruses. *J Virol* **78**: 1954-1961.

Williamson SJ, Cary SC, Williamson KE, Helton RR, Bench SR, Winget D *et al* (2008). Lysogenic virus-host interactions predominate at deep-sea diffuse-flow hydrothermal vents. *ISME J* **2**: 1112-1121.

Winter AJ, Williams C, Isupov MN, Crocker H, Gromova M, Marsh P *et al* (2018). The molecular basis of protein toxin HicA-dependent binding of the protein antitoxin HicB to DNA. *J Biol Chem* **293**: 19429-19440.

Woese CR, Fox GE (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5088-5090.

Bibliographie

Wolfe RS, Physiology, Biochemistry, Genetics (2012). Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics: **1**.

Wommack KE, Colwell RR (2000). Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**: 69-114.

Wood AG, Whitman WB, Konisky J (1989). Isolation and characterization of an archaeobacterial viruslike particle from *Methanococcus voltae* A3. *J Bacteriol* **171**: 93-98.

Xiang X, Chen L, Huang X, Luo Y, She Q, Huang L (2005). *Sulfolobus tengchongensis* Spindle-Shaped Virus STSV1: Virus-Host Interactions and Genomic Features. *J Virol* **79**: 8677-8686.

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* **17**: 405-419.

Zaitlin M (1998). The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease. *Discoveries In Plant Biology: (Volume I)*. World Scientific. pp 105-110.

Zander A, Willkomm S, Ofer S, van Wolferen M, Egert L, Buchmeier S *et al* (2017). Guide-independent DNA cleavage by archaeal Argonaute from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Nat Microbiol* **2**: 17034.

Zaretsky M, Roine E, Eichler J (2018). Sialic acid-like sugars in *Archaea*: Legionaminic acid biosynthesis in the halophile *Halorubrum* sp. PV6. *Front Microbiol* **9**: 2133.

Zhang L, Kang M, Xu J, Huang Y (2015). Archaeal DNA polymerases in biotechnology. *Microbiol biotechnol* **99**: 6585-6597.

Zhang L, Xu D, Huang Y, Zhu X, Rui M, Wan T *et al* (2017). Structural and functional characterization of deep-sea thermophilic bacteriophage GVE2 HNH endonuclease. *Scientific Reports* **7**: 42542.

Zhang Z, Liu Y, Wang S, Yang D, Cheng Y, Hu J *et al* (2012). Temperate membrane-containing halophilic archaeal virus SNJ1 has a circular dsDNA genome identical to that of plasmid pHH205. *Virology* **434**: 233-241.

Zhao H, Wood AG, Widdel F, Bryant MP (1988). An extremely thermophilic *Methanococcus* from a deep sea hydrothermal vent and its plasmid. *Archives of Microbiology* **150**: 178-183.

Bibliographie

Zheng H, Wu H (2010). Gene-centric association analysis for the correlation between the guanine-cytosine content levels and temperature range conditions of prokaryotic species. *Bioinformatics* **11**: S7.

Ziganshin AM, Liebetrau J, Pröter J, Kleinsteuber S, biotechnology (2013). Microbial community structure and dynamics during anaerobic digestion of various agricultural waste materials. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 5161-5174.

Zillig W, Stetter KO, Wunderl S, Schulz W, Priess H, Scholz I (1980). The Sulfolobus-“Caldariella” group: taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerases. *Archives of Microbiology* **125**: 259-269.

Zillig W, Holz I, Janekovic D, Schäfer W, Reiter W (1983). The archaebacterium *Thermococcus celer* represents, a novel genus within the thermophilic branch of the *archaebacteria*. *Systematic and Applied Microbiology* **4**: 88-94.

Zillig W, Arnold HP, Holz I, Prangishvili D, Schweier A, Stedman K *et al* (1998). Genetic elements in the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus*. *Extremophiles* **2**: 131-140.

Annexes

I. Publications et Communications

Publication

Participation aux travaux ayant permis la **description de MCV1 et MCV2**, deux bacteriovirus hydrothermaux isolés de Petrotogales thermophiles lors de la thèse de Coraline Mercier. Ces travaux ont été publiés dans la revue « Environmental microbiologie » :

Mercier, C., Lossouarn, J., Nesbo, C. L., Haverkamp, T. H. A., Baudoux, A. C., Jebbar, M., Bienvenu, N., Thiroux, S., Dupont, S., Geslin, C. "Two viruses, MCV1 and MCV2, which infect Marinitoga bacteria isolated from deep-sea hydrothermal vents: functional and genomic analysis." *Environmental microbiology*20.2 (2018): 577-587.

Two viruses, MCV1 and MCV2, which infect *Marinitoga* bacteria isolated from deep-sea hydrothermal vents: functional and genomic analysis

C. Mercier,^{1,2,3} J. Lossouarn,^{1,2,3†} C. L. Nesbo,^{4,5}
T. H. A. Haverkamp,^{6,7} A. C. Baudoux,^{6,7}
M. Jebbar,^{1,2,3} N. Bienvenu,^{1,2,3} S. Thiroux,^{1,2,3}
S. Dupont^{1,2,3} and C. Geslin^{1,2,3*}

¹Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) - UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, rue Dumont d'Urville, F-29280 Plouzané, France.

²CNRS, IUEM - UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), rue Dumont d'Urville, F-29280 Plouzané, France.

³Ifremer, UMR 6197 Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Technopôle de la Pointe du diable, F-29280 Plouzané, France.

⁴Centre for Ecological and Evolutionary Synthesis (CEES), Department of Biology, University of Oslo, Oslo 0316, Norway.

⁵Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, AB T6G2R3, Canada.

⁶Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR 7144, Equipe DIPO, Station Biologique de Roscoff, F-29680 Roscoff, France.

⁷CNRS, UMR 7144, Adaptation et Diversité en Milieu Marin, Station Biologique de Roscoff, F-29680 Roscoff, France.

Summary

Viruses represent a driving force in the evolution of microorganisms including those thriving in extreme environments. However, our knowledge of the viral diversity associated to microorganisms inhabiting the deep-sea hydrothermal vents remains limited. The phylum of *Thermotogae*, including thermophilic bacteria, is well represented in this environment. Only one virus was described in this phylum, MPV1

carried by *Marinitoga piezophila*. In this study, we report on the functional and genomic characterization of two new bacterioviruses that infect bacteria from the *Marinitoga* genus. *Marinitoga camini* virus 1 and 2 (MCV1 and MCV2) are temperate siphoviruses with a linear dsDNA genome of 53.4 kb and 50.5 kb respectively. Here, we present a comparative genomic analysis of the MCV1 and MCV2 viral genomes with that of MPV1. The results indicate that even if the host strains come from geographically distant sites, their genomes share numerous similarities. Interestingly, heavy metals did not induce viral production, instead the host of MCV1 produced membrane vesicles. This study highlights interaction of mobile genetic elements (MGE) with their hosts and the importance of including hosts-MGEs' relationships in ecological studies.

Introduction

Deep sea hydrothermal vents are one of the most extreme environments on Earth. They are minerals edifices with massive sulphide deposits and high concentration of various metals (e.g., Cu, Cd, Ni, Zn, Mn, Co, Ag, Au) (Auguste *et al.*, 2016). These ecosystems are characterized by steep physicochemical gradients, high hydrostatic pressures, very high to low temperatures, obscurity and prevalence of microbial chemosynthesis (Flores and Reyssenbach, 2011). They are home to a vast diversity of psychrophiles, mesophiles, hyperthermophiles, acidophiles, piezophiles and even moderate halophiles microorganisms belonging to the Bacteria and Archaea domains (Jebbar *et al.*, 2015). The virosphere associated with these deep-sea microorganisms remains largely unexplored; to date only eight viruses have been characterized (Lossouarn *et al.*, 2015a). Two of these viruses infect *Thermococcales*, one of the largest archaeal orders that comprises hyperthermophilic and chemoorganoheterotrophic microorganisms. These are non-virulent lemon-shaped archaeoviruses, and were isolated from *Pyrococcus abyssi* (PAV1) and *Thermococcus prieurii* (TPV1) (Geslin *et al.*, 2003a,b, 2007; Gorlas *et al.*, 2012).

Received 8 June, 2017; revised 25 September, 2017; accepted 19 October, 2017. *For correspondence. E-mail claire.geslin@univ-brest.fr; Tel. +33 (0) 2 98 49 88 58; Fax +33 (0) 2 98 49 87 05. †Present address: Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France.

© 2017 Society for Applied Microbiology and John Wiley & Sons Ltd

Communications

Présentation d'un poster lors du colloque de l'**AFEM 2017** à Camaret-sur-mer en France.

Poster # 7 : Les éléments génétiques mobiles des sources hydrothermales océaniques profondes

Sarah Thiroux * ¹

¹ Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) – Université de Bretagne occidentale, Centre National de la Recherche Scientifique : FR2195 – Technopôle Brest-Iroise, Place Copernic, 29280 Plouzané, France

Les éléments génétiques mobiles (EGMs) les mieux décrits au niveau des sources hydrothermales océaniques profondes sont les virus, les plasmides ou encore les vésicules membranaires (5). Ce mobilome abyssal a un impact non négligeable sur cet écosystème aux conditions physico-chimiques extrêmes. Les EGMs sont impliqués dans la diversité et l'évolution des communautés microbiennes (2). Ils facilitent les transferts horizontaux de gènes et sont d'importants acteurs de l'adaptation microbienne aux environnements extrêmes (1). Nos connaissances concernant le mobilome abyssal restent encore aujourd'hui limitées. En effet, bien que les sources hydrothermales océaniques profondes aient été découvertes il y a 40 ans, seulement 6 virus de bactéries et 2 virus d'archées sont décrits à ce jour (5). Pourtant les virus sont abondants (10^4 à 10^7 VLPs/mL) et jouent un rôle primordial dans l'écosystème marin profond (7). Les vésicules membranaires jouent également un rôle clé au niveau de l'écosystème marin notamment dans des systèmes de défense face aux virus, dans des systèmes de transferts latéraux de gènes, au niveau de la compétition entre microorganismes ou encore dans le recyclage du carbone (3, 6). C'est dans ce contexte que nous nous intéressons à la caractérisation d'EGMs (virus, plasmides et vésicules) associés aux bactéries et archées des sources hydrothermales océaniques profondes. Plus récemment, nous avons axé notre étude sur de nouveaux virus d'archées méthanogènes hyperthermophiles et sur les vésicules membranaires produites en conditions de stress aux métaux lourds (4). Nous décrivons actuellement le premier virus tête-queue produit par une archée autotrophe hyperthermophile isolée d'une source hydrothermale océanique profonde.

Mots clés : Virus, Vésicules Membranaires, Bacteria, Archaea, Hyperthermophile, Méthanogène, Océan Profond, Sources Hydrothermales Océaniques Profondes, Métaux Lourds
Références :

Présentation orale en anglais lors du congrès du **GDR Archaea 2018** à Brest en France.

Viruses of hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hydrothermal vents

Sarah Thiroux * ¹, Nadège Bienvenu[†] ², Samuel Dupont ², Anne Godfroy[‡] ³, Claire Geslin[§] ²

¹ Laboratoire de microbiologie des environnements extrêmes (LMEE) – Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) – Rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané,

² Laboratoire de microbiologie des environnements extrêmophiles (LM2E) – Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), CNRS : UMR6197, Université de Bretagne Occidentale (UBO), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM) – Centre de Brest DRV/VP - BP 70 29280 PLOUZANE,

³ Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes [Plouzané] (LM2E) – CNRS : UMR6197, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Université de Bretagne Occidentale (UBO) – Technopôle Pointe du Diable, 29280 Plouzané,

Viruses of hyperthermophilic archaea isolated from deep-sea hydrothermal vents

S. Thiroux, N. Bienvenu, S. Dupont, A. Godfroy and C. Geslin.

Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes, UMR6197, UBO-IUEM, Ifremer, CNRS, Plouzané, France.

Viruses have a potential to be powerful agents that drive evolution and adaptation of their cellular hosts in the extreme marine environments. Nevertheless, our knowledge of the viral diversity associated to microorganisms inhabiting the deep sea hydrothermal vents is still limited. Only 10 viruses, 2 archaeovirus and 8 bacteriovirus, were isolated and characterized from this extreme environment *. Two lemon-shaped viruses, PAV1 and TPV1, associated to hyperthermophilic anaerobic *Archaea*, *Thermococcales* order, have been characterized in our laboratory. In order to deepen our knowledge on the viral diversity of marine hydrothermal microorganisms, we have extended our investigation to the order *Methanococcales*.

A screening carried on hyperthermophilic methanogens, has led to the discovery of the first archaeovirus isolated from the *Methanocaldococcus* genus. It is the first head/tail virus (a siphovirus-like) isolated from a hyperthermophilic archaea.

Comparative studies of these mobile genetic elements from hyper/thermophilic Archaea and Bacteria will help us understand the dynamics of the microbial communities in the deep marine biosphere.

*Speaker

[†]Corresponding author:

[‡]Corresponding author: anne.godfroy@ifremer.fr

[§]Corresponding author: claire.geslin@univ-brest.fr

Présentation orale en anglais lors du congrès **Thermophile 2019** à Fukuoka au Japon.

Oral Presentation

030

Archaeal Viruses of Deep Sea Hydrothermal Vents: *Methanocaldococcus fervens* virus 1, The First Head-Tailed Virus Isolated from an Hyperthermophilic Archaeon

Sarah Thiroux^{1,2,3}, Samuel Dupont^{1,2,3}, Nadège Bienvenu^{1,2,3}, Camilla L. Nesbo^{4,5}, Mart Krupovic⁶, Anne Godfroy^{1,2,3}, Stéphane L'Haridon^{1,2,3}, Patrick Forterre⁷, Claire Geslin^{1,2,3}

1. Université de Bretagne Occidentale (UBO, UEB), Institut Universitaire Européen de la Mer (IUEM)- UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Rue Dumont d'Urville, F29280 Plouzané, France.

2. CNRS, IUEM – UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), rue Dumont d'Urville, F29280 Plouzané, France.

3. IFREMER, UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), rue Dumont d'Urville, F29280 Plouzané, France.

4. CEES, Department of Biology, University of Oslo, 0316, Oslo, Norway 11

5. Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, AB, T6G2R3, 12 Canada

6. Department of Microbiology, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr Roux, 75015 Paris, France

7. Université Paris-Saclay, Institut de biologie intégrative de la cellule, Laboratoire de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extremophiles (LBMGE), UMR8621/CNRS, 91405 Orsay Cedex, France

Despite the importance of viruses in the diversity, evolution and adaptation of microbial communities, the virosphere of extreme ecosystems, especially deep sea hydrothermal vents, remains poorly characterized. Viral abundance was estimated at 10^7 VLPs (Virus Like Particles) per millilitre in this extreme ecosystem. These VLPs can be viral particles but also membrane vesicles containing viral, plasmid or cellular DNA. Viruses, membrane vesicles and plasmids are part of the mobile genetic elements included in the abyssal mobilome. To date, only eight bacterial viruses and two archaeal viruses associated with deep sea hydrothermal vents have been described. These two archaeal viruses are lemon-shaped and infect hyperthermophilic *Thermococcales*: PAV1 (*Pyrococcus abyssi* virus 1) and TPV1 (*Thermococcus prieurii* virus 1). The archaeal viruses are generally diverse and show a large variety of morphotypes and genome contents.

In this context, we are studying and characterising archeoviruses isolated from the abyssal ecosystem. Particularly, our studies are concentrated on viruses of methanogens. Methanogens represent an important group of autotrophic microorganisms in deep sea hydrothermal vents. This group is probably influenced by interaction with mobile genetic elements such as viruses. Few viruses infecting methanogens have been discovered but none of them from abyssal ecosystem.

We are describing MFV1 (*Methanocaldococcus fervens* virus 1), the first head-tailed virus providing from a deep sea hyperthermophilic archaea. The host, is a hyperthermophile methanogen isolated from deep sea hydrothermal sediments at 2000 meters depth. MFV1 is a siphovirus with a size of 200nm in length. The viral genome is a double stranded linear DNA of 31kb. This is the first evidence of production of head-tailed viruses by hyperthermophilic archaea. The infectivity of MFV1 was demonstrated on a strain of *Methanocaldococcus jannaschii* that does not carry provirus. The basal viral production is high (10^9 virions/ml) and could be explained by a spontaneous induction of MFV1 within a fraction of the growing host cells. Notably, *M. fervens* carry MFV1 virions and also a plasmid of 22,1kb, with a possible interaction between these two mobile genetic elements. Our results open a new window on the understanding of the abyssal mobilome.

Key words: Viruses, Archaea, Hyperthermophile, Methanogen, Deep sea hydrothermal vents

II. Enseignement

J'ai pu effectuer **10 h de vacations** au cours de mes années de thèse. Ces heures d'enseignements ont été effectuées sous la forme de travaux dirigés à l'Université de Bretagne Occidentale à l'attention d'étudiants en 2^e année de Licence de Biologie des Organismes et des Population (BOP). Ces travaux dirigés entraient dans l'Unité d'Enseignement intitulé OMBOE (Outils moléculaires appliqués à la biologie des organismes et à leur l'écologie) portée par le Dr Jean-Luc Yung.

III. Formations

Tout au long de ma thèse j'ai pu suivre des formations dont certaines particulièrement adaptées à mes travaux de thèse et qui ont pu élargir mes compétences et les perspectives d'étude de mon sujet :

- Formation à l'**éthique en science**
- Formation **FISH** dispensée par Valérie Cueff-Gauchard (ingénieure au LM2E)
- Formation **QPCR** dispensée par Valérie Cueff-Gauchard (ingénieure au LM2E)
- Formation « **l'orateur en situation** »

IV. Vulgarisation scientifique

Durant ces trois ans de thèse, j'ai eu l'occasion de participer à des événements de vulgarisations scientifiques :

Avec le LM2E, j'ai pu participer à l'élaboration d'un stand présenté dans le cadre de la **Nuit Européenne Des Chercheurs (NEDC)** en 2016, 2017 et 2018.



J'ai également rejoint l'équipe d'organisation de « **Pint Of Science Brest** » pour l'édition 2018 de ce festival de vulgarisation scientifique.



Titre : Etudes des interactions entre virus et hôtes archéens hydrothermaux hyperthermophiles

Mots clés : Virus, Archaea, Hyperthermophile, Méthanogène, Thermococcales, Sources Hydrothermales

Malgré l'importance des virus dans la diversité, l'adaptation et l'évolution des communautés microbiennes, la virosphère des sources hydrothermales océaniques, reste peu caractérisée. Seulement 10 virus, dont 8 bacteriovirus et 2 virus d'archées, ont été décrits à ce jour. C'est dans ce contexte que ce travail de thèse s'inscrit avec pour objectif de caractériser des archaeovirus isolés de la composante microbienne abyssale. Les études ont porté sur des virus de méthanogènes, des producteurs primaires abondants dans ces environnements hydrothermaux. MFV1, premier virus tête-queue hyperthermophile décrit, a été isolé de *Methanocaldococcus fervens* une méthanogène hyperthermophile issue de sédiments marins profonds. Une caractérisation fonctionnelle et génomique de ce nouveau siphovirus a été conduite.

Le caractère infectieux des virions a été démontré sur des *Methanocaldococcus*. Le plasmide pMEFER01, porté par *M. fervens*, peut également être empaqueté dans les capsides virales. L'étude d'autres virus de méthanogènes hyperthermophiles hydrothermales a été amorcée. *M. vulcanius* produit des virions tête-queue tandis que ceux isolés de *M. jannaschii* ont une morphologie particulière (tige-boucles). En parallèle, l'étude d'un virus en forme de citron, infectant *Thermococcus thio-reducens*, a permis de s'intéresser à un autre ordre archéen, bien représenté au sein des systèmes hydrothermaux marins. De façon surprenante, ce virus semble capable d'infecter des méthanogènes. La mise en évidence de nouveaux systèmes hôtes-virus mais également d'interactions avec différents éléments génétiques mobiles (plasmides, vésicules) a permis d'élargir les connaissances sur le mobilome abyssal.

Title: Studies of interactions between viruses and hyperthermophilic hydrothermal archaeal hosts

Keywords: Virus, Archaea, Hyperthermophilic, Methanogen, Thermococcales, Hydrothermal vents

Despite the importance of viruses in the diversity, adaptation, and evolution of microbial communities, the virosphere of deep-sea hydrothermal vents remains poorly characterized. To date, only 10 viruses isolated from deep sea hydrothermal vents, including 8 bacterial viruses and 2 archaeal viruses, have been described. In this context, this thesis work focused on gaining insights into the viral interactions with deep-sea autotrophic archaeal component. We aimed to characterize viruses of methanogens, which are abundant primary producers in these hydrothermal environments. MFV1, the first hyperthermophilic head-tail virus described, was isolated from *Methanocaldococcus fervens*, a hyperthermophilic methanogen from hydrothermal sediments. A functional and genomic characterization of this new siphovirus was conducted.

The infectivity of MFV1 was demonstrated on *Methanocaldococcus* species. The plasmid pMEFER01, carried by *M. fervens*, can also be packaged in viral capsids. The study of other viruses of hyperthermophilic and hydrothermal methanogens was initiated. *M. vulcanius* produced head-tailed virions whereas those isolated from *M. jannaschii* had a particular morphology (stem-loops). In parallel, the study of a lemon-shaped virus, infecting *Thermococcus thio-reducens*, permits to take an interest on another archaeal order, which is well-represented in marine hydrothermal systems. Surprisingly, this virus seemed capable of infecting hyperthermophilic methanogens. The characterization of new host-virus systems but also of interactions with different mobile genetic elements (plasmids, vesicles) expanding knowledge about the abyssal mobilome.