



Gilbert Greub¹

Virus géants: du mimivirus au lausannevirus

Malgré l'absence de rôle pathogène avéré, la découverte de virus géants et leur étude approfondie a permis (i) de démontrer que la perte de contenu génétique est plus fréquente en conditions allopatriques et que le lausannevirus présente un taux de mutation relativement bas de l'ordre de trois à huit mutations par année, ainsi que (ii) de documenter l'importance de l'endonucléase et de la nudix hydrolase dans la réplication du lausannevirus au sein de l'amibe. L'analyse du génome de ce virus a également contribué à documenter des protéines virales apparentées aux histones eucaryotes qui pourraient contribuer à la plus grande stabilité du génome de lausannevirus et interagir avec l'ADN de l'hôte amibien.

Le *Bradford coccus*

En janvier 2001, alors que j'effectuais un séjour postdoctoral à Marseille, j'ai eu le mandat de faire des images de microscopie électronique de deux coques différents fournis par Timothy Robotham, un chercheur anglais spécialiste des amibes et des bactéries intracellulaires d'amibes. Il s'agissait de *Hall coccus* et de *Bradford coccus*.

Le premier, *Hall coccus*, correspondait à une souche isolée d'un humidificateur [1], par la suite renommé *Parachlamydia acanthamoebae* en raison de sa similarité de séquences avec d'autres membres de l'ordre des *Chlamydiales* et de sa croissance intracellulaire avec deux stades typiques des *Chlamydia*, les corps élémentaires et les corps réticulés [2]. Le second, *Bradford coccus*, se révéla, lors de cette séance de microscopie, être présent en grandes quantités au sein de l'amibe *Acanthamoeba polyphaga* et présentait une structure typique icosaédrique des virus (figure 1).

Le mimivirus

Une caractérisation détaillée par l'équipe marseillaise a permis une première description de ce virus géant, d'une taille similaire à *Ureaplasma* et proche génétiquement des *Poxviridae* et des *Phycodnaviridae*, au sein d'une nouvelle famille de virus: les *Mimiviridae* [3]. Sa structure icosaédrique et sa phase d'éclipse typique dans son cycle cellulaire ainsi que l'absence des gènes communs aux bactéries telles que les protéines ribosomales indiquaient clairement sa nature virale [3]. De plus, 21 gènes du mimivirus étaient homologues à ceux conservés dans la plupart des NCLDV (*nucleo-cytoplasmic large DNA virus*).

Depuis, l'équipe de Didier Raoult a largement caractérisé le mimivirus, publiant plus de 100 articles originaux sur cette famille de virus géants. Leurs travaux ont permis notamment la découverte d'un deuxième mimivirus parasité par un virophage [4]. Les travaux sur les mimivirus ont montré plusieurs transferts horizontaux entre les virus géants et différentes bactéries intra-amibiennes [5,6]. De plus, dans le cadre d'un travail collaboratif entre l'équipe de Didier Raoult, de Brendan Loftus et mon équipe lausannoise, nous avons également pu documenter un nombre conséquent de transferts latéraux entre l'amibe du genre *Acanthamoeba* et les virus géants [7].

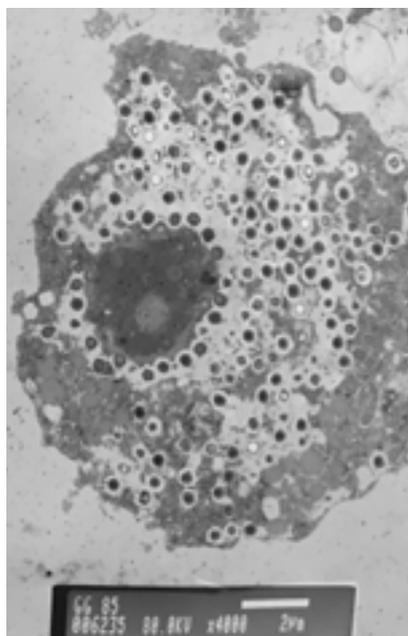


Figure 1: Le *Bradford coccus* tel que visualisé par microscopie électronique en janvier 2001, plus tard rebaptisé mimivirus au vu de sa nature virale et de sa grande taille mimant celle des microbes (*microbe-mimicking virus*). Présence de nombreux virus avec leur structure icosaédrique au sein de l'amibe *Acanthamoeba polyphaga*. Image prise par microscopie électronique à transmission à un grossissement de 4000x.

La coculture d'amibes

Lorsque je suis rentré en Suisse et que j'y ai établi mon groupe de recherche, l'un de mes premiers objectifs a été de mieux étudier la biologie de *Parachlamydia acanthamoebae*, en raison de ses mécanismes de virulence partagés avec *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, qui sont des pathogènes établis, et en raison de son possible rôle comme pathogène émergent [8]. Ainsi, nous avons implémenté à Lausanne la coculture d'amibes afin découvrir de nouvelles espèces de *Chlamydiae* [8,9]. Cette technique s'apparente à de la culture cellulaire mais utilise des amibes comme tapis de cellule. Cette coculture utilise (i) une température basse et une atmosphère humidifiée afin de prévenir l'enkystement de l'amibe, ainsi que (ii) des milieux non nutritifs afin d'accroître la phagocytose par les amibes affamées [9,10]. Cet outil nous a permis d'isoler un virus géant à partir des eaux de la Seine, échantillonnées à Morsang au sud de Paris. Cette nouvelle espèce de virus géants, visible en microscopie optique, a été appelée lausannevirus [11].

Le lausannevirus

Après filtration (0,22 microns) et réinfections d'amibes fraîches avec le filtrat, une culture pure dépourvue de légionelles a été obtenue. Cette culture provoquait la lyse des amibes du genre *Acanthamoeba* en 24 heures. Fort de mon expérience à Marseille avec le *Bradford coccus*, j'ai suspecté qu'il s'agissait d'un virus géant et nous l'avons caractérisé (i) par microscopie électronique démontrant la structure icosaédrique typique, puis (ii) par microscopie confocale démontrant une phase d'éclipse quatre heures postinfection et une lyse totale des amibes au-delà de 16 heures postinfection [11].

¹ Institut de microbiologie de l'Université de Lausanne, CHUV, Lausanne

Nos investigations pour déterminer un possible rôle pathogène de ce virus géant ont été plutôt rassurantes. En effet, bien que les humains soient régulièrement exposés au lausannevirus ou à des virus apparentés et présentent une séroprévalence de l'ordre de 2% [12], il n'a pas été possible par PCR de documenter d'infections respiratoires à ce jour (données non publiées). Notons que la présence d'anticorps dirigés contre le lausannevirus était associée à la pratique sportive fréquente et à une consommation de lait cru [12].

Des protéines apparentées aux histones eucaryotes

L'analyse du génome de lausannevirus [11] a montré sa grande colinéarité avec le génome de Marseillevirus, un autre virus géant isolé dans l'intervalle par l'équipe de Didier Raoult [13]. Ainsi, 71% des protéines de lausannevirus avaient leurs plus proches homologues dans le génome de marseillevirus [11]. Ce travail nous a également permis de détecter des protéines apparentées aux histones des mammifères avec une similarité de séquences avec les «histone fold» H2A, H2B, H3 ainsi qu'avec une séquence d'histones présente chez des archées [11]. La présence de ces protéines apparentées aux histones chez lausannevirus et marseillevirus pourrait suggérer un rôle de ces virus géants comme de possibles précurseurs des histones mammifères actuels. La présence de protéines de type «histones» permettant de protéger l'ADN n'est pas surprenante chez des virus géants qui doivent trouver une manière de condenser et décondenser rapidement leurs longs chromosomes. Les arbres phylogénétiques ne sont pas suffisamment forts pour confirmer l'hypothèse d'une origine virale aux histones eucaryotes. Il se pourrait également que les protéines apparentées aux histones présentes chez lausannevirus soient initialement d'origine eucaryotes et aient été acquises ultérieurement par les virus géants.

La thymidylate: synthase du lausannevirus

Une autre découverte intéressante faite lors de l'analyse du génome de ce virus fut la présence d'une dihydrofolate reductase couplée à une thymidylate syn-

thase sur une protéine bifonctionnelle. Notre équipe a alors décidé de tester l'expression de cette enzyme chez la levure. Nous avons ainsi complété une souche haploïde de *Saccharomyces cerevisiae* délétée du gène codant pour la dihydrofolate reductase en insérant un plasmide exprimant la dihydrofolate reductase de lausannevirus couplé à la thymidylate synthase. Ce mutant complété de *saccharomyces* était capable de pousser en l'absence de thymidine, démontrant la fonctionnalité de la dihydrofolate reductase de lausannevirus [14]. Ainsi, cette enzyme pourrait représenter une cible thérapeutique si un jour le rôle pathogène de lausannevirus venait à être documenté. Nous avons alors testé différents médicaments agissant sur le métabolisme des acides foliques et plus précisément sur la dihydrofolate reductase, et avons pu démontrer que la dihydrofolate reductase du lausannevirus est résistante au triméthoprim et à la pyriméthamine. En revanche, nous avons pu documenter une susceptibilité du lausannevirus au proguanil, un antimalarique [14].

Evolution de lausannevirus

En 2009, nous avons isolé une souche bactérienne, appelée *Estrella lausannensis*, qui poussait très rapidement au sein des amibes du genre *Acanthamoeba* [15, 16]. Nous avons

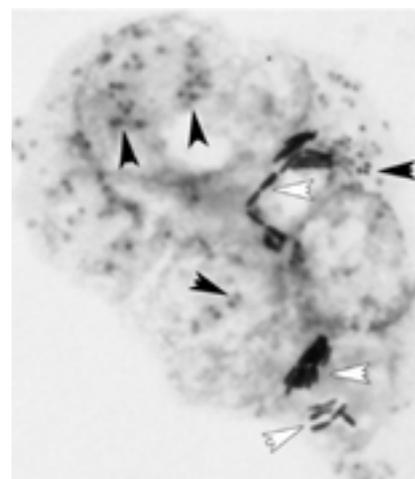


Figure 2: Présence à l'intérieur d'amibes du genre *Acanthamoeba* de bactéries correspondant à des légionelles résistantes aux amibes (flèches blanches) et à de petites coques (flèches noires), qui se révéleront correspondre au lausannevirus. Coloration de Gimenez, grossissement de 1000x. Image adaptée de Thomas et al. [11].

Riesenviren: von Mimivirus bis Lausannevirus

Obwohl für Riesenviren keine pathogenen Eigenschaften nachgewiesen wurden, konnte dank ihrer Entdeckung und eingehenden Erforschung (i) aufgezeigt werden, dass der Verlust von genetischen Informationen unter allopatrischen Bedingungen häufiger auftritt und diese Viren eine relativ niedrige Mutationsrate in der Grössenordnung von 3 bis 8 Mutationen pro Jahr aufweisen, und (ii) dokumentiert werden, welche Bedeutung der Endonuklease und der Nudixhydrolase bei der Replikation des Lausannevirus innerhalb der Amöbe zukommt. Die genomischen Studien haben ferner zum Nachweis viraler Proteine beigetragen, die eukaryotischen Histonen ähneln, die die Genomstabilität des Lausannevirus erhöhen sowie mit der DNA des Amöbenwirts interagieren könnten.

donc décidé d'évaluer par coculture d'amibes dans *Acanthamoeba* l'évolution du lausannevirus en condition allopatrique (seule) et en condition sympatrique (en présence d'*Estrella*). Cette évolution du lausannevirus a été investiguée sur une période d'une année avec trois passages par semaine, soit un total de 144 passages [17]. Nous avons ensuite effectué l'analyse des séquences de génomes à 0,3, 6, 9 et 12 mois. En présence d'*Estrella lausannensis*, nous avons observé que le virus, après avoir initialement au temps zéro et trois mois eu une population stable à 10^6 virions par millilitre, présentait parfois une sous-population de virus présentant seulement 10^2 virions par millilitre [17]. Cette baisse du «set-point» observée dans certaines sous-populations était vraisemblablement liée à une adaptation du virus afin de le rendre moins pathogène vis-à-vis de son hôte *Acanthamoeba*. Le haut «set-point» correspond à un virus hautement répliatif et plutôt lytique vis-à-vis de l'amibe, alors que le virus avec le «set point» plus bas à hauteur de 10^2 virions par millilitre se rapproche d'une certaine forme de latence.

Une autre chose intéressante que nous avons observée dans ce travail fut la perte d'un segment d'ADN dans les cultures allopatriques durant l'année étudiée. Notons qu'après la même période d'une année, cette même délétion n'était observée que dans une seule des huit cultures sympatriques (en présence d'*Estrella*), suggérant que cette réduction génomique pourrait

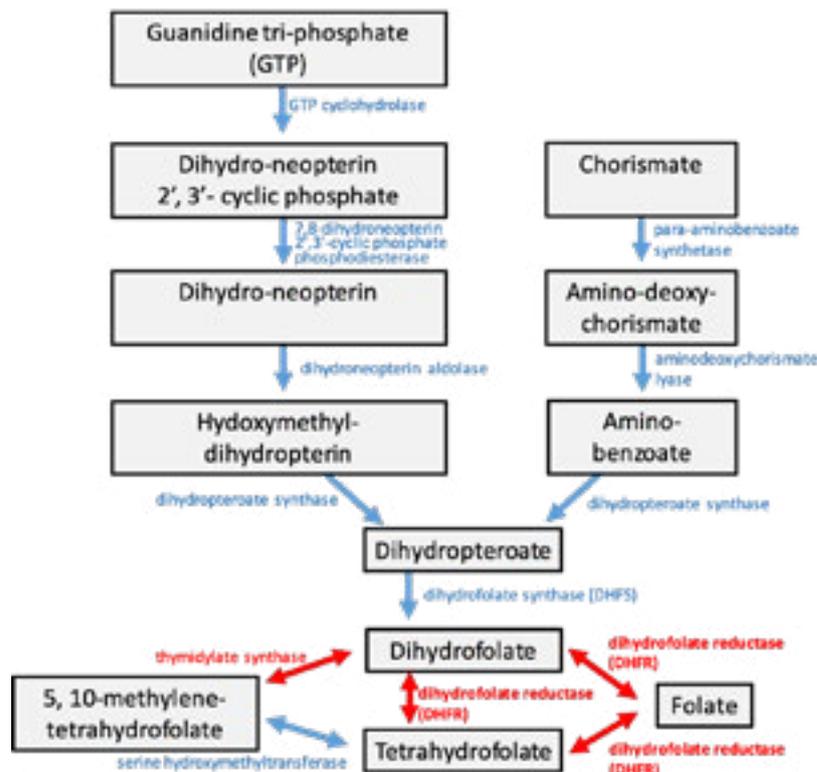


Figure 3: Le métabolisme des folates et la dihydrofolate réductase, cible d'action de plusieurs médicaments dont le proguanil, le triméthoprime et la pyriméthamine. Les substances-clés retrouvées aux différentes étapes du métabolisme des folates sont en noir fond gris, alors que les enzymes sont en bleu. Les deux enzymes (dihydrofolate réductase et thymidylate kinase) codées par l'un des gènes du génome de lausannevirus sont mis en évidence en rouge. Image adaptée des références 14 et 22, ainsi que du site KEGG et plus précisément de la carte KEGG 00790 (https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?map00790).

être facilitée en l'absence de concurrence extérieure pour la réplication intra-amibienne. Ainsi, la grande taille des virus géants pourrait aussi être le reflet indirect de leur vie dans un milieu compétitif en condition allopatrique et leur besoin de maintenir un large pool de gènes (de compétences) dans ces conditions [17], et ne pas être seulement lié au «melting pot» génétique retrouvé en condition allopatrique, considéré comme favorisant les échanges horizontaux de gènes [5, 6, 13].

Les endonucléases et la nudix hydrolase du lausannevirus

Dans cette expérience, nous avons également observé la grande stabilité du génome du lausannevirus puisqu'une moyenne de 5,8 mutations par mégabases par année a été observée en condition sympatrique pour 8,7 mutations par mégabases par année en condition allopatrique. Notons que ces mutations touchaient principalement

des endonucléases, que ce soit en situation sympatrique ou allopatrique. Les endonucléases pourraient jouer un rôle important dans la réplication virale, comme démontré chez les chlorovirus où ce rôle d'endonucléase de restriction permet de dégrader l'ADN de l'hôte de manière précoce [18].

Notons qu'en dehors des mutations documentées au niveau des endonucléases, après une année de repiquages successifs, des mutations ont également été documentées, entre autres au niveau du gène codant pour la nudix hydrolase du lausannevirus. La nudix hydrolase pourrait être associée à une plus haute charge virale puisque comme décrit par Pariss et al., la nudix hydrolase de l'african swine virus a une activité de decapping sur l'ARN messenger [19]. Cette protéine virale pourrait donc contrôler le ratio d'ARN messenger respectif du virus et de l'hôte et le biaiser en faveur de l'ARN messenger viral. Cette mutation observée uniquement en condition allopatrique

pourrait être bénéfique au lausannevirus en lui permettant de se répliquer davantage qu'*Estrella lausannensis* au sein de l'amibe.

Conclusion

En conclusion, l'étude des virus géants, de leur génome, de leur interaction avec d'autres microbes d'amibes et leur réplication intracellulaire permet de mieux comprendre la biologie de ces virus et leur évolution. De manière plus générale, la découverte de nouvelles espèces nous apporte de nouveaux champs d'investigation et il est important que dans nos laboratoires, nous fassions preuve de créativité afin d'implémenter de nouvelles méthodes de culture qui nous permettent non seulement de découvrir la présence de nouveaux pathogènes, mais surtout de mettre à disposition les souches pour les études approfondies ultérieures. Ainsi, la découverte récente du *Cedratvirus lausannensis* [20], un parent de *Pithovirus sibericum*, nous permet de réanalyser l'histoire évolutive des *Pithoviridae*, pour lesquelles la disponibilité d'une souche vieille de plus de 30 000 ans [21] représente un inestimable témoignage du passé.

Correspondance

gilibert.greub@chuv.ch

Références

En ligne sur le site: www.sulm.ch/f/pipette -> Numéro actuel (N 5-2020)