

► Le premier virus (celui de la mosaïque du tabac) a été découvert par Ivanoski en 1892 parce qu'il n'était pas retenu par les bougies de porcelaine de Chamberland¹, au contraire des microbes connus de son temps. Pendant plus d'un siècle, les virus sont ensuite restés associés à leur propriété de passer à travers les filtres « stérilisants » qui est encore le critère opérationnel standard pour distinguer la « fraction virale » de celles des autres microbes dans des échantillons médicaux ou environnementaux. La première exception au critère simpliste de la taille des particules est venue avec la découverte de Mimivirus, dont la nature virale n'a été reconnue qu'en 2003, après dix ans au cours desquels il a été confondu avec une bactérie intracellulaire obligatoire. Treize années plus tard, nous commençons à réaliser que les « virus géants » non filtrables sont loin d'être rares, qu'ils sont probablement ubiquitaires, et qu'ils couvrent une grande diversité de formes de virions, de tailles de génomes, de contenus en gènes, et de stratégies de réplication. Après une brève description des quatre familles de virus géants connus aujourd'hui, nous évoquerons les énigmes, les controverses et les perspectives de révolutions conceptuelles qui sont associées à ce nouveau domaine de la virologie en plein essor. ◀

Des virus que personne n'attendait

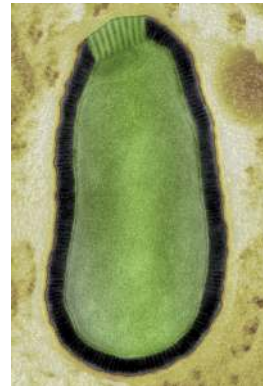
La notion paradoxale de « virus géants » date de 2003, quand la nature « virale » du Mimivirus a été finalement

Vignette (Pithovirus © Jean-Michel Claverie).

¹ Charles Chamberland (1851-1908) était un biologiste et physicien français. Il travaille avec Louis Pasteur et est principalement connu pour ses travaux de stérilisation rendu nécessaire avec le développement de la microbiologie. Lors d'une épidémie de fièvre typhoïde à Paris, il conçoit le filtre Chamberland, à partir d'une bougie de porcelaine poreuse permettant de filtrer les liquides et de retenir par exemple les micro-organismes présents dans l'eau. Les virus d'une taille plus petite que les pores ne sont pas retenus par la bougie de porcelaine.

Les virus géants État des connaissances, énigmes, controverses et perspectives

Jean-Michel Claverie^{1,2}, Chantal Aberger¹



¹Information Génomique et Structurale, Aix-Marseille Université, CNRS (UMR7256), Institut de Microbiologie de la Méditerranée (FR3479), 13000 Marseille, France ;
²Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille, Marseille, France.
claverie@igs.cnrs-mrs.fr

reconnue [1], plus de 10 années après son isolement et sa classification initiale comme une bactérie parasite intracellulaire obligatoire des amibes du genre *Acanthamoeba* [2]. Par la taille de ses virions (d'un diamètre d'environ 750 nm), le Mimivirus représentait la première violation du critère historique de la « bougie de Chamberland » qui avait mené à la découverte du premier virus par Ivanoski en 1898 [3] et s'appliquait depuis à tous les virus : leur capacité à passer à travers des filtres de stérilisation (de porosité 0,2 µm) retenant la plupart des bactéries et, par conséquent, leur invisibilité en microscopie optique. Fidèle à cette tradition, notre laboratoire ne qualifie de géants que les virus dont les particules sont suffisamment grandes pour être facilement dénombrables en lumière visible. Comme les premiers virus dotés de particules « géantes » avaient également des génomes de grandes tailles (plus d'un million de paires de bases pour les premiers Mimiviridae), ce dernier critère a souvent été utilisé à la place du critère de visibilité optique. Or nous savons maintenant que la corrélation entre la taille des virions et celle des génomes qu'ils transportent est loin d'être absolue. L'existence de virus à grands génomes (*i.e.* > 300 kilobases [kb]), mais dont les virions restent sous la limite de la visibilité optique, est maintenant source d'inconsistances dans la littérature, dans laquelle ces virus sont parfois répertoriés comme « géants ». Dans cette revue, nous resterons fidèles au critère historique. Nous ne présenterons en détails que les virus dont les particules « géantes » sont clairement visibles en microscopie optique. Ces virus correspondent aujourd'hui à 4 familles distinctes dont les prototypes sont Mimivirus [4], *Pandoravirus salinus* [5], *Pithovirus sibericum* [6] et *Mollivirus sibericum*² [7] (Figure 1).

² Lors de sa dernière réunion plénière le 1-2 février 2016 à Hinxton, le comité international de taxonomie des virus (ICTV) a voté une motion réhabilitant l'utilisation de la nomenclature binomiale latine pour les virus.

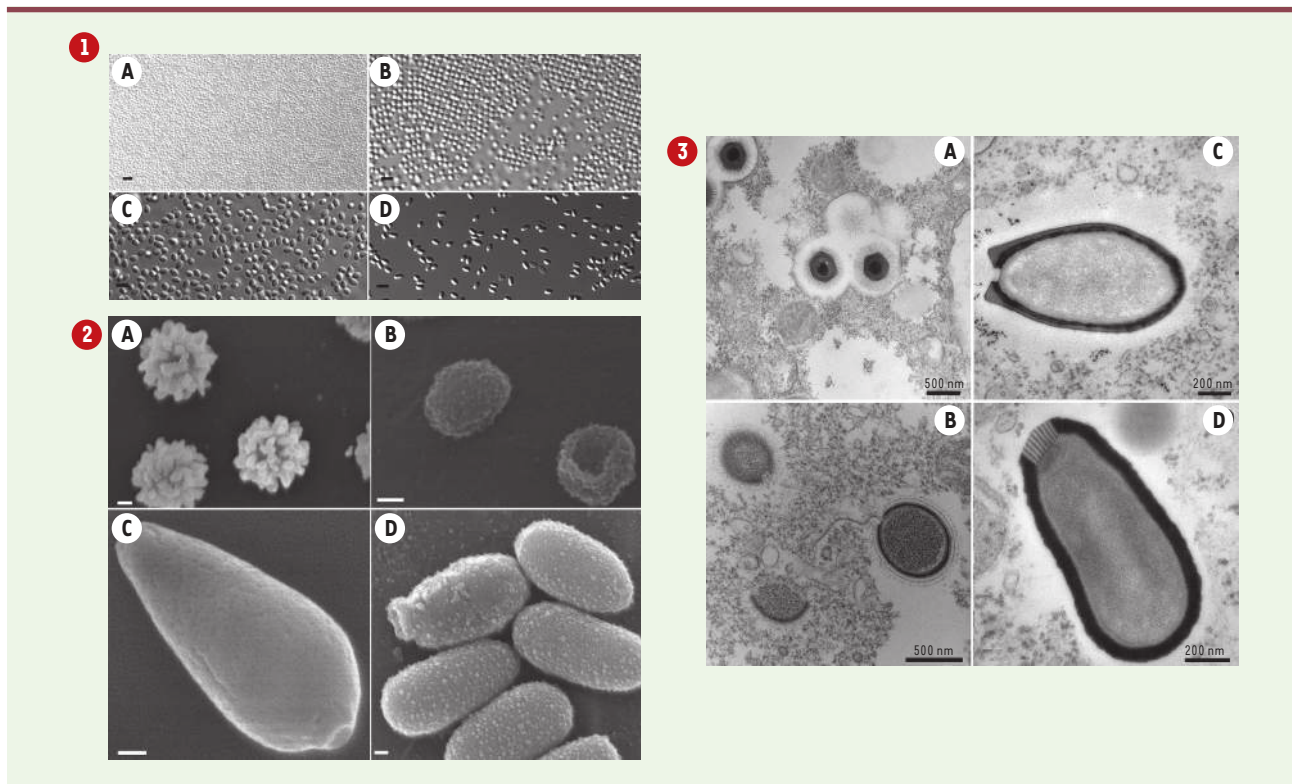


Figure 1. Morphologie des particules. 1. Vues en microscopie optique (x63, Nomarski). La barre d'échelle mesure 2 μ m. 2. Vues en microscopie électronique à balayage. La barre d'échelle mesure 100 nm. 3. Vues en coupe fine par microscopie électronique en transmission. A : Mimivirus. B : Mollivirus. C : Pandoravirus. D : Pithovirus.

Nous ne parlerons pas de deux autres familles qui sont à la limite du critère de visibilité pour lesquelles les prototypes sont *Marseillevirus* [8], dont les membres infectent le même hôte cellulaire que les quatre précédentes, et *Faustovirus* qui infecte une autre amibe du genre *Veramoeba* [9] (Tableau 1).

Les Mimiviridae : une famille virale diverse et probablement très ancienne

D'abord retardée par le paradigme construit au cours du premier siècle de la virologie consacré – par définition – aux virus dits « filtrants », la découverte du premier virus géant, *Mimivirus*, n'a constitué que la première étape d'une aventure scientifique encore plus étonnante dans laquelle nous sommes encore plongés : les virus géants non seulement existent, mais nous savons maintenant qu'ils sont ubiquitaires, abondants, et se répartissent dans une diversité de familles dont nous avons probablement à peine commencé l'inventaire. La famille des Mimiviridae (ou des Megaviridae, tels qu'ils sont quelquefois dénommés, en référence à leur génome de plus d'une mégabase) s'est progressivement dessinée à partir de l'exploration systématique de multiples environnements, dans le but initial de mieux cerner les propriétés et les contours de ce que l'on pensait n'être qu'une famille unique de « monstres de foire » apparentés à *Mimivirus*. Dans cette recherche, les premiers travaux de métagénomique ont joué un rôle important puisque ce sont eux qui nous ont d'abord guidé

vers l'exploration de l'environnement marin [10] qui a mené à l'identification, sur les côtes chiliennes, du plus grand Mimiviridae connu à ce jour, *Megavirus chilensis* [11]. En parallèle, les travaux de virologues/océanographes s'intéressant spécifiquement à la dynamique des efflorescences de protozoaires planctoniques ont révélé l'existence d'une branche divergente de Mimiviridae marins de plus petite taille (aux génomes néanmoins respectables de plus de 450 000 paires de bases) mais qui semblent jouer un rôle majeur dans la régulation des populations planctoniques [12]. Ces virus n'infectent pas l'amibe *Acanthamoeba*, mais des eucaryotes unicellulaires tels que *Cafeteria roenbergensis* (CroV) [13], *Phaeocystis globosa* (PgV) [14], *Haptolina ericina* (CeV) [15], ou *Aureococcus anophagefferens* (AaV) [16] (Figure 2). Ces protozoaires appartiennent à différentes divisions au sein du groupe phylogénétique des Bikonts (i.e. des cellules à deux flagelles) dont la divergence avec les amibes (appartenant au groupe des Unikonts, cellules à un seul flagelle) précède la radiation du domaine eucaryote. Une telle distribution d'hôte suggère immanquablement que l'origine des Mimiviridae pourrait avoir précédé cette radiation et donc être contemporaine de l'émergence du domaine eucaryote [17] (Figure 2), une hypothèse qui est encore loin de faire



Famille/ nom	Hôte	G+C %	Génome (taille)	Génome type	Protéines	Virion (forme)	Virion (taille)	Mode d'infection	Relargage des virions
Mimiviridae	Acanthamoeba	28	≈ 1,2 Mb	dsADN linéaire	≈ 1 000	Icosaèdre	750 nm Ø	Phagocytose	Lyse
Pandoraviridae	Acanthamoeba	62-64	1,9-2,8 Mb	dsADN linéaire	≈ 2 550	Amphore	500 nm x 1 200 nm	Phagocytose	Lyse et exocytose
Pithovirus	Acanthamoeba	36	610 kb	ADN circulaire	≈ 465	Amphore	500 nm x 1 500 nm	Phagocytose	Exocytose
Mollivirus	Acanthamoeba	60	651 kb	ADN linéaire	≈ 520	Sphère	600 nm Ø	Phagocytose	Exocytose
Marseilleviridae	Acanthamoeba	43	≈ 350 kb	ADN circulaire	≈ 400	Icosaèdre	200 nm Ø	Phagocytose	Bourgeoisement en sacculées
Faustovirus	Vermamoeba	36,2	466 kb	ADN circulaire	450	Icosaèdre	200 nm Ø	Phagocytose	Lyse

Tableau 1. Liste des familles (ou uniques représentants) de virus « géants » et de leurs propriétés. Les deux dernières lignes (en vert) correspondent à des virus qui sont à l'extrême limite de la visibilité en microscope optique. Tous sont des virus d'amibes (Acanthamoeba ou Vermamoeba). dsADN : ADN double brin ; Mb : mégabase ; kb : kilobase ; Ø : diamètre ; G : guanine ; C : cytosine.

l'unanimité [18] même si elle correspond au scénario évolutif le plus parcimonieux. Une origine aussi ancienne prédit que des virus de la famille des Mimiviridae auraient pu (ou pourraient) infecter des hôtes cellulaires appartenant à la lignée des Opisthokonts (qui inclut les métazoaires et les champignons) ou des plantes. Aucun exemple de cette sorte n'a pour l'instant été documenté, mais de très anciennes infections semblent avoir laissé des traces dans les génomes d'espèces appartenant à ces groupes [19] (comme au sein des cnidaires, un des plus anciens phylums du règne animal [20]) (voir *Encadré*).

À la suite de la découverte de la nature virale de Mimivirus, près de 10 années de recherche d'autres virus géants réalisée par co-culture de multiples échantillons environnementaux avec Acanthamoeba n'ont étonnamment livré que de nouveaux membres de la famille des Mimiviridae. Tous partagent la même structure caractéristique de leur virion : une couche externe constituée d'un matériau fibrillaire entourant une capsid protéique pseudo-icosaédrique d'environ 0,5 µm de diamètre contenant elle-même deux membranes lipidiques entourant un « noyau » dense aux électrons. Ils partagent un génome d'ADN linéaire riche en adénine-thymine (AT > 70 %) avec des tailles allant jusqu'à 1,26 million de paires de bases codant jusqu'à 1 120 protéines [11]. Si cette quête a progressivement permis d'établir l'existence de trois sous-groupes proches mais néanmoins distincts (A : prototype Mimivirus, B : prototype *Megavirus chilensis*, C : prototype Moumouvirus), elle a failli nous faire croire que les seuls virus géants à découvrir n'appartiendraient qu'à une seule et même famille, suggérant par là même leur statut d'aberration évolutive et de monstre de foire³ [46, 47] (→).

(→) Voir la Nouvelle de M. Bekliz et al., m/s n° 10, octobre 2016, page 818

L'immense surprise des Pandoravirus

C'est dans ce contexte qu'est survenue la découverte quasiment simultanée de deux nouveaux virus géants dont l'analyse génomique a démontré qu'ils n'avaient aucune parenté phylogénétique avec les Mimiviridae. D'abord nommés, *en interne*, « nouvelle forme de vie », en raison de leurs dimensions (plus d'un micron de long), de leur morphologie (une sorte d'amphore), et de leurs propriétés (multiplication sans division apparente), ces deux nouveaux virus [5] ont été publiés sous les noms de *Pandoravirus salinus* (isolé des côtes chiliennes) et *Pandoravirus dulcis* (isolé d'un étang au beau milieu de l'université La Trobe, près de Melbourne). Ils représentaient les premiers exemplaires de la famille des Pandoraviridae qui se peuple maintenant de nombreux nouveaux membres (en cours de caractérisation). En microscopie électronique, leurs virions révèlent une même ultrastructure complexe : un compartiment interne bordé par une membrane elle-même entourée par un tégument épais de 70 nm constitué de trois couches : 20 nm d'une couche interne peu dense aux électrons, 25 nm d'un maillage de fibrilles parallèles à la surface dense aux électrons, et 25 nm d'une couche de matériaux de densité intermédiaire. Un pore apical est visible à une extrémité de chaque particule dont l'ouverture permet d'en délivrer le contenu dans le cytoplasme de l'hôte, à travers un canal formé par la fusion de la membrane interne du

³ Même si les Mimiviridae n'ont plus l'exclusivité du gigantisme viral, ils restent néanmoins une famille de virus aux propriétés très particulières avec leur propre virus [2] et une façon unique d'y résister [46, 47].

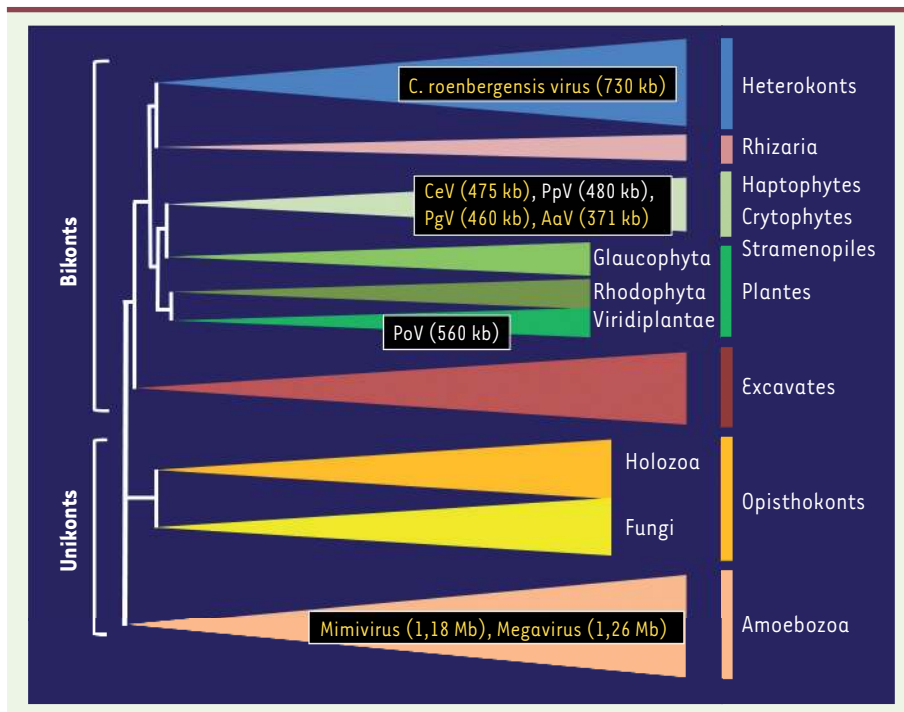


Figure 2. Diversité des hôtes eucaryotes connus pour être infectés par des Mimiviridae. Les noms des virus dont les génomes sont entièrement séquencés sont écrits en jaune, les génomes partiels en blanc. Mb : mégabase ; kb : kilobase (d'après [17]).

du contenu de la particule dans le cytoplasme lors de l'initiation de l'infection.

La découverte des Pandoravirus, qui ne présentent pas de parenté avec les Mimiviridae, a immédiatement suggéré que la diversité des virus géants infectant le même hôte amibien pouvait être plus importante que ce qu'avait laissé supposer l'isolement répétitif des premiers Mimiviridae. La forme en amphore des particules de Pandoravirus suggérait également que les virus géants n'étaient pas limités à des morphologies icosaédriques, ouvrant la possibilité que d'autres familles virales associées à des virions sans symétrie particulière aient pu être confondues avec des bactéries parasites comme ce fut d'ailleurs le cas pour Pandoravirus [21]. L'échantillonnage pouvait donc reprendre de plus belle.

virion avec celle de la vacuole de l'amibe. En contraste avec les Mimiviridae, les Pandoravirions ne montrent pas de région centrale dense aux électrons correspondant habituellement au matériel génétique. Paradoxalement, la localisation et la structure physique de l'énorme génome caractérisant les Pandoravirus reste pour l'instant mystérieuse.

Notre choix du nom de « Pandoravirus », s'inspirait bien entendu de la mythologie grecque, selon laquelle la « boîte » (en fait une grande amphore appelée *Pithos*) reçue de Zeus par Pandore recelait un contenu mystérieux dont la révélation ne pouvait qu'avoir des conséquences désastreuses. Or, s'ils ne représentent aucun danger pour l'homme, puisqu'ils n'infectent que les amibes du genre *Acanthamoeba*, les Pandoravirus se sont révélés être dotés de propriétés s'avérant dévastatrices pour beaucoup des idées reçues concernant les virus. *Pandoravirus salinus* est, par exemple, doté d'un génome ADN de 2,8 millions de paires de bases ayant la capacité de coder plus de 2 500 protéines dont plus de 90 % n'ont aucune similarité de séquence avec des protéines (virales ou cellulaires) déjà répertoriées dans les bases de données. Paradoxalement, malgré un génome dont la taille est comparable à celle des plus petits microorganismes eucaryotes (les microsporidies) et trois fois plus grands que celui des mycoplasmes, les Pandoravirus sont tributaires du noyau de leur hôte pour leur réplication, contrairement aux Mimiviridae dont le cycle infectieux se déroule intégralement dans le cytoplasme. La synthèse des particules de Pandoravirus s'effectue par un mécanisme totalement original où le tégument complexe qui délimite les virions semble être synthétisé en même temps que leur contenu (comme si on fabriquait une bouteille en même temps qu'on la remplissait !). La synthèse de ces virions en forme d'amphore est initiée à partir de l'extrémité (l'apex) dont l'ouverture sert au déversement

de leur contenu dans le cytoplasme lors de l'initiation de l'infection.

Pithovirus : un virus géant qui a pu côtoyer Néandertal

En 2012, un article décrivant la régénération d'une plante (*Silene stenophylla*) à partir de fruits conservés dans une couche de *permafrost* (ou pergélisol) sibérien datée de 30 000 ans, a attiré notre attention [22]. Ce résultat spectaculaire provenait du laboratoire du Professeur Gilichinsky (malheureusement décédé peu après), un des pionniers de l'étude de la microbiologie des sols arctiques qui a consacré beaucoup d'efforts à démontrer que des organismes unicellulaires (bactéries, archaebactéries, protozoaires) pouvaient persister et survivre durant de très longues périodes dans les sols gelés [23]. En raison de l'absence de lumière et d'oxygène, de son pH neutre, de son environnement réducteur, le pergélisol du nord-est de la Sibérie est, *a priori*, un des plus appropriés à la survie des microorganismes. Nous avons donc initié une collaboration avec ce laboratoire pour explorer la possibilité que des virus infectant *Acanthamoeba* (présent dans le pergélisol) puissent également avoir survécu dans des strates de pergélisol d'ancienneté croissante, en commençant par celle datée de 30 000 ans.

Les coraux sont-ils la cible de virus géants ?

Les coraux (phylum des Cnidaires) sont parmi les animaux les plus ancestraux que nous connaissons, l'aboutissement d'une lignée qui s'est séparée du reste des métazoaires (les bilatériens) il y a plus de 700 millions d'années. Les coraux se répartissent en deux classes, les octocoraux et les hexacoraux, qui semblent s'être séparées avant le tout début du Cambrien (540 millions d'années). Parmi tous les animaux, les espèces de la sous-classe des octocoralliaires (par exemple les Gorgones) sont les seules à posséder des mitochondries dont le génome code une enzyme de réparation de l'ADN caractéristique (appelée *Msh1* [*mutS* homologue 1]). Toutes les espèces octocoralliaires possèdent ce gène qui est par contre systématiquement absent de toutes les espèces de la sous-classe des hexacoralliaires. L'événement qui a mené à l'acquisition de ce gène est donc postérieur à la divergence de ces deux lignées, mais antérieur à la radiation des octocoralliaires. Avant la découverte du Mimivirus, le plus proche voisin du gène *Msh1* était son homologue bactérien (*mutS*), plus précisément dans sa version trouvée chez les protéobactéries de la division *epsilon*. L'interprétation standard de cette bizarrerie était donc celle d'un transfert latéral du gène *mutS* d'une bactérie vers l'ancêtre de la mitochondrie de tous les octocoralliaires.

L'analyse des génomes des virus de la famille des Mimiviridae est venue compliquer ce scénario. En effet, une des caractéristiques uniques de tous les membres de cette famille (y compris de ceux beaucoup plus petits qui n'infectent pas *Acanthamoeba*, mais diverses espèces de planctons marins unicellulaires) est de posséder eux aussi un homologue du gène *mutS*. Parmi tous les virus connus, les Mimiviridae sont les seuls à coder une telle enzyme. Cerise sur le gâteau, le gène *mutS* des Mimiviridae a clairement comme plus proche voisin la version caractéristique des mitochondries octocoralliaires ! Une simple analyse phylogénétique (Figure 4) suggère maintenant le scénario suivant : l'ancêtre de tous les Mimiviridae a d'abord acquis la version virale de *mutS* par transfert latéral du gène à partir d'une protéobactérie *epsilon*, puis ce gène a été transféré d'un Mimiviridae à la mitochondrie de l'ancêtre des octocoralliaires. Ce scénario a plusieurs implications importantes. La première est de confirmer qu'un ancêtre des Mimiviridae (dont le spectre d'hôte était peut-être plus large qu'aujourd'hui) existait déjà au moment de l'émergence des premiers animaux, il a donc 700 millions d'années. L'arbre phylogénétique suggère également que le transfert du gène *mutS* viral aux octocoralliaires ait été contemporain de la séparation entre la lignée des Mimiviridae « géants » (infectant *Acanthamoeba*) et celle de « petits » Mimiviridae (infectant des algues unicellulaires). Cette divergence daterait donc du début du cambrien (540 millions d'années). Enfin, ce transfert latéral suggère que des virus de la famille des Mimiviridae aient pu infecter des octocoralliaires ancestraux et échanger des gènes avec les mitochondries au cours de leur réplication intracytoplasmique. Si tel est le cas, où sont donc passés ces virus géants aujourd'hui ? Il va sans dire que nous en cherchons activement la trace dans les données métagénomiques produites en grande quantité par les chercheurs préoccupés par la santé déclinante des récifs coralliens. Sans résultat pour l'instant.

Notre protocole habituel de co-culture de quelques grammes d'échantillons de pergélisol avec *Acanthamoeba castellanii* a rapidement révélé une mortalité des cellules accompagnée de la multiplication de particules d'une forme comparable à celle des virions de Pandoravirus, quoique légèrement plus allongées (1,5 µm contre 1 µm). Cependant, une analyse de coupes fines en microscopie électronique a montré que ces particules avaient une ultrastructure différente. Elles apparaissent constituées d'une enveloppe épaisse de 60 nm composée de bandes parallèles mais perpendiculaires à la surface. Cette enveloppe entoure une membrane lipidique qui délimite un compartiment interne dont la seule structure discernable est une petite sphère d'environ 50 nm de diamètre très dense aux électrons (parfois également visible dans les Pandoravirus). Chaque virion possède une ouverture à l'une de ses extrémités mais qui apparaît scellée par un « bouchon » (de 160 nm de diamètre et 80 nm d'épaisseur) constitué d'une grille de symétrie hexagonale.

Associée à l'absence de réplication par division, la détermination de la séquence complète du génome et de son contenu en gènes nous a permis de conclure à la nature véritablement virale de ce microorganisme préhistorique que nous avons baptisé *Pithovirus sibericum* en référence à sa forme en amphore et à son origine [6]. Son génome d'ADN double brin est circulaire (ou circulairement permuté), riche en AT (64 %) comme celui des Mimiviridae, mais ne compte que 610 033 paires de bases, une taille bien modeste comparée à celle de la particule (la plus volumineuse connue à ce jour). Paradoxalement, bien que ne codant que 467 protéines, *Pithovirus* semble disposer de la totalité des fonctions

nécessaires à sa réplication sans faire appel au noyau de son hôte, au contraire des Pandoravirus. Néanmoins, comme attendu d'un virus, le génome de *Pithovirus* ne révèle aucune trace d'une machinerie de traduction (ribosome, ARNt [ARN de transfert] ligases, ARN ribosomiaux). *Pithovirus sibericum* inaugure donc une nouvelle famille de virus géant (les « Pithoviridae ») à la réplication intégralement cytoplasmique, mais sans la moindre parenté phylogénétique avec les Mimiviridae. Comme il est habituel pour tous les virus géants inaugurant une nouvelle famille, plus de deux tiers de ses protéines n'ont aucune similarité significative dans les bases de données [24]. Récemment, nos collègues marseillais ont décrit un cousin moderne de *Pithovirus sibericum* qu'ils ont baptisé *Pithovirus massiliensis* (leurs génomes sont identiques à 84 % en moyenne) [25]. La nouvelle famille des Pithoviridae est donc appelée à s'enrichir de nouveaux membres dans les années qui viennent.

Mollivirus sibericum : un virus géant peut en cacher un autre

Les premières phases de co-culture de l'échantillon duquel nous avons isolé *Pithovirus sibericum*, semblaient indiquer l'amplification progressive non pas

d'un seul, mais de deux types de particules distinctes. Une fois réalisée la caractérisation de Pithovirus, des dilutions sériées de cette co-culture nous ont permis d'isoler un autre microorganisme mystérieux, d'une forme approximativement sphérique et d'un diamètre de 500 à 600 nm. En l'absence d'image de division binaire, la présence d'un deuxième virus géant a donc été suspectée puis validée par des observations en microscopie électronique et par le séquençage de l'ADN extrait de ces particules purifiées [7].

Examinées en coupes minces, ces particules apparaissent entourées par deux à quatre anneaux espacés de 25 nm correspondant à des fibres de différentes longueurs. Ces fibres sont ancrées dans un tégument constitué d'au moins deux couches de différentes densités et structures. La couche externe (épaisse de 10 nm) semble être formée de bandes tangentes à la surface de la particule et espacées de 30 à 40 nm. La couche interne (épaisse de 12 à 14 nm) est constituée d'un maillage de fibrilles qui ressemble à la couche centrale du tégument observé chez les Pandoravirus.

Le séquençage de l'ADN extrait des particules a révélé un génome linéaire de 651 523 paires de bases, riche en GC (60 %), codant 523 protéines dont aucune ne suggère la présence d'une machinerie de traduction. Il s'agit donc d'un virus géant que nous avons baptisé *Mollivirus sibericum* en référence à son origine, et aux formes « molles » que ces particules semblent adopter lors de leur passage dans les phagosomes au cours de la phase précoce d'infection des cellules d'*Acanthamoeba*. Si, comme à chaque comparaison d'un virus inaugurant une nouvelle famille, près des deux tiers des protéines prédites (et validées par l'analyse du transcriptome) ne ressemblent à rien de connu, *Mollivirus sibericum* montre une parenté phylogénétique partielle avec les Pandoravirus avec lesquels il partage 83 protéines homologues [7].

L'analyse en microscopie du cycle infectieux de *Mollivirus sibericum* dans *Acanthamoeba castellanii* met en évidence une déformation et une désorganisation du noyau de l'hôte qui sont suivies d'une synthèse de nouvelles particules à sa périphérie. La pénétration de l'ADN viral dans le noyau de l'amibe a pu être directement visualisée (grâce à un marquage avec de la 5-éthynyl-2'-déoxyuridine). *Mollivirus sibericum* est donc un virus dont la phase précoce de répllication est clairement nucléaire. Contrairement aux autres familles de virus géants que nous avons décrites, les nouvelles particules produites ne sont pas libérées simultanément par la lyse des cellules infectées, mais par un processus qui préserve plus longtemps l'intégrité de la cellule hôte et au cours duquel la plupart des particules sont libérées par exocytose [7].

Énigmes, controverses et perspectives

Si la découverte des virus géants a brutalement et spectaculairement élargi le champ de la virologie, elle a aussi ressuscité des interrogations biologiques beaucoup plus fondamentales en ce qui concerne le statut même des virus : sur le fait qu'ils soient vivants ou non, sur leur origine, leur mode d'évolution, et leur relation avec le monde cellulaire [3, 26-28]. Dans cette dernière partie, nous décrivons brièvement les questions les plus ouvertes qui sont aujourd'hui sujettes à débat.

Combien de nouvelles familles encore à découvrir, quelle diversité ?

Treize ans à peine après la découverte de Mimivirus, nous connaissons maintenant quatre familles distinctes de virus géants clairement identifiées, dont trois ont été décrites ces trois dernières années [24]. Une telle progression suggère que nous avons à peine défloré ce nouveau territoire, celui des virus infectant des protozoaires dont la diversité est, elle-même, très mal connue [29]. Si quatre familles de virus géants (la cinquième étant celle des *Marseilleviridae*) ont pu être découvertes en n'utilisant comme appâts que les seules amibes du genre *Acanthamoeba*, que pourrions-nous découvrir en changeant d'hôte ? Un simple changement de classe au sein des Amoebozoa a déjà permis la découverte d'un lointain cousin des *Asfarviridae* infectant *Vermamoeba vermiformis* [9] (Tableau I).

La découverte de virus géants très différents, associés à des particules oblongues ou sphériques, permet aussi d'imaginer que leur diversité, sans doute aussi importante que celle des virus à capsides icosaédriques au plan phylogénétique et génomique, pourrait se cacher dans ces nouveaux types de véhicules. La plupart d'entre eux ont pu être jusqu'à présent confondus avec des petites bactéries non cultivables. Notre protocole de détection a également mis de côté la possibilité de l'existence de virus (géants ou non) spécifiques d'amibe dont l'infection ne serait pas, ou marginalement, lytique.

D'où viennent les virus géants ?

En l'absence de fossiles, la phylogénie moléculaire (*i.e.* la construction d'arbres à partir des séquences de protéines ou de leurs structures [30]) est le seul outil de la biologie moderne pour tenter de remonter le temps. Cette limitation est encore plus problématique pour des virus dont l'évolution serait, ou non, corrélée à celle de l'hôte qu'ils infectent : soit les virus accompagnent l'histoire de leur hôte, soit ils en changent ! Il est nécessaire, de plus, de disposer de nombreuses « espèces » de virus d'une même famille, mais infectant un éventail d'hôtes différents, pour éventuellement reconstituer leur histoire. À l'heure actuelle, seule la famille des *Mimiviridae* est assez diverse et nombreuse pour satisfaire ces critères. Finalement, cette reconstitution ne pourra être réalisée que sur la base des quelques gènes qui sont communs à ces virus et au reste de l'arbre du vivant (comme l'ADN polymérase). Le résultat est alors sans appel. Il est en accord avec la diversité des hôtes actuels : l'ancêtre des *Mimiviridae* était contemporain de l'origine même des eucaryotes. Quand on étend ce type d'analyse aux autres familles de virus géants (*Pitho-*

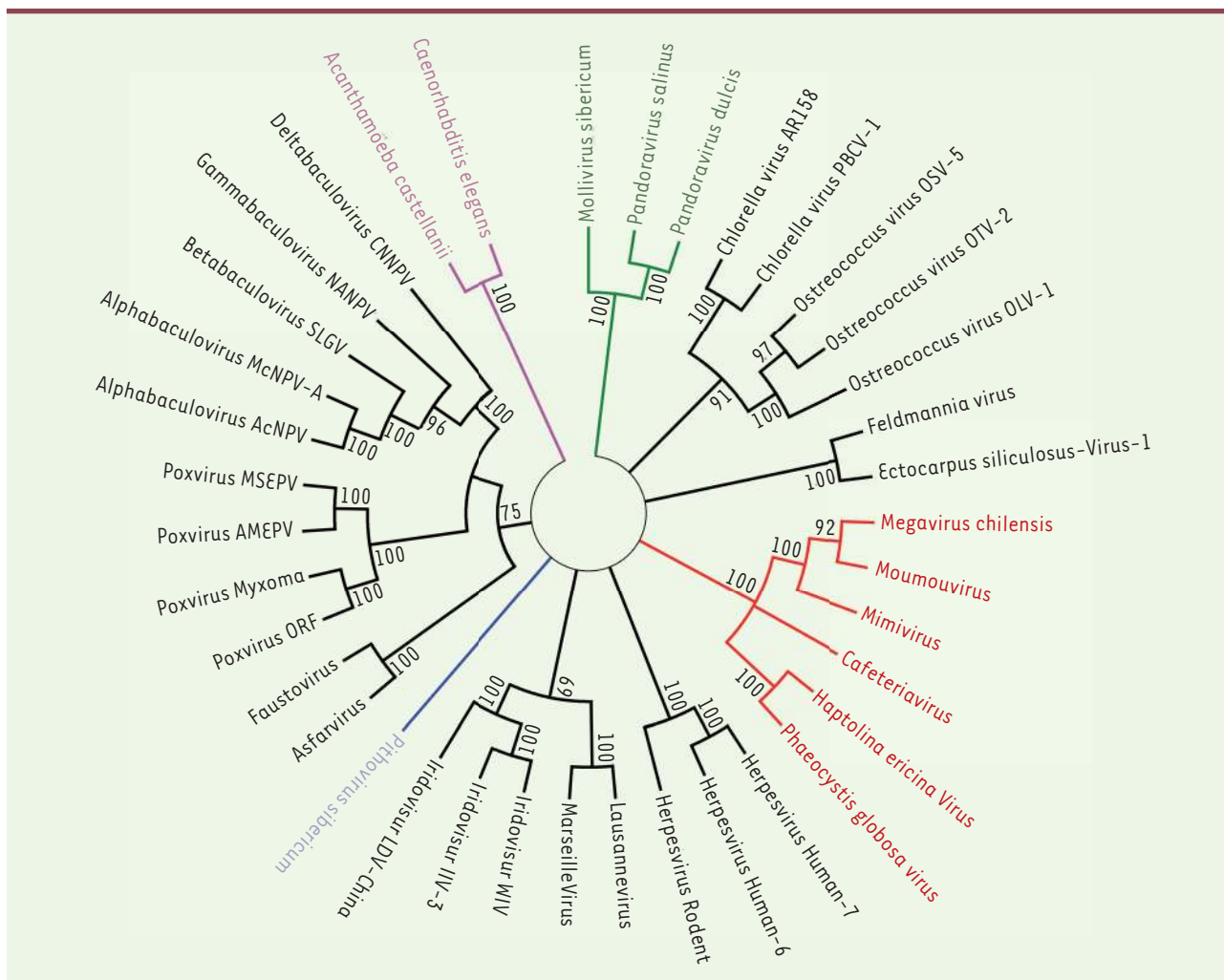


Figure 3. Classification des grandes familles de virus à ADN. Phylogénie moléculaire (*neighbor-joining*) basée sur un alignement multiple des ADN polymérases. Chaque famille de virus géants semble émerger d'une lignée très ancienne, contemporaine ou précédant la radiation du règne eucaryote (en mauve) (d'après [24]).

virus, Pandoravirus, Mollivirus), autant de branches différentes, dont l'origine se situe en amont de la radiation des Mimiviridae, sont générées (Figure 3). Tous les virus géants d'amibes ont donc une origine qui semble précéder celle des premières cellules à noyau... Mais quelle était la nature de cet ancêtre ?

Deux scénarios évolutifs totalement opposés

Au-delà d'une vingtaine de gènes qu'ils peuvent avoir en commun, les virus géants possèdent des centaines de gènes codant des protéines sans la moindre similarité avec le monde cellulaire (bactéries, archaeobactéries, eucaryotes) ni même avec les autres virus. Pour chaque premier virus inaugurant une nouvelle famille, plus de deux tiers de ses protéines (et jusqu'à 90 % pour les Pandoravirus) sont « orphelines » [24]. Une telle situation ne plaide ni pour une origine commune (si ce n'est pour les quelques gènes qu'ils ont en commun), ni pour une origine cellulaire (procaryote ou eucaryote). À ce niveau,

deux conceptions totalement opposées s'affrontent : soit les génomes des virus géants ont pour origine une poignée de gènes qui se sont amplifiés jusqu'à atteindre la taille qu'ils ont aujourd'hui [31], soit ils sont l'aboutissement d'une réduction progressive de leur taille qui a fait passer ces microorganismes du statut d'indépendants à celui de parasites intracellulaires obligatoires, notamment en raison de leur incapacité de traduire leurs propres protéines [3, 17, 24]. Ces deux hypothèses souffrent de difficultés majeures.

- Le scénario inflationniste a comme premier problème de postuler une pression évolutive qui est contraire à celle documentée pour tous les parasites, en particulier les parasites intracellulaires : le parasitisme s'accompagne inévitablement de la perte irréversible de gènes et de fonctions qui conduit le parasite dans une voie

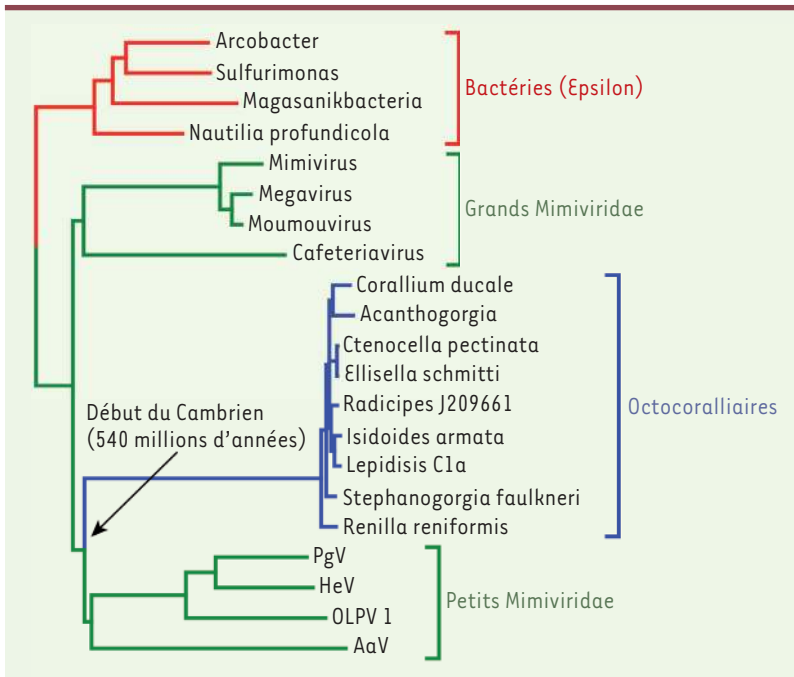


Figure 4. Phylogénie et scénario d'acquisition du gène *mutS* par les Mimiviridae et son transfert aux octocoralliaires. Arbre calculé sur 752 sites selon l'algorithme *neighbor-joining* (modèle WAG, Whelan and Goldman).

de dépendance croissante envers son hôte. Le second problème est l'origine mystérieuse (cellulaire ou virale) des gènes « acquis » par ces virus. Selon toute vraisemblance, les génomes viraux devraient garder une trace phylogénétique de leurs origines, or ce n'est pas le cas puisqu'ils ne ressemblent très majoritairement à aucun gène connu.

• Le scénario réductionniste, que nous préférons, reste en parfait accord avec la tendance universelle chez des parasites à perdre des gènes. Mais l'absence de similarité des gènes viraux avec ceux du monde cellulaire actuel, comme celle entre les différentes familles virales, reste à comprendre. Nous avons proposé que les différentes familles de virus géants soient issues de différentes lignées proto-cellulaires qui ont pu coexister en compétition avec celle qui a finalement conduit à l'ancêtre commun des cellules actuelles (LUCA : *last universal cellular ancestor*). Ces lignées « perdantes » de la compétition évolutive n'auraient alors trouvé comme moyen de survie que de devenir des parasites de celle, « gagnante », à l'origine de la totalité du monde cellulaire d'aujourd'hui. Selon ce scénario, les virus géants seraient de véritables fossiles « vivants » de lignées proto-cellulaires avortées. L'étude détaillée de leur physiologie pourrait donc nous renseigner sur l'origine même de la vie. La découverte récente de fossiles suggérant l'existence d'organismes multicellulaires dès le premier pic d'oxygénation de l'atmosphère terrestre il y a 2,6 milliards d'années [32, 33] montre à quel point l'ampleur des extinctions d'organismes pourrait avoir été sous-estimée dans le scénario de l'évolution considéré actuellement comme standard.

Les virus géants sont-ils pathogènes ?

Dans un article pour *médecine/sciences*, nous ne pouvions pas ignorer la question, elle aussi controversée, de l'association éventuelle de Mimivirus avec des pathologies humaines. Rappelons que Mimivirus a été isolé dans le contexte d'une épidémie de légionellose [1]. Depuis, la plupart des études impliquant des cohortes de tailles importantes

n'ont pas réussi à démontrer une association convaincante de Mimivirus avec des pathologies respiratoires [34, 35]. La dernière en date, réalisée sur plus de 6 000 patients chinois, n'a pu montrer la présence de Mimivirus que dans un seul cas, qualifié de litigieux [36]. D'autres enquêtes, plus restreintes, ont conclu à des associations éventuelles [37, 38] mais douteuses si elles reposent sur des tests sérologiques [39] qui sont jugés peu fiables par leurs auteurs eux-mêmes [40]. Enfin, de la même façon que l'homme n'est pas la cible des nombreux bactériophages associés à son microbiote, la détection de Mimivirus (ou d'anticorps

qui lui sont spécifiques) chez un patient peut n'être due qu'à la présence d'amibes dans son organisme qui, elles, sont infectées. Une fois phagocytés par des macrophages non permissifs à leur réplification, les virus géants seront dégradés et leurs antigènes présentés au système immunitaire. Cela engendra éventuellement des anticorps sans qu'une infection n'en soit véritablement l'origine. Il est néanmoins envisageable qu'une telle sollicitation du système immunitaire en l'absence d'une véritable infection puisse produire des effets délétères découlant, notamment, d'une rupture de tolérance vis-à-vis de certains autoantigènes. Un tel processus a pu être montré expérimentalement chez la souris pour laquelle l'injection d'une protéine issue de Mimivirus, homologue du collagène, a conduit à la production d'anticorps dirigés contre le collagène de l'hôte, induisant ainsi des symptômes similaires à ceux observés dans l'arthrite rhumatoïde [41]. L'induction d'une pathologie consécutive à la phagocytose d'un virus géant non répliquatif par des cellules présentatrices d'antigènes reste donc envisageable. Un tel scénario pourrait s'appliquer à l'association incongrue d'un grand virus d'algue à la diminution de certaines facultés cognitives comme cela a été montré chez l'homme et la souris [42].

Le dégel du pergélisol s'accompagne-t-il d'un risque infectieux majeur ?

À ce jour, nous avons isolé et identifié les deux derniers virus géants, *Pithovirus sibericum* et *Mollivirus sibericum*, à partir d'un même échantillon de sol sibérien resté gelé depuis environ 30 000 ans [6, 7]. Nous avons

ainsi montré que des virus d'amibe pouvaient conserver leur pouvoir infectieux pendant des milliers d'années, pourvu qu'ils soient préservés dans des conditions idéales de froid, de pH neutre, d'obscurité et d'absence d'oxygène. Il est donc concevable que cette capacité de survie puisse être étendue à d'autres virus et non pas limitée aux seuls virus infectant les amibes. Cette possibilité ouvre de nouvelles perspectives sur l'éventualité que ce même pergélisol puisse contenir des particules virales infectieuses pour les plantes, les animaux, ou qui auraient pu, auparavant, infecter les populations d'hominiens préhistoriques (*Homo sapiens*, Néandertaliens, Denisoviens) dont la présence en Sibérie et dans la région du détroit de Béring pendant des millénaires est amplement documentée [43-45]. Cette éventualité est actuellement explorée, le plus prudemment possible, par une approche métagénomique : l'ADN extrait de ces échantillons est séquencé à la recherche de l'empreinte génétique de virus (ou autres pathogènes) connus. En attendant les résultats futurs de ces travaux, un principe élémentaire de précaution devrait, d'ores et déjà, nous inciter à reconsidérer la notion à l'échelle planétaire « d'éradication » virale comme étant toute relative. Si le pergélisol profond (jusqu'à 1 000 m dans ces régions) n'est pas menacé d'une fonte immédiate, il est clair que son déblaiement soudain à l'air libre dans le cadre des exploitations minières à grande échelle (devenu possible par la libération des glaces arctiques) n'est *a priori* pas sans danger pour les travailleurs qui y seront directement exposés. On ne peut donc que conseiller à ces futures exploitations de s'adjoindre les compétences médicales nécessaires au diagnostic d'infections rappelant les grandes épidémies passées et d'une capacité d'isolement de patients éventuellement infectés par des virus hérités de nos cousins néandertaliens. ♦

SUMMARY

Giant viruses: update, enigmas, controversies and perspectives

Unlike microbes known in his time, the first virus (that of tobacco mosaic disease) was discovered by Ivanoski in 1892 because it was not retained by Chamberland's porcelain candles. For more than a century afterward, viruses were equated with this simple property that is still extensively used today (using modern 0,2 µm pore filters) as a practical criterion to delineate the "viral fraction" from other microbes in medical or environmental samples. The first documented exception to the simplistic criterion of particle size came with the discovery of Mimivirus, the viral nature of which was eventually recognized in 2003, following ten years during which it was mistaken for an obligate intracellular bacterium. Thirteen more years later, we now realize that non-filtering "giant viruses" are not rare, probably ubiquitous, and come in a large variety of virion shapes, genome sizes, gene contents, and replication strategies. Following a quick description of the 4 giant virus families known today, we discuss the enigmas, controversies and perspectives of conceptual revolutions that are brought about by this new and booming area of virology. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

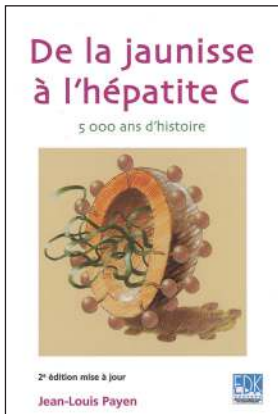
RÉFÉRENCES

1. La Scola B, Audic S, Robert C, et al. A giant virus in amoebae. *Science* 2003 ; 299 : 2033.
2. Claverie JM, Abergel C. Mimivirus and its viroplasm. *Annu Rev Genet* 2009 ; 43 : 49-66.
3. Claverie JM, Abergel C. Giant viruses : The difficult breaking of multiple epistemological barriers. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* 2016 ; 59 : 89-99.
4. Raoult D, Audic S, Robert C, et al. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* 2004 ; 306 : 1344-50.
5. Philippe N, Legendre M, Doutre G, et al. Pandoraviruses : amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science* 2013 ; 341 : 281-6.
6. Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 4274-9.
7. Legendre M, Lartigues A, Bertaux L, et al. In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-y-old giant virus infecting Acanthamoeba. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : E5327-35.
8. Boyer M, Yutin N, Pagnier I, et al. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009 ; 106 : 21848-53.
9. Reteno DG, Benamar S, Khalil JB, et al. Faustovirus, an asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J Virol* 2015 ; 89 : 6585-94.
10. Ghedin E, Claverie JM. Mimivirus relatives in the Sargasso sea. *Virology* 2005 ; 2 : 62.
11. Arslan D, Legendre M, Seltzer V, et al. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of Megaviridae. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 ; 108 : 17486-91.
12. Monier A, Claverie JM, Ogata H. Taxonomic distribution of large DNA viruses in the sea. *Genome Biol* 2008 ; 9 : R106.
13. Fischer MG, Allen MJ, Wilson WH, Suttle CA. Giant virus with a remarkable complement of genes infects marine zooplankton. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010 ; 107 : 19508-13.
14. Santini S, Jeudy S, Bartoli J, et al. Genome of *Phaeocystis globosa* virus Pgv-16T highlights the common ancestry of the largest known DNA viruses infecting eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 10800-5.
15. Gallot-Lavallée L, Pagarete A, Legendre M, et al. The 474-Kilobase-Base Complete genome sequence of CeV-01B, a virus infecting *Haptolina* (*Chrysochromulina*) *ericina* (*Prymnesiophyceae*). *Genome Announc* 2015 ; 3 : Pii e01413-15.
16. Moniruzzaman M, LeCleir GR, Brown CM, et al. Genome of brown tide virus (AaV), the little giant of the Megaviridae, elucidates NCLDV genome expansion and host-virus coevolution. *Virology* 2014 ; 466-7 : 60-70.
17. Claverie JM, Abergel C. Open questions about giant viruses. *Adv Virus Res* 2013 ; 85 : 25-56.
18. Koonin EV, Yutin N. Origin and evolution of eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses. *Intervirology* 2010 ; 53 : 284-92.
19. Maumus F, Epert A, Nogué F, Blanc G. Plant genomes encode footprints of past infections by giant virus relatives. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 4268.
20. Ogata H, Ray J, Toyoda K, et al. Two new subfamilies of DNA mismatch repair proteins (MutS) specifically abundant in the marine environment. *ISME J* 2011 ; 5 : 1143-51.
21. Claverie JM, Abergel C. From extraordinary endocytobionts to pandoraviruses. *Comment on Scheid et al.* Some secrets are revealed : parasitic keratitis amoebae as vectors of the scarcely described pandoraviruses to humans. *Parasitol Res* 2015 ; 114 : 1625-7.
22. Yashina S, Gubin S, Maksimovich S, et al. Regeneration of whole fertile plants from 30,000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 4008-13.
23. Rivkina E, Laurinavichius K, McGrath J, et al. Microbial life in permafrost. *Adv Space Res* 2004 ; 33 : 1215-21.
24. Abergel C, Legendre M, Claverie JM. The rapidly expanding universe of giant viruses : Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiol Rev* 2015 ; 39 : 779-96.
25. Levasseur A, Andreani J, Delcer J, Bou Khalil J, Robert C, La Scola B, Raoult D. Comparison of a modern and fossil Pithovirus reveals its genetic conservation and evolution. *Genome Biol Evol* 2016 ; 8 : 2333-9.
26. Claverie JM, Abergel C. Les virus sont-ils vraiment des virus ? *Virologie* 2013 ; 17 : 217-28.
27. La rédaction. Éditorial. *Virologie* 2013 ; 17 : 217.
28. Abergel C, Claverie JM. Diversité des virus géants. *Virologie* 2016 ; 20 : 61-3.

RÉFÉRENCES

29. Forster D, Dunthorn M, Mahé F, et al. Benthic protists : the under-charted majority. *FEMS Microbiol Ecol* 2016 ; 92 : pii : fiw120. doi : 10.1093/femsec/fiw120.
30. Nasir A, Caetano-Anollés G. A phylogenomic data-driven exploration of viral origins and evolution. *Sci Adv* 2015 ; 1 : e1500527.
31. Yutin N, Wolf YI, Koonin EV. Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology* 2014 ; 466-7 : 38-52.
32. El Albani A, Bengtson S, Canfield DE, et al. Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature* 2010 ; 466 : 100-4.
33. El Albani A, Bengtson S, Canfield DE, et al. The 2.1 Ga old Francevillian biota : biogenicity, taphonomy and biodiversity. *PLoS One* 2014 ; 9 : e99438.
34. Larcher C, Jeller V, Fischer H, Huemer HP. Prevalence of respiratory viruses, including newly identified viruses, in hospitalised children in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006 ; 25 : 681-6.
35. Dare RK, Chittaganpitch M, Erdman DD. Screening pneumonia patients for mimivirus. *Emerg Infect Dis* 2008 ; 14 : 465-7.
36. Zhang XA, Zhu T, Zhang PH, et al. Lack of mimivirus in a large cohort of patients with respiratory disease, China. *Emerg Infect Dis* 2016 Nov. (sous presse).
37. La Scola B, Marrie TJ, Auffray JP, Raoult D. Mimivirus in pneumonia patients. *Emerg Infect Dis* 2005 ; 11 : 449-52.
38. Berger P, Papazian L, Drancourt M, et al. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2006 ; 12 : 248-55.
39. Vincent A, La Scola B, Forel JM, et al. Clinical significance of a positive serology for mimivirus in patients presenting a suspicion of ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2009 ; 37 : 111-8.
40. Pelletier N, Raoult D, La Scola B. Specific recognition of the major capsid protein of *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus by sera of patients infected by *Francisella tularensis*. *FEMS Microbiol Lett* 2009 ; 297 : 117-23.
41. Shah N, Hülsmeier AJ, Hochhold N, et al. Exposure to mimivirus collagen promotes arthritis. *J Virol* 2014 ; 88 : 838-45.
42. Yolken RH, Jones-Brando L, Dunigan DD, et al. Chlorovirus ATCV-1 is part of the human oropharyngeal virome and is associated with changes in cognitive functions in humans and mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014 ; 111 : 16106-11.
43. V Dryomov S, Nazhmidenova AM, Shalaurova SA, et al. Mitochondrial genome diversity at the Bering Strait area highlights prehistoric human migrations from Siberia to northern North America. *Eur J Hum Genet* 2015 ; 23 : 1399-404.
44. Tackney JC, Potter BA, Raff J, et al. Two contemporaneous mitogenomes from terminal Pleistocene burials in eastern Beringia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015 ; 112 : 13833-8.
45. Fu Q, Li H, Moorjani P, et al. Genome sequence of a 45,000-year-old modern human from western Siberia. *Nature* 2014 ; 514 : 445-9.
46. Bekliz M, Levasseur A, La Scola B, Raoult D. MIMIVIRE, un système de défense chez mimivirus qui illustre l'hypothèse de la Reine Rouge. *Med Sci (Paris)* 2016 ; 32 : 818-9.
47. Claverie JM, Abergel C. CRISPR-Cas-like system in giant viruses: why MIMIVIRE is not likely to be an adaptive immune system. *Virology* 2016 ; 511 : 193-6.

TIRÉS À PART
J.M. Claverie



ISBN : 978-2-8425-4136-1 128 pages

La jaunisse est un symptôme facilement identifiable ; il paraissait bien naturel que l'homme, confronté à une modification de la couleur de ses yeux et de sa peau ait de tous temps recherché les causes de cette transformation.

Il n'est donc pas surprenant que le premier traité de médecine, écrit 3 000 ans avant J.C. par un médecin sumérien, décrive déjà la jaunisse. À chaque époque de l'histoire de la médecine, les praticiens, influencés par les concepts médicaux de leur temps, attribuèrent une ou plusieurs explications particulières à ce symptôme. Ainsi, du démon *Ahhâzu* des Sumériens à la sophistication des biotechnologies qui permirent la découverte du virus de l'hépatite C, le lecteur cheminera sur une période de 5 000 ans au travers des différents continents.

Ici encore, l'histoire se révèle une formidable source de réflexion : le foie souvent impliqué dans l'apparition des jaunisses est-il le siège de l'âme ?

Les expérimentations humaines chez des volontaires ou chez des enfants handicapés mentaux étaient-elles justifiées pour permettre la découverte des virus des hépatites ?

Le formidable développement de la transfusion sanguine, des vaccinations, mais aussi de la toxicomanie explique-t-il les épidémies d'hépatites du XX^e siècle ?

Autant de questions qui sont abordées dans ce livre passionnant et accessible à tous.

BON DE COMMANDE

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **De la jaunisse à l'hépatite C, 5 000 ans d'histoire** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |