

**CRIBLAGE DE PERTE DE FONCTION À L'ÉCHELLE DU GÉNOME DE MIMIVIRUS****LOSS-OF-FUNCTION GENOME-WIDE SCREENING OF MIMIVIRUS**

*Etablissement* **Aix Marseille Université**

*École doctorale* **Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé**

*Spécialité* **Biologie-Santé - Spécialité Microbiologie**

*Unité de recherche* **IGS - Information Génomique et Structurale**

*Encadrement de la thèse* **Chantal ABERGEL**

**Financement** du 01-10-2024 au 30-09-2024

Concours pour un contrat doctoral

Concours de l'ED62

**Cotutelle FRANCE**

*Début de la thèse le* **1 octobre 2024**

*Date limite de candidature (à 23h59)* **1 juin 2024**

## Mots clés - Keywords

Virus géants, Manipulation Génétique, Génétique avancée, Gènes Orphelins, Mimivirus, Criblage à l'échelle du génome

Giant virus, Genetic manipulation, Forward genetics, ORFan genes, Mimivirus, Genome-wide screening

## Description de la problématique de recherche - Project description

Les virus géants (GV) possèdent des milliers de gènes codant pour des protéines. 70 % de ces gènes codent pour des protéines qui n'ont jamais été observées dans d'autres organismes et sont donc des gènes orphelins. Ces gènes sont un aboutissement évolutif leurs permettant de détourner les fonctions cellulaires et concurrencer d'autres agents pathogènes d'Acanthamoeba. En conséquence, leur utilisation possible en thérapeutique, bio-ingénierie ou pour réaliser des avancées méthodologiques est énorme. Au cours des deux dernières années, nous avons introduit une batterie d'outils pour la manipulation du génome des virus géants. Nous souhaitons maintenant utiliser ces outils pour générer une plateforme de knock-out à l'échelle du génome viral afin d'évaluer la fonction d'environ 1000 gènes codés par les mimivirus. Pour ce projet de doctorat, le candidat générera une plateforme pour réaliser le knock-out de chacun des gènes de mimivirus et utilisera les mutants produits pour étudier le phénotype global de chaque gène sur la « fitness » du virus et élucider la fonction de ces gènes au cours du cycle infectieux de mimivirus. En outre, nous utiliserons cette plateforme pour identifier les gènes associés à la compétition entre les organismes pathogènes par génétique directe. Les criblages génétiques avancés seront réalisés en présence de compétiteurs comme le pandoravirus (viral) ou Babella spp. (bactérie) ; ou d'agents infectieux comme le virophage sputnik, qui inhibe la réplication du mimivirus. Dans l'ensemble, le projet présenté ici vise à fournir des informations fonctionnelles étendues sur les gènes de mimivirus et à faciliter les approches futures visant à utiliser les gènes viraux à des fins biotechnologiques.

Giant viruses (GVs) encode thousands of protein-coding genes. 70% of such genes encode proteins unseen in any other organisms and thus, are ORFan genes. Such genes likely evolved to hijack cellular functions and outcompete other Acanthamoeba pathogens. Concordantly, their potential use for therapeutics, bioengineering, or methodological advances is tremendous. During the past two years, we have introduced a battery of tools for the manipulation of the genome of giant viruses. We now aim to utilize those tools to generate a genome-wide platform of knock-out viruses to assess the function of the approx. 1000 genes encoded by mimivirus. For this PhD project, the applicant will generate a platform of viruses containing a knockout for each gene of mimivirus and use them to address each gene's overall fitness-conferring phenotype and investigate gene function at different stages in the infectious cycle of mimivirus. In addition, we will use this platform to identify genes associated with competition between pathogenic organisms by forward genetics. Forward genetic screens will be performed in the presence of competitors like pandoravirus (viral) or Babella spp. (bacteria); or infectious agents like the sputnik virophage, which inhibits mimivirus replication. Overall, the project presented here aims to provide broad-based functional information on mimivirus genes and facilitate future approaches to utilize viral genes for biotechnological purposes.

## Thématique / Domaine / Contexte

Virus géants

Microbiologie - Biologie moléculaire

Découverts il y a une vingtaine d'années, les virus géants, dont la taille et la complexité génétique rivalisent avec celles observées dans le monde cellulaire [1,2] ont initié une nouvelle aire de recherche en virologie. De nombreux travaux de microbiologie environnementale ont par la suite démontré leur diversité et leur abondance au sein de nombreux écosystèmes dans lesquels ils semblent jouer un rôle majeur. Leur contenu génique pléthorique couvre de fait un large éventail de fonctions qui leur permet de prendre le contrôle de l'hôte cellulaire et de «reprogrammer» son activité métabolique. [3–6] La question de savoir pourquoi ces virus infectant en majorité des organismes unicellulaires eucaryotes ont tant de gènes quand d'autres virus se suffisent d'une poignée est la source de recherches actives et de débats brûlants dans la communauté scientifique [7–9].

Au cours des deux dernières années, L'IGS a développé une batterie d'outils pour la manipulation du génome des virus géants et par recombinaison sur mimivirus en introduisant systématiquement un gène de sélection en remplacement de chacun des gènes du génome viral. Nous souhaitons ici utiliser cet outil pour générer une librairie de knock-out de tous les gènes de mimivirus afin d'évaluer la fonction des quelque 1000 gènes codés par Mimivirus. Chaque mutant aura une étiquette ADN distinct permettant de les identifier (code-barre). La librairie de mutants devrait être finalisée grâce à une plateforme de criblage semi-automatique développée au LCB et sera le fruit d'une collaboration avec Dr. Jean-Raphaël Fantino.

L'objectif de ce projet de thèse sera d'établir ces virus recombinants qui seront ensuite utilisés pour étudier le phénotype global de chaque gène et leur capacité à conférer au virus une adaptation à son environnement. Cette librairie de mutants permettra d'étudier la fonction des gènes viraux à différentes étapes du cycle infectieux de mimivirus. En outre, nous utiliserons cette plateforme pour identifier les gènes associés à la compétition entre les organismes pathogènes par génétique directe. Les cribles génétiques seront réalisés en présence de compétiteurs comme pandoravirus (viral) ou Babella spp. (bactérie); ou d'agents infectieux comme le virophage sputnik, qui inhibe la réplication des mimivirus. Dans l'ensemble, le projet présenté ici vise à fournir des informations fonctionnelles à grande échelle sur les gènes des mimivirus et à faciliter les approches futures d'utilisation des gènes viraux à des fins biotechnologiques.

## Objectifs

Objective 1 : Generate a platform of recombinant viruses to perform genome-wide screening of loss-of-function studies in mimivirus.

In order to generate a platform of recombinant viruses for GWS, oligos were designed and synthesized in a pool containing homology arms to achieve homologous recombination in each gene in the genome of mimivirus. Two oligos were designed per gene in order to obtain duplicate data points during each experiment. From this point, the PhD candidate will construct the recombinant plasmids using a semi-automatic pipeline with a Tecan Freedom Evo robot available at the host institution department. Recombinant plasmids will be transfected independently and single knock out viruses will be obtained in 96 well plates. A proof of principle of the overall strategy of cloning has been set up by generating 8 individual knock out viruses utilizing this pipeline.

Objective 2 : GWS screening of loss-of-function in mimivirus

The platform generated during the objective 1 will be utilized to assess the function of each individual gene in two independent manners:

1) Perform a genome wide competition assay between recombinant viruses, providing an overall view of the importance of each gene for the infectious cycle of mimivirus. Input viral DNA will be collected and barcode regions (contained in the oligos previously designed) will be amplified by PCR. The relative abundance of barcodes measured by Next-Generation Sequencing will be compared between input DNA and the progeny viral DNA after 1-6 rounds of pooled viral infections. Differences in abundance of the barcodes will be associated with fitness differences related to the gene knocked out.

2) Light microscopy analysis of the individual recombinant viruses will provide more specific data on the phenotype associated with the knockout of each gene. These experiments will be performed in 96 well plates, pictures will be taken automatically and data will be analysed using a previously published automatic method to analyse GV's infection of *A. castellanii*. Migration, shape and size of amoeba cells will be analysed. Moreover, size of the amoeba nucleus and food/contractile vacuole will be also monitored. Timing of Viral Factory formation as well as their size will be specifically addressed. Hoechst will be also included in the growth media, allowing a rough estimation of DNA content.

Gene knockout associated with major phenotypic impairment during the GWS will be further analysed independently for detailed mechanistic characterization. Overall assays for phenotypic characterization have been set up in the laboratory including quantitative PCR (to analyze DNA replication), viral quantification (to assess burst size), electron microscopy imaging (to dissect intracellular infection and virion morphology), co-immunoprecipitations (to identify protein interacting partners) and immunofluorescence (to analyze protein localization). Complementation will be performed for a subset of recombinant viruses of particular interest.

Objectif 3 : Study the arsenal of mimivirus genes associated to the competition with other microorganisms.

Genome-wide competition assays will be repeated in presence of competing microorganisms for infection of *Acanthamoeba castellanii*.

Different organisms including the parasitic bacteria Babella (isolated by the IGS lab) the viruses pandoravirus (nuclear virus) or pithovirus (cytoplasmic virus) will be utilized for these experiments. In addition, competition will also be performed in the presence of a virophage (virus of giant viruses) which significantly affects the infectious cycle of mimivirus. Barcodes differentially enriched or lost during new conditions will be associated with functions related to the interaction between these organisms and thus, will be selected for further studies. Phenotypic dissection of these genes will be performed as described during objective 2.

## Méthode

- Culture et infection de cellules avec population globale de mutants
- Production de virions mutants: Strategy for genome wide screening. (a) Oligos contain 50bp of homology at each extremity of the gene to be knocked out (Homology recombination arms). 18bp at each end of the oligo will allow PCR amplification and cloning into the plasmid containing a selection cassette. A restriction enzyme site for linearization (shown with an arrowhead) and barcodes for each construct are also included. (b) Cloning will be performed by In-Fusion® Cloning. (c) Once bacteria are transformed, individual colonies will be grown in 96 well plates. This procedure will be performed automatically by a Tecan Freedom Evo robot available at the host institute department (d) Bacteria containing the plasmids will be screened in a pooled fashion by NGS using barcoded primers. Briefly, primers will be designed to amplify the entire oligo that contain 96 different barcodes on the forward primer (to identify each well) and 20-30 different barcodes in the reverse primer (to identify the plate). PCRs reactions will be prepared automatically using the Tecan Freedom Evo robot. Plasmids with correct sequences will be selected for amplification in bacteria. (e) Recombinant viruses will be generated independently using transfection

methods previously described<sup>10</sup> adapted to 96 well plates. Failure of generating a particular knockout will be a strong indicative of the essentiality of the targeted gene.

- qPCR au cours des cycles infectieux pour sélectionner un sous-set de mutants

Analyse des Cycles infectieux par microscopie optique, électronique et fluorescence.

Expériences de pull-down.

Expériences de compétition avec virus et bactéries parasites.

## Résultats attendus - Expected results

---

Le but de ce projet est d'identifier des voies métaboliques non essentielles fournissant au virus un avantage dans l'environnement

## Références bibliographiques

---

1. Raoult D, Audic S, Robert C, et al. The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus. *Science* 2004 ; 306 : 1344–1350.
2. Abergel C, Legendre M, Claverie J-M. The rapidly expanding universe of giant viruses: Mimivirus, Pandoravirus, Pithovirus and Mollivirus. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015 ; 39 : 779–796.
3. Moniruzzaman M, Gann ER, Wilhelm SW. Infection by a Giant Virus (AaV) Induces Widespread Physiological Reprogramming in *Aureococcus anophagefferens* CCMP1984 – A Harmful Bloom Algae. *Front. Microbiol.* 2018 ; 9 : 752.
4. Schulz F, Roux S, Paez-Espino D, et al. Giant virus diversity and host interactions through global metagenomics. *Nature* 2020 ; 578 : 432–436.
5. Jeudy S, Bertaux L, Alempic J-M, et al. Exploration of the propagation of transpovirons within Mimiviridae reveals a unique example of commensalism in the viral world. *ISME J* 2020 ; 14 : 727–739.
6. Stough JMA, Yutin N, Chaban YV, et al. Genome and Environmental Activity of a *Chrysochromulina parva* Virus and Its Virophages. *Front. Microbiol.* 2019 ; 10 : 703.
7. Krupovic M, Dolja VV, Koonin EV. Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019 ; 17 : 449–458.
8. Filée J. Route of NCLDV evolution: the genomic accordion. *Curr Opin Virol* 2013 ; 3 : 595–599.
9. Yutin N, Wolf YI, Koonin EV. Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. *Virology* 2014 ; 466–467 : 38–52.

## Précisions sur l'encadrement - Details on the thesis supervision

---

Dr. Hugo Bisio, Chercheur CDD, appliquant sur la CPJ CNRS Biologie des virus géants (BVG)

Hugo.Bisio@igs.cnrs-mrs.fr

## Conditions scientifiques matérielles et financières du projet de recherche

---

En complément de la bourse de thèse de l'école doctorale, une ERC advanced grant permettra de financer ce projet.

Les données de protéomique seront produites par une collaboration avec la plateforme de protéomique EDyP (Yohann Coute, Grenoble).

Le laboratoire dispose des équipements et des compétences nécessaires à la fois en biochimie en biologie structurale et en biologie cellulaire (incluant l'imagerie) et génétique.

## Ouverture Internationale

---

Oui

## Objectifs de valorisation des travaux de recherche du doctorant : diffusion, publication et confidentialité, droit à la propriété intellectuelle,...

---

Publication d'articles dans des revues internationales à comité de lecture.

Présentation des résultats obtenus dans des congrès nationaux et internationaux.

## Collaborations envisagées

---

LCB plateforme: Dr. Jean-Raphaël Fantino

## Complément sur le sujet

---

<https://www.igs.cnrs-mrs.fr/> (<https://www.igs.cnrs-mrs.fr/>)

## Profil et compétences recherchées - Profile and skills required

---

Le (la) candidat(e) devra avoir une expérience et des connaissances solides en biologie moléculaire et en biologie cellulaire et/ou virologie. Une expérience en biochimie des protéines (expression, purification et caractérisation de protéines recombinantes) serait un plus mais n'est pas requis.

The candidate should have experience and strong knowledge in molecular biology and cell biology and/or virology. Experience in protein biochemistry (expression, purification and characterization of recombinant proteins) would be a plus but is not required.

Dernière mise à jour le 6 mars 2024