

Risques sanitaires liés au réchauffement de l'Arctique : fantasmes et réalités



Jean-Michel Claverie est professeur émérite de l'université Aix-Marseille et ancien praticien hospitalier de l'APHM en santé publique. De 1995 à 2018, il a dirigé le laboratoire Information génomique et structurale (IGS), une UPR puis UMR du CNRS, et de 2009 à 2018 il a également dirigé l'Institut de microbiologie de la Méditerranée (FR3589). Après une carrière au CNRS commencée en 1975 comme stagiaire de recherche, il a en a reçu la médaille d'Argent en 2003 pour ses travaux en génomique microbienne et la découverte de Mimivirus, le premier virus géant.

Chantal Abergel est directrice de recherche et directrice du laboratoire IGS depuis 2018. Médaille d'Argent du CNRS et chevalier de la Légion d'honneur en 2014, officier de l'ordre national du Mérite en 2019, elle est spécialiste des virus géants. Avec Jean-Michel Claverie, elle poursuit l'exploration de ce nouveau domaine de la virologie qui recouvre désormais pas moins de cinq nouvelles familles virales distinctes. En 2014 et 2015, la découverte de virus restés infectieux après 30 000 ans de congélation dans le pergélisol sibérien a fait naître la crainte que le réchauffement climatique puisse causer la résurgence de pathogènes d'un lointain passé.

Résumé : Le réchauffement climatique est clairement associé à l'émergence de nouveaux risques sanitaires, l'augmentation des températures autorisant la migration vers les régions tempérées d'Europe de vecteurs de maladies infectieuses jusqu'ici confinées aux régions tropicales. Une autre menace pourrait également venir du Nord, où les nombreux microbes stockés depuis des milliers d'années dans les sols de l'Arctique sibérien seront remis en circulation à l'occasion de leur dégel de plus en plus profond, ou des multiples activités minières qui y sont projetées. Ce scénario de science-fiction a été promu au rang de possibilités après que nous ayons réussi à réactiver plusieurs virus isolés à partir de pergélisol datant de 30 000 ans. Nous racontons ici les circonstances de cette découverte, avant de discuter des précautions à prendre pour minimiser les risques de pandémies venues du froid.

MARSEILLE, PATRIE DES VIRUS « ZOMBIES » VENUS DU FROID

On imagine mal un laboratoire situé à Marseille, ville où il ne gèle quasiment jamais, se distinguer par ses recherches sur la microbiologie du pergélisol, jusqu'à devenir le point de départ d'un emballement médiatique international sur les risques sanitaires éventuellement liés au dégel des sols arctiques dû au réchauffement climatique, et en particulier des virus géants dits « Zombies ». La première partie de cet article consistera donc à décrire comment notre laboratoire s'est retrouvé mêlé à ce thème de recherche. Dans une deuxième partie nous présenterons les résultats obtenus, avant de terminer en essayant de faire la part des choses, c'est-à-dire démêler la part de l'emballement médiatique du risque réel associé à la libération des microbes congelés dans les sols arctiques depuis des dizaines de milliers d'années.

QU'EST-CE QUE LE PERGÉLISOL ?

Contrairement à la perception que peuvent en avoir les habitants des zones tempérées, les régions situées au nord du cercle polaire arctique ne sont pas des étendues glacées recouvertes de neige en permanence. Même si la moyenne annuelle des températures n'excède pas -10°C (en prenant l'exemple de la petite ville de Cherskyi, située au Nord du 68° parallèle, et sur laquelle nous reviendrons), la moyenne des températures s'installe au-dessus de zéro des mois de juin à septembre, une période suffisante pour permettre la croissance d'une végétation luxuriante (Fig. 1), et la prolifération d'insectes qui ne facilite pas la vie des rares humains qui s'y aventurent. De juin à août, les températures diurnes les plus élevées



Fig. 1 : Le site de Duwanny Yar ($68^{\circ}39' \text{ N}$, $159^{\circ}4' \text{ E}$) et sa végétation, fin août 2019, sur les rives du fleuve Kolyma. Source : IGS-CNRS.

peuvent atteindre 30 °C. Chaque été permet donc la constitution d'une couverture végétale importante, associée au réveil d'une faune diverse (arthropodes, vers) et d'un microbiome complexe (protozoaires, bactéries, archaebactéries, virus).

Au retour de chaque hiver, cette couche de matière vivante se recongèle en une sorte d'humus dont l'accumulation va former un empilement jusqu'à atteindre une profondeur à partir de laquelle la température ne repasse plus jamais au-dessus de 0 °C, même en été. Ce sol gelé en permanence constitue le « pergélisol » (ou « *permafrost* » en anglais). Contrairement à une confusion souvent entretenue par les médias populaires, le pergélisol n'est donc pas de la « glace », mais une sorte de tourbe gelée en permanence (Fig.2). L'épaisseur de pergélisol est délimitée, en surface par une couche dite « active » de moins d'un mètre (dont la température repasse au-dessus de zéro pendant l'été), et une profondeur maximale (qui peut atteindre jusqu'à 1 500 m en Sibérie nord-orientale) où la température repasse au-dessus de 0 °C, sous l'influence du gradient géothermique. Entre les deux, la température du pergélisol reste relativement constante (entre -15 °C et -5 °C).



Fig. 2 : A gauche, falaise de pergélisol (site de Duvanny Yar) attestée par la présence de « coins de glace » (zones brillantes) contemporains de la congélation du sol ; à droite, l'échantillonnage du pergélisol. Source : IGS-CNRS.

UNE LONGUE TRADITION DE TRAVAUX RUSSES, PEU CONNUS

L'exploration de la flore microbienne du pergélisol des régions arctiques est beaucoup plus ancienne que pourrait le faire croire l'engouement récent des médias, comme des vulgarisateurs scientifiques, pour ce sujet. C'est en lisant un article de revue rédigé par David Gilichinsky et son groupe de recherche (1) que nous avons

découvert que les premières mises en évidence de bactéries dans le cryosol arctique avaient été publiées dès 1911 (2), et plus spécifiquement dans le pergélisol dès 1912(3). Ces recherches, pour la plupart menées par des laboratoires russes, sont restées ignorées des chercheurs occidentaux pendant une bonne partie du vingtième siècle pour des raisons à la fois politiques (la guerre froide) et linguistiques, la plupart des chercheurs de l'ex-union soviétique publiant leurs travaux localement dans des journaux en langue russe non-distribués à l'étranger. Dès 1944, par exemple, on savait déjà que des bactéries sont capables de survivre à 1000 ans de congélation dans le pergélisol (4). David Gilichinsky a été un des premiers spécialistes de la microbiologie des cryosols sibériens à briser cet isolement en publiant en anglais dès 1992 (5). Malheureusement, ses résultats ont d'abord été présentés dans le contexte d'études destinées à établir la possibilité d'une vie microbienne extraterrestre (notamment martienne), et donc publiés dans des journaux sans visibilité auprès des microbiologistes traditionnels (comme « *Advances in Space Research* » ou « *Astrobiology* »). Du côté occidental, l'exploration de la microflore arctique (Manitoba, Yukon, Alaska) semble avoir débuté beaucoup plus tard qu'en Union Soviétique, les premières publications de quelques groupes américains consacrées au pergélisol datant, à notre connaissance, du début des années 60 (6).

En 1967, l'annonce de la résurrection d'un plant de Lupin arctique (*Lupinus arcticus*) à partir d'une graine congelée depuis plus de 10 000 ans allait grandement populariser les recherches sur le pergélisol et les formes de vie capable d'y survivre pendant des milliers, voire des millions d'années. Ironie de l'histoire, ce résultat a été invalidé depuis (7) ; mais il illustre parfaitement la difficulté majeure de toute recherche paléobiologique : se prémunir des contaminations du présent. Ainsi, si plusieurs groupes affirment qu'ils ont été capables de ressusciter certaines bactéries (comme *Exiguobacterium*) à partir de pergélisol datant de plus d'un million d'années, cet âge record reste mis en doute par d'autres. Une ou deux centaines de milliers d'années semble un consensus plus raisonnable de viabilité. Mais la grande majorité des études n'explorent pas au-delà de 50 000 ans AP (avant le présent), qui est la limite d'utilisation de la datation au radiocarbone. Pour fixer les idées, il semble que les Néandertaliens aient disparu d'Europe il y a 40 000 ans. Le dernier maximum glaciaire est lui daté de 21 000 ans. En terme géologique, le Pleistocène supérieur s'achève il y a 11 000 ans.

2012 : PREMIER CONTACT DE NOTRE LABORATOIRE AVEC LE PERGÉLISOL

C'est en mars 2012 que l'équipe de David Gilichinsky annonce qu'elle a été capable de régénérer une petite plante à fleur (*Silene stenophylla*) à partir d'un fruit conservé dans un terrier d'écureuil figé dans le pergélisol depuis environ 32 000 ans (8). Contrairement aux travaux précurseurs sur le Lupin arctique (7), cet âge record est, cette fois, confirmé par une datation au radiocarbone directement réalisée sur les restes de plante. Il est donc établi qu'un organisme multicellulaire eucaryote peut être « ressuscité » après plusieurs milliers d'années de congélation dans le pergélisol. Cette nouvelle tombe à pic, alors que nous avons déjà réorienté une partie de notre laboratoire vers la recherche tous azimuts de nouveaux virus géants infectant les amibes, notamment dans divers environnements aquatiques (des côtes chiliennes à des étangs australiens) d'où nous venions d'isoler les premiers membres de ce qui deviendra la nombreuse famille des *Pandoraviridae* (9). Enthousiasmés par le travail de Gilichinsky, nous pensons immédiatement : « s'ils sont capables de ressusciter une plante, pourquoi ne serions-nous pas capables de faire de même avec un virus » ? Aussitôt dit, aussitôt fait, un courriel de félicitation et de proposition de collaboration est adressé à David Gilichinsky ... il restera tragiquement sans réponse. Nous réaliserons un peu plus tard (par une note en bas de page de l'article), qu'il est brutalement décédé entre la date de l'acceptation du manuscrit et celle de sa publication (<http://davidinmemoriam.blogspot.com/>).

Après avoir redirigé notre courrier à un autre des auteurs, notre demande a rapidement abouti au lancement d'une collaboration avec le reste de l'équipe spécialisée dans l'étude du pergélisol constituée depuis des années par David Gilichinsky à Puschino, au sein de l'Institut des problèmes physico-chimiques et biologiques des sciences du sol. Ce premier projet de virologie environnementale du pergélisol l'aurait probablement enthousiasmé.

2014-2015 : NOS PREMIÈRES TENTATIVES D'ISOLEMENT DE VIRUS DE PERGÉLISOL ANCIEN

Accord de collaboration conclu, nous avons rapidement reçu une partie du même échantillon de pergélisol d'où provenait la plante ressuscitée. Nous avons immédiatement entrepris une analyse métagénomique (extraction de l'ADN total et séquençage massif) de ce matériel à l'apparence d'une tourbe fibreuse, et sa mise en culture sur un tapis d'amibes *Acanthamoeba castellanii*. Ce point qui peut paraître un détail est en fait fondamental. Le seul moyen d'isoler un virus est de lui proposer un

« hôte » cellulaire adéquat au sein duquel il va pouvoir se reproduire sous la forme de milliers de particules virales inertes, mais capable à leur tour d'infecter des cellules du même type, ainsi de suite. Ce n'est qu'après avoir maîtrisé cette production que l'on peut étudier la structure et la physiologie du virus à l'aide des multiples techniques dont nous disposons : microscopie électronique, génomique, transcriptomique, protéomique, etc. Sans hôte donc, pas de virus.

Mais, le choix de l'hôte n'est pas qu'un détail de protocole opérationnel. Il est fondamental car il conditionne les risques sanitaires, et donc le niveau de sécurité dont devront être entourées toutes les expériences subséquentes sur le virus nouvellement isolé. L'utilisation d'un hôte (de laboratoire), plutôt qu'un autre, définit en quelque sorte une fenêtre (étroite) sur la diversité virale qu'on s'autorise à explorer. En continuité historique avec la découverte de *Mimivirus*, nous sommes restés fidèle aux amibes du genre *Acanthamoeba*, pour plusieurs raisons : 1) les amibes appartiennent aux protozoaires (des organismes eucaryotes unicellulaires) dont aucun virus n'avait été caractérisé avant *Mimivirus* ; 2) les amibes du genre *Acanthamoeba* sont parmi les plus faciles à cultiver en laboratoire, capable de se multiplier dans un milieu axénique (stérile) ; 3) ces amibes sont ubiquitaires (sols, milieux aquatiques de toutes natures) et permettent donc un échantillonnage exhaustif de toutes sortes d'environnements ; enfin, 4) bien que proches de nous en terme de physiologie cellulaire fondamentale (organelles et métabolisme eucaryote), les amibes sont évolutivement très distantes du phylum dont les animaux sont issus, et dont elles ont divergé il y a environ 1 milliard d'années. Il y a donc une probabilité infime que les virus d'amibes isolés de l'environnement puissent poser le moindre risque d'infections pour les personnels les manipulant. Ce point est évidemment crucial lorsque que l'on prétend vouloir ressusciter des virus inconnus, contemporains de l'extinction des Néandertaliens, ce que nous étions sur le point d'accomplir.

PITHOVIRUS SIBERICUM ET MOLLIVIRUS SIBERICUM : LES DEUX PREMIERS VIRUS « ZOMBIES »

Quelques grammes de l'échantillon de pergélisol remis en suspension et déposés sur un tapis d'amibes, et les voici qui, après quelques jours, commencent à dépérir. Une conclusion, triviale et tautologique : si nos amibes meurent, c'est qu'il y a quelque chose qui les tue ! De plus, nous constatons que cette mortalité semble s'accompagner de la multiplication de micro-organismes bizarres, visibles au microscope optique, mais sans ressemblance avec des bactéries connues (dont la croissance

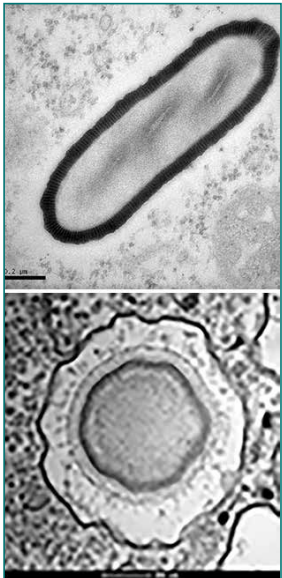


Fig. 3 : Micrographie électronique (coupes fines) de particules de *Pithovirus sibericum* (haut), et de *Mollivirus sibericum* (bas).
Source : IGS-CNRS.

La particule de *Pithovirus sibericum* (10) est oblongue (500 nm de diamètre, jusqu'à 2000 nm de longueur). Celle de *Mollivirus sibericum* (11) est d'apparence sphérique (mais déformable, d'où son nom), et fait environ 600 nm de diamètre (Fig. 3).

Bien que dotés tous les deux d'un ADN génomique d'environ 600 000 bases (respectivement 610 kb et 652 kb), leurs contenus génétiques sont très différents, correspondant à une réplication intra-cytoplasmique pour *Pithovirus* (10), et partiellement nucléaire pour *Mollivirus* (11). Une fois les génomes de ces deux virus décryptés, nous avons pu détecter la présence de fragments de leurs séquences dans les données de métagénomiques provenant du séquençage de l'ADN total de l'échantillon de départ, encore qu'en très petite proportion (de l'ordre du millionième). Ce résultat démontre à la fois la présence des deux virus dans l'échantillon d'origine de pergélisol, mais aussi l'absence de risque infectieux à manipuler des échantillons environnementaux de ce type avant d'initier l'amplification du très faible contenu viral à l'aide de l'hôte de laboratoire approprié.

Si la découverte simultanée de deux nouvelles familles de virus géants infectant les amibes a reçu un accueil enthousiaste au sein de la communauté de virologie fondamentale (précisons quand même qu'après en avoir décliné l'examen, la revue Science a piteusement consacré plusieurs éditoriaux à nos travaux qu'ils avaient refusé sans appel!), c'est la démonstration que des virus

aurait dû être inhibée par l'antibiotique contenu dans le milieu de culture). Après quelques semaines de purification, de passages et d'amplifications successives des cultures, les observations au microscope (optique et électronique) finissent par nous convaincre que, bien que ces microbes se multiplient abondamment, on ne les voit jamais se diviser. L'hypothèse virale devient donc de plus en plus probable. Elle sera finalement validée par le séquençage complet et l'analyse du contenu génétique des deux virus : pas de ribosomes, pas de métabolisme énergétique, pas de division. Selon les critères de Lwoff, nous sommes bien en présence de deux virus, mais de types encore jamais décrits !

La particule de *Pithovirus sibericum* (10) est oblongue (500 nm de diamètre, jusqu'à 2000 nm de longueur). Celle de *Mollivirus sibericum* (11) est d'apparence sphérique (mais déformable, d'où son nom), et fait environ 600 nm de diamètre (Fig. 3).

QUEL SONT LES RISQUES INFECTIOLOGIQUES VÉRITABLEMENT LIÉS À LA FONTE DU PERGÉLISOL ?

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le risque infectieux lié à la persistance de bactéries dans le pergélisol est connu depuis longtemps, grâce notamment aux travaux de l'école russe de microbiologie des sols. La persistance de spores de la bactérie *Bacillus anthracis*, agent de la maladie du « charbon » (*anthrax* en anglais), dans les couches superficielles de pergélisol est la cause bien documentée d'une multitude d'épidémies qui ont ravagé les troupeaux de rennes au cours de l'histoire contemporaine, les années particulièrement chaudes étant associées à un risque accru de remettre en circulation des agents infectieux. Des chercheurs russes ont estimé que le pergélisol sibérien renferme 1,5 millions de carcasses de rennes infectés par la bactérie du charbon, dont les spores sont connues pour y survivre plus de 100 ans (et sans doute beaucoup plus). En 2007, la Russie a interrompu le programme de vaccination des troupeaux mis en place à l'époque soviétique,

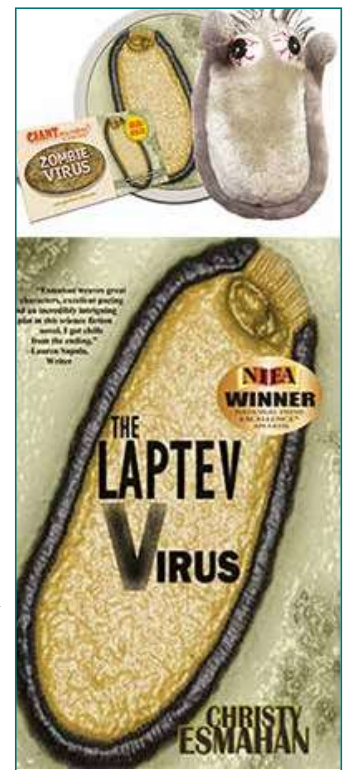


Fig. 4 : Peluche de l'effigie de *Pithovirus* (haut) ; couverture du roman « The Laptev virus » (bas).
Source : www.giantmicrobes.com

ouvrant la porte à une résurgence de la maladie, dont la dernière en date a eu lieu en 2016 dans la péninsule de Yamal, à la suite d'un été très chaud qui a probablement exhumé les restes de rennes morts au cours d'une épidémie datant de 75 ans.

Toujours à la limite de la couche active du pergélisol, une équipe de chercheurs français a aussi révélé en 2012 la présence d'ADN génomique du virus de la variole au sein des tissus d'un corps momifié inhumé il y a environ 300 ans dans la région de Yakutsk (République de Sakha, Sibérie orientale) (12). Les réglementations internationales concernant la manipulation de ce virus officiellement éradiqué depuis 1980 ont interdit toute tentatives de réactivation du virus, dont on ne sait donc pas quelle proportion des particules, même faible, aurait pu rester infectieuses. Mais la libération de virus des couches superficielles de pergélisol, même si elle s'amplifie en moyenne chaque été, ne nous paraît pas associée à un danger qualitativement nouveau. Dès qu'elles apparaissent à la surface, les particules virales sont soumises au pouvoir stérilisant de la lumière et de l'oxygène de l'air, puis sont emportées par les eaux de ruissellement dans le cours d'eau le plus proche, où elles se diluent bien avant d'atteindre la mer.

LE VRAI RISQUE RÉSIDE PLUTÔT DANS LE PERGÉLISOL PROFOND

Avec la découverte et la réactivation de *Pithovirus* et de *Mollivirus* à partir de pergélisol prélevé à environ 30 mètres de profondeur, nous avons changé d'échelle, en passant d'un intervalle de dimension historique à un intervalle quasi-géologique, ces deux virus datant de 30 000 ans et donc, formellement, du Pleistocène supé-



Fig. 5 : Dr. Eugène Christo-Foroux, alors thésard, posant fièrement avec la défense de mammoth qu'il vient de trouver sur la berge du fleuve Kolyma, sur le site de Duvanny yar. (août 2019). Source : IGS-CNRS.

rieur. Or cette période est contemporaine de l'extinction rapide de plusieurs grands animaux alors très abondants tels que les rhinocéros laineux (il y a 14 000 ans), les mammoths (il y a 10 000 ans) (Fig. 5), ou les derniers Néandertaliens (il y a 30 000 ans). Ainsi, les mêmes échantillons de pergélisol qui ont livré nos virus d'amibes préhistoriques pourraient être la source de virus encore infectieux, ayant participé à l'extinction de ces espèces, mais encore jamais entrés en contact avec les espèces modernes de ruminants, éléphants ou autres mammifères, dont l'homme. Leur éventuelle pathogénicité dans le contexte actuel est donc inconnue et imprévisible.

Nos recherches récentes, encore non-publiées, ont confirmé que des virus d'amibes appartenant aux familles de virus que nous avons précédemment décrites pouvaient être réactivés à partir d'échantillons de tissus animaux congelés depuis environ 28 000 ans (site paléolithique de Yana RHS) (Fig. 6). Il paraît donc tout à fait raisonnable d'envisager que des virus à génome ADN capables d'infecter des cellules de mammifères soient présents dans ces mêmes échantillons, et aient pu également rester infectieux. La présence de tels virus est d'ailleurs détectée, en très petite proportion, par l'analyse des séquences de l'ADN total extrait de ces mêmes échantillons. Fidèle à notre principe de précaution, nous nous sommes interdits d'en tenter la moindre réactivation en utilisant comme hôte potentiel des cellules autres que celle d'*Acanthamoeba*. En effet, la réactivation de virus à la pathogénicité inconnue éventuellement capable de déclencher une épidémie incontrôlable, nous paraît un risque sans commune mesure avec l'intérêt scientifique d'une telle recherche.

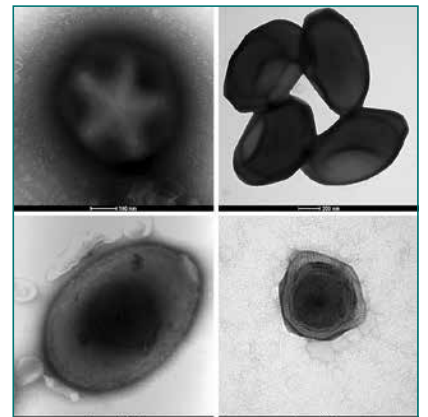


Fig. 6 : Quatre nouveaux virus d'amibe « ressuscités » à partir de restes animaux congelés extraits de couche de pergélisol datant d'environ 28 000 ans (AP). De gauche à droite et de haut en bas : Megavirus, Pandoravirus, Pithovirus, « Pacman virus » (cousin d'Asfarvirus). © J-M Claverie & C Abergel.

Malheureusement, cet avis n'est pas partagé par tout le monde, puisque l'Institut russe Vector, situé à Novosibirsk, vient d'annoncer son intention de lancer un pro-

gramme de « paléovirologie » à partir de restes animaux exhumés de pergélisol ancien (rhinocéros, mammoth, etc). Ce laboratoire, un des fleurons des recherches militaires en microbiologie de l'ère soviétique, reste l'un des deux sites à pouvoir légalement détenir le virus de la variole, et devrait pouvoir travailler au plus haut niveau de biosécurité (BSL-4). Mais une explosion récente sur ce site (septembre 2019) n'est pas de nature à nous rassurer totalement.

Mais au-delà des risques microbiologiques résultant de la fonte périodique des couches superficielles de pergélisol, et des quelques recherches scientifiques limitées à la microflore des mammoths, nous sommes beaucoup plus inquiets du danger venant du développement rapide de l'exploitation industrielle du littoral arctique russe (mer de Laptev, mer de Sibérie orientale), région où des couches de pergélisol profondes de plusieurs centaines de mètres et vieilles d'un million d'années surplombent un sous-sol riche en ressources minérales de toutes sortes (hydrocarbures, barytine, apatite, cuivre, nickel, zinc, tungstène, uranium, or, argent, diamant, fer, platine). Le réchauffement climatique y réduit considérablement la banquise d'été et accroît les possibilités d'accès aux ressources naturelles par la mer. Pour faciliter l'implantation de sites industriels dans ces régions désertes, la Russie dispose désormais de centrales nucléaires flottantes capables de subvenir aux besoins énergétiques de 100 000 personnes.

Afin d'atteindre les minerais précieux que recèle le sous-sol, des dizaines de millions de tonnes de pergélisol devront au préalable être déblayées, dans d'énormes exploitations à ciel ouvert de centaines de mètres de profondeur et de largeur (comme la mine de diamant de Mirny). Cette étape aura donc le potentiel de remettre en circulation à relativement court-terme une microflore et des virus pouvant dater de près d'un million d'années, et de les mettre en contact avec un nombre important de travailleurs sans la moindre barrière de biosécurité microbiologique. Or, nos connaissances sur la viabilité potentielle de virus au-delà de 50 000 ans (la limite de la datation au carbone 14), sont rigoureusement nulles.

Si l'on peut faire l'hypothèse que des bactéries, même très anciennes, puissent être sensibles aux antibiotiques dont nous disposons, comment apprécier le risque de l'éventuelle réactivation de virus dont nous ne savons rien, et qui ont peut-être causé de dramatiques épidémies chez les mammifères, ou les hominidés dont ils étaient contemporains ? La crise de la Covid-19 nous a encore une fois rappelé à quel point chaque virus était unique,

et qu'il n'existe pas d'antiviraux à large spectre. Il serait donc important que des conventions internationales établissent une liste minimale des équipements sanitaires (capacité diagnostique, capacité d'isolement) et des procédures d'alerte à mettre en place au cas (extrêmement improbable) où un « Zombie virus » viendrait par inadvertance franchir la frontière entre la fiction et la réalité.

RÉFÉRENCES

- (1) Gilichinsky D *et al.* (2008) Bacteria in Permafrost, *in*: R. Margesin *et al.* (eds.), *Psychrophiles: from Biodiversity to Biotechnology*, p. 83-102. Springer-Verlag, Berlin.
- (2) Omelyansky V (1911) Bacteriological investigation of Sanga mammoth and nearby soil. *Arkhiv biologicheskikh nauk*, N 4 : 335-340.
- (3) Isachenko B (1912) Some data on permafrost bacteria. *Izvestiya Sankt-Peterburgskogo Botanicheskogo Sada*, 12 (N 5-6): 140.
- (4) Kriss AE, Grave NA (1944) On microorganisms in one thousand-year-old permafrost. *Mikrobiologiya*, 13 : 251- 255.
- (5) Gilichinsky DA *et al.* (1992) Long-term preservation of microbial ecosystems in permafrost. *Advances in Space Research*, 12 : 255-63.
- (6) Boyd WL, Boyd JW (1964) The presence of bacteria in permafrost of the Alaskan arctic. *Canadian Journal of Microbiology*, 10 : 917-919.
- (7) Zazula GD *et al.* (2009) Radiocarbon dates reveal that *Lupinus arcticus* plants were grown from modern not Pleistocene seeds. *New Phytologist*, 182 : 788-792.
- (8) Yashina S *et al.* (2012) Regeneration of whole fertile plants from 30,000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109 : 4008-4013.
- (9) Philippe N *et al.* (2013) Pandoraviruses : amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science*, 341 : 281-286.
- (10) Legendre M *et al.* (2014) Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111 : 4274-4279.
- (11) Legendre M *et al.* (2015) In-depth study of *Mollivirus sibericum*, a new 30,000-y-old giant virus infecting *Acanthamoeba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 112 : E5327-5335.
- (12) Biagini P *et al.* (2012) Variola virus in a 300-year-old Siberian mummy. *New England Journal of Medicine*, 367: 2057-2059.