

# LES BACTERIOPHAGES.

Par définition, ce sont les virus des Bactéries. Chaque Bactéries possèdent son propre phage. Ils sont facilement isolables car ils se développent parallèlement aux Bactéries. Ils se retrouvent dans les déchets, sols, excréments des Hommes et animaux et même dans des zones extrêmes (dorsales océaniques, sources thermiques, ...).

## 1. Classification et Morphologie des Phages.

### • Découverte.

Mise en évidence des bactériophages en 1896 par HANKIN (GB), il travaillait sur le Gange (Inde) où il avait remarqué qu'il y avait peu de bactéries par rapports aux risques de contamination. En travaillant sur Vibio cholerea il a isolé un « potentiel anti-bactérien » par filtration sur un filtre de porcelaine (absence de bactéries sur le filtre mais présence d'un « potentiel anti-bactérien » ; si T°C = 100°C alors disparition de ce « potentiel anti-bactérien »).

Ces travaux ont été repris par Félix d'HERELLE (Fç) qui a mis en évidence qu'il s'agit « d'entités biologiques » qui sont capables, après filtration, de détruire des cultures bactériennes ( = phages de lyses). En 1922, F. d'H. Nomme cette entité biologique « Bactériophage ».

### • Classification.

cf. doc. 1

Elle est basée sur la structure de la particule virale (c'est-à dire la « nucléocapside ») et sur la structure du génome. Il y 4 types particulièrement étudiés. La plupart infectent E. coli.

#### • Phage de la série T:

Ces phages sont à l'origine de beaucoup de manipulations de Biologie moléculaire, les T<sub>2</sub> en particulier. (début du 20ème siècle:) A partir de l'étude du T<sub>2</sub>, HERSHEY et CHASE ont pu mettre en évidence que l'ADN était le support de l'information génétique. D'autre part, VOKIN et ASTRACHAN ont ms en évidence le rôle de l'ARNm et sa fonction biologique.

Les T<sub>7</sub> sont utilisés pour des vecteurs de clonage comme promoteur fort.

Les T<sub>pairs</sub> comme les T<sub>2,4,6</sub> appartiennent à la famille des Myoviridae. A la plce de la Cytosine il y a de l'HydroxyMéthylCytosine dans leur génome. L'intérêt est que cela leur permet de résister aux enzymes de restriction lors de l'infection.

Les T<sub>impairs</sub> appartiennent à la famille des Podoviridae.

Tous les phages de la série T possèdent un ADN linéaire bicaténaire et possèdent une structure avec « tête et queue ».

cf. doc. 2

#### • Phage Tempéré:

Ils présentent deux cycles de multiplication, contrairement aux phages T.

→ un cycle lytique, comme les phage T,

→ un cycle lysogène: le phage s'intègre dans le génome bactérien au lieu de rester virion.

Le plus étudié est le phage  $\lambda$  notamment pour les clonage.

Autres: phage P<sub>1</sub>, P<sub>22</sub>, P<sub>5</sub> et phage Mu.

#### • Petit phage à ADN:

Ce sont des phages de petite taille avec deux sortes de nucléocapside.

→nucléocapside icosaédrique (comme X<sub>174</sub>, S<sub>13</sub>). L'étude de ces phages a été à l'origine de la découverte des gènes superposés.

→nucléocapside filamenteuse (comme phage fd, phage M<sub>13</sub>). Ces phages sont très utilisés car ADN simple brin (donc facilement séquençable).

#### • Phage à ARN:

Ils appartiennent à la famille des Leviridae comme le phage Q $\beta$ , M<sub>s2</sub>. Ils servent de modèles pour la traduction de l'ARN.

Les phages présentent différents types de génomes: ADN double-brins, ADN simple-brin, ARN; et différents types de structures de nucléocapside: filamenteuse, isocaidrique ou comme les T<sub>2</sub>.

- **Structure des phages.**

- **Bactériophages T2:**

*cf. doc. 3*

[capable de refaire le schéma ou de le re-légendrer]

- **Bactériophages filamenteux:**

*cf. doc. 3 poly. B*

La nucléocapside forme une longue gaine qui protège le génome (ADN simple-brin). A l'extrémité protéique: G3P: c'est ici que le phage va s'accrocher à la bactérie au niveau des pilus sexuels (pili F).

## **2. Deux Types de Cycles.**

- **Présentation Générale.**

- **Infection lytique:**

Ici le phage se multiplie au dépend de la bactérie et généralement la détruit. Ces sortes de phages sont dits « virulents ».

- **Infection lysogène:**

Ici le génome du phage est injecté dans la bactérie, mais ne s'y réplique pas. Par contre il va s'intégrer dans le génome bactérien. La multiplication du phage se fait grâce à la réplication du chromosome bactérien. Le phage s'intègre à un seul endroit du génome bactérien.

Quand le phage est intégré, il y a un phénomène d'immunité qui préserve la bactérie d'une surinfection du même phage.

Un phage intégré = prophage et seuls les phages tempérés ont la capacité d'avoir un cycle lysogène (ils possèdent aussi un cycle lytique).

- **Cycle lytique du phage T2.**

*cf. doc. 4 poly B.*

- **Phase d'absorption:**

Le phage se fixe sur la bactérie. C'est une phase fondamentale car il y a une reconnaissance spécifique entre le récepteur et le phage (sinon pas de fixation). Les conditions d'absorption dépendent, parfois des cofacteurs libérés par la bactérie qui va être parasitée.

Ex: T4 se fixe bien si la bactérie libère Tyr.

$\lambda$  se fixe bien si la bactérie libère  $Mg^{2+}$ .

Le récepteur, au niveau de la bactérie, varie suivant le phage.

T2 = porine;  $\lambda$  = porine lam B.

On retrouve ainsi des pilus sexuels (F) pour M13. Certains utilisent le LPS comme site de fixation.

- **Phase de fixation:**

Pour le phage T2, la fixation est effectuée par les filaments codaux et la plaque terminale. Elles deviennent rapidement irréversibles. C'est ici que les enzymes de la plaque codale s'activent et hydrolysent les enveloppes bactériennes pour pouvoir injecter l'ADN virale.

- **Injection du Génome:**

Elle est réalisée par contraction de la gaine externe qui favorise la pénétration du cylindre central.

*cf. doc. 5 poly. B*

- **Phase d'éclipse:**

Après injection, le virion cesse d'exister, ne persiste que le génome dans la bactérie. Il n'y a plus de particule virale (environ 12 min). De nombreux événements se déroulent alors: la synthèse de l'ADN bactérien est stoppée par le phage, une DNase phagique va dégrader le génome bactérien (DNase phagique pendant 2 à 3 min après l'injection, issue des gènes précoces). Il y a aussi production d'ARNm et production de protéines constituant la nucléocapside et, parallèlement l'ADN se multiplie. Cet ADN est formé sous forme de "concatamères" (= cercle roulant) c'est-à-dire plusieurs séquences d'ADN colées à la suite.

Ici accumulation des différents composants du phage: ADN phagique, nucléocapside => fin de la phase d'éclipse.

- **Phase de maturation et libération:**

Entre 12 à 15 min. L'ADN produit en concatamère est coupé en fragments de taille normale

avec parfois des sources d'erreurs (101 à 112% taille totale du génome) donc fragments plus longs ou plus courts. Ce qui est à l'origine d'une importante mutation des phages. La nucléocapside se structure, il y a alors apparition de la particule virale = virions dans la bactérie.

Quand la bactérie accumule entre 100 à 200 virions, il y a activation d'une endolysine phagique qui entraîne l'éclatement de la bactérie et la libération des phages.

- **Cycle lysogène du phage  $\lambda$ .**

- **Présentation générale:**

La structure est "tête et queue" mais ici le phage ne possède pas de filaments codiaux (cf. doc.2). Ici, l'expression du phage est réprimée. Pour sortir de cette phase lysogène il faut que la bactérie hôte subisse "un stress" (rayons X, UV, agent mutagène,...) alors le phage devient productif -> cycle lytique.

- **Génome du phage  $\lambda$ :**

Il s'agit d'un phage qui infecte E. Coli K12. Il possède un génome double-brin à extrémités cohésives (donc circulaire) (cf. doc. 6).

Lorsque le génome du phage est infecté dans la bactérie il se circularise.

Taille  $\approx$  49Kpb.

1. --- Gènes impliqués dans la régulation de lysogénie.
2. --- Gènes impliqués dans la recombinaison, c'est-à-dire l'étape d'intégration (aH: séquence complémentaire qui permet l'intégration).
3. --- Gènes impliqués dans la synthèse de m'ADN (lytique).
4. --- Gènes impliqués dans le phénomène de lyse de la bactérie (lytique).

Tout le reste sont des gènes qui codent pour la nucléocapside, des gènes structuraux.

- **Cycle lytique du phage  $\lambda$ :**

Il débute comme le phage T2.

Résistance à la bactérie = Lam B.

Quand le génome est injecté, il se circularise et il débute sa transcription.

Protéine Cro et N dès le début.

Cro = régule les cycles lysogène / lytique.

N = permet la synthèse d'ARNm de taille variable "  $\alpha$ terminateur".

Puis CII, CIII et Q --> switch --> soit lysogène soit lytique.

Dans la phase lytique [Q] augmente ce qui entraîne l'augmentation du régulateur Pro: on bloque alors les protéines qui activent la lysogénie (rétrocontrôle +). Le phage produit alors des ARNm longs et donc fabrique sa tête et sa queue.

Comme le phage T2, l'ADN est répliqué sous forme de concatémère puis est réduit par une DNase virale qui génère les extrémités cohésives (ex: EcoR1).

- **Cycle lysogène du phage  $\lambda$ :**

Pour qu'il soit induit il faut réprimer les gènes tardifs, qui codent pour la tête et la queue et activer les gènes de recombinaison. La protéine régulatrice est C<sub>I</sub>. Par un système de régulation génique, C<sub>I</sub> s'exprime et augmente ce qui inhibe les gènes tardifs. Il y a alors activation du cycle lysogène ou le génome viral s'intègre au génome bactérien.

La sortie de cette phase lysogène (phase naturelle du phage) se fait par REC A (protéine bactérienne) qui est produit en cas de stress (RECA hydrolyse C<sub>I</sub> ce qui induit le cycle lytique).

- **Applications.**

- **Diagnostic et Taxonomie:**

cf. poly. C

Principe de la lysotypie: on s'en sert au niveau médical, au niveau industriel pour identifier les couches de levain. La recherche du phage est un indicateur de Contamination Fécale (eau, aliments,...).

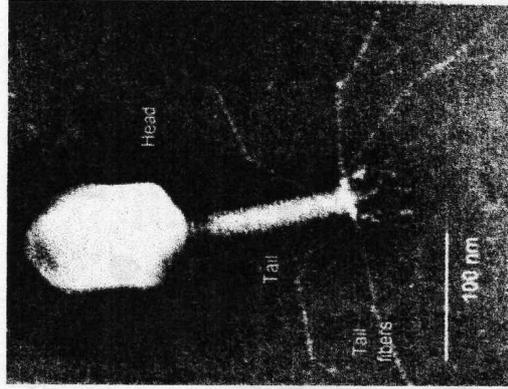
- **Outils de la Biologie Moléculaire:**

M12 possède un ADN monobrin donc utile pour le séquençage.

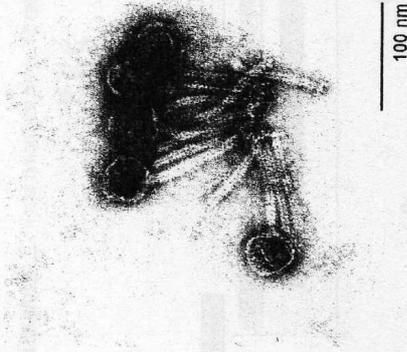
$\lambda$  est utilisé comme vecteur de clonage (phagemide) et comme un système de traduction in vitro (production d'ARNm).

**Document 1** : classification des bacteriophages

Family or Group:	Genera:	Type Member:	Particle Morphology:	Envelope :	Genome:
Corticoviridae	Corticovirus	PM2	isometric	No	supercoiled d/s DNA
Cystoviridae	Cystovirus	Ø6	isometric	Yes	3 segments d/s RNA
Inoviridae	Inovirus Plectrovirus	coliphage fd Acholeplasma phage	rod	No	circular s/s DNA
Leviviridae	Levivirus Allolevirus	coliphage MS2 coliphage Qbeta	icosahedral	No	1 (+)strand RNA
Lipothxviridae	Lipothxvirus	Thermoproteus phage 1	rod	Yes	linear d/s DNA
Microviridae	Microvirus Spirovirus	coliphage ØX174 Spiroplasma phages Mac-1 phage coliphage T4	icosahedral tailed phage	No	circular s/s DNA linear d/s DNA
Myoviridae				No	linear d/s DNA
Plasmaviridae	Plasmavirus	Acholeplasma phage	pleiomorphic	Yes	Circular d/s DNA
Podoviridae		coliphage T7	tailed phage	No	1 linear d/s DNA
Siphoviridae	lambda phage group	coliphage lambda	tailed phage	No	linear d/s DNA
Sulpholobus shibatae virus		SSV-1	lemon shaped	No	circular d/s DNA
Tectiviridae	Tectivirus	phage PRD1	icosahedral	No	linear d/s DNA

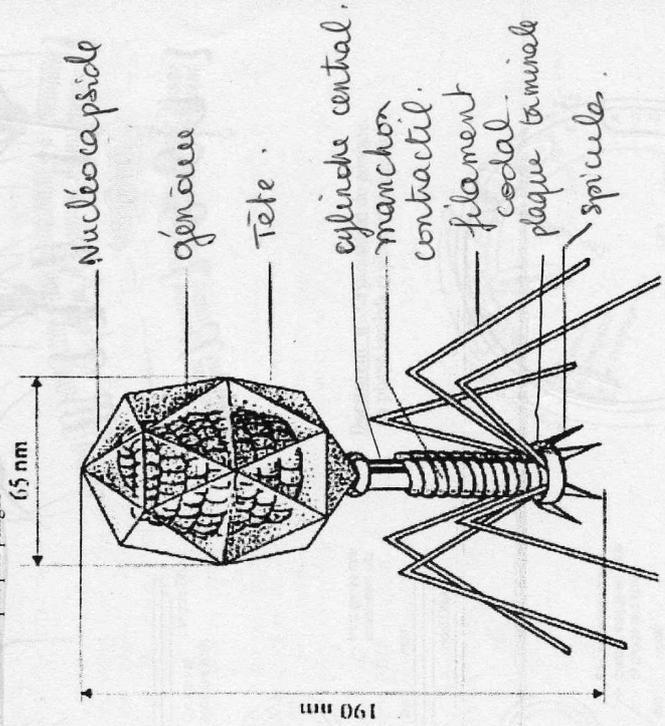


Phage T4

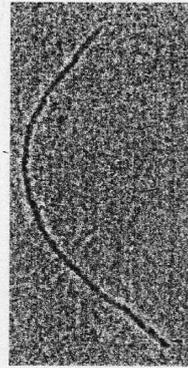


Phage lambda

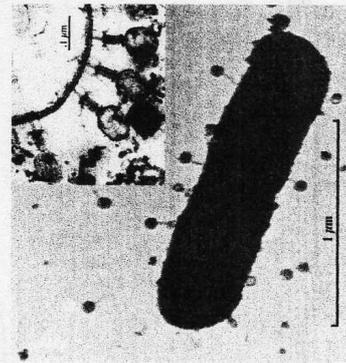
**Document 3** : Structures de quelques phages



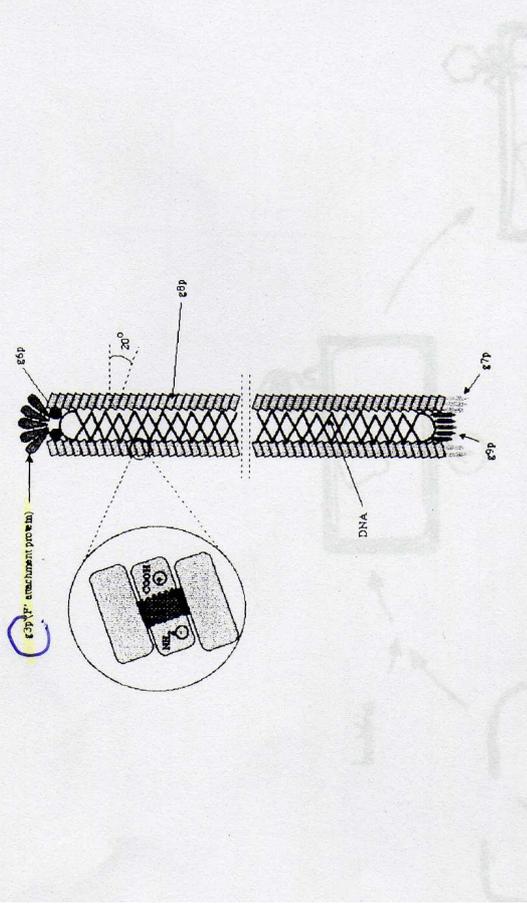
**Document 2** : Electronographie de quelques phages



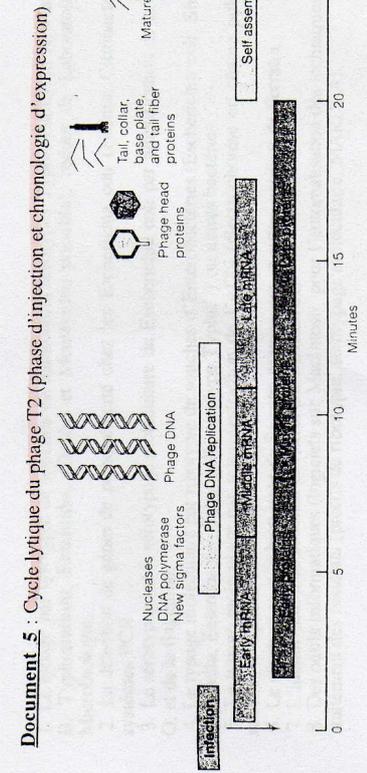
Phage fd (800 nm X 6 nm)



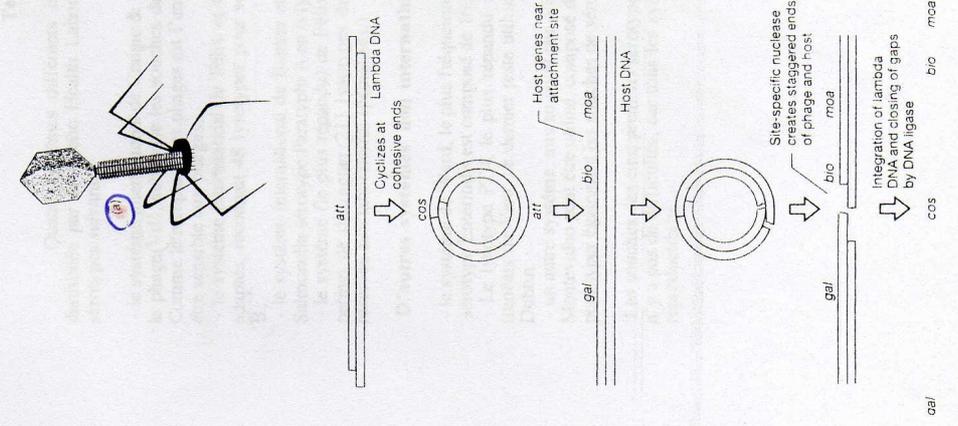
Phages T4 et T5 (zoom)



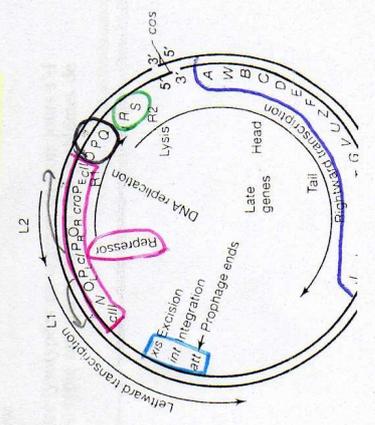
**Document 4** : Cycle lytique et lysogénique d'un bactériophage



**Document 5** : Cycle lytique du phage T2 (phase d'injection et chronologie d'expression)



**Document 6** : Organisation du génome du phage lambda et phase d'intégration



## UN EXEMPLE DE LYSOTYPYPIE

<http://www.pasteur.fr/sante/cf/re/cadre/nr/typerob/typerob-activites.html#lysotypie>

1. Le typage par lysotypie de souches de Salmonella sérotypes Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, Typhimurium, Enteritidis, (Dublin et Montevideo possible), reçues de Laboratoires de Microbiologie.
2. La détection de gènes de pathogénicité chez les Escherichia coli (Hafnia, Citrobacter) par systèmes PCR
3. Le sérotypage et le sérotypage moléculaire de Escherichia coli par amplification de la région O, et de la flagelline.
4. Le typage moléculaire par ribotypie de souches d'Entérobactéries (Escherichia coli, Shigella, Klebsiella, Enterobacter, Salmonella sérotype Typhi...) ou autres bactéries.
5. Le typage moléculaire par macrorestriction de l'ADN (électrophorèse en champ pulsé) de souches d'espèces très variées
6. Le sérotypage et le biotypage de Serratia marcescens et autres espèces de Serratia,
7. L'identification de souches difficiles par MARDRA.
8. Des outils informatiques (logiciels sur Macintosh pour l'automatisation des techniques et traitement des résultats (profils de ribotypie, sérotypage moléculaire, MARDRA).

### Techniques utilisées

Quatre systèmes différents internationaux de lysotypie, standardisés et qui sont distribués par le Public Health Laboratory (Colindale, UK), permettent de subdiviser les sérotypes suivants :

- le système international de Craige & Yen, utilisant 87 variants issus du même bactériophage, le phage (VII), subdivise les souches de Salmonella enterica sérotype Typhi en 106 lysotypes. Comme le récepteur des phages est l'antigène Vi, les isolats doivent produire cet antigène pour être sensible aux phages.
- le système international de Félix et Callow, composé de 12 bactériophages adaptés et non adaptés, reconnaît 48 lysotypes pour subdiviser les souches de Salmonella sérotype Paratyphi (B).
- le système international de Banker et Anderson, composé de 6 phages, permet de typer les Salmonella sérotype Paratyphi A en 6 lysotypes.
- le système (le plus répandu) de Félix, Callow et Anderson, comprenant 31 bactériophages, permet de distinguer 211 lysotypes dans le sérotype Typhimurium. (Sa mise en livre reste réservée aux laboratoires spécialisés.)

### D'autres systèmes non internationaux sont utilisés au CNRTME :

- le système de Ward, le plus fréquemment utilisé actuellement pour différencier les souches de sérotype Enteritidis est composé de 16 phages : 74 lysotypes peuvent être reconnus.
- Le lysotype PT4, le plus répandu en Europe, correspondait au lysotype 33 du système français de Vieu: ce dernier reste utilisé occasionnellement pour typer les souches de sérotype Dublin.
- un autre système, mis au point par Vieu et al. pour typer les souches de Salmonella sérotype Montevideo peut être utilisé, composé de 14 phages. Il permet de subdiviser en 95 lysotypes et peut typer également les souches de sérotype Virchow.

Les souches des cinq premiers sérotypes peuvent être lysotypées en urgence en trois jours s'il n'y a pas de difficultés, car tous les systèmes de lysotypie ont quelques fois des problèmes de reproductibilité.

