

# Les bactériophages codant les Shiga-toxines

---

## **I. Caractéristiques des phages Stx**

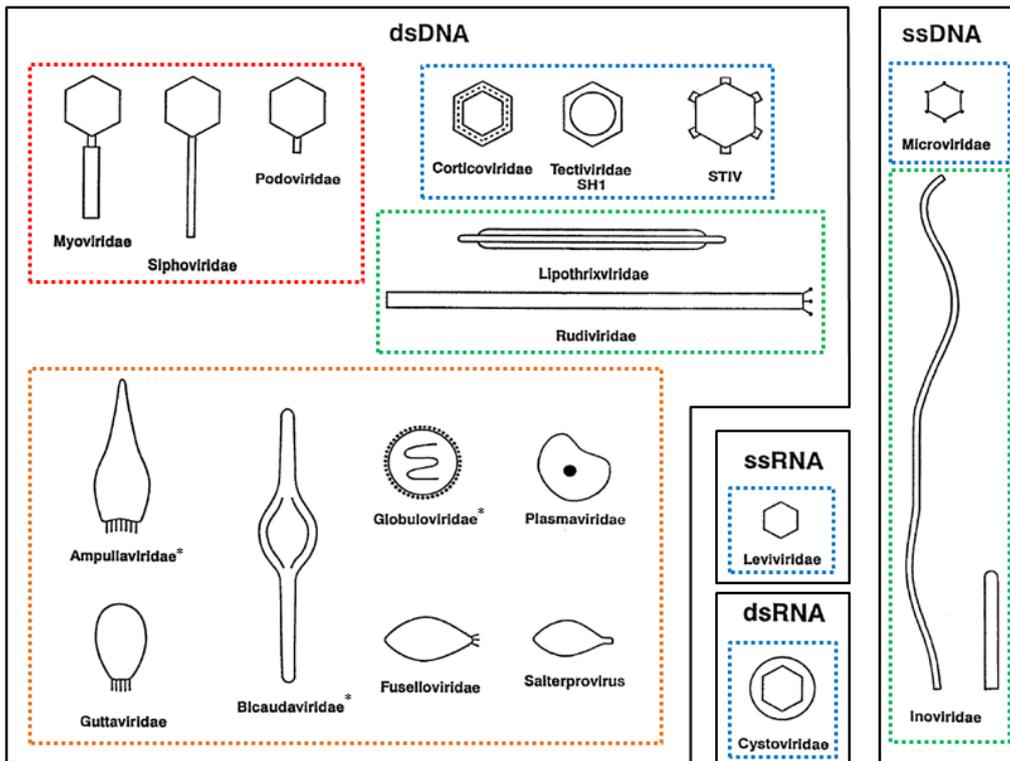
### I.1. Généralités sur les phages

#### *I.1.1. Historique*

Les phages ou bactériophages sont des virus de procaryotes, que l'on retrouve aussi dans les eubactéries et les archées. Les phages font partis d'un groupe très diversifié : le nombre d'espèces de phage connues augmente chaque année et se compte désormais en millions (Ackermann, 2007). Le premier recensement de phage, daté de 1967, a permis d'en dénombrer 210. Entre les années 1995 et 2000, ce nombre passa de 4551 à 5136 phages. (Ackermann, 2007). De par leur nature, les phages sont présents dans tous les milieux dans lesquels des bactéries ont été identifiées. Ils ont ainsi pu être identifiés dans les océans, les sols, les plantes et les animaux (Lopes *et al.*, 2014).

#### *I.1.2. Classification et morphologie des phages*

Il n'existe pas de méthode universelle pour la classification des phages. La première d'entre elles a été proposée par Ernst Ruska en 1943 et se base sur une classification classique des virus. En 1962, Lwoff, Horne et Tournier ont proposé de classer les phages selon leur type d'acide nucléique (ADN ou ARN), la forme de leur tête, la présence/absence d'enveloppe et le nombre de capsomères (protéines qui protègent les acides nucléiques du phage) (Figure 10) (Ackermann, 2009). D'après une étude de Ackermann, quatre types de morphologie de phage ont été déterminées, les phages possédant une queue, les polyédriques, les filamenteux et les polymorphes (Figure 10) (Ackermann, 2007). Néanmoins, 96% des phages appartiennent au groupe de ceux qui possèdent une queue, correspondant à l'ordre des *Caudovirales*. Cet ordre est divisé en trois familles en fonction de la morphologie de la queue des phages : les *Siphoviridae* ont une queue longue et non contractile (majorité des phages soit 61%), les *Myoviridae* ont une queue longue et contractile (24,5%), alors que les *Podoviridae* ont une queue courte (14%). Les phages présentant une autre morphologie représentent seulement 3 à 4% de l'ensemble des phages. Pour finir, 14,5% des phages avec une queue, possèdent une tête allongée et ont été qualifiés de « prolates ». Ces types de phages sont assez fréquents notamment chez les entérobactéries (20%) (Ackermann, 2007).



**Figure 10. Morphotypes des bactériophages**

dsDNA et dsRNA, ADN ou ARN double brin ou « double-stranded » ; ssDNA et ssRNA, ADN ou ARN simple brin ou « single-stranded ». Les quatre types de morphologies de phages sont représentés par des encadrés en pointillés de couleur, en rouge : les caudovirales ; en bleu : les polyédriques ; en vert : les filamenteux ; et en orange : les polymorphes. \*, phages en attente de classement (Adaptée de Ackermann 2007)

Un autre système de classement des phages a été proposé dans une étude plus récente. Cette classification est basée sur les protéines impliquées dans la connexion entre la tête et la queue des phages, formant le « cou » du phage (Lopes *et al.*, 2014). Cette étude, réalisée en particulier sur l'ordre des Caudovirales, montre que les phages peuvent être classés en quatre types correspondant à quatre architectures du cou. Le type 1, le plus abondant, est composé par des phages appartenant à deux familles, les *Siphoviridae* et les *Myoviridae*, qui possèdent les protéines de structure du cou Ad1, Hc1 et Tc1. Le type 2 est composé de dix clusters caractérisés par des combinaisons différentes entre les protéines de tête, de cou et de queue. Le type 2 ne comprend que des phages de la famille *Myoviridae* qui possèdent les protéines Ad2, Hc2 et Tc2. Les types 3 et 4 regroupent les phages de la famille des *Podoviridae* qui possèdent les protéines Ad3 et Hc3 pour le type 3 et Ad4 pour le type 4 (Lopes *et al.*, 2014).

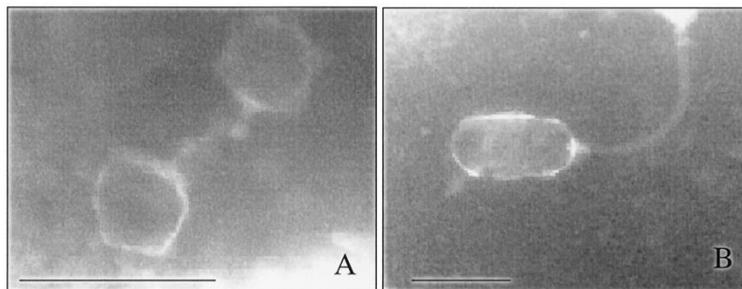
## I.2. Présentation des phages Stx

### I.2.1. *Historique et morphologie des phages Stx*

Les phages Stx ont été mis en évidence et décrits dans la littérature à partir de 1983 dans des souches d'*E. coli* de sérotypes O26:H11 (souche H19, phage H-19B) et O157:H7 (souche EDL933, phage 933W) (Smith *et al.*, 1983, Herold *et al.*, 2004, O'Brien *et al.*, 1984). Ils appartiennent au groupe des lambdoïdes (Smith *et al.*, 2012) dont le chef de file, le phage  $\lambda$  (lambda), mis en évidence pour la première fois en 1951 par Esther Lederberg, est le phage le plus connu et le plus étudié dans la littérature (Casjens & Hendrix, 2015).

Les phages Stx sont composés d'un ADN double brin et appartiennent aux familles des *Siphoviridae*, des *Myoviridae* et des *Podoviridae* (Smith *et al.*, 2012, Schmidt, 2001, Huang *et al.*, 1987). Le phage Stx1 issu de la souche H19 possède une tête hexagonale allongée tandis que la tête du phage Stx2 (933W), issu de la souche EDL933, est régulière. Enfin, ces deux phages possèdent une queue non contractile et flexible pouvant mesurer 27 à 170 nm (Schmidt, 2001). Plus récemment, des études ont montré qu'il existe plusieurs types de phage Stx2 possédant des différences aussi bien du point de vue génétique que morphologique (Muniesa *et al.*, 2003, Muniesa *et al.*, 2004b, Garcia-Aljaro *et al.*, 2009).

En effet, certains phages Stx2 peuvent avoir une tête hexagonale régulière, d'environ 60nm de diamètre (Figure 11-A), alors que d'autres peuvent posséder une tête allongée (à l'instar du phage Stx1 issu de la souche H19) d'environ 45 x 90 nm (Figure 11-B) (Muniesa *et al.*, 2003, Muniesa *et al.*, 2004b).



**Figure 11. Morphologie de deux types de phages Stx2 observés par MET**

MET : Microscopie électronique à transmission ; A : Phage SC370; B: phage LC159; la barre horizontale représente 100 nm (Muniesa *et al.*, 2003).

### 1.2.2. Cycles lytique et lysogénique

Le phage Stx, comme le phage  $\lambda$ , est un bactériophage dit tempéré puisqu'il est capable d'effectuer aussi bien le cycle lysogénique que le cycle lytique. Lors du cycle lysogénique, le phage a la capacité d'intégrer son génome dans le chromosome bactérien sous la forme d'un prophage et de persister au cours des divisions cellulaires de la bactérie (Figure 12). Lors du cycle lytique, le phage utilise la machinerie cellulaire pour se multiplier et former de nouvelles particules qui seront libérées de la bactérie par lyse de la membrane bactérienne (Figure 12) (Canchaya *et al.*, 2003, Lwoff, 1953).

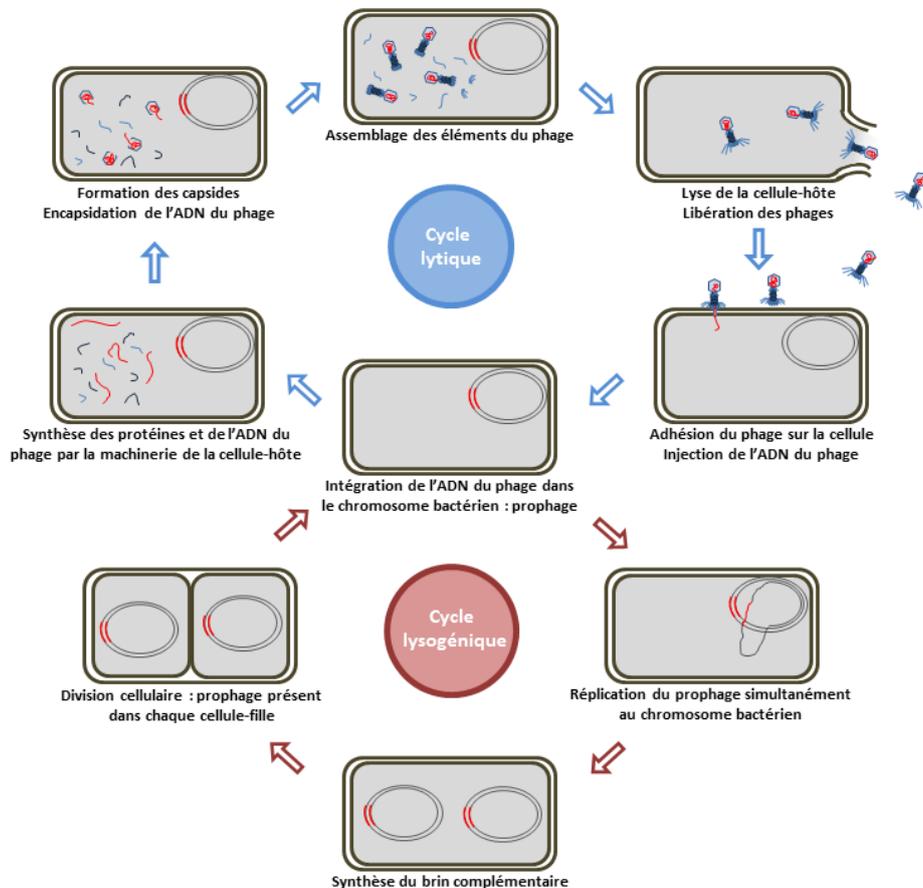


Figure 12. Schéma du cycle lytique et lysogénique des phages

### 1.2.3. Récepteurs des phages sur la bactérie

Des études ont montré que les phages Stx interagissent avec au moins trois récepteurs à la surface des bactéries, FadL, LamB et YaeT. Parmi ces récepteurs, les protéines LamB et FadL ont initialement été décrites comme récepteurs du phage  $\lambda$  et du phage T2 (Smith *et al.*, 2007a, Watarai *et al.*, 1998).

L'étude de Watarai *et al.* (1998) a mis en évidence que les deux phages Stx2 (Stx2Φ-I et Stx2Φ-II), issus d'une souche de STEC O157:H7 responsable d'une épidémie au Japon en 1996, n'utilisaient pas le même récepteur membranaire chez la bactérie hôte *E. coli* C600. Le phage Stx2Φ-I s'est révélé être similaire au phage 933W issu de la souche EDL933 (Strockbine *et al.*, 1986) tandis que le phage Stx2Φ-II n'avait pas d'équivalent déjà connu (Watarai *et al.*, 1998). Les tests d'infection de la souche *E. coli* C600 par ces deux phages ont montré que le phage Stx2Φ-I se lie essentiellement à la protéine FadL tandis que le phage Stx2Φ-II a la possibilité de se lier à LamB et FadL (Watarai *et al.*, 1998).

L'étude de Smith *et al.* (2007) a montré que la protéine YaeT est impliquée dans la reconnaissance des phages Stx à queue courte (tels que les *Podoviridae*) à la surface des bactéries (Smith *et al.*, 2007a). Le gène codant la protéine YaeT est un gène essentiel chez *E. coli* (Gerdes *et al.*, 2003). Cette observation a aussi été confirmée par une étude d'Islam *et al.* (2012), dans laquelle un phage Stx2 (Sp5), issu de la souche Sakai (O157:H7), utilise la protéine YaeT pour se lier aux cellules bactériennes. En revanche, ce phage n'est pas capable de reconnaître les protéines LamB et FadL (Islam *et al.*, 2012). Enfin, les phages Stx dotés d'une queue longue, tels que le phage H19-B de la famille des *Siphoviridae* et les *Myoviridae*, reconnaîtraient d'autres molécules de surface (Smith *et al.*, 2007a). Une des candidates serait la protéine OmpC connue pour être un récepteur pour des phages de *Shigella* et de *Salmonella* (Marti *et al.*, 2013, Parent *et al.*, 2014, Smith *et al.*, 2007a).

### I.3. Description génomique des phages Stx

#### I.3.1. *Structure du génome*

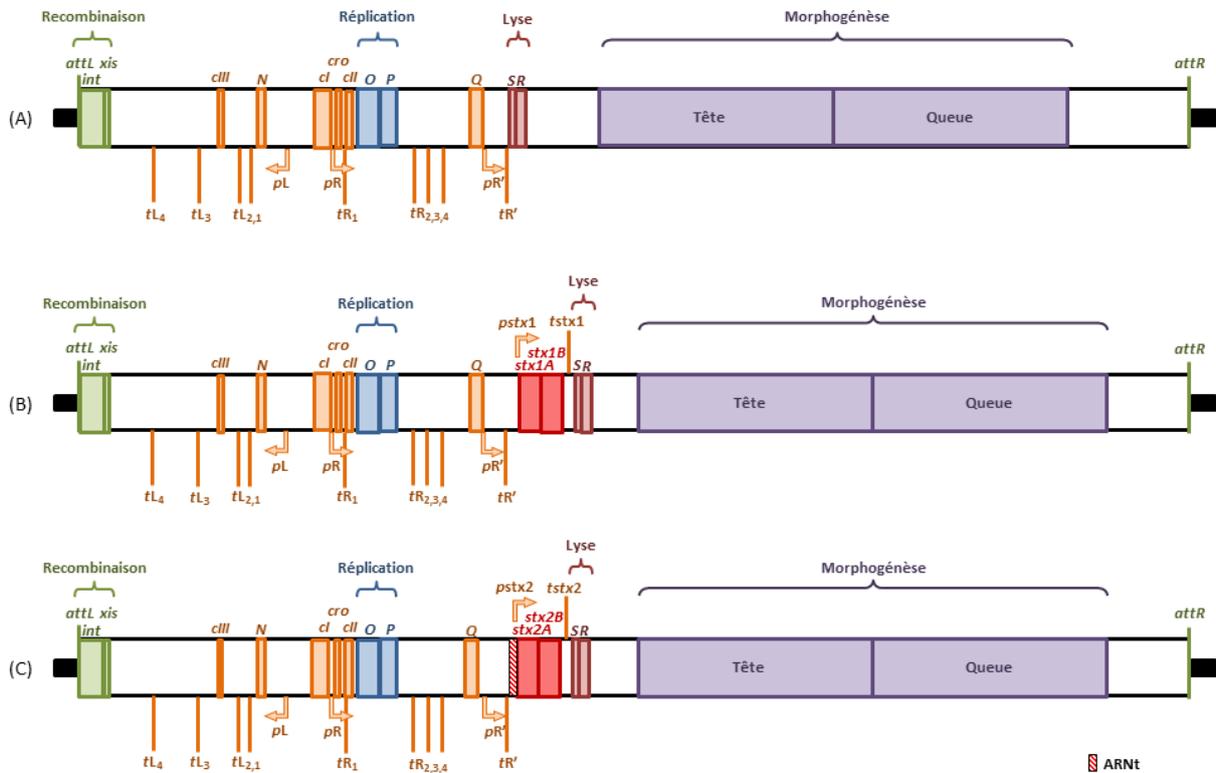
Le génome des phages Stx a été caractérisé dans les années 80. L'organisation génomique du phage Stx est similaire à celle du phage  $\lambda$  (Smith *et al.*, 2012). En revanche, il a été démontré que la taille des génomes des phages Stx issus de STEC des sérogroupes O26 et O157 était comprise entre 47 kb et 70 kb (Schmidt, 2001) suggérant donc des variations par rapport au génome du phage  $\lambda$  (48,5 kb).

Le génome d'un phage lambdoïde (tel que le phage  $\lambda$  et les phages Stx) est organisé en opérons ou groupes de gènes pour lesquels la transcription ne s'effectue pas simultanément. Ces gènes sont nommés précoces et tardifs selon le moment où ils sont transcrits. Parmi les gènes précoces, les gènes codant les protéines N et Cro sont les premiers à être transcrits. La protéine Cro joue un rôle dans l'entrée en cycle lytique. La protéine N, quant à elle, est un anti-terminateur de transcription. Elle se fixe aux promoteurs  $p_L$  et  $p_R$  et permet ainsi de continuer la transcription des gènes précoces. Les autres gènes précoces codent les protéines impliquées dans la réplication (O et P) et dans la recombinaison du phage (telles que Int, Xis, Exo, Bet et Gam) ainsi que la protéine Q et les protéines cII et cIII. La protéine Q est également un anti-terminateur de transcription. Elle se fixe au promoteur  $p_R'$  permettant la transcription des gènes tardifs. Ces gènes codent les protéines impliquées dans la lyse cellulaire (R et S). Les gènes tardifs codent aussi des protéines impliquées dans la morphogénèse de nouvelles particules de phage comme les protéines A, B, C, D, E et F formant la tête et G, H, I, J, K, L, M, T, U, V et Z formant la queue (Figure 13) (Casjens & Hendrix, 2015). Parmi les gènes de lyse cellulaire, le gène *R* code une endolysine responsable de la dégradation du peptidoglycane de la paroi cellulaire. Le gène *S*, quant à lui, code une petite protéine membranaire nommée « *holin* » qui crée des lésions non-spécifiques de la membrane cytoplasmique permettant ainsi à l'endolysine de dégrader le peptidoglycane (Blasi & Young, 1996).

Enfin, l'entrée en cycle lytique ou lysogénique est contrôlée par les protéines Cro et cI. La protéine Cro permet l'entrée en cycle lytique alors que la protéine cI joue un rôle dans le maintien du cycle lysogénique. La transcription de cI est initiée grâce aux protéines cII et cIII. Le maintien du cycle lysogénique ou l'entrée en cycle lytique résulte d'une compétition entre les protéines Cro et cI ainsi que d'une cascade complexe de régulation (Figure 13) (Casjens & Hendrix, 2015).

A la différence du phage  $\lambda$ , les phages Stx possèdent les gènes *stx* qui ont été mis en évidence en aval du promoteur  $p_R'$  (à une distance d'environ 1 kb) et plus précisément en aval des

gènes de lyse (Figure 13) (Wagner *et al.*, 2002, Wagner *et al.*, 2001b, Neely & Friedman, 1998).



**Figure 13. Schéma de l'organisation génétique des phages  $\lambda$  et Stx**

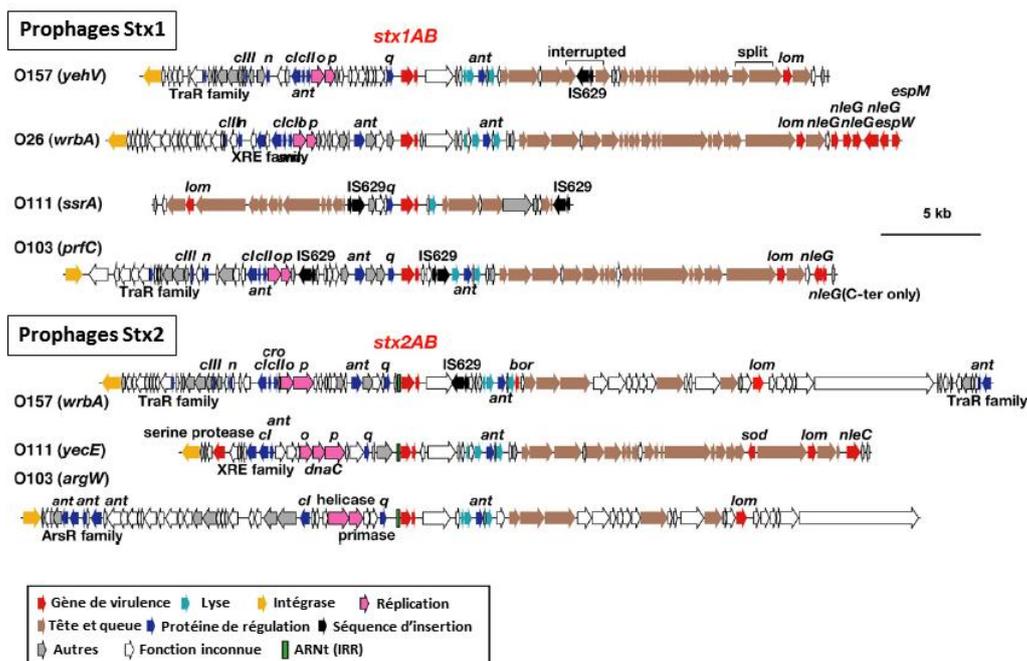
Les génomes des phages sont représentés dans leur forme intégrée (prophage) dans le chromosome bactérien (en noir) entourés des sites jonctions *attL* et *attR* (en vert). (A) phage  $\lambda$ , (B) phage Stx1, (C) phage Stx2. Le phage Stx2 possède trois gènes codant pour des ARN de transfert (ARNt) : *ileZ*, *argN* et *argO* (hachures rouges).

La comparaison des génomes de deux phages Stx (933W et H19B) à celui du phage  $\lambda$  a révélé que certains gènes situés en amont du promoteur *pR'* étaient homologues tandis que les gènes tardifs et la terminase sont différents de  $\lambda$  (Schmidt, 2001). De plus, trois gènes codant des ARN de transfert (ARNt), *ileZ*, *argN* et *argO*, ont été mis en évidence en amont du gène *stx* mais seulement dans les phages Stx2 (Plunkett *et al.*, 1999, Schmidt, 2001). Enfin, deux gènes, *lom* et *bor*, présents chez le phage  $\lambda$  ont été aussi identifiés dans des phages issus de STEC O157:H7. Le gène *bor* est impliqué dans la résistance au sérum alors que le gène *lom* code une protéine de la membrane externe qui permet d'améliorer la capacité de la bactérie à survivre dans les macrophages (Schmidt, 2001). Ce gène *lom* a aussi été retrouvé dans des phages Stx issus de STEC de sérogroupes non-O157 et est considéré comme un gène de virulence (Figure 14) (Ogura *et al.*, 2009).

Une autre étude ayant pour objectif de comparer plusieurs génomes de phage Stx connus a permis de mettre en évidence que les séquences des 11 phages Stx étudiés sont toutes différentes. Parmi eux, le génome du phage P27 est celui qui présente le moins de similarité avec celui des autres phages. Cette particularité résulte d’une recombinaison entre un phage lambdaïde et un phage non-lambdaïde (Smith *et al.*, 2012, Recktenwald & Schmidt, 2002).

Une étude portant sur l’analyse des gènes de 70 phages Stx a montré une grande variabilité de séquence entre certains gènes ou au contraire de grande similarité (Smith *et al.*, 2007b). Les similarités concernent le gène *int* généralement proche de celui des phages 933W et  $\Phi$ 24<sub>B</sub>, ainsi que les gènes de régulation, *cIII*, *cII* et *Q*, qui sont relativement bien conservés. En revanche, les gènes *cro* et *cI* présentent une très forte hétérogénéité, quatre variants du gène *cro* (*cro 1*, 3, 8 et 9) et six du gène *cI* (*cI 1b*, 2a, 2b, 2d, 3 et 4) ont été identifiés parmi les 70 phages. Enfin, parmi les gènes de structure des phages analysés, le gène codant la protéine localisée à la fin de la queue du phage, impliquée dans la reconnaissance des protéines de surface bactérienne, est hautement conservé au sein de chaque famille morphologique (Smith *et al.*, 2007b).

Des phages Stx provenant de différents sérogroupes de STEC (O157, O26, O111 et O103) ont aussi été comparés. Ces études ont montré qu’il y avait une grande divergence dans l’organisation génomique des phages Stx provenant de sérogroupes de STEC différents (Figure 14) (Ogura *et al.*, 2009, Unkmeir & Schmidt, 2000).



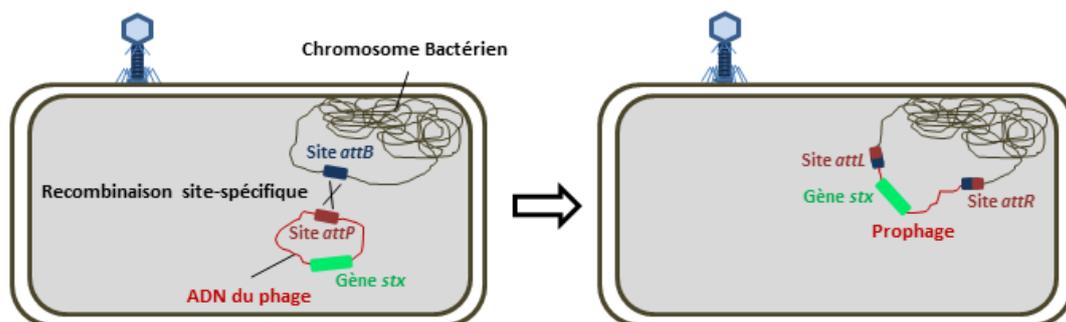
**Figure 14. Organisation des gènes de phages Stx1 et Stx2 provenant de STEC de sérogroupes différents**

IRR : Opéron *ileZ-argN-argO* (adaptée de Ogura *et al.* 2009)

La présence de séquence d'insertion (IS) comme IS629, a été observée dans certains phages, en particulier dans des phages de STEC de sérotype O157:H7 (Stanton *et al.*, 2014, Matsutani & Ohtsubo, 1990). L'intégration de ces IS entraîne typiquement des inactivations de gènes, des délétions dans des régions flanquantes du chromosome et des réarrangements génomiques (Stanton *et al.*, 2014). Par exemple, l'IS1203, identifiée chez plusieurs STEC O157:H7, a été localisée dans la région amino-terminale de la sous unité B de la Shiga-toxine, ayant donc pour effet l'inactivation du gène *stx2* (Kusumoto *et al.*, 1999).

### I.3.2. Système d'intégration spécifique de site

L'ADN des phages Stx est intégré dans le chromosome bactérien par une recombinaison spécifique de site (de type « *crossing-over* »). Cette recombinaison s'effectue entre le site *attB* de la bactérie et le site *attP* présent sur le génome du phage. L'intégrase (Int) codée par le phage reconnaît deux séquences distinctes dans les sites d'attachement (De Greve *et al.*, 2002) (Figure 15). Le site *attB* contient deux sites de fixation pour la protéine Int, appelés « sites cœur ». Le site *attP* contient lui aussi deux sites de fixation pour l'intégrase, similaires aux « sites cœur » de la bactérie, nommés « sites *arm* ». Les deux sites de fixation de Int présents dans les régions « cœur » et « *arm* » sont composés de deux motifs de séquences répétées, orientées inversement et séparées par un court espace appelé région de recouvrement (ou « *overlap region* ») contenant la séquence à échanger. Ces motifs sont reconnus spécifiquement par différents domaines de l'intégrase Int. Une fois intégré, le génome du phage est encadré par les sites hybrides ou de jonction, *attL* et *attR* (Dorgai *et al.*, 1998, Yagil *et al.*, 1995) (Figure 15). L'intégration du phage s'effectue selon trois étapes, le clivage des brins d'ADN, l'échange et la liaison des brins entre eux. Trois protéines accessoires, Xis, Fis et IHF se fixent sur une séquence spécifique de la région *arm* du site *attP*, et jouent un rôle structural dans la formation du complexe de recombinaison entre l'intégrase et les sites d'attachement (Dorgai *et al.*, 1998).



**Figure 15. Recombinaison site-spécifique pour l'insertion de l'ADN du phage dans le chromosome bactérien**

Deux grandes familles d'intégrase ont été définies, les tyrosine-recombinases et les sérine-recombinases (Groth & Calos, 2004). Les intégrases codées par les phages de type  $\lambda$  appartiennent à la famille des tyrosine-recombinases. Ces recombinases utilisent un résidu tyrosine pour cliver le brin d'ADN et reconnaissent généralement de longues séquences *attP*. Cette famille d'intégrase nécessite des facteurs supplémentaires codés par le phage et par la bactérie hôte comme le facteur d'intégration de l'hôte (IHF ou « *integration host factor* »). Les sérine-recombinases utilisent un résidu sérine pour cliver le brin d'ADN. A l'inverse des tyrosine-recombinases, cette famille d'intégrase reconnaît des séquences *attP* courtes et ne requiert pas de facteurs codés par l'hôte (Groth & Calos, 2004).

L'excision du phage est stimulée par le facteur de stimulation d'inversion (FIS) de la bactérie hôte. Durant l'induction du phage, l'excisionase Xis, si elle est produite en quantité suffisante, va entraîner l'excision du phage catalysée par l'intégrase. Les protéines Xis et FIS se fixent alors sur leurs sites respectifs (sur les sites X1 et X2 pour Xis, et F pour FIS) et induisent ainsi une courbure de l'ADN. La fixation de Xis sur X1 permet de faciliter la liaison entre Int et le site P2 (adjacent au site X1, et seulement impliqué dans l'excision) entraînant une interaction protéine-protéine et l'excision du phage (De Greve *et al.*, 2002).

### 1.3.3. Les sites d'insertion des phages Stx

L'ADN des phages Stx est préférentiellement intégré dans des gènes basiques du chromosome bactérien (Herold *et al.*, 2004). Il existe, chez les EHEC, neuf sites d'insertion potentiels des phages Stx décrits dans la littérature. Les quatre plus connus sont les sites *wrbA* codant la protéine de fixation du répresseur du tryptophane (Plunkett *et al.*, 1999), le site *yehV* codant un régulateur transcriptionnel (Yokoyama *et al.*, 2000, Creuzburg *et al.*, 2005b), le site *yecE* dont la fonction est inconnue (De Greve *et al.*, 2002) et le site *sbcB* qui code une exonucléase (Mellor *et al.*, 2012, Ohnishi *et al.*, 2002). Les cinq autres sites d'insertion sont le site Z2577 codant une oxydoréductase (Koch *et al.*, 2003), le site *ssrA* codant un ARNtm (transfert et messenger) (Creuzburg *et al.*, 2005a, Williams, 2003), le site *prfC* codant une protéine nommée « *peptide chain release factor 3* », le site *argW* codant l'ARNt-Arg (ARN de transfert de l'Arginine) et la région intergénique *torS-torT* (Ogura *et al.*, 2007, Ogura *et al.*, 2009, Shringi *et al.*, 2012).

Une étude de Mellor *et al.*, dans laquelle les sites d'insertion des phages Stx d'une collection de 606 EHEC O157:H7 ont été caractérisés, a montré que les phages Stx<sub>1</sub> et Stx<sub>2</sub> étaient plus fréquemment intégrés dans les sites *wrbA* et *yehV* aux Etats-Unis. En Australie, le

phage Stx1 a aussi été identifié, ainsi que le phage Stx<sub>2c</sub>. Cependant, ces deux phages sont préférentiellement intégrés dans les sites *argW*, *sbcB* et *yehV*. Cette différence suggère une divergence dans l'évolution des EHEC O157:H7 entre les Etats-Unis et l'Australie (Mellor *et al.*, 2013). Une autre étude a montré que les phages Stx des EHEC appartenant à d'autres sérotypes qu'O157:H7 avaient des sites d'insertion différents par rapport aux phages Stx de la souche Sakai EHEC O157:H7 (Ogura *et al.*, 2009, Ogura *et al.*, 2007).

Une étude de Steyert *et al.* (2012) a montré que, lorsque le LEE était absent, les phages Stx étaient localisés au niveau de sites d'insertion différents comme, par exemple, les gènes *potC*, *yciD*, *ynfH*, *serU* et *yjbM*. De plus, cette étude démontre qu'il n'y a pas de corrélation entre le gène *int* et le variant du gène *stx* (Steyert *et al.*, 2012).

Il est intéressant de noter qu'une souche de STEC peut posséder plusieurs copies du même phage Stx à diverses positions dans son chromosome (Fogg *et al.*, 2007).

## **II. Induction des phages Stx**

### II.1. Systèmes d'induction des phages Stx

#### *II.1.1. Aspects généraux et le système SOS*

L'induction des phages Stx permet le passage du cycle lysogénique au cycle lytique et conduit donc à la libération de nouvelles particules phagiques. La présence d'agents inducteurs, provoquant des lésions sur l'ADN, peut entraîner l'induction des phages. Les bactéries lysogènes possédant des prophages du type  $\lambda$  sont en général très stables. Cependant, en l'absence d'agent inducteur externe, une simple lésion de l'ADN (coupures) ou un arrêt de la transcription suffit à déclencher une induction dite spontanée (Tyler *et al.*, 2013, Schmidt, 2001).

Ces dommages déclenchent une cascade de régulation, le système SOS, impliqué dans la réparation de l'ADN. Le système SOS est composé du régulon LexA auquel appartient la protéine RecA, impliquée dans la réparation de l'ADN. Cependant, cette protéine permet aussi d'induire un auto-clivage des répresseurs du phage tels que la protéine cI (Tyler *et al.*, 2013, Little, 1983, Fuchs *et al.*, 1999). Une fois la protéine cI clivée, le phage entre en cycle lytique provoquant ainsi la production de nouvelles particules de phages et la synthèse des protéines de lyse. Les nouvelles particules de phages sont alors libérées de la cellule lysée et la toxine se répand hors de la bactérie. Cependant, une mutation mise en évidence dans le gène du répresseur cI permet d'empêcher l'induction du phage. Cette mutation nommée *ind*, induit le changement d'un acide aminé dans une région de la protéine cI impliquée dans l'activité sérine-protéine permettant son auto-clivage (Tyler *et al.*, 2013).

#### *II.1.2. Autre voie d'induction RecA-indépendante*

Une étude a montré qu'il existe un autre mécanisme indépendant de la protéine RecA, le système RcsABC, impliqué dans la détection par la bactérie hôte d'une mort cellulaire imminente. Ce mécanisme permet également l'induction du cycle lytique des phages (Rozanov *et al.*, 1998). Ce mécanisme est caractérisé par deux gènes d'*E. coli*, *rcaA* et *dsrA*, qui, lorsqu'ils sont surexprimés, entraînent l'induction des phages de type  $\lambda$ . Le gène *rcaA* code la protéine RcsA, un régulateur positif de transcription de l'opéron *cps* impliqué dans la synthèse de polysaccharides capsulaires. Le gène *dsrA* code un ARN de 85 nucléotides qui lève la répression du gène *rcaA* causé par la protéine « *histone-like* » H-NS (Rozanov *et al.*, 1998).

### II.1.3. Induction spontanée

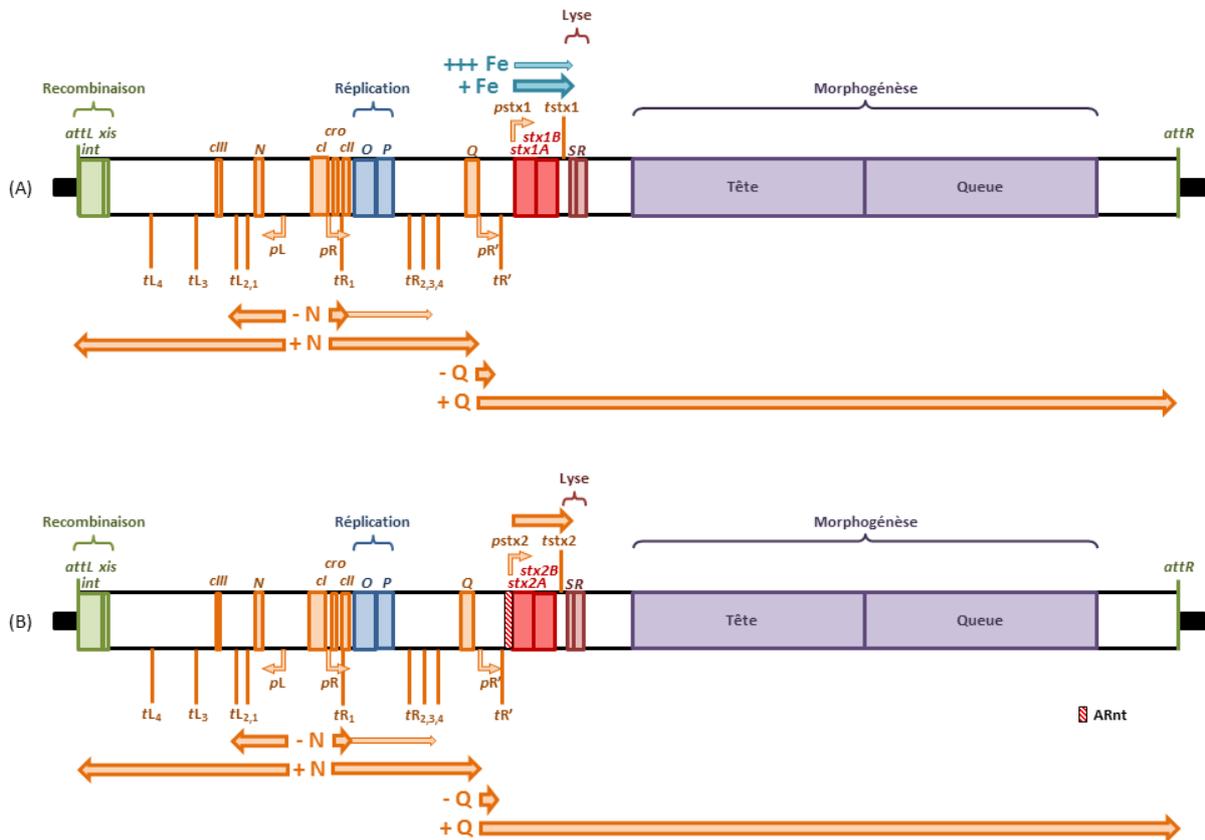
Selon une étude de Livny *et al.*, les phages Stx sont induits spontanément dans une fraction de souches lysogènes. En effet, une cellule lysogène sur 20 000 qui possède le phage Stx1 (H-19B) et une cellule lysogène sur 7 000 qui possède le phage Stx2 (933W) sont induites spontanément à chaque génération cellulaire en milieu LB (Livny & Friedman, 2004). De plus, l'induction spontanée des phages Stx est plus fréquente que celle d'autres phages de type  $\lambda$ . Grâce à des pressions de sélection, seule une petite partie de la population bactérienne possédant un phage Stx est sacrifiée pour permettre l'induction des phages Stx ainsi que la production de Shiga-toxines.

La population majoritaire restante a donc la possibilité de se développer et de coloniser les cellules épithéliales comme cela a déjà été suggéré par Wagner *et al.* (2001) (Wagner *et al.*, 2001b, Livny & Friedman, 2004). Cette population « survivante » est alors à l'origine des symptômes de diarrhée (Livny & Friedman, 2004).

### II.1.4. Conséquences de l'induction sur la production de Shiga-toxine

L'induction entraîne donc l'expression du gène *stx* et des gènes impliqués dans la lyse cellulaire et dans la morphogénèse de nouvelles particules de phages. La production de ces nouvelles particules est donc couplée à celle de la Shiga-toxine (Wagner *et al.*, 2001b, Smith *et al.*, 2012). En effet, il a été mis en évidence que la transcription des gènes *stx* est contrôlée par la protéine Q qui se fixe sur le promoteur  $p_{R'}$  (Figure 16) (Schmidt, 2001, Wagner *et al.*, 2001b, Neely & Friedman, 1998).

De plus, selon une étude de Wagner *et al.*, le phage Stx1 issu de la souche H19 (O26:H11) constitue un cas particulier puisque la transcription des gènes *stxIA* et *stxIB* est régulée par un autre promoteur,  $p_{Stx1}$ , influencé par la présence de fer (Wagner *et al.*, 2002). En effet, la transcription de ces gènes est initiée lors de la croissance de la bactérie dans un environnement pauvre en fer (Wagner *et al.*, 2002). La présence du terminateur  $t_{stx1}$  en aval des gènes *stxIA* et *stxIB* permet de terminer la transcription. La transcription des gènes de lyse n'est donc pas régulée par le promoteur  $p_{Stx1}$  mais par la voie « classique » grâce à la protéine Q et au promoteur  $p_{R'}$  (Figure 16). Le mécanisme de régulation par le fer permet d'optimiser la production de la toxine Stx1 qui s'accumule dans la bactérie dans l'attente de la transcription des gènes de lyse et donc, de la lyse cellulaire (Wagner *et al.*, 2002).



**Figure 16. Voies de transcription des gènes des phages Stx1 et Stx2**

Les génomes des phages sont représentés dans leur forme intégrée (prophage) dans le chromosome bactérien (en noir) entourés des sites jonctions *attL* et *attR* (en vert). (A) phage Stx1; (B) phage Stx2.

## II.2. Les Facteurs déclencheurs d'induction

### II.2.1. Les antibiotiques : la mitomycine C

Plusieurs antibiotiques ont un effet inducteur sur les phages Stx. Des antibiotiques, tels que le carbodox et l'olaquinox, (qui inhibent la croissance bactérienne des Gram+ et Gram-), ainsi que la norfloxacine (qui bloque la répliation de l'ADN) et l'azithromycine (qui bloque la synthèse des protéines), utilisés à des concentrations sous-inhibitrices induisent la production des phages Stx *via* le système SOS (Kohler *et al.*, 2000, Nassar *et al.*, 2013). Cependant, d'autres antibiotiques, utilisés aussi à des concentrations sous-inhibitrices, tels la rifampicine (qui bloque la transcription), l'imipénème (qui bloque la synthèse du peptidoglycane) et la gentamicine (qui bloque la synthèse des protéines) induisent aussi les phages Stx mais par une voie indépendante du système SOS (Nassar *et al.*, 2013).

Parmi les antibiotiques, la mitomycine C est une molécule fréquemment utilisée pour l'étude de l'induction des phages Stx. Cet antibiotique a été découvert dans les années 1950 par des microbiologistes japonais lors de la fermentation de *Streptomyces caespitosus*. Cette molécule a également une action antitumorale largement utilisée dans le milieu hospitalier

(Tomasz, 1995). La mitomycine C a plusieurs rôles tels que l'inhibition de la synthèse de l'ADN, la mutagenèse, la stimulation de la recombinaison génétique et l'induction de la réponse SOS (Tomasz, 1995). En effet, une étude d'Imamovic *et al.* a montré que la mitomycine C n'avait aucun effet sur l'induction des phages présents dans des souches déficientes pour le gène *recA*, démontrant ainsi que l'action de la mitomycine C est dépendante du système SOS (Imamovic & Muniesa, 2012).

Plusieurs études ont donc mis en évidence l'effet inducteur de la mitomycine C sur les phages Stx (Garcia-Aljaro *et al.*, 2009, Muniesa *et al.*, 2004a, Muniesa *et al.*, 2003, Ritchie *et al.*, 2003). Cependant, des études ont montré des variations d'induction des phages Stx2 en présence de mitomycine C. En 2003, Muniesa *et al.* ont montré que parmi des souches STEC O157:H7 isolées à partir d'une seule et même épidémie en Espagne, la production de phages Stx2 était variable (Muniesa *et al.*, 2003). Les bactéries ont alors été séparées en trois groupes selon leur niveau de production du phage Stx (faible, moyenne ou haute) après induction par la mitomycine C. Les résultats montrent qu'une forte production de phage se caractérise par une faible densité optique à 600nm ( $DO_{600nm}$ ) de la culture bactérienne, due à la lyse bactérienne par les phages, et par l'obtention d'une forte quantité d'ADN de phages libérés. Cette étude a aussi mis en évidence qu'en présence de deux phages nommés  $\Phi$ SC370 et  $\Phi$ LC159 dans la même souche, seul le phage  $\Phi$ SC370 est détecté et en quantité moyenne voire faible. Les auteurs ont suggéré que la libération de l'autre phage,  $\Phi$ LC159, était peut être masquée par celle du phage  $\Phi$ SC370. En revanche, lorsque le phage  $\Phi$ LC159 est le seul présent dans la bactérie, il devient détectable et en très grande quantité. Ces résultats ont permis de suggérer que la présence des deux phages dans le génome d'une même bactérie affectait leur induction par un système de répression (Muniesa *et al.*, 2003). Cet effet a été mis en évidence également par Watarai *et al.* qui, lorsqu'ils utilisèrent une souche possédant deux phages Stx, retrouvèrent seulement l'un des deux transféré dans une autre souche d'*E. coli* (Watarai *et al.*, 1998).

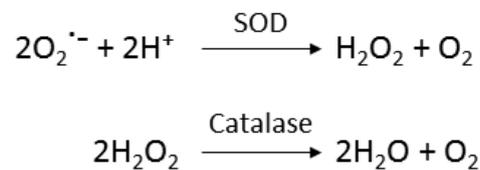
Enfin, une étude de Ritchie *et al.* a mis en évidence que la mitomycine C avait très peu d'effet sur la production de la toxine Stx1 par rapport à la toxine Stx2 issue de souches bovines (Ritchie *et al.*, 2003). En revanche, la production de Stx1 est plus forte en présence de fer en faible quantité dans le milieu de culture. Cette étude suggère que l'induction du phage Stx1 ne serait pas nécessaire pour la production de la toxine Stx1 (Ritchie *et al.*, 2003).

Une étude de Shimizu *et al.* (2009) a aussi montré que l'induction des phages Stx1 et Stx2 était différente en présence de mitomycine C.

En effet la présence de la toxine Stx2 a été mise en évidence dans la fraction extracellulaire (surnageant de culture) tandis que la toxine Stx1 n'était pas détectée dans cette fraction mais dans la fraction périsplasmique (Shimizu *et al.*, 2009). Ce résultat suggère que la libération de Stx2 est bien liée à l'induction des phages Stx2 qui entraîne la transcription des gènes *stx2* et des gènes de lyse (*S* et *R*). A l'inverse, la transcription des gènes *stx1* et des gènes de lyse sont indépendants (Shimizu *et al.*, 2009).

### II.2.2. Divers stress bactériens

Durant le stress oxydatif, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites et entraînent l'activation de protéines telles qu'OxyR, SoxRS et RpoS. Ces réponses au stress oxydatif sont importantes pour la survie de la bactérie dans les conditions d'aérobies (présence d'oxygène dans le milieu) (Glinkowska *et al.*, 2010). OxyR et SoxRS sont les régulateurs majeurs d'opérons de gènes de réponse au stress oxydatif. Des gènes comme la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase sont régulés respectivement par SoxRS et OxyR. La SOD permet de dismuter le radical super-oxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) en  $H_2O_2$ , tandis que la catalase dégrade le  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$  (Chiang & Schellhorn, 2012) selon la réaction suivante :



De plus, le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) à 3mM a été caractérisé comme agent inducteur des phages Stx d'au moins une fraction des cellules bactériennes (Los *et al.*, 2009, Los *et al.*, 2010). Les STEC peuvent être soumis à un stress oxydatif dans l'intestin lors d'une contamination humaine. En effet, les bactéries présentes dans l'intestin de l'Homme peuvent induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Kumar *et al.*, 2007). De plus, des études ont mis en évidence que les neutrophiles peuvent produire du  $H_2O_2$  entraînant une stimulation de la production de Shiga-toxine à partir d'une souche clinique de STEC (Wagner *et al.*, 2001a, Lainhart *et al.*, 2009)

Il a aussi été démontré que le chlorure de sodium (NaCl) induirait un bactériophage de type  $\lambda$  présent chez *E. coli*, le phage  $\lambda^{imm434}$  (Shkilnyj & Koudelka, 2007). En revanche, l'étude menée par Los *et al.* (2009) montre qu'il y a une induction seulement pour le phage  $\lambda$  et pas pour les cinq phages Stx testés en présence de 200 mM de NaCl dans le milieu (Los *et al.*, 2009). Contrairement à l'étude précédente, l'étude menée par Harris *et al.* (2012)

démontre qu'en présence d'une concentration de sel équivalente à celle retrouvée lors des processus de transformation de la viande (2%), des phages Stx2 peuvent être induits (Harris *et al.*, 2012). Le sel est utilisé dans la transformation de la viande afin de solubiliser les protéines myofibrillaires et d'améliorer les saveurs des produits mais aussi comme agent antimicrobien. L'utilisation d'une concentration de sel à 2% augmente significativement l'induction des phages Stx et la production de Shiga-toxine. En revanche, à une concentration de 3%, le sel provoque une diminution de l'induction des phages Stx et de la production de Shiga-toxine. Cette diminution peut être expliquée par l'effet inhibiteur du sel à cette concentration sur des processus physiologiques vitaux de la bactérie tels que la réponse SOS (Harris *et al.*, 2012) ou pourrait aussi entraîner le déclenchement du système RopS impliqué dans la survie des bactéries (Cheville *et al.*, 1996).

L'étude d'Imamovic *et al.* a montré l'effet du stress acide sur l'induction des phages Stx. Lorsque le pH est inférieur à 5,5 une inhibition de l'induction des phages Stx a pu être observée même en présence de mitomycine C. Les conditions acides permettent donc une préservation des bactéries contre la lyse ainsi qu'une survie des lysogènes dans les environnements acides tels que l'intestin de l'Homme (Imamovic & Muniesa, 2012). De plus, à pH 5,5, la transcription des gènes *stx* est très faible voire inexistante (Olesen & Jespersen, 2010). En effet, le stress acide déclenche le système RpoS impliqué dans la survie des bactéries (Cheville *et al.*, 1996). En revanche, à des pH élevés (pH 10), l'induction des phages a été observée en présence d'EDTA dans des souches *recA*-négatives (Imamovic & Muniesa, 2012).

Pour finir, l'étude de Los *et al.* a aussi mis en évidence que la température avait un effet sur l'induction des phages en présence d'autres agents inducteurs tels que la mitomycine C, l'irradiation aux UV et le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, à 30°C, l'efficacité d'induction est plus faible qu'à 37°C tandis qu'à 43°C, elle est considérablement augmentée (Los *et al.*, 2009).

### II.2.3. Autres agents inducteurs

A l'origine, le phage  $\lambda$  a été mis en évidence et isolé suite à l'irradiation aux ultraviolets (UV) de la souche d'*E. coli* de laboratoire K12 (Casjens & Hendrix, 2015). En effet, une étude a montré que l'irradiation aux UV était responsable de l'activation du système SOS chez *E. coli* (Aksenov, 1999). Yue *et al.* ont par la suite confirmé l'induction des phages Stx chez *E. coli* O157:H7 suite à une irradiation aux ultraviolets.

Ils ont aussi mis en évidence que l'augmentation de la température de 22°C à 37°C était également un facteur d'induction. Ils ont d'ailleurs montré qu'une irradiation aux UV associée à une hausse de température avaient un effet synergique (100 fois plus important) sur l'induction des phages Stx (Yue *et al.*, 2012).

Imamovic & Muniesa ont montré que l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) permettait aussi d'entraîner l'induction des phages Stx. L'EDTA est un agent chélateur et un antioxydant utilisé dans la production alimentaire, cosmétique et pharmacologique (Heindorff *et al.*, 1983, Imamovic & Muniesa, 2012). L'EDTA provoque des perturbations de la membrane externe des bactéries dues à la chélation des ions magnésium ( $Mg^{2+}$ ) augmentant ainsi la perméabilité de la membrane qui devient plus accessible à d'autres agents antimicrobiens. Ces perturbations déclenchent les systèmes de réponse au stress de l'enveloppe bactérienne différents de la réponse SOS. De plus, un effet synergique sur l'induction a pu être mis en évidence lorsque la mitomycine C est utilisée en même temps que l'EDTA (Imamovic & Muniesa, 2012).

La pression hydrostatique a aussi été caractérisée comme un agent inducteur des phages Stx (Aertsen *et al.*, 2005). En effet, de fortes pressions hydrostatiques sont utilisées dans la conservation des aliments afin d'inactiver les micro-organismes présents et de maintenir une bonne qualité de fraîcheur. Une induction des phages Stx a été observée à une pression supérieure à 250 MPa (Méga-Pascal) dans une culture de STEC mais aussi à partir d'une culture de la souche MG1655 préalablement infectée par le phage Stx. De plus, à partir d'une souche MG1655 possédant un phage Stx et modifiée pour être résistante à la pression, l'induction du phage Stx a pu être observée à une pression supérieure à 300 MPa (Aertsen *et al.*, 2005).

Pour finir, il existe plusieurs autres inducteurs des phages Stx décrits dans la littérature tels que les *DNase colicins* (des bactériocines) et l'irradiation, à faible dose, au Cobalt 60 ( $^{60}Co$ ) (Toshima *et al.*, 2007, Yamamoto *et al.*, 2003). A l'inverse, il existe des inhibiteurs d'induction des phages Stx tels que le citrate de sodium, la carence en acides aminés, l'isothiocyanate de phénéthyle (inhibiteur de la cancérogenèse et tumorigenèse) et l'oxyde nitrique (Nejman-Falenczyk *et al.*, 2012, Nowicki *et al.*, 2014, Vareille *et al.*, 2007).

### II.3. Particularités d'induction

#### II.3.1. Altruisme bactérien et réponse au stress oxydatif

Los *et al.* utilisent le terme « d'altruisme bactérien » pour évoquer un phénomène intéressant (Los *et al.*, 2012). Une fois dans l'intestin humain, les STEC sont reconnus comme étrangers à l'organisme, ce qui déclenche les mécanismes de défense de l'hôte. Lorsque les neutrophiles recrutés pour combattre les bactéries produisent du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, une partie de la population de STEC se sacrifie en induisant les phages Stx et la production de la Shiga-toxine qui a pour effet de détruire les neutrophiles. Cette induction touchant seulement une petite partie de la population, la population restante peut coloniser l'intestin humain. De plus, la présence de nouvelles particules de phages peut entraîner la lysogénéisation d'autres *E. coli* présents dans l'intestin (Los *et al.*, 2012, Wagner *et al.*, 2001a).

En revanche, la fréquence d'induction par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est assez faible, sans doute due à la présence d'un régulateur de transcription tels que la protéine OxyR stimulée lors d'un stress oxydatif. Il a été montré que ce régulateur interagissait avec l'ADN de phage de type  $\lambda$ , d'une part au niveau du promoteur *pR*, facilitant ainsi sa répression engendrée par la protéine *cI*, et d'autre part au niveau du promoteur *pL* (requis pour la production de la protéine *cI*). L'interaction de la protéine OxyR sur les promoteurs *pR* et *pL* entraîne ainsi le maintien du phage en cycle lysogénique (Los *et al.*, 2012, Glinkowska *et al.*, 2010).

#### II.3.2. Sur-infection des STEC par des phages Stx

Une étude de Serra-Moreno *et al.* (2008) a montré que lorsque deux phages Stx sont intégrés dans le chromosome bactérien, la production de Shiga-toxine et le taux d'activation du cycle lytique de chaque phage sont fortement diminués. Il semblerait que ces phénomènes soient liés au répresseur *cI* suite à l'incorporation du second prophage (Serra-Moreno *et al.*, 2008). La diminution de l'induction des phages Stx ainsi que de la production de toxine, lorsque la souche STEC possède deux phages, avait déjà été observée par Muniesa *et al.* (2003) (Muniesa *et al.*, 2003). Le cycle lysogénique semble donc être stabilisé par la présence d'un second prophage. De plus, les auteurs suggèrent que cette diminution d'induction du cycle lytique entraînerait une stabilisation de l'information génétique de la bactérie hôte (Serra-Moreno *et al.*, 2008).

De plus, dans l'étude de Serra-Moreno *et al.*, les auteurs suggèrent également que la surinfection par un phage possédant une immunité différente mais une recombinaison similaire au premier phage, conduit à la perte du premier phage, ce phénomène se nomme « *heteroimmune curing* » ou « élimination hétéro-immun » (Serra-Moreno *et al.*, 2008).

En revanche, d'autres études ont montré que la présence de deux phages serait à l'origine d'une meilleure induction du cycle lytique par rapport aux souches ne contenant qu'un seul phage (Fogg *et al.*, 2012). Les auteurs ont suggéré que, pour les doubles lysogènes, l'induction des phages Stx et la production de Shiga-toxine peuvent être supérieures ou inférieures *in vitro* à celles d'une souche simple lysogène, selon les conditions et les facteurs environnementaux. En revanche, il est difficile de prédire la production de la toxine *in vivo* par des simples ou doubles lysogènes car cette production peut dépendre de plusieurs paramètres tels que la réponse immunitaire, l'état de santé, la composition et la complexité du microbiote intestinal de l'hôte (Fogg *et al.*, 2012).

### II.3.3. Phages défectifs

Certains phages peuvent être qualifiés de « défectifs » en raison de l'existence de plusieurs défauts génétiques dans leur génome (Asadulghani *et al.*, 2009, McDonough & Butterton, 1999). McDonough & Butterton (1999) ont montré que *Shigella dysenteriae* 1 possédait le gène *stx* dans son chromosome mais qu'il n'était pas transmissible. Le gène *stx* de *S. dysenteriae* était à l'origine sur un prophage devenu défectif suite à l'insertion d'une IS et des réarrangements chromosomiques qui suivirent (McDonough & Butterton, 1999).

Asadulghani *et al.* (2009) ont mené une étude portant sur plusieurs phages de la souche Sakai, un EHEC O157:H7, dont la plupart sont défectifs. Ils ont montré que la plupart des prophages défectueux, y compris le phage Stx1, étaient inductibles et pouvaient être libérés des cellules sous forme de particules d'ADN. De plus, certains de ces prophages peuvent même être transférés à d'autres souches d'*E. coli*. D'autre part, certains phages sont inductibles que si d'autres phages sont présents, témoignant d'une interaction entre les phages. De plus, ces interactions entre phages expliqueraient l'apparition de nouveaux phages Stx1 générés par recombinaison entre les génomes de phages Stx1 et Stx2. Ces prophages défectueux ne sont pas simplement des « vestiges » génétiques générés au cours de l'évolution de la souche O157:H7, mais plutôt des éléments génétiques ayant un fort potentiel de transfert à d'autres bactéries et permettant ainsi l'acquisition de nouveaux gènes (dont des gènes de virulence) par de nouveaux hôtes (Asadulghani *et al.*, 2009).