

NOUVELLE

Les prophages Parasites cellulaires ou moteurs de l'évolution ?

Barbara Cardoso^{1*}, Camille Maillé^{1*}, Océane Reille^{1*}, Iris Veyrier^{1*},
Colin Vieillot^{1*}, Laurent Aussel²

¹Master 2 Microbiologie intégrative et fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.

²Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR7283, IMM, Marseille, France.

*Ces cinq auteurs ont participé de façon égale au travail

barbara.cardoso-domingues@etu.univ-amu.fr

camille.maille@etu.univ-amu.fr

oceane.reille@etu.univ-amu.fr

iris.veyrier@etu.univ-amu.fr

colin.vieillot@etu.univ-amu.fr

aussel@imm.cnrs.fr

> Les virus sont les entités biologiques les plus abondantes sur notre planète. Parmi eux se trouvent les bactériophages (ou phages), terme employé pour la première fois en 1917 par Félix d'Hérelle qui démontra leur aptitude à infecter spécifiquement les bactéries. De manière générale, le phage est constitué d'une tête ou capsid, à l'intérieur de laquelle est encapsidée le génome, et d'une queue de structure complexe permettant sa fixation sur la bactérie cible et l'injection de son matériel génétique. Les phages peuvent se reproduire de deux manières différentes. Les phages virulents prolifèrent uniquement grâce à un cycle lytique, marqué par la genèse de nouveaux phages et la lyse de la bactérie infectée. En revanche, les phages tempérés peuvent intégrer leur

génom dans l'ADN de l'hôte grâce à des événements de recombinaison, sous la forme d'un prophage transmis à la descendance. Ce processus est appelé cycle lysogénique [1]. Les prophages peuvent ainsi être considérés comme de véritables atouts pour les bactéries car ils constituent un moteur important et rapide de leur évolution. En effet, diverses interactions géniques existent entre les prophages et l'hôte cellulaire, les plus étudiées concernant celles qui conduisent à l'apport de gènes de virulence par le phage à la bactérie cible. Ces prophages peuvent aussi, via leur intégration durable dans le réseau bactérien, influencer le métabolisme et l'adaptation de l'hôte à un environnement changeant [2]. Il est important de noter qu'une fois intégrés

dans le génome cellulaire, les gènes viraux vont aussi être capables d'autorégulation via l'expression de protéines permettant de contrôler la stabilité du prophage dans le chromosome. L'étude de ces différentes interactions géniques constitue un véritable enjeu sanitaire car les bactériophages présents dans notre intestin ont un impact considérable sur notre microbiote. En effet, le transfert horizontal de gènes pourrait être impliqué dans l'établissement de dysbioses (perte d'équilibre de la flore microbienne), certains de ces gènes pouvant favoriser la survie des bactéries receveuses dans certaines conditions [3]. En outre, *via* le mécanisme de recombinaison spécifique de site, les prophages sont capables de s'exciser du génome

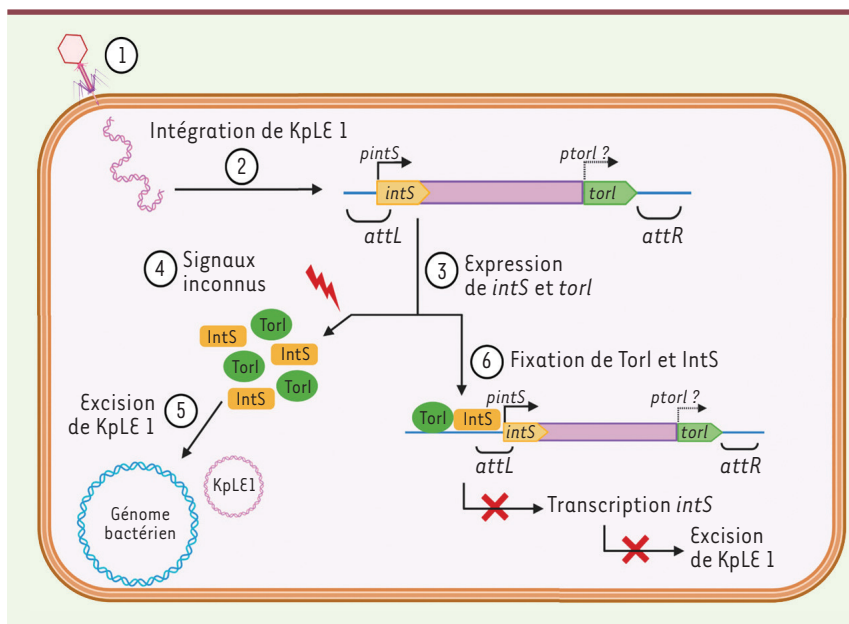


Figure 1. Régulation de l'excision du prophage KplE1. 1. L'ADN du bactériophage est injecté. 2. KplE1 est intégré dans le génome bactérien par recombinaison entre les sites *attP* (génome phagique) et *attB* (chromosome bactérien), conduisant à la formation des séquences recombinées *attL* (qui comprend le promoteur du gène *intS*) et *attR*. 3. Les protéines TorI (RDF) et IntS (intégrase) sont exprimées à un niveau basal. 4. Des signaux inconnus entraînent la surexpression de *torl* et *intS*. 5. Cela permet au prophage, via une recombinaison excisive, de s'exciser définitivement du chromosome bactérien. 6. Lorsque que les conditions environnementales sont optimales, l'expression d'*intS* est réprimée. Cette répression est assurée par une autorégulation négative d'IntS et par la protéine TorI, permettant de maintenir et

stabiliser la concentration d'IntS dans la cellule. Bactérie : *Escherichia coli* MG1655 ; ADN en rose : ADN prophagique (KplE1) ; ADN en bleu : chromosome bactérien (figure créée avec BioRender).

bactérien pour entrer dans un cycle lytique, conduisant à la lyse cellulaire. Ainsi, l'activation de prophages latents dans le microbiote intestinal constitue une véritable « bombe moléculaire » pour leur hôte, pouvant entraîner de graves conséquences écologiques comme la domination de bactéries pathogènes, favorisant ainsi l'apparition de maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn [3]. Cette nouvelle détaille les différentes régulations transcriptionnelles impliquées dans le contrôle de l'excision du prophage (interactions prophage-prophage) mais aussi celles impliquées dans l'amélioration de l'adaptabilité cellulaire (interactions prophage-hôte).

Un nouveau modèle de régulation d'excision du prophage

Pour le phage λ , virus modèle pour l'étude des mécanismes d'intégration du génome viral, la recombinaison se produit grâce à une complémentarité de séquences d'ADN phagiques et bactériennes, conduisant à la formation des séquences recombinées *attL* et *attR* présentes aux jonctions entre le chromosome bactérien et le prophage [4]. Si l'environnement de l'hôte cellulaire devient hostile, un nouvel évè-

nement de recombinaison est réalisé, permettant l'excision du prophage. Des protéines appelées intégrase et facteur de directionnalité de la recombinaison (RDF) participent à ce processus. Leurs gènes respectifs sont sous le contrôle d'un même promoteur, assurant ainsi leur expression simultanée avec pour conséquence l'excision du prophage. Cependant, cette organisation génétique n'est pas conservée chez tous les phages. En effet, pour le prophage KplE1, les gènes *intS* et *torl*, codant respectivement pour l'intégrase IntS et le RDF TorI, sont sous le contrôle de promoteurs distincts. En outre, la méthode d'extension d'amorce a permis de confirmer expérimentalement que le promoteur de l'intégrase (P_{intS}) chevauchait la séquence *attL*, avec différentes conséquences (Figure 1). Panis et al. ont voulu montrer en quoi la régulation de l'expression des gènes codant pour un RDF et une intégrase constituait un nouveau paradigme chez le prophage KplE1 [5].

L'étude *in vivo* chez *Escherichia coli* de l'activité du promoteur d'*intS* a été réalisée en fusionnant la séquence de la région *attL* (contenant le P_{intS}) au gène codant la GFP. En l'absence d'IntS ou TorI,

la fusion *PattL-gfp* est plus fortement exprimée qu'en présence de l'une de ces deux protéines, démontrant que l'expression d'*intS* est régulée négativement par la protéine TorI mais aussi par la protéine IntS elle-même (autorégulation négative). En outre, des analyses bioinformatiques ont mis en évidence, au sein du P_{intS} , de possibles sites de fixation des protéines TorI et IntS. Des expériences de mutagenèse dirigée sur ces sites dans le gène de fusion *PattL-gfp* ont permis de mettre en évidence que TorI et IntS réprimaient directement l'expression de la fusion. De plus, l'expression du gène *intS* est finement régulée. En effet, l'excision ne peut se produire qu'à des concentrations précises d'IntS, comme l'ont démontré les mesures de l'efficacité de la recombinaison « excisive » *in vitro* en fonction de la concentration de l'intégrase par PCR quantitative [5].

La localisation du prophage KplE1 dans le gène d'ARNt *argW* chez *E. coli* K-12 a son importance car des analyses bioinformatiques ont révélé que la majorité des prophages intégrés dans des gènes codant des ARNt présentaient un chevauchement du site *attL* et du promoteur *intS* ainsi qu'un mécanisme

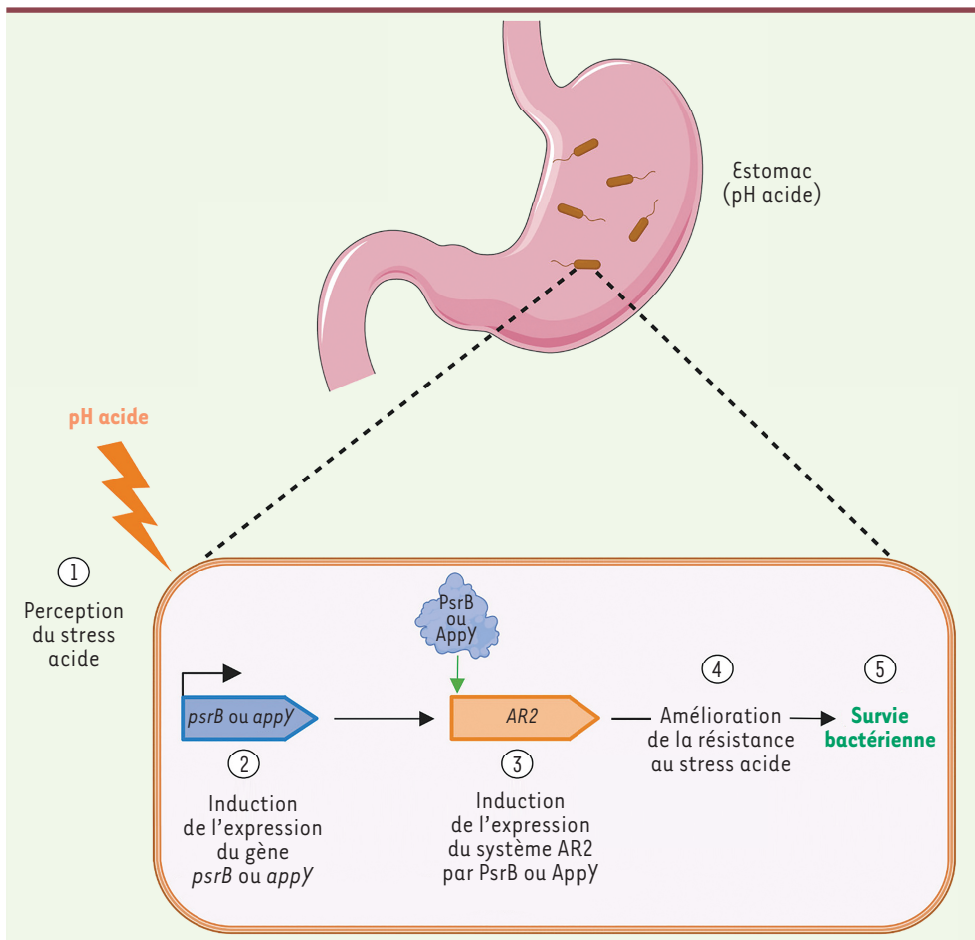


Figure 2. Adaptabilité bactérienne au pH acide par les protéines PsrB et AppY lors de la traversée de l'estomac. 1. Au cours de son processus de colonisation, la bactérie *Escherichia coli* doit traverser la barrière acide de l'estomac [7]. 2. L'acidité du pH, perçue par la bactérie, entraîne l'expression des gènes *psrB* ou *appY* [6,8]. 3. Une fois synthétisées, les protéines PsrB ou AppY activent l'expression du système AR2 [6,8]. 4-5. Les protéines codées par ce système permettent d'améliorer la résistance bactérienne au stress acide et donc sa survie [7,8] (figure créée avec BioRender).

d'autorégulation négative de l'expression d'*intS* similaire à celui observé dans le prophage KplE1. Par extension, ce mécanisme de régulation de l'excision pourrait aussi être retrouvé dans de nombreuses espèces bactériennes, y compris pathogènes. À titre d'exemple, ce processus d'inhibition de l'excision pourrait être présent chez la bactérie *Vibrio cholerae*. La virulence de cette bactérie est assurée par la présence d'îlots de pathogénicité (segments d'ADN de tailles variables, contenant un ou plusieurs gènes de virulence), dont un dénommé VPI-2. Le gène de l'intégrase bactérienne responsable de la conservation de VPI-2 se trouve à proximité du locus de l'ARnt sérine. Cette proximité avec un gène d'ARnt suggère l'existence d'un mécanisme d'autorégulation négative de l'expression de cette intégrase similaire à celui de l'intégrase du prophage KplE1 [5].

Protéines prophagiques et survie bactérienne

Certains prophages, devenus défectifs par accumulation de mutations, peuvent perdre leur capacité à lyser leur hôte et à être intégrés durablement dans le réseau de gènes de régulation bactériens. Cette domestication a même placé certaines protéines prophagiques au cœur de la régulation de la survie bactérienne, constituant parfois un véritable avantage évolutif pour la cellule hôte. La protéine AppY illustre parfaitement cette conversion lysogénique. AppY est un régulateur transcriptionnel de la famille AraC/XylS codé par un prophage défectif (phage DLP12) et présent dans le génome d'*E. coli* K-12. Des expériences de Chip-Seq (*chromatin immunoprecipitation-sequencing*), méthode d'analyse des interactions entre protéines et ADN permettant d'identifier les gènes cibles de régulateurs transcriptionnels, ont révélé qu'AppY modulait directement l'expres-

sion de 13 gènes bactériens [6]. Notamment, dans des conditions de stress comme le stress acide, AppY a un rôle central dans l'expression de protéines bactériennes régulatrices. Derdouri et *al.*

se sont alors demandé comment la pléiotropie d'une protéine d'origine phagique permettait d'améliorer significativement la survie de l'hôte bactérien. En effet, AppY joue un rôle important dans la formation des biofilms, des communautés multicellulaires protégeant et améliorant la survie des bactéries dans un environnement hostile. En outre, AppY participe à la diminution de la motilité bactérienne. Il est probable que ce défaut sévère de motilité permette à la bactérie de mobiliser plus d'énergie pour la mise en place de différents types de réponses au stress environnant. Par ailleurs, il est aussi possible que cette répression se produise lors des premières étapes de la formation d'un biofilm, quand la perte de la motilité est essentielle à l'établissement d'une vie sessile. Enfin, AppY contribue à l'activation du système majeur de résistance au stress acide, dénommé AR2 (*acid-resistance system 2*) [6]. Ce dernier permet à *E. coli*



Entretien avec Mireille Ansaldo et Aurélia Battesti



Mireille Ansaldo, directrice de recherche au CNRS, et Aurélia Battesti, maître de conférences à Aix-Marseille Université, travaillent au Laboratoire de Chimie bactérienne (LCB) de Marseille. Elles sont spécialisées dans l'étude des interconnexions qui existent entre les prophages et les génomes bactériens, d'un point de vue évolutif et mécanistique. Le collectif Phages.fr, auquel appartient Mireille Ansaldo, a reçu en 2018 le prix François Sommer Homme Nature par la Fondation Sommer.

Qu'est-ce qui vous a poussées à travailler dans la recherche ?

Mireille Ansaldo : Initialement, je voulais faire des études courtes. J'ai donc choisi un BTS. Après cette formation en biotechnologies, j'ai travaillé comme technicienne dans un laboratoire mais je me suis rendu compte que je souhaitais finalement continuer mes études. Je suis donc retournée à l'université et je ne me suis plus arrêtée.

Aurélia Battesti : Je suis également allée à l'université sans savoir précisément quel métier je voulais exercer. Une fois en maîtrise, ma rencontre avec des professeurs de microbiologie passionnants m'a donné envie de continuer dans ce domaine. C'est lorsque je suis rentrée dans un laboratoire que j'ai compris que je voulais faire de la recherche.

Quel aspect des bactériophages vous intéresse le plus ou attise le plus votre curiosité ?

MA : Cette question est compliquée car la recherche sur les bactériophages présente de multiples facettes et c'est cela que je trouve passionnant. La recherche fondamentale me captive ; par exemple, je suis en train de développer un projet sur la « dark matter », c'est-à-dire les réserves de gènes que l'on peut trouver dans les organismes vivants et particulièrement dans les virus pour lesquels nous n'avons pas de classification. De plus, les applications m'enthousiasment tout particulièrement. Ainsi, une partie de mon laboratoire travaille sur des applications presque commerciales ; chaque étape entre la recherche fondamentale et les applications finales suscite un vif intérêt.

Qu'est-ce que vos recherches apportent à votre enseignement, et réciproquement ?

AB : C'est une vaste question ! D'une part, mon enseignement bénéficie de mon travail de recherche. J'ai la chance d'enseigner dans une unité de virologie et je peux progressivement enrichir mes cours. En effet, de par mon métier de chercheuse, je suis amenée à conduire de nombreux projets dans le laboratoire, mais aussi à consulter les derniers articles parus sur les bactériophages. Ainsi, mon travail de recherche profite à mes cours qui visent à être toujours à la page. Par ailleurs, j'adore partager et échanger avec les étudiants sur mes activités au laboratoire. D'autre part, l'enseignement représente

aussi une précieuse aide pour mon travail de recherche : il peut constituer une coupure salutaire surtout lorsque je rencontre des obstacles au laboratoire. Prendre du recul aide à porter un regard neuf sur les difficultés afin de pouvoir les surmonter. Enfin, certaines questions d'étudiants me poussent à me poser des questions différemment, m'apportant un éclairage nouveau. Voilà pourquoi, enseignement et recherche sont pour moi deux activités complémentaires.

Pensez-vous que les bactériophages deviendront un traitement pour faire face à la résistance aux antibiotiques en France ?

AB : Je l'espère ! Les congrès portant sur les bactériophages réunissent de plus en plus de médecins, ce qui témoigne d'un intérêt grandissant pour la phagothérapie. En effet, ses applications sont toujours assez spectaculaires et constituent pour moi un véritable espoir pour l'avenir, en tant que chercheuse mais aussi en tant que citoyenne.

MA : Je partage tout à fait le point de vue d'Aurélia ! Le plus compliqué, c'est d'intégrer à nouveau des médicaments qui ont été sortis de la pharmacopée. C'est particulièrement complexe car ce changement repose sur une adaptation des règlements européens sur le médicament, ce qui est en cours de discussion. Nos voisins belges ont beaucoup fait bouger les choses avec un hôpital qui pratique la thérapie phagique depuis plusieurs années déjà. Cette pratique a été autorisée par le gouvernement dans la mesure où les bactériophages ne sont pas des médicaments classiques : ce ne sont pas des molécules chimiques. J'espère vivement qu'en France, nous trouverons également un moyen pour adapter à notre tour la phagothérapie à la réglementation du médicament. Parce que, même si la phagothérapie n'est pas une solution miracle, on pense clairement que, dans certains cas, c'est une alternative ou un complément de thérapie qui permettra de faire avancer significativement les choses sur le plan des maladies infectieuses.

AB : Oui, on voit que ça bouge aussi en France ! Des projets réunissent des équipes françaises qui ont trouvé des financements. Il y a ainsi un « réseau phages » qui commence à se constituer. C'est très prometteur !

Quelles découvertes vous ont rendues les plus fières ?

AB : Toutes ! Je crois que quand on a consacré beaucoup de temps à un projet, à essayer de comprendre un mécanisme, une voie de régulation, on est toujours fière d'aboutir à quelque chose, d'apporter notre pierre à l'édifice et d'essayer de contribuer à la « connaissance » à notre niveau.

MA : Aucune de mes découvertes ne me rend plus fière qu'une autre. J'ai quelques années de carrière et j'ai travaillé sur des sujets très différents. Je me rends compte que, finalement, aucune découverte ne l'emporte sur une autre ; je suis passionnée à l'heure actuelle comme je l'étais il y a 20 ans.

Quels sont vos projets pour l'avenir à moyen terme dans vos recherches scientifiques ?

MA : Pour moi, la réponse est facile : mon métier actuel consiste à écrire des projets, ce qui occupe quasiment tout mon temps. Mes projets à l'heure actuelle sont concentrés autour du minage

de la « *dark matter* » : arriver à comprendre quels sont ces gènes nouveaux dont on connaît déjà parfois, mais pas toujours, les fonctions. Je pense qu'il y a encore énormément de choses à trouver dans cette « *dark matter* », comme cela a été le cas avec la découverte des anti-CRISPR codés par les bactériophages permettant de contrôler l'activité CRISPR. C'est pourquoi j'essaie de concrétiser, avec des collègues européens, des projets qui allient différents aspects de prédictions qui pourraient conduire à de nouvelles pistes que d'autres laboratoires plus expérimentaux pourraient alors tester. C'est là un projet qui me tient vraiment à cœur pour les années à venir !

AB : Travaillant dans le laboratoire de Mirelle, j'étudie l'apport de prophages : ce sont des phages qui sont intégrés dans le chromosome bactérien participant à la physiologie bactérienne. Ainsi, j'essaie de comprendre comment des gènes d'origine phagique peuvent aider la bactérie à survivre dans certaines conditions de stress. Actuellement, j'étudie plus particulièrement des régulateurs transcriptionnels d'origine phagique. Grâce à de nombreuses collaborations au sein du laboratoire, des analyses globales ont pu être développées, en utilisant par exemple le RNA-Seq et le Chip-Seq. Nous avons déjà étudié deux régulateurs transcriptionnels et évalué leur impact sur la physiologie bactérienne. Donc, mon projet consiste à continuer dans cette voie-là, continuer à comprendre comment ces gènes d'origine virale peuvent faire évoluer le génome bactérien.

Quels sont, selon vous, les moyens de communication les plus efficaces pour sensibiliser le grand public aux sciences ?

MA : Je pense qu'il n'y a pas de formule magique. Sensibiliser le grand public, c'est déjà en avoir envie. Ce n'est pas qu'une question de moyen ou de média, c'est d'abord une volonté, une envie particulière de communiquer avec le public. Moi, ça fait des années que je fais des interventions pour le public. J'ai commencé à destination des plus jeunes : dans les écoles mater-

nelles et primaires. Je me suis beaucoup investie dans le laboratoire en participant au programme « Diffusons la science » pendant la période Covid. Communiquer me passionne. Le défi majeur est alors de vulgariser, c'est-à-dire raconter ce que je fais avec des mots simples. Le plus agréable est de constater que l'auditoire parvient à comprendre des notions qui lui sont au départ étrangères, ou la plupart du temps inaccessibles car les médias n'en parlent pas. Outre le contenu scientifique, l'oralité et le contact avec le public sont aussi pour moi extrêmement importants.

Que pensez-vous de la place des femmes dans le monde de la recherche scientifique ?

MA : Là aussi, c'est une question un peu complexe, présentant de multiples facettes. Comme je fais partie de différentes instances du CNRS, je suis bien placée pour mesurer la place des femmes dans le monde de la recherche scientifique : c'est très simple, plus le poste est élevé, plus la part des femmes se réduit. Toutefois, cela varie également en fonction des disciplines. Par exemple, en sciences biologiques, nous sommes particulièrement mauvais à cet égard.

En effet, la grande majorité des postes de techniciens ou d'ingénieurs sont occupés par des femmes ; elles sont déjà moins nombreuses comme chercheuses et quasiment inexistantes dans les postes de directeurs de recherche, voire directeurs de recherche classe exceptionnelle. Le plafond de verre saute aux yeux. Pour le briser, le CNRS, comme d'autres organismes de recherche, a mis en place des plans sur l'égalité des chances et sur les opportunités femmes/hommes dans les carrières, mais cela progresse bien doucement, doucement, doucement ...

AB : La bonne nouvelle, c'est que nous sommes ici deux femmes et que Mireille est cheffe d'équipe, directrice de recherche et co-directrice du LCB ! Donc c'est prometteur, c'est un exemple inspirant et encourageant pour la suite.

de résister à la forte acidité de l'estomac rencontrée lors de sa traversée vers l'intestin [7]. De plus, il a été démontré chez une espèce d'*E. coli* entéro-hémorragique que des protéines régulatrices homologues à AppY et codées par des gènes prophagiques, telles que P_{srB}, permettaient de résister au stress acide de l'estomac chez la souris via l'activation du système AR2 (Figure 2) [8]. Ainsi, il est envisageable qu'AppY puisse favoriser la survie d'*E. coli* confronté au pH acide de l'estomac [6]. À ce jour, nombreux sont les gènes de prophages exprimés dans les cellules et dont la fonctionnalité n'a pas encore été caractérisée. Ainsi, la mise en évidence du rôle crucial d'AppY dans la régulation de nombreux processus bactériens chez *E. coli* souligne l'importance des études visant à mieux caractériser les prophages bactériens, et

leurs rôles dans la physiologie bactérienne. Par conséquent, la compréhension de la biologie cellulaire bactérienne ne peut être complète sans l'étude des nombreuses interactions géniques intervenant entre l'hôte et le prophage, mais également de celles qui ont lieu au sein même du prophage et qui permettent de contrôler son devenir dans la bactérie. Il apparaît désormais essentiel de définir davantage la diversité des prophages mais aussi leurs mécanismes de régulation et leurs apports évolutifs afin de progresser dans notre connaissance de la physiologie bactérienne. ♦

Prophages: Cellular parasites or driving force of evolution?

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

1. Oppenheim AB, Kobiler O, Stavans J, et al. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet* 2005 ; 39 : 409-29.
2. Wahl A, Battesti A, Ansaldo M. Prophages in Salmonella enterica: a driving force in reshaping the genome and physiology of their bacterial host? *Mol Microbiol* 2019 ; 111 : 303-16.
3. Norman JM, Handley SA, Baldrige MT, et al. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 2015 ; 160 : 447-60.
4. Van Duyne GD, Lambda Integrase: Armed for Recombination. *Curr Biol* 2005 ; 15 : 658-60.
5. Panis G, Duverger Y, Courvoisier-Dezord E, et al. Tight Regulation of the intS Gene of the KpIE1 Prophage: A New Paradigm for Integrase Gene Regulation. *PLoS Genet* 2010 ; 6 : e1001149.
6. Derdouri N, Ginet N, Denis Y, et al. Pleiotropic effects of AppY, an AraC-like regulator from prophage origin, on *E. coli* physiology. *bioRxiv* 2022.
7. Foster J.W. Escherichia coli acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2004 ; 2 : 2898-907.
8. Yang J, Russell TW, Hocking DM, et al. Control of Acid Resistance Pathways of Enterohemorrhagic Escherichia coli Strain EDL933 by P_{srB}, a Prophage-Encoded AraC-Like Regulator. *Infect Immun* 2015 ; 83 : 346-353.