



## BIOLOGIE STRUCTURALE

Les bactériophages, virus qui attaquent les bactéries, sont l'entité biologique la plus abondante et la plus diversifiée sur Terre. Ils sont présents dans tous les biotopes, de la haute atmosphère aux fosses océaniques profondes en passant par notre corps. Tueurs de bactéries, mais également vecteurs d'information génétique entre bactéries, les phages ont un rôle essentiel dans l'évolution, la diversité et la régulation des populations bactériennes. Ils jouent également un rôle important dans l'acquisition de toxines par les souches bactériennes qui peuvent alors devenir infectieuses pour l'homme.

# Les phages, ces





# tueurs de bactéries

**Ils sont partout !**

Les phages sont l'entité biologique la plus abondante sur Terre.

Texte et conception : Marc Jary  
Photos : Marc Jary, CEA IBS



Dans le cadre des conférences Midi Minatec, Cécile Breyton, directrice de recherche au CNRS, chef de l'équipe "Structure et stabilité des protéines membranaires intégrales et d'assemblages de phages" à l'Institut de Biologie Structurale, a fait découvrir aux chercheurs et à des jeunes venus nombreux dans le cadre de la fête de la Science un monde inconnu : celui des phages. Comment ces virus naturels et guérisseurs présentent peut-être LA solution pour traiter les maladies infectieuses dues à des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques ? Comment les phages ont permis le développement de la génétique moderne et de la biologie moléculaire ? *Le Mensuel* vous propose un voyage en microbiologie, à la découverte des phages.

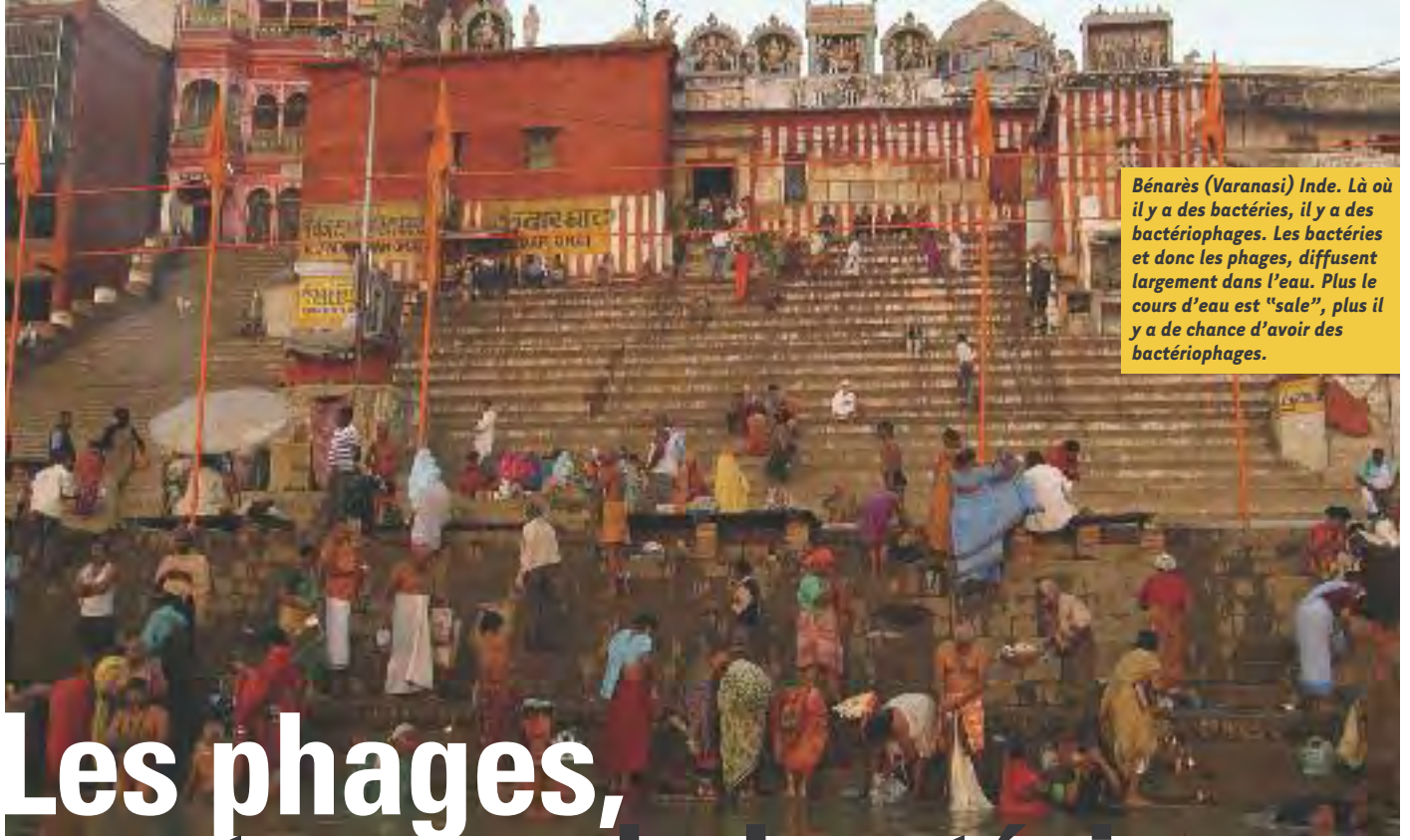


L'équipe Structure et stabilité des protéines membranaires intégrales et d'assemblages de phages de l'IBS. De gauche à droite : Christine Ebel, Romain Linares, Cécile Breyton, Charles Arnaud, Séraphine Crassac et Aline le Roy.



Cécile Breyton, directrice de recherche au CNRS, et Romain Linares post doc à l'Institut de Biologie Structurale.

M. JARY / DR / CEA



Bénarès (Varanasi) Inde. Là où il y a des bactéries, il y a des bactériophages. Les bactéries et donc les phages, diffusent largement dans l'eau. Plus le cours d'eau est "sale", plus il y a de chance d'avoir des bactériophages.

# Les phages, ces tueurs de bactéries

**1896. Le Gange à la confluence des croyances et de la science. Tant de baigneurs au même endroit, voilà qui doit créer un impressionnant bouillon de culture !**

Le phénomène surprend Ernest Hankin, un bactériologiste britannique missionné en Inde, qui étudie le Gange et un de ses affluents le Yamuna. Il remarque qu'il y a peu de bactéries par rapport aux risques de contamination. "Comment se fait-il que lorsque le choléra éclate sur un lieu de pèlerinage, placé sur les rives d'un des fleuves, il ne descende pas dans les villages placés en aval ?" Le choléra étant une maladie hydrique, c'est-à-dire transportée par l'eau, sa propagation devrait en effet suivre les flots. Hankin engage alors une série d'expériences, qui seront publiées en 1896 par l'Institut Pasteur. En travaillant sur *Vibrio cholerae*, il isole "un potentiel anti bactérien" par filtration sur un filtre de porcelaine (absence de bactéries sur le filtre mais présence d'un "potentiel anti bactérien"). Hankin montre qu'une substance contenue dans les eaux des deux fleuves, invisible avec les microscopes de l'époque et plus petite que les bactéries du choléra, tue ces dernières avec une redoutable efficacité. Sans le savoir, Hankin vient de réaliser la première observation d'un type de virus que l'on retrouve partout sur la planète, et qui s'attaque uniquement aux bactéries. Il faudra attendre vingt ans pour que Félix d'Hérelle en fasse une étude plus complète. Le biologiste franco-canadien met en évidence qu'il s'agit "d'entités biologiques" qui sont capables, après filtration, de détruire des cultures bacté-

riennes (plage de lyses) <sup>(1)</sup>. En 1922, Félix d'Hérelle nomme cette entité biologique "bactériophage", les mangeurs de bactéries. Le chercheur envisage immédiatement leur utilisation pour éliminer des bactéries pathogènes et traiter des infections. Il est ainsi considéré comme le précurseur de la phagothérapie (la thérapie par les phages). "Puisque ces virus sont capables de tuer une espèce de bactérie, pourquoi ne pas les utiliser pour éliminer une bactérie pathogène ?" C'est la base de la phagothérapie (lire page 12).

**Présents dans l'ensemble de la biosphère**  
"Chaque type de phages reconnaît une espèce, voir une sous-espèce de bactérie. Un bactériophage ne va donc pas infecter et éliminer toutes les bactéries, mais uniquement celles qui vont être reconnues par le phage et permettre sa multiplication. De par sa grande spécificité, un bactériophage ne pourra jamais infecter une de nos propres cellules ou autres cellules animale ou végétale."  
"Présents dans l'ensemble de la biosphère, les bactériophages constituent l'entité biologique la plus répandue et la plus diversifiée : on estime leur nombre à  $10^{31}$  sur Terre. Mis bout à bout ces phages couvriraient une distance de  $10^8$  années lumière !, précise Cécile Breyton. Ils jouent un rôle environnemental essentiel, notamment en régulant la croissance bactérienne mais également en contribuant à l'évolution génétique de nombreux microorganismes. L'étude des bactériophages a contribué au développement de nos connaissances du vivant et à l'essor de la biologie

moléculaire. Actuellement, avec l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, les phages sont considérés comme une alternative plus que prometteuse aux antibiothérapies classiques." ■

(1) En biologie, la lyse est la destruction de la membrane plasmique de cellules eucaryotes ou bactéries par action d'un agent physique, chimique ou biologique et menant à la mort de la cellule. Les produits résultants sont des lysats.

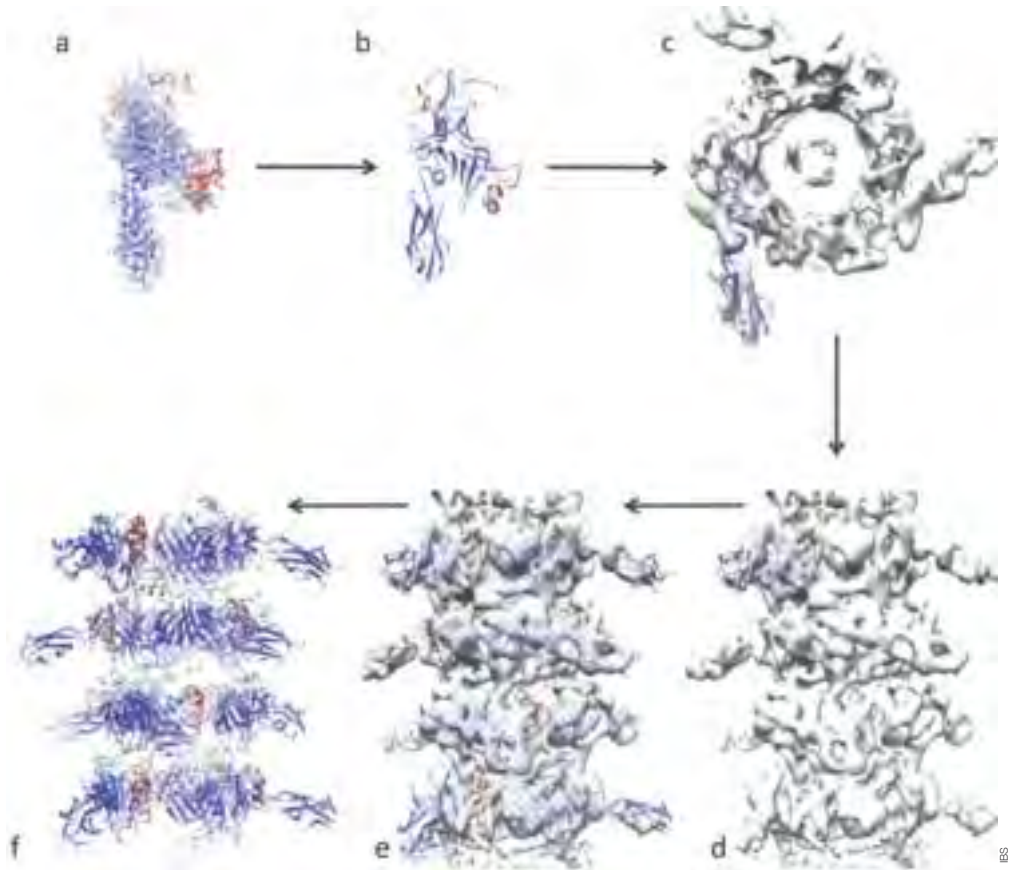
**> BIO EXPRESS**  
**ERNEST HANKIN, bactériologiste anglais, en mission en Inde, a étudié la malaria, le choléra et d'autres maladies. On le considère comme le premier à avoir détecté l'activité de bactériophage et à avoir suggéré que leur présence dans les eaux du Gange et de Yamuna pouvait avoir eu un rôle dans la limitation des éruptions de choléra.**



Ernest Hankin

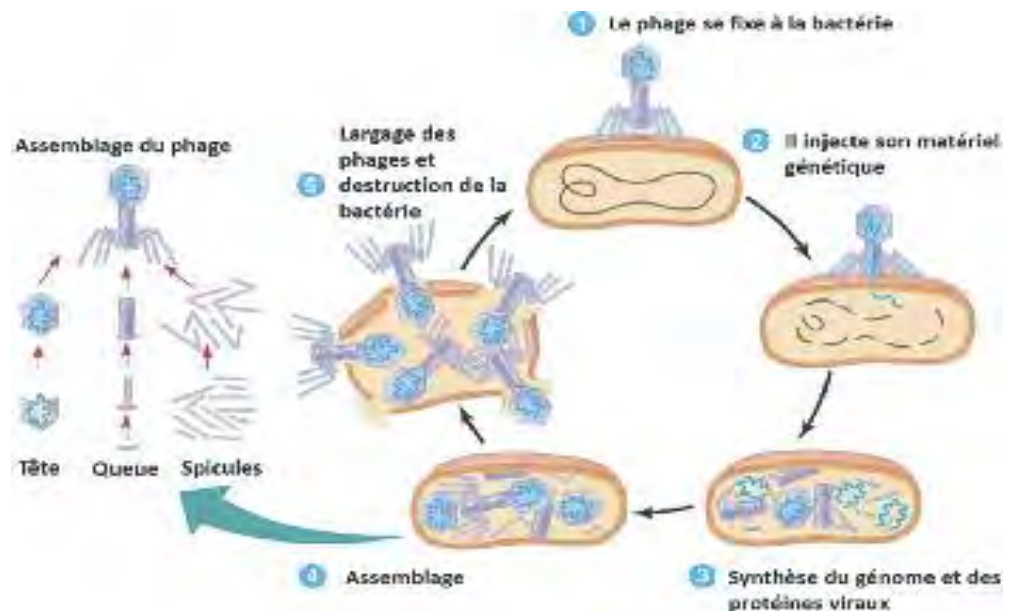
# Cycle de vie des phages: le cycle lytique conduit à la mort bactérienne

**L**orsqu'un bactériophage est en présence d'une bactérie hôte, il va se fixer sur des récepteurs spécifiques situés à la surface de la bactérie: c'est l'adsorption. Le virus va alors injecter son ADN à l'intérieur de la bactérie. Celui-ci va détourner la machinerie bactérienne qui va devenir une usine à fabriquer des bactériophages. Une centaine de virus sera ainsi produite par chaque bactérie infectée qui va finir par lyser (exploser) pour laisser sortir les bactériophages. Ceux-ci vont pouvoir ainsi infecter d'autres bactéries hôtes. C'est ce que l'on nomme le cycle lytique. Certains types particuliers de bactériophages sont également capables d'intégrer leur matériel génétique dans le génome de la bactérie hôte. On parle alors de phages lysogènes. La bactérie hôte ne sera pas lysée mais son génome va contenir et exprimer certains gènes du phage. Ceux-ci peuvent coder pour de dangereuses toxines. Certaines souches d'*E. coli* ou le *Vibrio cholera*, par exemple, deviennent pathogènes grâce à l'ADN d'un phage intégré dans leur génome. En conditions défavorables pour la bactérie, le phage lysogène redevient lytique et de nouveaux phages sont produits et libérés par la bactérie.



Combinaison de données de cristallographie et de microscopie électronique pour obtenir un modèle atomique de la queue du phage T5 (f). Structure de la protéine majeure de queue déterminée par cristallographie à 2,2 Å de résolution, représentée en tout atome (a) et en ruban (b). Cette structure peut être ajustée dans la structure du tube de la queue du phage T5 obtenue par microscopie électronique à 6 Å de résolution, vue de dessus (c) et de côté (d et e).

### LE CYCLE DES PHAGES





IBS/GUY SCHOEHN

## L'IBS, une structure unique en France

L'Institut de Biologie Structurale (IBS) est une structure de recherche dédiée à la biologie structurale intégrée. Il s'agit d'une Unité Mixte de Recherche (UMR 5075) créée par le CEA, le CNRS et l'Université Grenoble Alpes (UGA).

Dans son étude structurale et fonctionnelle des macromolécules biologiques (notamment des protéines), l'Institut propose une approche multidisciplinaire, aux frontières de la biologie, de la physique et de la chimie, alliant recherche fondamentale, recherche appliquée et innovation technique. Ses thématiques sont développées au sein de dix-huit groupes de recherche, regroupant environ 270 personnes. Les recherches sur les phages s'intègrent ainsi parfaitement dans les missions de l'IBS puisque l'Institut est composé de trois axes de recherche : infection et médecine moléculaire, signalisation et transports membranaires et biophysique et chimie pour la biologie structurale. Les recherches sur les phages relèvent des thématiques "Membranaire" et "Infection" de l'IBS. Les scientifiques de l'IBS participent activement à la formation des étudiants, élèves de master et doctorants et plus de vingt professeurs



M. JARY / DR / CEA

Guy Schoehn est responsable du groupe et de la plate-forme microscopie électronique à l'Institut de Biologie Structurale. Le chercheur est devant un microscope électronique Polara à très haute résolution pour l'étude des échantillons biologiques.

et maîtres de conférences enseignent à l'Université Grenoble Alpes. ■

# Une plate-forme accessible au monde académique et industriel

**L**a plate-forme de microscopie électronique de l'Institut de Biologie Structurale est adossée au groupe de microscopie électronique de l'Institut. Elle est labélisée ISO9001 : 2008 et NF X50-900 et sept personnes (techniciens, ingénieurs et chercheurs) du groupe de microscopie électronique consacrent une partie de leur temps à maintenir cette plate-forme à son meilleur niveau et à la faire fonctionner. Trois modalités de prestations sont proposées. La première correspond à des prestations de service. Les chercheurs fournissent les échantillons et repartent avec les images. La seconde, la plate-forme est mise à disposition : les instruments peuvent alors être utilisés par des experts. Enfin, un volet formation : "Si cela se justifie, nous formons les utilisateurs pour qu'ils puissent être indépendants sur nos instruments", précise Guy Schoehn, responsable de la plate-forme. Ces offres sont accessibles au monde académique et industriel, national et international. "Nous possédons une expertise reconnue dans l'observation et la résolution de structure de particules isolées par coloration négative ou cryo-microscopie mais



Phages T4 (queue contractile) observés en coloration négative.

GUY SCHOEHN / IBS

également dans la préparation et l'observation d'échantillons plus épais (tels que cellules, bactéries, tissus etc.) grâce à la microscopie électronique cellulaire", souligne Guy Schoehn. Celle-ci est équipée de trois

microscopes électronique à transmission et de tous les instruments annexes permettant de préparer les particules isolées ou les échantillons épais dans le but de les observer ensuite par microscopie électronique. ■

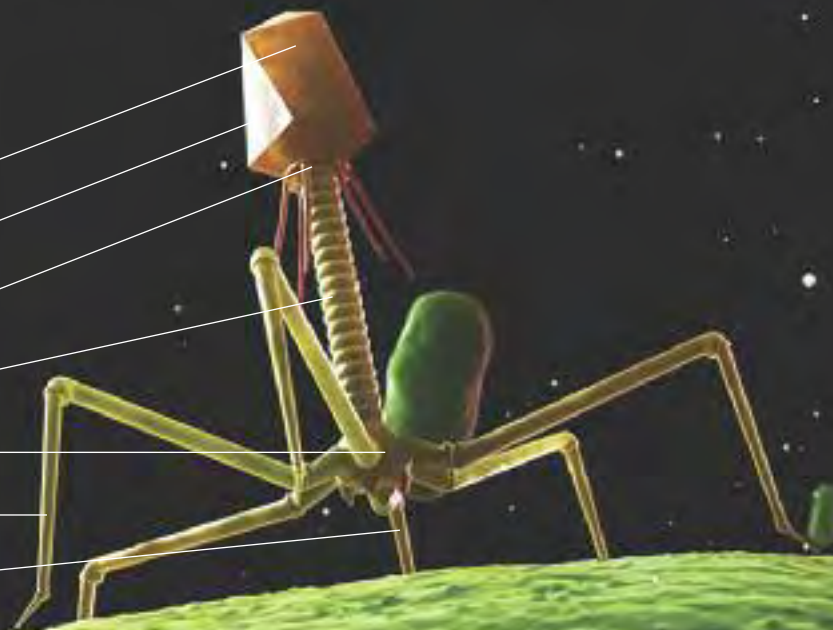
**FELIX D'HÉRELLE** (debout au centre) et ses collaborateurs dans son laboratoire. En 1917, Félix d'Hérelle, chercheur à l'Institut Pasteur de Paris, observa un phénomène étrange : des agents qui détruisaient les bactéries ! Il leur donna le nom de bactériophages, ou "mangeurs de bactéries". Cent ans plus tard, les bactériophages reviennent dans l'actualité scientifique, en raison de l'augmentation des résistances aux antibiotiques.



INSTITUT PASTEUR

## Structure d'un bactériophage

- Tête
- ADN
- Collier
- Gaine
- Plateau
- Fibres caudales
- Crochets



*Certains phages avec leurs têtes à symétrie icosaédrique, leurs longues queues et surtout leurs six fibres terminales en forme de « pattes d'insectes » ressemblent au L.E.M (module lunaire) des missions Apollo.*

*Le phage est l'entité biologique la plus abondante sur Terre. Échantillon d'eau de mer marqué par fluorescence (visualisation de l'ADN) :  $10^6$  à  $10^8$  particules virales par millilitre, 50 génotypes par litres soit  $10^{31}$  phages sur Terre. Les plus grosses tâches correspondent à des bactéries, toutes les petites à des virus, en grande majorité à des phages.*



# Des virus contre les bactéries

Après la découverte des bactériophages par Félix d'Hérelle en 1922, l'utilisation des phages a été rapidement reconnue par un grand nombre de scientifiques comme étant une voie possible pour combattre les infections bactériennes. Avant un retour en Europe ? Rien n'est fait d'un point de vue réglementaire, mais les travaux scientifiques avancent.



INSTITUT ELIAVA

▲ *L'institut Eliava de Tbilissi, totalement dédié à la phagothérapie, est l'aboutissement de l'expertise scientifique et médicale de plus de 90 ans d'expérience dans la thérapie bactériophage.*

▲ **L**a phagothérapie est l'utilisation de virus bactériophages lytiques afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. "Ce traitement a été utilisé avant la découverte des antibiotiques. Si elle a été progressivement abandonnée par les pays occidentaux séduits par les avantages de l'antibiothérapie, la phagothérapie traditionnelle est toujours employée et développée dans les pays de l'ancienne Union Soviétique", rappelle Cécile Breyton.

▼ Mais depuis les années 1990, l'utilisation des bactériophages est reconsidérée dans de nombreux

pays devant le double constat du développement inquiétant des infections nosocomiales à bactéries multi résistantes aux antibiotiques et de l'absence de nouveaux antibiotiques efficaces.

En septembre 2017, la revue *Futura Santé* rapporte les faits : "Deux patients qui souffraient d'infections ostéo-articulaires ont guéris grâce à des virus mangeurs de bactéries. Cette avancée majeure a été obtenue aux Hospices Civils de Lyon (HCL) grâce à des virus préparés par la société Pherecydes Pharma." Aujourd'hui, des applications sont envisagées non seulement dans le domaine médical mais aussi dentaire, vétérinaire, agricole ou environnemental...

Si Félix d'Hérelle initie la phagothérapie à travers le monde, un Géorgien, George Eliava, qui avait travaillé à l'Institut Pasteur de Paris, avec d'Hérelle, a créé en 1923 à Tbilissi (Géorgie) un institut de virologie. C'est ensemble qu'ils développent à partir de 1930 l'étude des bactériophages et l'application de la phagothérapie pour l'ensemble de l'Union Soviétique. L'Institut géorgien George Eliava, possède une grande collection de bactériophages thérapeutiques. Les phagothérapeutes géorgiens ont quatre-vingt-dix ans d'expérience clinique dans ce domaine.

Dans le reste du monde, avant la deuxième Guerre Mondiale, la commercialisation de produits phagiques est lancée par de grands groupes pharmaceutiques comme Eli Lilly aux États-Unis, Robert & Carrière (absorbé aujourd'hui par Sanofi-Aventis) en France. ■



INSTITUT ELIAVA

# résistantes aux antibiotiques

## Phagothérapie, pour ou contre...

### POUR

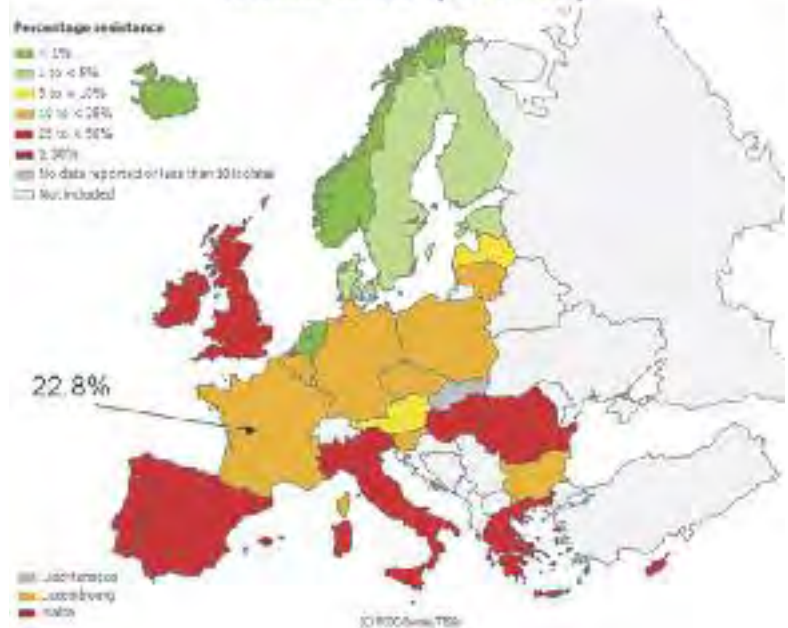
- Spécificité: un phage/une espèce bactérienne
- Ennemis naturels des bactéries: les bactériophages thérapeutiques lytiques sont incapables de s'associer au génome bactérien
- Traitement rapide
- Auto répliquatif
- Production rapide et peu chère: un avantage pour les pays en voie de développement qui manquent de moyens pour traiter les infections.
- Pas d'effets secondaires observés
- Effet synergique avec les antibiotiques

### CONTRE

- Spécificité: un phage/une espèce bactérienne; il faut trouver le bon!
- Attention aux phages tempérés (cycle lysogénique). Certains phages sont capables d'apporter des propriétés nouvelles aux bactéries (résistances aux antibiotiques, virulence, toxines, etc.) et de s'intégrer à leur génome
- Phages à apporter sur le lieu de l'infection: or ces virus, bien que très petits, ont une taille supérieure aux molécules médicamenteuses et ne diffusent pas aussi facilement
- Développement de résistance: contrairement aux antibiotiques, molécules inertes purifiées ou produites par le génie humain, les phages évoluent sans cesse avec les bactéries. Lorsque la seconde (la bactérie) évolue, le premier (le phage) s'adapte
- L'opinion publique: se faire soigner avec un virus?!

**"Par contraste avec les antibiotiques qui tuent toutes les bactéries, bonnes ou pathogènes, on peut considérer les phages comme des antibactériens 'intelligents'."**

## Staphylococcus aureus résistant à la métilcilline (SARM)



**L'augmentation inquiétante des bactéries pathogènes résistantes aux antibiotiques. Pourcentage de staphylocoques dorés résistants à la métilcilline (SARM) en 2010 en Europe.**

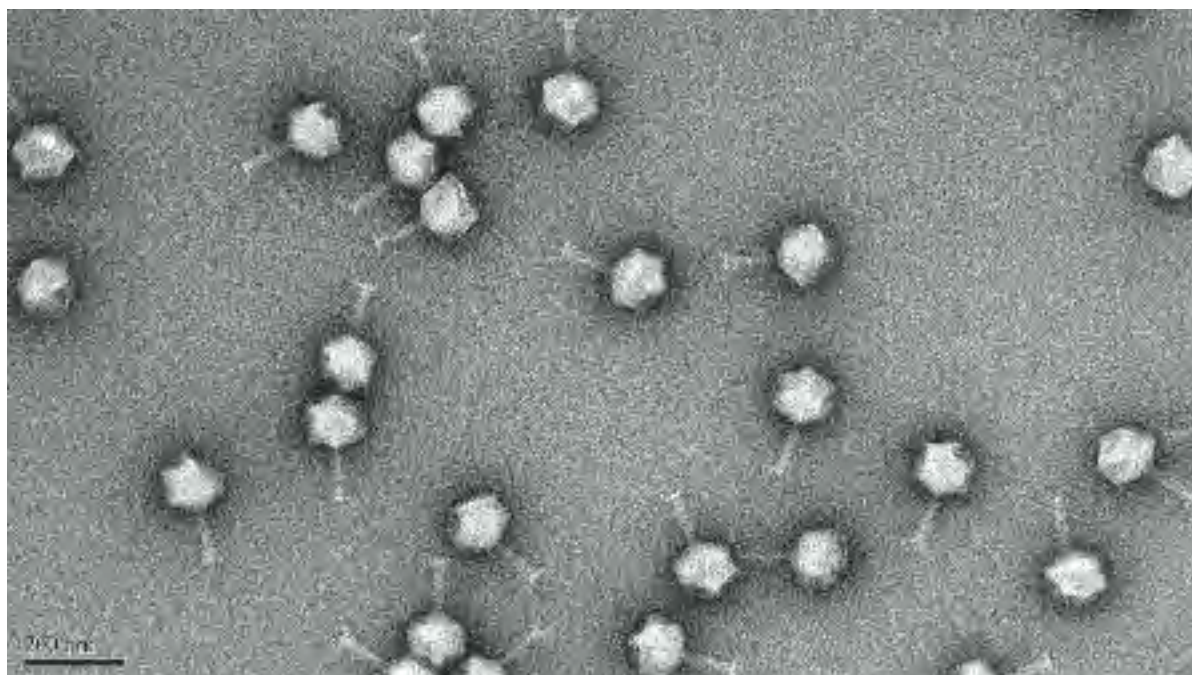




*Image de coloration négative d'un ensemble de phages RSL1 (phage à queue contractile qui infecte des bactéries attaquant les plants de tomate), et du phage T5 (phage à queue flexible qui infecte la bactérie *Escherichia coli*) obtenue grâce au microscope T12 de la plate-forme de microscopie électronique de l'IBS. Cette plate-forme comprend également deux autres microscopes électroniques dont un microscope Polara équipé d'un détecteur direct d'électrons permettant d'accéder à la résolution quasi-atomique. Cette plate-forme est accessible au niveau national mais également au niveau européen.*

M. JARY / DPC CEA

**Romain Linares, post doc à l'Institut de Biologie Structurale, réalise des purifications de phages.**



GUY SCHERNY / DRIES

**BIOLOGIE STRUCTURALE** Cécile Breyton, directrice de recherche au CNRS et chercheuse à l'Institut de Biologie Structurale (IBS) étudie les premières étapes de l'infection au niveau moléculaire et structural. Pour conduire leurs investigations et étudier la structure des protéines membranaires et virales liées à la pathologie, les chercheurs de l'IBS combinent différents outils : la cristallographie des rayons X, la RMN et la microscopie électronique.

## Dompteuse de phages

### Pourquoi les chercheurs de l'IBS étudient-ils les phages ?

L'IBS est un institut de biologie structurale. Ses scientifiques étudient la structure des objets biologiques, pour en comprendre le fonctionnement. Mes recherches consistent à étudier au niveau moléculaire comment les phages perforent la paroi des bactéries pour pouvoir y injecter leur ADN. Une fois l'ADN dans le cytoplasme de l'hôte, il neutralise ses systèmes de défense et utilise à son profit toute la machinerie biosynthétique pour produire de nombreux virions (particules virales). C'est ainsi que le phage se reproduit. Le phage T5 que l'on étudie à l'IBS reconnaît spécifiquement, avec sa longue fibre droite localisée au bout de sa queue flexible, une protéine de la membrane externe de la bactérie. Suite à cette interaction, il y a formation d'un canal à l'extrémité de la queue du phage, canal qui perce la paroi bactérienne, véritable armure de la bactérie. Nous nous intéressons aux changements moléculaires qui se déroulent, de l'étape de la reconnaissance de la paroi bactérienne à l'étape de sa perforation pour générer ce canal qui conduit l'ADN du phage à l'intérieur de la cellule. Nos projets de recherche portent d'une part sur l'étude de la structure atomique de tous les composants de ce phage et d'autre part sur l'étude de la structure dynamique qui permet d'aller de la reconnaissance à la perforation. Pour l'heure, nous sommes fiers des résultats de recherche obtenus récemment. Nous avons déterminé la structure de la queue du phage T5, avant et après interaction avec le récepteur bactérien. Nous avons pu montrer que l'information de reconnaissance de l'hôte n'est pas transmise par le tube de la queue, mais vraisemblablement par la protéine qui détermine la taille de la queue, la protéine "vernier" de T5. Ces résultats viennent d'être publiés dans la revue *Nature Communication*.



Cécile Breyton réalise le branchement d'une colonne de chromatographie pour la purification de protéine.

M. JARY / DR / CEA

### Comment se placent les recherches menées à l'IBS au niveau de la communauté scientifique internationale ?

Il faut tout d'abord souligner que nous bénéficions à Grenoble d'un environnement scientifique unique, de renommée internationale. Il y a une concentration exceptionnelle de grands instruments sur le campus EPN : l'ESRF et l'ILL. Cet environnement favorable est complété par des plates-formes propres à l'état de l'art en microscopie électronique et en RMN (solide et liquide). Ainsi, l'IBS est l'unique site en France où les chercheurs disposent localement de toutes les techniques d'investigations en Biologie Structurale. Les rayons X de l'ESRF permettent de déterminer la structure statique de protéines isolées. La plate-forme de microscopie électronique de l'IBS – qui figure parmi les deux plus performantes en France – nous permet d'avoir accès à la structure d'objets plus gros, telle la queue du phage avant et après interaction avec la bactérie par exemple. Grâce aux outils de RMN, nous avons accès à la dynamique des protéines et nous pouvons ainsi com-

prendre comment celles-ci s'associent pour constituer la queue du phage. Si ces mécanismes biologiques sont étudiés sur d'autres phages par d'autres laboratoires, nous sommes à l'IBS, la seule équipe dans le monde à étudier la queue du phage T5, qui est le représentant d'une très grande famille de phages

### Pourquoi vous-vous êtes plus particulièrement intéressée aux phages ?

Les phages sont fascinants, ce sont des "objets" biologiques magiques à observer en microscopie électronique. Ils évoluent très vite et ont donc pu se spécialiser. Ils sont devenus des nanomachines extrêmement efficaces pour cibler leur fonction, pour empaqueter l'ADN dans la capsid qui a des pressions qui sont dix à quinze fois celles présentes dans une bouteille de champagne !

Les phages sont des machines moléculaires efficaces pour réaliser des structures protéiques qui permettent de reconnaître et d'infecter l'hôte avec une très grande spécificité. Ils sont capables de perforer la paroi bactérienne qui est remarquablement bien armée sans tuer la bactérie. La beauté des phages, c'est qu'avec très peu de protéines, ils assurent des fonctions très diverses. Les phages offrent aux chercheurs qui les étudient la beauté épurée de nanostructures hyperspécialisées. ■



"le Mensuel" est édité par le CEA Grenoble - 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex, tél. UCAP: 04 38 78 42 53. Directeur de la publication: Philippe Bourguignon. Rédacteur en chef: Marc Jary. Rédaction: Marc Jary. Ont collaboré à ce numéro: Cécile Breyton, Guy Schoehn, Malvina Bilières, Hélène Burlet, Didier Bouix. Photos: CEA (Marc Jary, IBS, Pierre Jayet). Conception, réalisation: Stéphane Ronchin - 04 76 49 52 46. Impression: Imprimerie Notre Dame - 04 76 18 56 16. Routage: Evolution. Dépôt légal: 4<sup>e</sup> trimestre 2017. ISSN: 1269-0031. CPPAP: n° 3133 ADEP.

