





Library and Archives  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file* *Votre référence*  
ISBN: 978-0-494-79775-4  
*Our file* *Notre référence*  
ISBN: 978-0-494-79775-4

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

*La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi !*

Albert Einstein

# TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTE DES ANNEXES .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Résistances microbiennes et alternatives thérapeutiques .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Résistances aux antibiotiques .....	1
1.1.2. Alternatives thérapeutiques aux antibiotiques .....	1
<b>1.2. Les bactériophages.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. Écologie des phages.....	2
1.2.2. Taxonomie et morphologie des phages .....	3
1.2.3. Mécanismes d'infections .....	6
1.2.3.1. Adsorption .....	6
1.2.3.2. Injection de l'ADN.....	7
1.2.3.3. Cycle infectieux.....	7
1.2.4. Organisation génomique des phages.....	12
1.2.4.1. Module d'encapsidation et de structure de la capside.....	12
1.2.4.2. Module de structure de la queue.....	13
1.2.4.3. Module de lyse cellulaire.....	14
1.2.4.4. Module de contrôle de la lysogénie .....	14
1.2.4.5. Module de réplication et de modification de l'ADN.....	15
1.2.5. Impacts des phages .....	16
1.2.5.1. Phages virulents.....	16
1.2.5.2. Phages tempérés .....	17

<b>1.3. Clostridium difficile .....</b>	<b>21</b>
1.3.1. Écologie .....	21
1.3.1.1. Distribution de la bactérie .....	21
1.3.1.2. Épidémiologie de <i>C. difficile</i> .....	22
1.3.2. Facteurs de risques.....	24
1.3.3. Symptômes.....	25
1.3.4. Traitements des ICD .....	26
1.3.5. Facteurs de virulence .....	27
1.3.5.1. Toxines A et B .....	27
1.3.5.2. Toxine binaire (CDT) .....	30
1.3.5.3. Autres facteurs .....	31
1.3.6. Méthodes de typage .....	32
1.3.6.1. REA et PFGE .....	33
1.3.6.2. Ribotypage par PCR .....	33
<b>1.4. Objectifs du projet.....</b>	<b>34</b>
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Souches, milieux de culture et conditions de croissance.....</b>	<b>36</b>
<b>2.2. Extraction et purification d'ADN.....</b>	<b>37</b>
2.2.1. Extraction d'ADN génomique bactérien .....	37
2.2.2. Extraction d'ADN génomique de bactériophages .....	37
2.2.3. Extraction d'ADN plasmidique .....	39
<b>2.3. Le ribotypage par PCR .....</b>	<b>40</b>
2.3.1. Réaction par polymérisation en chaîne (PCR).....	40
2.3.2. Analyse des ribotypes .....	41
<b>2.4. Isolement des bactériophages .....</b>	<b>42</b>
2.4.1. Sources de prélèvement .....	42
2.4.2. Enrichissement en phages .....	42
2.4.2.1. Préparation des échantillons.....	42
2.4.2.2. Enrichissements successifs .....	43

2.4.3.	Détection des phages dans les bouillons d'enrichissement .....	45
2.4.4.	Validation de la méthode d'enrichissement.....	46
<b>2.5.</b>	<b>Caractérisation des phages <math>\phi</math>MMP isolés.....</b>	<b>47</b>
2.5.1.	Purification, amplification et titration.....	47
2.5.2.	Profil de restriction .....	49
2.5.3.	Buvar dage de type Southern .....	49
2.5.3.1.	Préparation des sondes .....	50
2.5.3.2.	Transfert sur membrane et hybridation.....	50
2.5.4.	Microscopie électronique par transmission d'électron .....	51
2.5.5.	Spectre d'hôtes des phages isolés .....	52
2.5.6.	Test de lysogénie avec les phages isolés .....	53
2.5.7.	Inductions des phages $\phi$ MMP01-04 .....	55
2.5.7.1.	Induction spontanée.....	55
2.5.7.2.	Détermination des concentrations minimales inhibitrices d'antibiotiques (CMI) pour les souches lysogènes et non lysogènes .....	56
2.5.7.3.	Induction provoquée .....	57
<b>2.6.</b>	<b>Séquençage des génomes de phages <math>\phi</math>MMP02 et <math>\phi</math>MMP04 .....</b>	<b>59</b>
2.6.1.	Méthode de séquençage .....	59
2.6.1.1.	454 pyrosequencing .....	59
2.6.1.2.	Séquençage direct sur l'ADN de phage .....	60
2.6.1.3.	Clonage des produits PCR.....	61
2.6.2.	Préparation du vecteur pour le clonage.....	62
2.6.3.	Ligations .....	62
2.6.4.	Transformations des cellules chimiocompétentes .....	63
<b>2.7.</b>	<b>Analyses bioinformatiques.....</b>	<b>64</b>
2.7.1.	Annotation et alignements des génomes de phages.....	64
<b>2.8.</b>	<b>Impact des phages <math>\phi</math>MMP sur <i>C. difficile</i> .....</b>	<b>65</b>
2.8.1.	Motilité des lysogènes comparé aux souches sauvages.....	65

2.8.2.	Immunodétection des toxines A et B (Dot Blot) .....	66
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1.</b>	<b>Caractérisation de la collection d'isolats cliniques de <i>C. difficile</i>.....</b>	<b>68</b>
3.1.1.	Ribotypage des isolats cliniques par réaction PCR .....	68
<b>3.2.</b>	<b>Isolement des bactériophages .....</b>	<b>71</b>
3.2.1.	Validation de la méthode d'enrichissement.....	72
3.2.2.	Isolement et détection de phages dans les affluents et les selles de patients infectés.....	73
<b>3.3.</b>	<b>Caractérisation microbiologique et moléculaire des phages <math>\phi</math>MMP .....</b>	<b>75</b>
3.3.1.	Morphologie par microscopie électronique (TEM).....	75
3.3.2.	Spectre d'hôte .....	76
3.3.3.	Profil de restriction des phages $\phi$ MMP .....	78
3.3.4.	Comparaison des phages par hybridation de type Southern .....	81
3.3.5.	Détermination du caractère virulent ou tempéré des phages $\phi$ MMP .....	84
3.3.6.	Lysogénisation de souches sensibles pour les phages $\phi$ MMP.....	90
3.3.7.	Inductions des phages $\phi$ MMP à partir lysogènes sauvages et de labo.....	90
3.3.7.1.	Induction spontanée.....	91
3.3.7.2.	Induction provoquée .....	92
<b>3.4.</b>	<b>Séquençage complet et caractérisation des génomes des phages <math>\phi</math>MMP02 et <math>\phi</math>MMP04 .....</b>	<b>98</b>
3.4.1.	Séquençage des génomes.....	98
3.4.2.	Annotations et cartes génomiques .....	99
3.4.2.1.	Génome du phage $\phi$ MMP02 .....	99
3.4.2.2.	Génome du phage $\phi$ MMP04 .....	106
3.4.3.	Comparaisons génomiques .....	111
3.4.3.1.	Alignements avec le phage $\phi$ MMP02.....	111
3.4.3.2.	Alignement avec le phage $\phi$ MMP04 .....	113
<b>3.5.</b>	<b>Analyses phénotypiques des lysogènes <math>\phi</math>MMP01-04 .....</b>	<b>115</b>

3.5.1.	Motilité.....	115
3.5.2.	Impact des phages $\phi$ MMP sur la production des toxines A et B.....	116
<b>4.</b>	<b>DISCUSSIONS .....</b>	<b>119</b>
<b>4.1.</b>	<b>Isolement des bactériophages tempérés <math>\phi</math>MMP01-04 .....</b>	<b>119</b>
4.1.1.	Détection des phages $\phi$ MMP01-04 .....	119
<b>4.2.</b>	<b>Détermination du caractère tempéré des phages <math>\phi</math>MMP01-04.....</b>	<b>123</b>
<b>4.3.</b>	<b>Origine des phages tempérés <math>\phi</math>MMP01-04.....</b>	<b>125</b>
<b>4.4.</b>	<b>Caractérisation des phages <math>\phi</math>MMP01-04.....</b>	<b>128</b>
4.4.1.	Spectre d'hôte .....	128
4.4.2.	Morphologie par microscopie électronique .....	129
4.4.3.	Similarité génomique entre les phages $\phi$ MMP.....	130
4.4.4.	Inductions des $\phi$ MMP01-04 .....	132
4.4.4.1.	Induction spontanée.....	132
4.4.4.2.	Induction provoquée .....	135
<b>4.5.</b>	<b>Diversité génétique des phages <math>\phi</math>MMP02 et <math>\phi</math>MMP04 .....</b>	<b>137</b>
4.5.1.	Caractérisation et comparaison génomique .....	138
4.5.1.1.	Génome du phage $\phi$ MMP02.....	138
4.5.1.2.	Génome du phage $\phi$ MMP04.....	139
<b>4.6.</b>	<b>Impact des phages <math>\phi</math>MMP01-04 sur le phénotype de <i>C. difficile</i> .....</b>	<b>141</b>
4.6.1.	Motilité.....	141
4.6.2.	Production des toxines A et B.....	142
<b>4.7.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>144</b>
	<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>146</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>147</b>
	<b>ANNEXE .....</b>	<b>163</b>



## LISTE DES FIGURES

Figure 1	Morphologie des différents phages isolés et caractérisés jusqu'à aujourd'hui.....5
Figure 2	Schéma représentant les différents cycles de répllication possibles retrouvés chez les phages.....8
Figure 3	Schéma représentant la régulation du système SOS chez le phage lambda d' <i>E. coli</i> .....11
Figure 4	Distribution de la souche hypervirulente BI/NAP1/027 en 2007-2008..23
Figure 5	Schéma représentant le locus de pathogénicité (PaLoc).....29
Figure 6	Représentation schématique de l'espace intergénique 16-23S dans le génome de <i>C. difficile</i> .....34
Figure 7	Validation de la méthode d'enrichissement successif avec la souche de <i>C. difficile</i> CD24 et le phage $\phi$ CD52.....47
Figure 8	Profils de ribotypage observés sur gel de polyacrylamide 5%.....69
Figure 9	Arbre phylogénétique créé à l'aide du logiciel Gel Compar II.....70
Figure 10	Répartition des isolats cliniques en fonction des différents ribotypes analysés par le logiciel Gel Compar II.....71
Figure 11	Validation de la méthode d'enrichissement.....73
Figure 12	Morphologie des particules de phages observées par microscope électronique (TEM).....75
Figure 13	Différentiation des phages par digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction HindIII.....80

Figure 14	Comparaison génomique des phages du laboratoire par hybridation ADN-ADN.....	83
Figure 15	Comparaison des profils de restriction des phages $\phi$ MMP01 et $\phi$ MMP03 originaux par rapport aux prophages induits des colonies lysogènes.....	84
Figure 16	Détection du phage $\phi$ MMP02 (prophages) dans le chromosome des colonies lysogènes correspondantes.....	85
Figure 17	Détection du phage $\phi$ MMP03 dans le chromosome de bactéries lysogènes provenant de selles de patients infectés.....	87
Figure 18	Quantification des phages $\phi$ MMP01-04 induits spontanément après 8 h d'incubation à partir des lysogènes sauvages et de labo.....	92
Figure 19	Courbe de croissance des bactéries lysogènes contenant les prophages $\phi$ MMP01-04 suite à l'induction avec la mitomycine C.....	94
Figure 20	Courbe de croissance des lysogènes en présence de différentes concentrations en ciprofloxacine.....	96
Figure 21	Quantification des phages $\phi$ MMP0 dans les surnageants de culture en présence ou non de différentes concentrations de ciprofloxacine.....	97
Figure 22	Carte génomique et annotation du phage $\phi$ MMP02.....	101
Figure 23	Carte génomique et annotation du phage $\phi$ MMP04.....	107
Figure 24	Comparaison des phages $\phi$ MMP02 et $\phi$ C2.....	112
Figure 25	Comparaison des phages $\phi$ MMP04 et $\phi$ CD119.....	114

Figure 26	Motilité des souches lysogènes et non lysogènes pour les phages $\phi$ MMP01-04.....	115
Figure 27	Détection par immunodot blot des toxines A et B produites par les souches lysogènes et non lysogènes après 48 et 72 h de croissance en milieu TY.....	117
Figure 28	Détection par immunodot blot des toxines A et B produites par les souches lysogènes et non lysogènes après 72 h de croissance en milieu TY.....	117
Figure A1	Carte génomique du plasmide pBS II KS.....	164

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Aperçu des familles de phages selon l'ICTV.....	4
Tableau 2	Liste des amorces utilisées dans le cadre de ce projet .....	40
Tableau 3	Liste des isolats de <i>C. difficile</i> utilisés pour l'enrichissement des eaux usées et des surnageants de selles de patients atteints d'ICD .....	45
Tableau 4	Valeurs des concentrations en ciprofloxacines utilisées pour l'induction provoquée des phages $\phi$ MMP.....	59
Tableau 5	Spectre d'hôte des isolats sensibles.....	77
Tableau 6	Souches de Clostridie utilisés pour évaluer la sensibilité de ces souches aux phages $\phi$ MMP01-04.....	78
Tableau 7	Paramètres cliniques associés à la détection des phages $\phi$ MMP.....	89
Tableau 8	Cadre de lecture déduit de la séquence génomique du phage $\phi$ MMP02 et des protéines prédites associées.....	102
Tableau 9	Cadre de lecture déduit de la séquence génomique du phage $\phi$ MMP04 et des protéines prédites associées.....	108
Tableau A1	Liste de facteurs de virulence encodés par des phages tempérés.....	166

**LISTE DES ANNEXES**

<b>Annexe A</b>	<b>Carte du vecteur utilisé pBS II KS.....</b>	<b>163</b>
<b>Annexe B</b>	<b>Liste de facteurs de virulence encodés par des phages tempérés.....</b>	<b>165</b>

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CDS	<i>Coding Sequences</i> (Séquences codantes)
CHUS	Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke
CMI	Concentration minimale inhibitrice
DIG	Digoxigénine
dNTP	Déoxyribonucléotides triphosphates
DO <sub>600</sub>	Densité optique à une longueur d'onde de 600 nanomètre
EDTA	Acide éthylène diamine tétra acétique
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EtBr	Bromure d'éthidium
GLIMMER	<i>Gene Locator and Interpolated Markov ModelER</i>
HCl	Acide chloridrique
ICD	Infection à <i>Clostridium difficile</i>
ICTV	<i>International Committee for the Taxonomy of Viruses</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside
kDa	kiloDaltons
kV	kiloVolt
LB	<i>Luria-Bertani Broth</i>

NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Cadre de lecture)
PaLoc	Locus de pathogénicité
PEG	Poly-Éthylène Glycol
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PBST	<i>Phosphate-Buffered Saline Tween</i>
UFP	Unité formant des plages
RBS	<i>Ribosome Binding Site</i>
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
TAE	Tris Acétate EDTA
TE	Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0,5 M
<i>TEM</i>	Microscopie par transmission électron
TP	Température pièce
TY	<i>Tryptose-Yeast Extract Broth</i>
UA	Uranyl Acétate
U.V.	Rayon Ultra Violet
v/v	volume / volume
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

## RÉSUMÉ

**Caractérisation de phages tempérés et évaluation de leurs impacts sur le phénotype bactérien chez *C. difficile*.** Mémoire de maîtrise présenté par Mathieu M. Pinard, Département de microbiologie et infectiologie, Université de Sherbrooke, Mai 2010.

*Clostridium difficile* est un pathogène entérique qui cause d'importantes infections nosocomiales dont le traitement est parfois problématique. Il n'existe, à l'heure actuelle, que deux antibiotiques approuvés pour traiter les infections à *C. difficile* et le taux de rechute est assez important. Ce projet a initialement visé à isoler et caractériser des phages virulents contre *C. difficile* en vue de les utiliser en phagothérapies comme outils thérapeutiques alternatifs. Les eaux usées et les selles de patients infectés par *C. difficile* ont été utilisées pour isoler et détecter les phages virulents. Or, quatre phages différents ( $\phi$ MMP01-04) ont été isolés mais aucun de ces phages ne s'est révélé être virulent. Les quatre phages tempérés ont donc été caractérisés et leur impact a été évalué sur quelques phénotypes bactériens chez *C. difficile* dont la motilité et la production des toxines A et B.

La caractérisation morphologique des phages  $\phi$ MMP01-04 a permis de déterminer que ceux-ci appartiennent à la famille des *Myoviridae* alors que la caractérisation génomique a permis de démontrer que certains de ces phages sont assez différents entre eux mais également par rapport aux autres phages tempérés, isolés et caractérisés dans la littérature. De façon générale, les phages  $\phi$ MMP01-04 ne semblent



pas s'induire spontanément de manière plus importante mais suggère que la présence de certains antibiotiques pourrait augmenter l'induction de certains de ces phages. L'impact des phages  $\phi$ MMP01-04 sur la motilité chez *C. difficile* n'a pas démontré que ceux-ci avaient un rôle à jouer sur ce phénotype. Par contre, certains des phages  $\phi$ MMP semblent augmenter ou diminuer la production en toxines A et B.

Les résultats de nos travaux indiquent donc que certains des phages caractérisés présentent des différences importantes qui suggèrent une grande diversité parmi les phages tempérés chez *C. difficile*. De plus, certains des phages  $\phi$ MMP auraient la capacité de participer aux transferts horizontaux de matériels génétiques et d'affecter la régulation de certains facteurs de virulence chez *C. difficile* tel que la production en toxines A et B. Évidemment, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour confirmer la modification du phénotype de production en toxines par ces phages mais également sur d'autres phénotypes associés aux autres facteurs de virulence de cette bactérie.

MOTS CLÉS : *Clostridium difficile*, phage tempéré, induction, toxines, virulence.

## 1. INTRODUCTION

### 1.1. Résistances microbiennes et alternatives thérapeutiques

#### 1.1.1. Résistances aux antibiotiques

La découverte accidentelle, le 3 septembre 1928, de la pénicilline par Alexander Fleming, a radicalement changé le rapport de force qui existait entre les infections bactériennes et les traitements disponibles aux patients. En effet, cette découverte imprévue, à permis de traiter une multitude d'infections bactériennes et a mené à la découverte de nombreux autres antibiotiques, encore utilisés aujourd'hui. Or, l'utilisation de ceux-ci pour traiter les différentes infections bactériennes à également mené à l'émergence de bactéries résistantes à ces antibiotiques, résistances acquises par mutation et via divers éléments génétiques mobiles (LINDSAY; ROBERTS et MULLANY, 2009).

#### 1.1.2. Alternatives thérapeutiques aux antibiotiques

L'augmentation du nombre de bactéries résistantes et la diminution de nouveaux antibiotiques approuvés en clinique rend urgente la recherche d'alternatives thérapeutiques. Les vaccins à ADN ont démontré un potentiel fort intéressant puisque ceux-ci, par l'intégration d'un gène codant pour un antigène exprimé à la surface d'une cellule eucaryote, induisent une réponse spécifique humorale et/ou à médiation cellulaire (DONNELLY *et al.*, 2000; SHEDLOCK et WEINER, 2000). Les recherches

sur l'ARN ont débouché sur la découverte des riboswitchs, une structure d'ARN qui régule l'expression de certains gènes en réponse à la liaison d'un substrat spécifique. Certains de ses riboswitchs auraient la capacité à contrôler des gènes essentiels à la virulence de bactéries pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* et *Clostridium difficile* (SUDARSAN *et al.*, 2008; MULHBACHER *et al.*, 2010). Les virus de bactéries ou bactériophages peuvent également être considérés comme outils thérapeutiques alternatifs aux antibiotiques à la condition que ceux-ci soient virulents ou strictement lytiques. En effet, les phages virulents ont la capacité d'infecter et de lyser une souche sensible sans possibilité que le génome de celui-ci ne s'intègre dans le chromosome bactérien, contrairement aux phages tempérés. D'ailleurs, plusieurs études ont démontrés que les phages strictement lytiques peuvent être utilisés en prophylaxie ou comme traitement sur les animaux et les humains (JOHNSON *et al.*, 2008; KUTATELADZE et ADAMIA, 2008).

## **1.2. Les bactériophages**

### **1.2.1. Écologie des phages**

Les bactériophages sont considérés comme étant l'entité biologique la plus répandue et la plus diversifiée de notre biosphère. En effet, la population en phages a été estimée à  $10^{31}$  particules virales, soit dix fois plus que le nombre de bactéries totales (BERGH *et al.*, 1989; BREITBART et ROHWER, 2005). De plus, l'abondance des différents phages est directement reliée à l'importance de la population bactérienne sensible à ces phages dans un environnement donné. D'ailleurs, les phages occupent

pratiquement toutes les niches écologiques mais la grande majorité d'entre eux (entre  $10^{29}$  à  $10^{30}$  phages) sont retrouvés dans l'eau et plus particulièrement dans les océans. Les eaux usées non traitées sont également un endroit propice à la prolifération des phages puisque les eaux usées recueillent, en partie, les fèces humaines, qui sont riches en phages de bactéries entériques (BREITBART et ROHWER, 2005). Par ailleurs, les phages de bactéries entériques sont souvent utilisés comme indicateur de contamination dans les eaux par des bactéries puisque ces bactéries entériques sont généralement éliminées dans les matières fécales (MANDILARA *et al.*, 2006; GINO *et al.*, 2007; PETRINCA *et al.*, 2009). De plus, plusieurs groupes de recherches ont réussi à isoler des phages de bactéries pathogènes pour l'homme, surtout dans les affluents d'eaux usées comme *Escherichia coli* et *Salmonella* (BONILLA *et al.*; GOYAL *et al.*, 1980; MCLAUGHLIN *et al.*, 2006; BORIE *et al.*, 2008).

### 1.2.2. Taxonomie et morphologie des phages

Jusqu'à maintenant, plus de 5500 phages ont été isolés et observés à travers le monde (ACKERMANN, 2007). La classification de ceux-ci s'est donc avérée essentielle pour les distinguer entre eux et les positionner sur l'arbre phylogénétique des virus. À l'opposé des bactéries, les virus (et donc les phages) ne possèdent pas de gènes conservés comme les séquences ribosomales (ARNr) permettant aux scientifiques de classer facilement les différentes bactéries isolées. La taxonomie des phages est donc considérée comme étant assez difficile, d'autant plus que ceux-ci ont la capacité d'acquérir du matériel génétique de façon rapide et en grande quantité. Or,

L'International Committee on the Taxonomy of Viruses (ICTV) a proposé un système de classification basé sur la nature des acides nucléiques, les séquences nucléotidiques et la structure des phages (VAN REGENMORTEL *et al.*, 2000). Le tableau 1 représente un exemple de classification par l'ICTV.

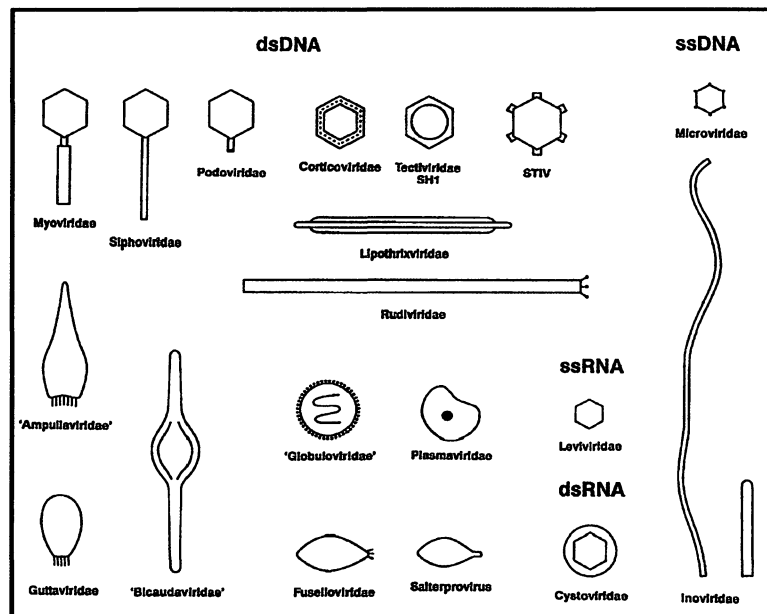
Tableau 1. Aperçu des familles de phages selon l'ICTV

Ordres	Familles	Acides nucléiques	Particularités	Exemples
<b>Caudovirales</b>	Myoviridae	ADNdb, linéaire	Queue contractile	T4
	Siphoviridae	ADNdb, linéaire	Longue queue non contractile	$\lambda$
	Podoviridae	ADNdb linéaire	Petite queue	T7
<b>Forme polyédrale</b>	Microviridae	ADNsb circulaire	Capsomère visible	$\phi$ X174
	Corticoviridae	ADNsb, circulaire	Membrane lipidique interne	PM2
	Tectiviridae	ADNsb, linéaire	Pseudoqueue, vésicule lipidique	PRD1
	Leviviridae	ARNsb, linéaire	Homologie avec poliovirus	MS2
	Cystoviridae	ADNdb, linéaire	Enveloppe composée de lipides	$\phi$ 6
<b>Forme filamenteuse</b>	Inoviridae	ADNsb, circulaire	Long filament/Courte tige	fd/MVL1
	Lipothxviridae	ADNdb, linéaire	Enveloppe composée de lipides	TTV1
	Rudoviridae	ADNdb, linéaire	Homologie avec TMV	SIRV-1
<b>Forme pléomorphique</b>	Plasmaviridae	ADNdb, circulaire	Pas de capsid mais enveloppe composée de lipides	L2
	Fuselloviridae	ADNdb, circulaire	Forme de citron	SSV1
	Salterprovirus	ADNdb, linéaire	Forme de citron	His1
	Guttaviridae	ADNdb, circulaire	Forme de goutte d'eau	SNDV
	Ampullaviridae	ADNdb, linéaire	Forme de bouteille	ABV
	Bicaudaviridae	ADNdb, circulaire	2 queues lors phase de croissance	ATV
	Globuloviridae	ADNdb, linéaire	Homologie avec paramyxovirus	PSV

Sur les 5568 phages isolés jusqu'en 2007, 96% de ceux-ci font partis de l'ordre des *Caudovirales* (phages possédant une queue) et sont répartis dans trois familles distinctes soient les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae*. Parmi ces trois familles, la famille des *Siphoviridae* semble la plus répandue puisqu'elle est composée de 61% des phages tandis que les familles des *Myoviridae* et des *Podoviridae* ne compte que 25% et 14% respectivement de tous les phages appartenant à l'ordre *Caudovirales*. Pour les 4% de phages ne possédant pas de queue, ils ne font pas partie d'un ordre en particulier, mais sont classés selon leur morphologie tels que les phages

de forme polyédrale, pléomorphe et filamenteuse. Ceux-ci sont sous-divisés en plusieurs familles telles qu'illustrées à la figure 1.

Comme on peut le constater à la figure 1, les différents phages possèdent des formes assez variées mais conservent une certaine structure commune. En effet, tous les phages conservent leurs matériels génétiques (ADN ou ARN) à l'intérieur d'une capsidie constituée de protéines ou de lipoprotéines. Par contre, seuls les phages de l'ordre des *Caudovirales*, possèdent une queue pour la reconnaissance et l'éjection de l'ADN vers l'intérieur de la bactérie hôte. D'ailleurs, les queues présentent des caractéristiques assez différentes entre les trois familles. La queue des *Myoviridae* est relativement longue mais est rigide et contractile alors que la queue des phages de la famille des *Siphoviridae* est très longue et non contractile. Les phages de la famille des *Podoviridae* possèdent quant à eux, une queue exceptionnellement petite mais non contractile (ACKERMANN, 2007; MC GRATH et VAN SINDEREN, 2007).



**Figure 1. Morphologie des différents phages isolés et caractérisés jusqu'à aujourd'hui.** Image tiré de l'article Ackermann HW, 2007, Arch Virol.

### 1.2.3. Mécanismes d'infections

Malgré la grande diversité des phages observés à ce jour, les mécanismes responsables de la réplication du génome viral sont restés assez similaires entre les différents phages. Les phages sont forcés d'utiliser la machinerie cellulaire et l'énergie de la bactérie hôte pour accomplir les mécanismes d'infection et permettre la réplication de leur génome et la transcription des gènes et la traduction des protéines des nouveaux virion (MC GRATH et VAN SINDEREN, 2007).

#### 1.2.3.1. Adsorption

La première étape consiste en l'adsorption du phage à la surface de la bactérie hôte. Cette reconnaissance se fait, dans un premier temps, de façon réversible par interaction avec un récepteur à la surface de la bactérie. Cette liaison réversible s'effectue, pour les phages possédant une queue, par l'intermédiaire de protéines situés à l'extrémité de la queue. Ensuite, l'adsorption du phage à la bactérie hôte devient irréversible par la liaison entre d'autres protéines virales situées sur la queue spécifique au phage et à des récepteurs bactérien de surface (WEINBAUER, 2004). Plusieurs structures (Gram + et -) sont reconnues pour jouer un rôle de récepteur bactérien dans le processus d'adsorption comme les polysaccharides, les LPS, les acides (lipo)téichoïque et les glycoprotéines (MC GRATH et VAN SINDEREN, 2007). Dans certains cas, la capsule, les pilis de conjugaison et les flagelles sont également des structures reconnues par les phages pour l'attachement de ceux-ci à la bactérie hôte (HANLON, 2007).

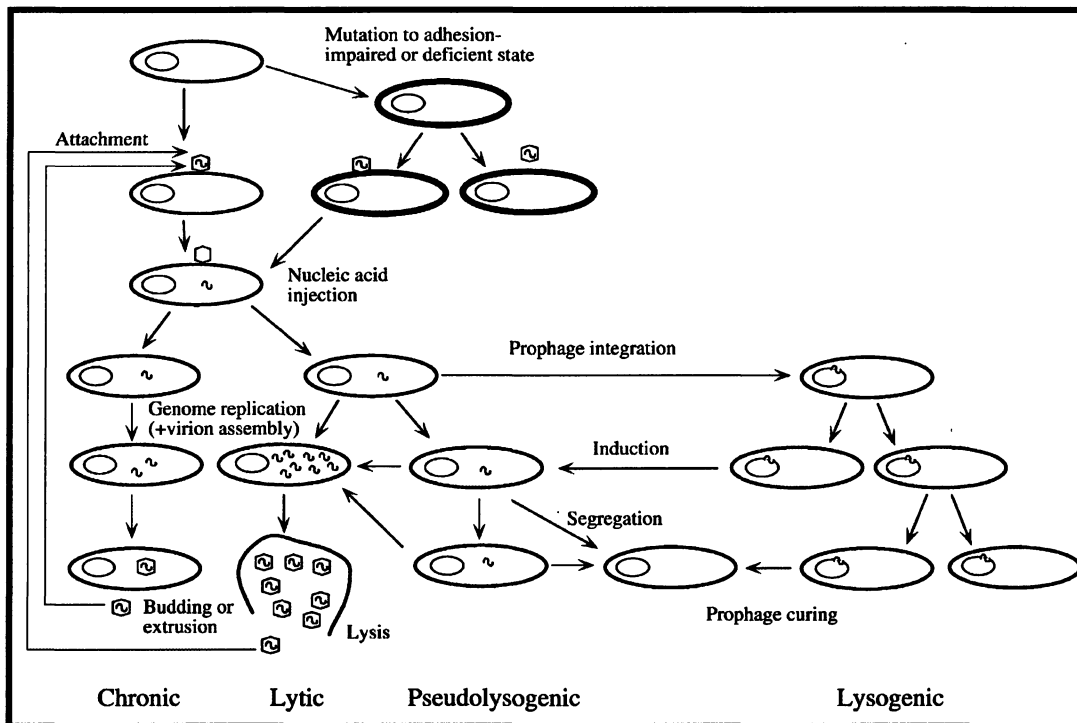
### 1.2.3.2. Injection de l'ADN

La deuxième étape est la phase d'injection de l'ADN viral à l'intérieur de la bactérie cible. Ce processus peut s'effectuer de différentes façons, dépendamment de la morphologie du phage en question. Par exemple, les phages de la famille des *Myoviridae* contractent une gaine entourant un tube rigide qui sert à percer la membrane bactérienne et force l'ADN à quitter la capsid, et déverser le contenu génétique du phage dans le cytosol de la bactérie. Des enzymes hydrolytiques, situés à la base de la queue, peuvent également être présents afin de dégrader la paroi bactérienne et faciliter l'entrée de l'ADN viral (HANLON, 2007).

### 1.2.3.3. Cycle infectieux

Il existe quatre types différents de cycles de réplication parmi les phages, soient le cycle lytique, le cycle lysogénique, le cycle pseudolysogénique et le cycle chronique (voir figure 2). À noter que les phages utilisant seulement le cycle lytique sont appelés phages virulents ou strictement lytiques tandis que les phages ayant la capacité de passer du cycle lytique au cycle lysogénique sont appelés phages tempérés.





**Figure 2. Schéma représentant les différents cycles de réplication possibles retrouvés chez les phages.** Image tirée de l'article Weinbauer MG, 2004,

*Cycle lytique.* Les phages virulents vont utiliser le cycle lytique pour répliquer leur génome ce qui va provoquer des changements majeurs au niveau physiologique chez la bactérie hôte. En effet, la majorité des processus cellulaires de la bactérie vont cesser de fonctionner et seront détournés pour assurer la production de nouveaux virions. Après injection de l'ADN viral dans le cytosol de la bactérie, l'ARN polymérase de cette dernière va être recrutée afin de transcrire les gènes précoces, impliqués dans la transcription et la régulation des gènes, la réplication de l'ADN et la recombinaison, etc. Ensuite, les tardifs seront transcrit, permettant ainsi la synthèse des protéines de structures (capside, queue). Parallèlement à ces événements, l'ADN polymérase de la bactérie est également recrutée pour permettre la réplication massive du génome viral. Les protéines de structure des nouveaux virions sont ensuite assemblées et l'ADN est

encapsidé. Finalement, la dernière étape consiste à libérer la progéniture de la bactérie hôte pour perpétuer le cycle lytique des nouveaux phages virulents. Cette lyse cellulaire est rendu possible grâce à un système qui utilise généralement deux enzymes, l'endolysine et la holine. D'une part, les endolysines sont des enzymes hydrolytiques ayant la capacité de dégrader le peptidoglycane en clivant différents types de liens à l'intérieur de la structure de celui-ci, dépendamment du type d'endolysine. Certaines vont s'attaquer au lien entre les deux sucres (n-acétylglucosamine et acide n-acétylmuramique) alors que d'autres vont couper les liens peptidiques entre les 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> acides aminés (BORYSOWSKI *et al.*, 2006). D'autre part, la holine est une petite protéine hydrophobique ayant comme fonction de s'insérer dans la membrane cytoplasmique à un moment précis du cycle lytique afin de créer des pores et permettre à l'endolysine d'atteindre le peptidoglycane (WEINBAUER, 2004; BORYSOWSKI *et al.*, 2006). Suite à la lyse cellulaire, les virions sont relâchés dans l'environnement et prêts à recommencer un nouveau cycle lytique.

*Cycle lysogénique.* La particularité des phages tempérés tient dans leur capacité à alterner entre deux cycles de réplication soient le cycle lytique et le cycle lysogénique. Suite à l'infection et à la translocation de l'ADN dans le cytoplasme de la bactérie, une décision est prise pour le déclenchement de l'un des cycles de réplication. Si le phage suit la voie lytique, la cascade du cycle s'effectue tel que décrit précédemment. Par contre, si le phage suit la voie lysogénique, les gènes du cycle lytique sont réprimés et le génome viral s'intègre dans le chromosome bactérien (MC GRATH et VAN SINDEREN, 2007). Toute division subséquente de la bactérie entraînera la réplication du chromosome bactérien mais également la réplication du génome viral. La bactérie

adopte alors le nom de lysogène et le phage le nom de prophage. La décision quant au choix du cycle de réplication à suivre débute assez rapidement après l'infection. La décision est fortement influencée par l'état physiologique de la bactérie. En effet, les dommages à l'ADNg bactérien et des conditions environnementales défavorables sont reconnus pour enclencher le cycle lytique (KUTTER et SULAKVELIDZE, 2005). Ainsi, dans l'optique que le phage opte pour le cycle lysogénique, quelques répresseurs transcriptionnels (par exemple CI, CII et CIII chez le coliphage Lambda) sont transcrits et traduits pour bloquer l'expression des gènes impliqués dans le cycle lytique (BABIC et LITTLE, 2007; ANDERSON et YANG, 2008). Or, la décision lyse-lysogénie prise par le phage lambda (phage le plus étudié) est un mécanisme complexe qui, même aujourd'hui, reste mal compris (PARUA *et al.*; ST-PIERRE et ENDY, 2008). L'enzyme intégrase est également exprimée et est responsable de l'intégration du génome du phage dans le chromosome bactérien, en général avec l'aide d'une protéine bactérienne (*Integration Host Factor*). Bien que les phages tempérés, sous forme de prophages, soient extrêmement stables, ceux-ci peuvent à tout moment, déclencher le cycle lytique pour s'induire de leur souche hôte (LITTLE *et al.*, 1999). Certaines conditions physiologiques particulières de la bactérie hôte vont parfois induire l'excision du prophage et le déclenchement du cycle lytique. Certains stress, comme les rayons U.V., un changement de température, la présence de produits chimiques (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pesticides, etc) sont connus pour induire une réponse SOS chez la bactérie lysogène. La protéine bactérienne RecA est alors activée et son activité de coprotéase provoque l'autoclivage du répresseur des gènes SOS, LexA (voir figure 3). L'inactivation de ce répresseur permet alors la transcription et éventuellement la

traduction des gènes SOS, impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN. Or, RecA active également le clivage protéolytique du répresseur CI, qui maintient le phage sous sa forme intégrée et régule les autres répresseurs du cycle lysogénique (WALDOR *et al.*, 2005). La diminution des répresseurs CI, CII et CIII entraîne l'augmentation de l'expression de la protéine Cro qui active la transcription des gènes du cycle lytique et réprime les gènes du cycle lysogénique (COURT *et al.*, 2007).

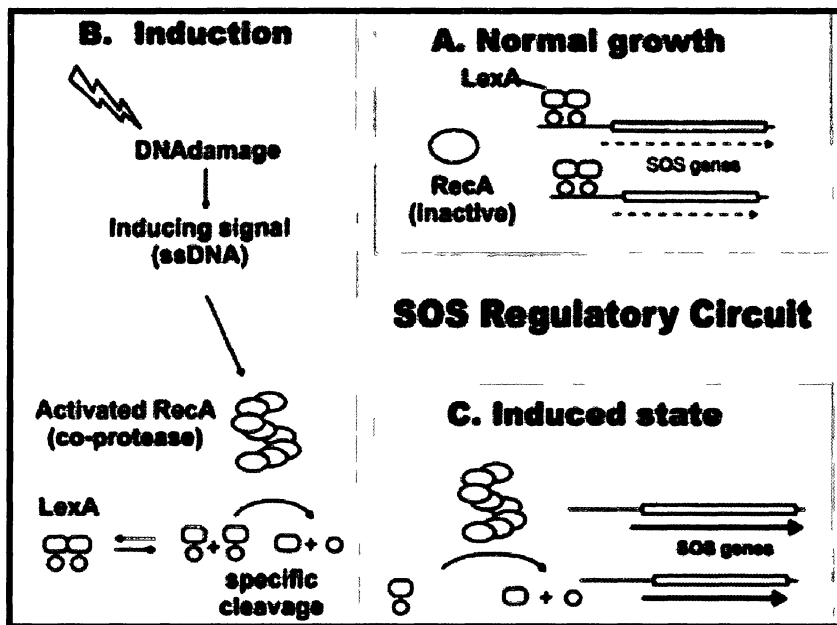


Figure 3. Schéma représentant la régulation du système SOS chez les phages d'*E. coli*. A. État de croissance normale où la protéine LexA réprime la transcription des gènes bactériens SOS et la protéine RecA reste sous forme inactive. B. Induction provoquée par des dommages à l'ADN ce qui déclenche l'activation de RecA, le clivage du répresseur LexA mais également le clivage du répresseur cI du prophage. C. L'état induit de la bactérie permet la transcription des gènes SOS et aussi le déclenchement du cycle lytique pour l'excision du phage. Image tirée du livre de Waldor MK et al, 2005.

*Cycle pseudolysogénique.* Certains phages possèdent un cycle de réplication très apparenté au cycle de lysogénie à la différence que ceux-ci persistent dans leur souche hôte de façon épisomal. De plus, une partie seulement de la population bactérienne va

être lysée par l'induction d'une certaines quantités des prophages via le cycle lytique (WEINBAUER, 2004; WALDOR *et al.*, 2005).

#### 1.2.4. Organisation génomique des phages

Le génome des phages est organisé sous forme de modules où sont regroupés les gènes partageant des fonctions complémentaires. Les phages tempérés et les phages virulents présentent la même organisation génomique à la différence que les phages tempérés possèdent un module de contrôle de la lysogénie qui assure la régulation du mode lytique et lysogénique du phage. Les paragraphes suivants décrivent les grandes lignes des modules fonctionnels généralement retrouvés chez les phages à ADN double brin.

##### 1.2.4.1. Module d'encapsulation et de structure de la capsid.

Les gènes encodés dans ce module sont responsables de l'encapsulation de l'ADN viral, nouvellement répliqué, à l'intérieur de la capsid mais sont également responsables de la structure de cette capsid. Plusieurs protéines sont impliquées dans la structure de la capsid par association de sous-unités (*Major/Minor Capsid protein*) et assemblées à l'aide d'une protéine d'échafaudage (*Scaffold protein*) (FOKINE *et al.*, 2005). Les petites et grandes sous-unités de la terminase (*Small subunit* ou TerS et *Large subunit* ou TerL) sont des enzymes ATPase dépendantes qui assurent l'encapsulation de l'ADN viral à l'intérieur de la capsid déjà formée et contrôlent la

longueur du brin d'ADN encapsidé (ALAM *et al.*, 2008; ALAM et RAO, 2008). De plus, la protéine portale (*Portal protein*) est essentielle pour l'entrée de l'ADN dans la capsid et pour bloquer la sortie de cet ADN lorsque le processus d'encapsidation est terminé (FOKINE *et al.*, 2005; ALAM et RAO, 2008).

#### 1.2.4.2. Module de structure de la queue.

Les protéines de ce module sont responsables de la structure de la queue qui est impliquée dans la reconnaissance de la souche sensible mais également dans l'éjection de l'ADN de la capsid vers le cytosol de la bactérie infectée (HENDRIX *et al.*, 2003). Cependant, la morphologie de la queue est assez différente entre les phages des familles *Myoviridae* et *Siphoviridae*. En effet, les phages de la famille des *Myoviridae* possèdent une queue contractile entourant un tube rigide. Elle est composée de protéines de structure (*Xkd* pour certains phages, *Major/Minor tail protein*, *Sheath tail*) qui sont assemblées généralement par une autre protéine, la *Tail Tape Measure* (PLISSON *et al.*, 2007). La queue des phages de la famille *Siphoviridae* est quant à elle formée d'un tube rigide mais non contractile. La composition protéique du tube reste similaire à celle des phages *Myoviridae*. La taille du gène encodant cette protéine détermine la longueur de la queue du phage. Ainsi, plus le gène est long, plus la queue est longue. La queue d'un phage joue également un rôle dans la reconnaissance des souches sensibles à celui-ci. Ainsi, à la base de la queue, des protéines fibrillaires (*Tail Fiber*) et une plaque basale (*Baseplate*), interviennent dans le processus d'adsorption

du phage avec certaines structures extérieures à la bactérie, de façon réversible et irréversible (TETART *et al.*, 1998; PUKATZKI *et al.*, 2007; SCIARA *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.3. Module de lyse cellulaire.

L'expression de ce module, qui ne comporte habituellement que deux gènes, s'effectue lors du déclenchement du cycle lytique, autant pour les phages tempérés que virulents. Ainsi, l'endolysine assure la dégradation du peptidoglycane et mène indubitablement à la lyse cellulaire et donc à la libération des nouveaux virions assemblés (FISCHETTI, 2005; LOESSNER, 2005). L'autre gène de ce module, code pour la protéine holine, une protéine hydrophobe responsable de la formation de pores à travers la membrane cytoplasmique. Ces pores formés par la holine perméabilisent la membrane ce qui permet aux endolysines d'accéder au peptidoglycane au bon moment (ZHENG *et al.*, 2008).

#### 1.2.4.4. Module de contrôle de la lysogénie

Le gène principal de ce module encode la protéine intégrase, essentielle pour l'intégration et l'excision du phage dans le chromosome bactérien (GHOSH *et al.*, 2008). D'autres protéines, telle que l'excisionase ou la résolvasse peuvent également jouer un rôle dans la lysogénisation d'une souche bactérienne, bien que certains phages ne possèdent pas ces deux enzymes. Ce module comporte également les gènes qui codent pour des répresseurs transcriptionnels (Cro, CI, etc) et des anti-répresseurs qui

régulent et déterminent les cycles de réplication des phages tempérés (OPPENHEIM *et al.*, 2005; BABIC et LITTLE, 2007). Bien que le gène *Integration Host Factor* (IHF) soit situé sur le génome de la bactérie, celui-ci, identifié principalement chez *E. coli*, est également essentiel pour l'intégration du phage tempéré dans le chromosome bactérien (RADMAN-LIVAJA *et al.*, 2006; LYZEN *et al.*, 2008).

#### 1.2.4.5. Module de réplication et de modification de l'ADN.

Ce module comprend plusieurs gènes dont les fonctions peuvent être assez diversifiées puisque ce dernier regroupe les protéines impliquées dans la réplication, la réparation, la modification et la recombinaison du génome viral. Les méthylases sont des enzymes qui auraient comme fonction de protéger l'ADN du phage (en méthylant les sites de reconnaissances aux nucléases) contre la dégradation par des nucléases produites par la bactérie pour se protéger contre l'infection du phage (LABRIE *et al.*, 2010). On retrouve également dans ce module, des gènes codant pour des nucléases qui auraient un rôle dans les processus de recombinaison, de réplication et de maturation de l'ADN viral (CRUTZ-LE COQ *et al.*, 2002). Les recombinases sont aussi retrouvées dans le module de réparation, modification et recombinaison de l'ADN du phage. Cette enzyme aurait, comme son nom l'indique, une fonction dans la réparation, la circularisation et la réplication du génome viral (LOPES *et al.*, 2010).

L'identification de ces modules et l'annotation des gènes qui composent le génome des phages permettent de comparer les génomes entre eux et d'évaluer la diversité génomique et l'évolution sous-jacente à ces modifications. La génomique des



phages permet donc de mieux comprendre le rôle des phages dans leur évolution mais également dans celle des bactéries.

### 1.2.5. Impacts des phages sur leur hôte bactérien

#### 1.2.5.1. Phages virulents

La particularité des phages virulents à utiliser le cycle lytique seulement, leur a conféré une importance clinique. En effet, la capacité des phages strictement lytiques à infecter et à lyser leur hôte a ouvert la voie au traitement des infections bactériennes que l'on appelle phagothérapie ou thérapie par les phages (KUTTER et SULAKVELIDZE, 2005). Plusieurs études ont démontré le potentiel des phages virulents pour traiter des infections bactériennes (*E. coli*, *Enterococcus faecium*) qui affligent les animaux (HANLON, 2007; FREITAG *et al.*, 2008). Or, l'application de la phagothérapie sur les animaux ouvre également la voie pour prévenir certaines infections bactériennes, qui sont transmises aux humains par la chaîne alimentaire. Ainsi, certaines infections animales causées par des pathogènes associés aux infections alimentaires, comme *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica* ou *E. coli*, ont pu être traitées avec succès (LOC CARRILLO *et al.*, 2005; BORIE *et al.*, 2008; JOHNSON *et al.*, 2008; CAPPARELLI *et al.*, 2010). De plus, l'utilisation en prophylaxie de phages virulents a aussi été étudiée pour quelques pathogènes alimentaires (*E. coli*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *S. aureus*) comme agents de conservations sur des aliments emballés prêts à la consommation. L'utilisation de certains de ces phages

a d'ailleurs été approuvée par la *US Food and Drug Administration* (FDA) et la *US Department of Agriculture* (USDA) à des fins commerciales (GARCIA *et al.*, 2008; MARTINEZ *et al.*, 2008). Finalement, la phagothérapie semblerait être également un outil thérapeutique intéressant contre les infections bactériennes chez des patients humains, mais cette approche n'est pas encore approuvée dans les pays occidentaux et est demeurée jusqu'à maintenant limitée aux pays de l'Europe de l'Est et de l'Ex-Union Soviétique. En effet, plusieurs cocktails de phages ont été créés et sont utilisés pour traiter des infections dermatologiques (Pyophages) et gastro-intestinales (Intestiphages) (FORTUNA *et al.*, 2008; KUTATELADZE et ADAMIA, 2008).

Les phages virulents peuvent également avoir un impact sur l'écosystème en général. En effet, la réplication des phages virulents, par le cycle lytique, peut cibler une population bactérienne dominante lorsque ceux-ci deviennent plus abondants. Cette dynamique soutient alors la diversité microbienne mais permet également la coexistence d'autres compétiteurs qui sont moins adaptés à l'environnement (WEINBAUER, 2004; SUTTLE, 2005).

#### 1.2.5.2. Phages tempérés

L'interaction entre les phages tempérés et leurs lysogènes a mis en évidence le rôle important que peuvent jouer ces phages dans l'évolution et la virulence des bactéries. Étant donné que les deux tiers de toutes les  $\alpha$ -protéobactéries et des bactéries Gram + (% G+C faible) arborent au moins un prophage dans leur génome et que ceux-ci portent souvent des gènes non essentiels à la réplication de celui-ci, les

phages tempérés sont considérés comme des acteurs actifs dans la diversité et l'évolution bactérienne à plusieurs niveaux (CASJENS, 2003). Les paragraphes suivants décrivent sommairement différentes façons par lesquelles les prophages peuvent influencer leur hôte bactérien.

*Réarrangements génomiques.* La comparaison de génomes bactériens représentant des souches différentes (ex : sérotypes différents) appartenant à une même espèce mène souvent à l'observation de différences génomiques importantes qui mettent parfois en lumière des réarrangements chromosomiques majeurs (BANKS *et al.*, 2002; NAGIEC *et al.*, 2004). Les phages tempérés, sous forme de prophages, sont reconnus pour servir de point d'ancrage pour des réactions de recombinaison homologues, en particulier lorsque deux ou plusieurs prophages apparentés sont présents dans la même bactérie. Cela mène à des réarrangements majeurs comme des inversions chromosomiques et on suppose que ces modifications de l'ADN bactérien par les phages tempérés modifient le « *fitness* » de ces lysogènes (BRUSSOW *et al.*, 2004).

*Inactivation de gènes.* Les phages tempérés peuvent également avoir un impact sur le phénotype bactérien par l'inactivation de gènes chez la bactérie. Par exemple, deux prophages (L54a et  $\phi$ 13) ont été identifiés chez *S. aureus* qui inactivent les gènes lipase et  $\beta$ -toxine respectivement lors de leur intégration dans le chromosome bactérien, ce qui inhibe la transcription de ces gènes et diminuent le phénotype virulent de cette souche (BRUSSOW *et al.*, 2004). L'intégration de prophages dans le chromosome bactérien peut donc inactiver ou moduler l'expression de gènes et altérer la virulence et le fitness bactérien (CANCHAYA *et al.*, 2004).

*Protection contre les phages lytiques.* L'intégration d'un phage tempéré confère habituellement à la bactérie lysogène une certaine immunité contre des phages tempérés qui sont apparentés au prophage intégré. Par exemple, lorsqu'un phage tempéré infecte une bactérie déjà lysogène pour un prophage qui possède de la similarité génomique avec les gènes régulateurs du cycle de réplication, le processus d'infection du phage tempéré sera arrêté. En effet, l'expression des gènes requis pour l'initiation du cycle lytique sera inhibée par le prophage et le phage tempéré ne sera pas en mesure d'infecter et de répliquer ou d'intégrer le lysogène. De plus, les phages peuvent encoder et exprimer des protéines d'exclusion à la surinfection, ce qui peut également empêcher l'infection par des phages apparentés. Ces protéines d'exclusion se fixent à des composantes de la membrane, généralement situées au point d'entrée utilisé par les phages pour injecter l'ADN. Le changement de conformation au site d'injection de l'ADN viral ainsi créé empêche alors l'infection par des phages apparentés (MC GRATH et VAN SINDEREN, 2007; LABRIE *et al.*).

*Lyse cellulaire de bactéries compétitrices.* Une autre façon par laquelle une bactérie lysogène peut tirer profit d'héberger un prophage est par l'induction spontanée du ou des prophages d'une fraction de la population bactérienne. Les nouveaux virions iront ensuite infecter et lyser les souches bactériennes rivales, lorsque celles-ci sont sensibles au phage en question. Cette forme de « suicide altruiste » permet de sacrifier une partie de la population lysogène afin d'éliminer les souches compétitrices dans l'environnement et ainsi assurer le maximum de ressource à la bactérie lysogène (BOSSI *et al.*, 2003; GORSKI et WEBER-DABROWSKA, 2005). La lyse cellulaire,

causée par l'induction spontanée des phages tempérés et par l'infection d'autres souches sensibles, provoque également un recyclage des matières organiques (nutriments, carbone) parmi les communautés microbiennes, ce qui permet l'utilisation de ces éléments pour la survie de la population dominante (SAWSTROM *et al.*, 2008).

*Conversion lysogénique.* Finalement, un des impacts les plus importants que peuvent avoir les phages tempérés concerne la conversion lysogénique. La conversion lysogénique représente un changement phénotypique chez une souche lysogène suite à l'intégration d'un prophage qui encode des gènes étrangers (CANCHAYA *et al.*, 2003; WALDOR *et al.*, 2005). Étant donné que les prophages peuvent constituer jusqu'à 20% de l'ADN d'un génome bactérien et que les gènes codant pour des facteurs de virulence peuvent représenter jusqu'à 15% du génome viral, les phages tempérés sont donc des éléments mobiles dont la présence peut avoir un impact assez important sur la bactérie lysogène (BOSSI *et al.*, 2003; CASJENS, 2003). D'une part, plusieurs études ont démontré que les prophages peuvent encoder plusieurs facteurs de virulence différents et moduler leurs expression (BRUSSOW *et al.*, 2004). Parmi les facteurs de virulence, les toxines sont les exemples de conversion lysogénique les plus connus. La toxine Shiga, produite par *E. coli* est encodée par un phage et son expression est régulée par l'induction du prophage. Or, l'induction de ce prophage peut mener à l'infection d'une nouvelle souche non toxigène et permettre le transfert des gènes codant pour cette toxine à la nouvelle souche (WAGNER *et al.*, 2002; IMAMOVIC *et al.*, 2009; SHIMIZU *et al.*, 2009). Plusieurs autres pathogènes sont considérés comme toxigènes et leurs toxines seraient également encodées par des phages tempérés (BAE *et al.*, 2006; CHOI *et al.*, 2009; OLIVER *et al.*, 2009). Le tableau A1 fournit

d'ailleurs plusieurs autres exemples de facteurs de virulence pouvant être encodés par les phages tempérés et être transférés d'une souche à une autre (BRUSSOW *et al.*, 2004; BRYAN *et al.*, 2008; RICE *et al.*, 2009). D'autre part, les phages tempérés ont également la possibilité d'encoder des gènes qui régulent l'expression de facteurs de virulences encodés par le chromosome bactérien et qui ne sont pas, à priori, reliés à un ADN viral. Ainsi, quelques études font mention du rôle que pourrait jouer les prophages chez *Clostridium difficile*, par exemple, en augmentant ou en diminuant l'expression des toxines (GOH *et al.*, 2005; GOVIND *et al.*, 2009).

### 1.3. *Clostridium difficile*

#### 1.3.1. Écologie

##### 1.3.1.1. Distribution de la bactérie

La bactérie *C. difficile* a été isolée et caractérisée pour la première fois en 1935 comme une bactérie de la flore intestinale d'un nouveau-née en santé par Hall et O'Tool (BARTLETT *et al.*, 1978). Par la suite, dans les années soixante-dix, la bactérie a été associée comme étant l'agent causant les colites pseudomembraneuses et en 1978, les diarrhées à *C. difficile* (DACD) ont inclus plusieurs autres symptômes dont la sévérité est plus importante (mégacolon toxique, septicémie, mort)(BLOSSOM et MCDONALD, 2007). Depuis, *C. difficile*, une bactérie Gram + et anaérobie strict, a été isolée dans plusieurs autres endroits tels que les fèces d'animaux, les eaux de rivières et les eaux usées, les légumes crus et même dans les eaux de piscines

(BRAZIER, 1998). Bien que *C. difficile* n'ait pas été identifiée comme une bactérie à l'origine d'infections zoonotiques, plusieurs espèces animales (chevaux, chats, chiens, porcs et bovins) semblent être porteurs de cette bactérie et développent parfois des diarrhées et pourraient donc présenter un risque pour la transmission chez les humains (ARROYO *et al.*, 2005). Or, chez l'homme, la bactérie *C. difficile* peut également être retrouvée chez des porteurs sains, des personnes ayant acquis la bactérie mais qui ne présentent pas les symptômes de la maladie associée à *C. difficile*. Plusieurs études font mention de porteurs sains chez 50 à 80% des enfants âgés entre 6 mois et 3 ans (HOLST *et al.*, 1981; DONTA et MYERS, 1982; GEORGE, 1986). Deux hypothèses ont été soulevées pour tenter d'expliquer ce phénomène soit la présence d'anticorps apportés par la mère ou l'absence des récepteurs aux toxines de *C. difficile*. Chez les adultes, ce pourcentage diminue à moins de 3% ce qui pourrait être expliqué par le changement dans la composition de la flore intestinale mais aucune explication appuyée ne peut être apportée au fait que ce pourcentage diminue à l'âge adulte (KUIJPER *et al.*, 2006).

#### 1.3.1.2. Épidémiologie de *C. difficile*

Évidemment, *C. difficile* cause une maladie simplement désignée sous le terme d'infection à *Clostridium difficile* (ICD). L'infection, causé par cette bactérie, est considérée comme une infection nosocomiale puisque la majorité des personnes qui contractent la maladie, le font en milieu hospitalier. Entre 16 et 35 % des gens qui sont hospitalisés seront colonisés par *C. difficile* au cours de leur séjour, pourcentage qui

varie en fonction de la condition du patient, de la virulence de la souche rencontrée et aussi du temps d'hospitalisation (KUIJPER *et al.*, 2006). Une épidémie d'ICD dans les hôpitaux du Québec en 2004-2005 a été provoquée par une souche hypervirulente, la souche BI/NAP1/027 (PEPIN *et al.*, 2004; WEISS *et al.*, 2007). Plus de 20 000 cas d'ICD ont été répertoriés au Québec entre 2004 et 2007, dont plus de 82% de ces infections ont été causés par la souche hypervirulente (LOO *et al.*, 2005; HUBERT *et al.*, 2007; LABBE *et al.*, 2008). L'épidémie qui a sévit au Québec et aux États-Unis n'a pas tardé à se répandre ailleurs dans le monde puisque rapidement, plusieurs pays d'Europe (figure 4) et d'Asie ont rapporté plusieurs cas d'infections associées à la souche hypervirulente (KUIJPER *et al.*, 2008; BAUER *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009; TERHES *et al.*, 2009). De plus, de nouvelles souches, encore sporadiques pour l'instant, semblent faire émergence et auraient éventuellement le potentiel de devenir épidémiques (GOORHUIS *et al.*, 2008; LEAL *et al.*, 2008; ARVAND *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2009; MCFARLAND, 2009; RUPNIK *et al.*, 2009).

A. Distribution of *Clostridium difficile* type 027, by countries in Europe, as of June 2008

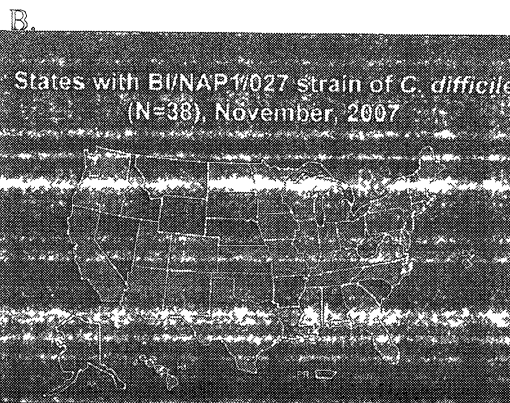


Figure 4. Distribution de la souche hypervirulente BI/NAP1/027 en 2007-2008. A. Carte représentant la répartition des ICD en Europe. B. Carte représentant la répartition des ICD aux États-Unis d'Amérique.



### 1.3.2. Facteurs de risques

Plusieurs facteurs de risques ont été identifiés et influencent la susceptibilité de développer une ICD. Ces facteurs sont répartis en trois grandes catégories soit les facteurs de l'hôte, l'augmentation à l'exposition aux spores et les facteurs impliqués dans la destruction de la flore intestinale normale.

*Facteurs de l'hôte.* Les personnes âgées (plus de 65 ans) sont beaucoup plus susceptibles d'être infectées et de souffrir des symptômes de l'infection tout comme les personnes dont le système immunitaire est supprimé (MCFARLAND, 2009). La condition du système immunitaire semble donc jouer un grand rôle dans le risque de développer cette infection d'autant plus que la présence d'anticorps IgG pourrait neutraliser l'activité des toxines produites par *C. difficile* (KYNE *et al.*, 2001).

*Exposition aux spores.* La bactérie *C. difficile* a la capacité de sporuler lors de conditions environnementales défavorables à sa prolifération. Cet état de latence permet à la bactérie de survivre pendant très longtemps à la dessiccation, à la présence de produits chimiques et à des températures élevées (SORG et SONENSHEIN, 2008). Cette capacité à survivre dans des endroits hostiles et à résister aux méthodes conventionnelles de nettoyage lui permet donc de persister plus longtemps et de se disséminer plus facilement, particulièrement dans les milieux hospitaliers où la bactérie peut contaminer diverses surfaces. Une mauvaise hygiène des mains et la désinfection inefficace de la chambre d'une personne atteinte d'ICD augmentent les risques de dissémination de la bactérie. La durée d'hospitalisation est également un autre facteur qui peut influencer le risque de développer la maladie puisque

l'exposition prolongée aux spores dans le milieu hospitalier augmente les risques de développer l'ICD (BLOSSOM et MCDONALD, 2007; DUBBERKE *et al.*, 2007).

*Destruction de la flore intestinale.* L'exposition à des antibiotiques à large spectre est particulièrement problématique puisque cela détruit les bactéries de la flore intestinale normale (BLOSSOM et MCDONALD, 2007), ce qui en fait probablement le facteur de risque le plus important. La barrière physique de la flore normale de l'intestin étant détruite par le traitement aux antibiotiques, *C. difficile* peut accéder aux nutriments et aux cellules épithéliales de l'intestin et entamer la colonisation et la production de toxines, causant ainsi les différents symptômes de la maladie. D'ailleurs, plusieurs antibiotiques (clindamycine, céphalosporine et fluoroquinolones) ont été associés à une incidence des ICD plus élevée puisque la souche hypervirulente NAP1/027, par exemple, est résistante à ces antibiotiques (MCFARLAND, 2009; RUPNIK *et al.*, 2009).

### 1.3.3. Symptômes

Les symptômes issus des ICD sont assez variés et leurs sévérités dépendent de la condition de l'hôte mais également de la virulence de la souche. Les symptômes les moins sévères s'apparentent à des diarrhées, des inflammations locales du colon, des crampes abdominales, etc. mais peuvent s'aggraver et provoquer des ileus paralytiques, la colite pseudomembraneuse, le mégacolon toxique avec nausée, etc. (SUNENSHINE et MCDONALD, 2006; BARTLETT et GERDING, 2008). Par ailleurs, la majorité de ces symptômes sont causés par l'action des toxines A et B,

sécrétées par *C. difficile*, sur les cellules épithéliales de l'intestin et par la réponse immunitaire qui s'en suit (RUPNIK *et al.*, 2009).

#### 1.3.4. Traitements des ICD

À l'heure actuelle, les principaux traitements disponibles et approuvés pour traiter les infections à *C. difficile* sont l'administration de deux antibiotiques, le métronidazole ou la vancomycine. Le métronidazole est généralement administré en première ligne aux patients atteints d'ICD puisque celui-ci est peu coûteux, assez efficace et moins problématique si le phénomène de résistance devient plus important (HEDGE *et al.*, 2008). À l'inverse, la vancomycine est utilisée si le traitement au métronidazole est inefficace, si la souche hypervirulente (BI/NAP1/027) est détectée, ou si le patient présente des épisodes de récurrences. Par contre, l'utilisation accrue de la vancomycine augmente le risque de sélection de bactéries résistantes à la vancomycine, comme les entérocoques (ERV). De plus, la téicoplanine, un glycopeptide dont l'activité antimicrobienne est similaire à la vancomycine, semble très prometteur et est également utilisée comme traitement contre les ICD, surtout en Europe (MCMASTER-BAXTER et MUSHER, 2007; NOREN *et al.*, 2009). Plusieurs autres traitements, en majorité de nouveaux antibiotiques, sont présentement en essais cliniques mais aucun n'a encore été accepté (HECHT *et al.*, 2007). Certaines thérapies alternatives aux antibiotiques contre *C. difficile* tels que les vaccins à ADN (GARDINER *et al.*, 2009), l'immunothérapie tels que les vaccins conventionnels et les anticorps monoclonaux (KYNE et KELLY, 1998; GERDING *et al.*, 2008; BAUER et

VAN DISSEL, 2009), les probiotiques (PARKES *et al.*, 2009), la prophylaxie de l'infection par la colonisation de souches de *C. difficile* non toxigènes (SAMBOL *et al.*, 2002; MERRIGAN *et al.*, 2009) et la transplantation fécale attendent encore de faire leur preuve (HEDGE *et al.*, 2008; MCFARLAND, 2009).

### 1.3.5. Facteurs de virulence

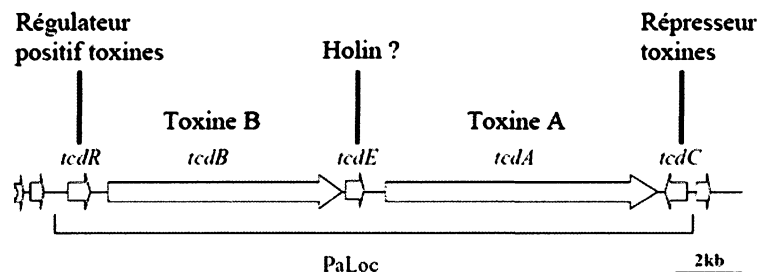
La bactérie *C. difficile* possède plusieurs facteurs de virulence différents bien que ceux-ci ne soient pas tous présents en même temps chez toutes les souches virulentes et qu'ils ne soient pas tous exprimés au même moment.

#### 1.3.5.1. Toxines A et B

*Mode d'action des toxines.* Le facteur de virulence le plus important est sans doute les deux exotoxines A et B (une entérotoxine et une cytotoxine respectivement) puisque toutes les souches virulentes causant des ICD possèdent et expriment au moins la toxine B, sinon les deux. D'ailleurs, les deux toxines auraient des rôles complémentaires dans la virulence d'une souche toxigène bien que la toxine B semble essentielle à cette virulence et que celle-ci est 100-1000x plus cytotoxique que la toxine A (JANK *et al.*, 2007; LYRAS *et al.*, 2009). Ainsi, les toxines A et B, une fois sécrétées à l'extérieure de la bactérie se fixent à des récepteurs cellulaires non protéiques (disaccharides) situé à la surface des cellules épithéliales par la portion C-terminale de ces deux toxines (VOTH et BALLARD, 2005; EGERER *et al.*, 2007).

Suite à cet attachement, les toxines sont transloquées à l'intérieur des cellules cibles par endocytose et l'intérieur de l'endosome est acidifié, ce qui entraîne un changement de conformation des toxines et permet la formation d'un pore à travers la membrane de l'endosome (GENTH *et al.*, 2008). L'activité protéolytique des toxines provoque le clivage de ceux-ci et permet la libération de la partie N-terminale des toxines A et B, qui possèdent une activité enzymatique glucosyltransférase (EGERER *et al.*, 2007; RUPNIK *et al.*, 2009). La portion enzymatique cible alors les petites protéines GTPase de la famille Rho (Rho, Rac, Ras, cdc42) pour les glucosyler à partir d'uridine diphosphate (UDP)-glucose (GERHARD *et al.*, 2008). Ces modifications inactivent de façon irréversible les protéines GTPases, responsable de la régulation du cytosquelette d'actine (GENTH *et al.*, 2008). L'inactivation de ces protéines GTPases entraîne une perte de structure de la cellule par la destruction de l'actine et des jonctions serrées. S'en suit le relâchement de médiateurs inflammatoires (cytokines) par le recrutement de cellules immunitaires (macrophages, neutrophiles, mastocytes) et l'apoptose de la cellule par activation des caspases (KIM *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2007; MEYER *et al.*, 2007; GERHARD *et al.*, 2008; MATTE *et al.*, 2009).

*Régulation de l'expression des toxines.* Les toxines A et B sont situées sur le chromosome bactérien dans une région spécifique appelée PaLoc (voir figure 5). Les deux toxines sont bordées par un régulateur positif (TcdR), un régulateur négatif (TcdC) et un gène s'apparentant à une holine de phage (TcdE) autant d'un point de vue structural que fonctionnel (HUNDSBERGER *et al.*, 1997; TAN *et al.*, 2001).



**Figure 5. Schéma représentant le locus de pathogénicité (PaLoc).**

La holine est une protéine retrouvée chez les phages qui permet de perméabiliser la membrane cellulaire à la fin du cycle lytique pour permettre l'accès de l'endolysine à la paroi de peptidoglycane. De façon similaire, TcdE aurait comme fonction de perméabiliser la membrane pour permettre la sécrétion des toxines A et B, puisque ces dernières ne possèdent pas de signal de sécrétion (TAN *et al.*, 2001). Le gène *tcdR* code pour un facteur sigma alternatif liant l'ARN polymérase et permettant l'initiation de la transcription des toxines A et B en fin de phase exponentielle et en phase stationnaire principalement (RUPNIK *et al.*, 2009). À l'inverse, le gène *tcdC* code pour un régulateur négatif de la synthèse des toxines en interférant avec la reconnaissance du complexe TcdR-ARN polymérase et les promoteurs des toxines A et B (DUPUY *et al.*, 2008). Or, certaines souches présentent une délétion d'une paire de base en position 117 du gène *tcdC*, ce qui change le cadre de lecture et provoque l'apparition d'un codon stop prématuré qui mène à la synthèse d'une protéine largement tronquée. Cette délétion permettrait à la bactérie de produire davantage de toxines (DUPUY *et al.*, 2008). La synthèse des toxines A et B est également modulée par les conditions de croissance et l'environnement de la bactérie. En effet, la synthèse est plus importante en fin de phase exponentielle et en début de phase stationnaire. D'ailleurs, quelques études ont démontré que la présence de prophages chez *C. difficile* peut également

altérer la production des toxines A et B dont la présence du gène RepR, encodé par le phage  $\phi$ CD119, qui diminue la production en toxines (GOVIND *et al.*, 2009). De plus, les facteurs environnementaux tels que les nutriments (niveaux de glucose, d'acides aminés et de biotine), la température ou la présence d'antibiotiques ont également un impact sur la production de toxines A et B (KARLSSON *et al.*, 2003; VOTH et BALLARD, 2005; KARLSSON *et al.*, 2008; RUPNIK *et al.*, 2009).

#### 1.3.5.2. Toxine binaire (CDT)

*Mode d'action de la toxine.* Bien que la toxine binaire ou CDT ne soit retrouvée que dans 1 à 16 % des patients atteints d'ICD, le rôle de cette toxine dans la sévérité de l'infection semble ambigu (GERIC *et al.*, 2004). En effet, la toxine CDT est encodée par la souche hypervirulente mais également par d'autres souches moins virulents ce qui démontre que cette toxine semble être associée de façon quelconque à un certain degré de sévérité des symptômes des ICD. La toxine binaire est composée de deux sous-unités, CdtA et CdtB qui assurent les fonctions enzymatiques (ADP-ribosyltransférase) et de liaison/translocation de la toxine respectivement (RUPNIK *et al.*, 2009). La sous-unité CdtA, une fois dans le cytosol, va ribosyler l'actine G des cellules épithéliales de l'intestin, ce qui inhibe toute polymérisation subséquente de l'actine mais également l'élongation des filaments d'actine F. Cette toxine aurait également un impact sur la virulence de la bactérie en augmentant l'adhésion de *C. difficile* sur les cellules épithéliales (SCHWAN *et al.*, 2009).

*Régulation de l'expression de la toxine.* La toxine CDT est également située sur un locus, le CdtLoc bien que sa régulation soit beaucoup plus simple. En effet, le gène *cdtR* est situé en amont des gènes codant pour les sous-unités CdtA et CdtB et régulerait l'expression de ces deux protéines. Le gène *cdtR* fait également parti de la famille des régulateurs LytR, dont la protéine AgrA de *S. aureus* fait partie (CARTER *et al.*, 2007).

### 1.3.5.3. Autres facteurs

*Mode d'action des autres facteurs.* Parmi les autres facteurs de virulence, les facteurs d'adhésion sont aussi importants. Ceux-ci regroupent plusieurs protéines identifiées (*S-layer*, *CwpV* et *Cwp66*, *GroEL*, *fibronectin binding protein*) situées à la surface de la bactérie et qui augmenteraient l'adhésion de *C. difficile* aux cellules cibles (DENEVE *et al.*, 2009; EMERSON *et al.*, 2009; FAGAN *et al.*, 2009; RUPNIK *et al.*, 2009). Les flagelles sont un autre facteur de virulence important puisque ceux-ci permettent à la bactérie de traverser plus facilement le mucus pour atteindre les cellules cibles mais permettraient également une meilleure d'adhésion aux cellules épithéliales (TASTEYRE *et al.*, 2000; TASTEYRE *et al.*, 2001; TWINE *et al.*, 2009). Une protéase a également été retrouvée comme autre facteur de virulence. En effet, la protéine Cwp84 pourrait avoir une activité protéolytique qui aurait comme fonction de dégrader les tissus à proximité de *C. difficile* et donc, faciliter l'envoi des toxines aux cellules cibles.



*Régulation de l'expression des autres facteurs.* Très peu de choses sont connues sur la régulation des autres facteurs de virulences. Toutefois, la modification post-traductionnelle par glycosylation des protéines de flagellines aurait la possibilité d'augmenter la motilité de *C. difficile* (TWINE *et al.*, 2009). De plus, les protéines de surface *S-layer* seraient régulées par la protéine Cwp84, une protéase cystéine. En effet, après transcription et traduction de la protéine précurseur SlpA, celle-ci est transloquée à la surface extérieure de la membrane externe. La protéine précurseur est alors clivée en deux portions (*High Molecular Weight, HMW* et *Low Molecular Weight, LMW*) par la protéase Cwp84. Ces deux protéines sont alors réassemblées pour former les *S-layer*, une structure en treillis qui tapisse la surface de la bactérie (DANG *et al.*, 2010).

#### 1.3.6. Méthodes de typage

Afin de caractériser et de différencier les diverses souches de *C. difficile* isolées jusqu'à maintenant, plusieurs méthodes de typage moléculaire ont été développées, chacune ayant leurs avantages et inconvénients. Mon but ici n'est pas de faire une revue exhaustive de toutes ces techniques, mais de vous présenter les plus pertinentes, i.e. celles qui sont le plus souvent utilisées ou qui sont utilisées comme méthodes de référence. Par exemple, la souche hypervirulente BI/NAP1/027 correspond au profil de restriction HindIII de type « BI » (REA), au profil de restriction en champ pulsé (PFGE) de l'Amérique du Nord de type « NAP1 » et au ribotype par PCR « 027 ». Une brève description de ces méthodes est présentée ci-dessous.

#### 1.3.6.1. REA et PFGE

Le typage des souches de *C. difficile* par profils de restriction est une technique rapide et facile d'exécution qui utilise le principe de comparaison entre les profils de bandes sur gel, établi par digestion enzymatique (HindIII) de l'ADNg entier de la souche bactérienne. Cependant, cette technique devient fastidieuse lorsque plusieurs échantillons sont typés et les profils sont parfois difficiles à interpréter lorsque les produits de digestions sont nombreux (BRAZIER, 1998). Une autre technique largement utilisée pour typer les souches de *C. difficile* est le *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Cette technique de typage moléculaire utilise comme principe la digestion enzymatique du chromosome bactérien en utilisant une enzyme de restriction dont les sites de coupure ne sont pas très fréquents (SmaI en l'occurrence). Les quelques fragments générés, de hauts poids moléculaires, sont par la suite séparés sur gel de poly-acrylamide (PAGE) en utilisant un champ pulsé. Le résultat fournit un patron de quelques bandes dont le profil est comparé avec les autres souches. Cette technique est assez discriminatoire et le profil assez facile à comparer mais présente une procédure lente et complexe comparativement aux autres méthodes (BRAZIER, 1998; BIDEF *et al.*, 2000; SAMBOL *et al.*, 2000).

#### 1.3.6.2. Ribotypage par PCR

Le principe de cette technique repose sur le polymorphisme de la région intergénique (*spacer*) entre les gènes codant pour les ARN ribosomaux 16S et 23S de *C. difficile* (voir figure 6). Cette région intergénique diffère d'une souche à l'autre de

*C. difficile* par sa longueur et sa séquence, de même que par le nombre de copies de ce locus sur le chromosome bactérien. Ainsi, la région est amplifiée par réaction PCR et les produits PCR sont séparés et analysés sur gel d'acrylamide non dénaturant (PAGE). Le patron de bande obtenu est ensuite comparé avec d'autres souches de référence du laboratoire. Cette technique possède un bon pouvoir discriminant, est rapide et facile à exécuter mais présente parfois des profils plus complexes et plus difficiles à analyser (BRAZIER, 1998; BIDEZ *et al.*, 1999; BIDEZ *et al.*, 2000; FORTIER et MOINEAU, 2007).



**Figure 6. Représentation schématique de l'espace intergénique 16S-23S dans le génome de *C. difficile*.** Le nombre et la longueur des espaces intergéniques varient parmi les diverses souches.

#### 1.4. Objectifs du projet

Avec les nombreux problèmes émergent associés aux infections à *Clostridium difficile*, mon projet visait à évaluer la possibilité d'utiliser des phages virulents contre cette bactérie afin d'éventuellement les utiliser comme outils thérapeutiques alternatifs. À ce jour, peu de phages tempérés chez *C. difficile* ont été isolés et caractérisés alors qu'aucun phage virulent n'a été répertorié dans la littérature. Dans un premier temps, nous avons tenté d'isoler des phages virulents provenant d'eaux usées et de selles de patients atteints d'ICD, pour ensuite les caractériser dans un deuxième temps. Malheureusement, malgré les efforts soutenus, aucun phage virulent n'a été découvert pendant l'exercice de ce projet. Cependant, quatre phages tempérés différents

( $\phi$ MMP01-04) ont été isolés des selles de patients atteints d'ICD et les objectifs du projet ont donc été modifiés pour tenir compte de cette nouvelle réalité. Nous avons donc caractérisé ces phages tempérés au niveau morphologique, génomique et également en évaluant l'importance de l'induction de ceux-ci. De plus, l'impact de ces phages a été évalué sur certains phénotypes bactériens, plus précisément la motilité et la production de toxines A et B chez *C. difficile*.

Ainsi, les phages tempérés  $\phi$ MMP01-04, ont été caractérisés au niveau morphologique par microscopie électronique et la similarité génomique entre ces phages a été étudiée par hybridation de type Southern. Le séquençage des génomes de deux des phages tempérés a été effectué par *454 pyrosequencing*. Cette caractérisation nous a permis d'apporter un peu plus d'information sur les phages tempérés chez *C. difficile*. Ces données nous ont également permis de confirmer l'existence d'une certaine diversité génétique parmi ces phages. D'autre part, aucune évidence directe n'a été établie sur l'impact que pouvaient avoir les phages  $\phi$ MMP01-04 sur la motilité de *C. difficile* alors que deux de ces phages ont démontré une tendance à influencer, positivement et négativement, la production de toxines A et B.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1. Souches, milieux de culture et conditions de croissance

Les isolats cliniques de *Clostridium difficile*, qui composent notre collection, ont été obtenus à partir de selles de patients infectés par la bactérie (ICD) dans différents hôpitaux du Québec, dont le Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke (CHUS) et l'hôpital Jean-Talon de Montréal entre 2004 et 2006. Le reste de la collection de *C. difficile* est composé d'isolats obtenus à partir d'affluents de différentes usines de traitement des eaux usées de la ville de Sherbrooke, de la rivière Magog, de la rivière St-François ainsi que de ruisseaux dans la région de l'Estrie. Les souches de *C. difficile* utilisées dans le cadre de ma maîtrise ont été incubées dans le milieu de culture *Brain Heart Infusion* (Oxoid, Napean, ON, Canada) comme milieu de culture standard et dans le milieu *Tryptose-Yeast Extract* (Oxoid pour le tryptose et BioShop, Burlington, ON, Canada pour le Yeast Extract) lors des essais d'inductions spontanées, provoquées et lors des quantifications en toxines A et B. Les cultures de *C. difficile* ont toujours été incubées à une température de 37°C dans des conditions d'anaérobiose stricte (absence d'oxygène) à l'intérieur d'une chambre anaérobique (Thermo Electron, Marietta, OH, USA). Les souches de *Escherichia coli* Top10 qui ont été utilisées lors des essais de clonage direct ont, quant à elle, étéensemencées dans le milieu Luria-Bertani (BioShop) en présence d'ampicilline à une concentration finale de 50 µg/ml. Ces souches d'*E. coli* ont été incubées à une température de 37°C dans des conditions aérobiques et avec agitation (environ 250 rpm).

## 2.2. Extraction et purification d'ADN

### 2.2.1. Extraction d'ADN génomique bactérien

L'extraction des acides désoxyribonucléiques génomiques (ADNg) des souches de *C. difficile* a été effectuée tel que décrite dans le protocole de la trousse commerciale *illustra<sup>TM</sup> bacteria genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, Baie d'Urfée, Qc, Canada). L'ADNg a été quantifié sur gel d'agarose 0,8% ou par dosage à l'aide d'un appareil spectrophotomètre Nanovue (GE Healthcare). Lorsque nécessaire, une précipitation à l'éthanol a été effectuée pour concentrer l'ADNg (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). Brièvement, de l'acétate de sodium 3M, pH 5.2 (Bioshop) a été ajouté à l'ADN à raison de 1/10<sup>e</sup> du volume total, suivi de 2 volumes d'éthanol anhydre. Lorsque les concentrations étaient très faibles, 1 µl de glycogène 20 mg/ml (USB, Cleveland, OH, USA) était ajouté. L'échantillon était alors mis à -80°C pour 30 minutes puis était centrifugé à 20 817 xg pendant 10 minutes à température pièce (TP). Après 3 lavages à l'éthanol 70 % pour éliminer les résidus de sels, l'ADNg était finalement solubilisé dans un tampon de Tris-HCl 10 mM, pH 8 puis conservé à -20°C.

### 2.2.2. Extraction d'ADN génomique de bactériophages

Afin d'obtenir des quantités appréciables d'ADNg de phages, les extractions se sont effectuées sur différents volumes de lysats d'amplification, dépendamment des besoins (entre 1 ml jusqu'à 1 L). L'extraction de l'ADNg de phages est réalisée à partir de lysats de phages (voir section 2.5.1) centrifugés à 4000 xg pendant 10 minutes à TP

et filtrés sur filtre 0,45  $\mu\text{m}$  (Sarstedt, Montréal, Qc, Canada). Ensuite, les lysats de phages sont traités pour éliminer toutes traces d'ADN et d'ARN ainsi que pour lyser les capsides, libérer l'ADN de phages et se débarrasser des protéines résiduelles tel que décrit précédemment (FORTIER et MOINEAU, 2007). Trois extractions phénol-chloroforme (50 :50 v :v, Bioshop) sont ensuite effectuées sur les surnageants récupérés afin d'éliminer les protéines résiduelles (SAMBROOK et RUSSELL, 2001). L'ADN est finalement précipité par l'ajout de 0,7 volume d'isopropanol (Laboratoire Mat, Montréal, Qc, Canada) et centrifugé à 20 817 xg pendant 10 min à 4°C. Après trois lavages du culot d'ADN à l'éthanol 70%, celui-ci est finalement séché à l'air libre pendant quelques minutes puis l'ADN est solubilisé dans du Tris-HCl 10 mM pH 8.

Pour purifier de grandes quantités d'ADNg de phages, un volume de lysat d'amplification de 200 ml à 1L a été utilisé. Pour ce faire, 0,5M final de NaCl (BioShop) est ajouté au lysat, suivi d'une incubation à 4°C pendant 1h et d'une centrifugation à 8000 xg pendant 15 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Ensuite, les particules virales du surnageant sont précipitées et concentrées après l'ajout de 10% polyéthylène glycol (PEG-8000, BioShop). Une fois le PEG dissout avec agitation à TP, le surnageant est incubé à 4°C avec agitation lente toute la nuit. Le lendemain, le surnageant est centrifugé une nouvelle fois à 8000 xg pendant 15 min à 4°C pour y récupérer le culot de phages, qui sera resuspendu dans une solution de Tris-HCl 10 mM pH 8. Le reste de l'extraction se déroule alors comme mentionné ci-haut.

### 2.2.3. Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction des ADN plasmidiques utilisés lors des essais de clonage, a été effectuée selon une méthode maison utilisant la silice. Brièvement, pour une mini-préparation d'ADN, 1,5-3 ml d'une culture en phase stationnaire d'*E. coli* contenant le plasmide ont été centrifugés à 14000 xg pendant 30 sec à TP. Le culot bactérien est resuspendu dans 200 µl de tampon P1 (50mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA). Ensuite, 200 µl de tampon P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) sont ajoutés puis mélangés par inversion, suivi de l'ajout de 200 µl de tampon 3 (5M acétate de potassium, 2M acide acétique glaciale) afin de précipiter les débris cellulaires. Les protéines et débris cellulaires sont alors centrifugés à 14 000 xg pendant 5 min à TP, puis le surnageant est récupéré et mélangé à 200 µl de matrice de silice (Sigma, Oakville, ON, Canada) (13% p/v dans de l'eau distillée). Une centrifugation à 14 000 xg pendant 10 sec est alors effectuée et le surnageant est éliminé par décantation. La matrice, restée au fond avec l'ADN plasmidique, est lavée avec 500 µl d'EtOH wash (50% EtOH, 0,1M NaCl, 1mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) et est de nouveau centrifugée à 14 000 xg pendant 10 sec. Après avoir laissé sécher la matrice avec l'ADN pendant quelques minutes, on ajoute 50 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8 et on incube à 55°C pendant 2 min pour éluer l'ADN. Après centrifugation à 14000 xg pendant 10 sec, on récupère délicatement le surnageant qui contient l'ADN plasmidique, puis on répète cette étape afin d'éliminer toute trace de silice résiduelle.



Dans certains cas, pour obtenir de l'ADN de meilleure qualité, la purification des ADN plasmidiques a été effectuée en utilisant la trousse commerciale *EZ-10 Spin Column Plasmid DNA* (BioBasic, Markham, Canada).

## 2.3. Le ribotypage par PCR

### 2.3.1. Réaction par polymérisation en chaîne (PCR)

Le ribotypage par PCR est une technique qui nous a permis de classer les divers isolats cliniques de *C. difficile* qui compose notre collection. Nous avons donc utilisé cette technique pour identifier les souches prédominantes de notre collection en utilisant le protocole de Bidet et *al.* (BIDET et al., 1999) et modifié par Fortier et *al.* (FORTIER et MOINEAU, 2007). Les amorces situées aux extrémités des gènes d'ARNr 16S et 23S sont LCF124 et LCF125 (voir tableau 2) respectivement et sont également les mêmes que celles utilisées par Bidet et *al.* (1999).

**Tableau 2.** Liste des amorces utilisées dans le cadre de ce projet

Nom amorce	Gène cible	Séquence	Référence
LCF124	ARNr 16S Fwd	5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3'	Bidet et al, 1999
LCF125	ARNr 23S Rev	5'-CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC-3'	Bidet et al, 1999
LCF394	contig048 Fwd	5'-TCAAACCCACAATATGGACACTTGC-3'	Cette étude
LCF395	contig048 Rev	5'-GGTACAAGAGTACATCCAGATGGTCA-3'	Cette étude
LCF396	contig165 Fwd	5'-AGAAGTCGAAGAGGTGTTGTAGCTT-3'	Cette étude
LCF397	contig165 Rev	5'-GCATCTGAAATGTTTGGTAGCACAGC-3'	Cette étude

Brièvement, les réactions PCR se sont effectuées à l'aide d'un appareil PCR *MasterCycler* d'Eppendorf (VWR, Mississauga, ON, Canada) sur 20-40 ng d'ADN génomique. Les produits PCR ont ensuite été mélangés à 8 µl de tampon de charge 6X

(Tris-HCl 10mM pH 7.6, 0,03% Bleu de bromophénol, 0,03% xylène cyanol, 60 mM EDTA et 60% glycérol) et 6µl des échantillons ont été déposés sur un gel d'acrylamide :bisacrylamide (29 :1) 5% non dénaturant (BioShop) d'une épaisseur de 1,5 mm. La migration des échantillons d'ADN a été effectuée dans un tampon Tris-Acétate-EDTA 1X à l'aide d'un appareil *Mini-Protean® Tetra Cell* (Bio-rad, Mississauga, ON, Canada) à un voltage de 100 V pendant une heure et 10 minutes. Les gels ont été ensuite trempés dans une solution de bromure d'éthidium (EtBr) pendant 10 minutes avant d'être visualisés sous rayons ultraviolets (UV) à l'aide d'un appareil *ImageQuant 300* (GE Healthcare).

### 2.3.2. Analyse des ribotypes

Les images prises des gels de ribotypage ont été analysées avec le logiciel de bioinformatique *Gel Compar II* (Applied-Maths, Austin, TX, USA) qui a été également utilisé comme base de données pour les ribotypes des isolats de *C. difficile*. Les images ont été transformées en format 2D 8 bit, les valeurs densitométriques inversées et aucune soustraction du *background* n'a été effectuée. Ce logiciel a aussi été utilisé pour comparer les différents profils de ribotypages. D'ailleurs, les gels ont été normalisés avec les marqueurs de poids moléculaires *100pb DNA Ladder* (Bioshop) situés dans les puits aux extrémités des gels. Les coefficients de similarités ont été calculés selon la corrélation de Pearson et la position de tolérance des bandes fixée à 2,00% pour la comparaison des profils.

## 2.4. Isolement des bactériophages

### 2.4.1. Sources de prélèvement

Les endroits d'échantillonnages ont été choisis en fonction des meilleures probabilités de trouver et d'isoler la bactérie hôte *C. difficile*, et donc d'isoler les phages infectant cette bactérie. Les prélèvements se sont effectués aux affluents (entrée) des usines d'épuration des eaux de la ville de Sherbrooke (site Rock Forest et site Fleurimont), la sortie des eaux usées du CHUS ainsi que dans les selles de patients déclarés positifs pour une infection à *C. difficile*. La prise d'échantillon d'eaux usées s'est étalée sur une période de 1 an (janvier 2008 à janvier 2009) et à une fréquence d'une fois toutes les deux semaines et ce, pour chaque site. L'échantillonnage des selles de patients d'ICD a duré 1 an également et la fréquence était établie selon le nombre de cas répertoriés au CHUS; bien qu'en moyenne, 5 échantillons de selles par semaine m'étaient apportés.

### 2.4.2. Enrichissement en phages

#### 2.4.2.1. Préparation des échantillons

D'une part, les eaux usées ont été prélevées dans des bouteilles de polypropylènes stériles (VWR, Mississauga, ON, Canada) à raison de 400 ml pour chaque échantillon. Une première filtration sur papier Whatman #4 1,5 µm, 90 mm Ø (Schleicher & Schuell, Maidstone, UK) a été effectuée sur les eaux d'affluents pour

éliminer les plus gros débris pour ensuite être de nouveau filtrés sur membrane EZ-Pak 0,45 µm (Millipore, Molshelm, France) pour se débarrasser de la majorité des bactéries et ne conserver que les phages potentiels. Un aliquote de 750 µl a été prélevé pour chacun des échantillons filtrés et conservé à -80°C dans une solution de glycérol 50% pour utilisation ultérieure au besoin. Un autre aliquote de 10 ml d'échantillon filtré a été conservé à 4°C pour la suite des enrichissements.

D'autre part, les selles de patients atteints d'ICD ont été homogénéisées dans 10 ml de milieu BHI puis centrifugées à 4000 xg pendant 60 min à TP. Les surnageants de selles ont ensuite été filtrés sur filtre 0,45 µm afin d'éliminer les gros débris et les bactéries et ne garder que les phages, s'il y a lieu. Un aliquote de 750 µl de chacune des selles filtrées a été également prélevé et conservé à -80°C dans 50% glycérol. La balance des selles filtrées a été conservée à 4°C pour les enrichissements subséquents.

#### 2.4.2.2. Enrichissements successifs

D'une part, pour l'enrichissement des eaux usées, plusieurs souches de *C. difficile* préalablement choisies par la technique de ribotypage décrite précédemment (voir tableau 3), ont étéensemencées à 2%, à partir des pré-cultures respectives, dans 5 ml de milieu BHI et incubées à 37°C pendant toute la nuit (cultures). Parallèlement, 5 ml de 3 échantillons d'affluents ont été combinés pour former un pool d'affluents (15 ml au total), et ce, pour réduire le nombre de tubes d'enrichissement à manipuler. Ensuite, dans 15 tubes contenant chacun 1,5 ml de milieu BHI supplémenté de 10 mM

MgCl<sub>2</sub> et 10 mM CaCl<sub>2</sub> (pour favoriser l'adsorption des phages aux bactéries), 1,25 ml du pool d'affluents sont ajoutés à chacun des tubes. Les mêmes tubes sont alors inoculés avec 250 µl d'une seule des 15 pré-cultures précédentes. Les tubes sont ensuite incubés à 37°C pendant toute la nuit pour la 1<sup>ère</sup> ronde d'amplification. Après incubation, les tubes ont été centrifugés à 4000 xg pendant 15 min à TP puis filtrés sur filtre 0,45 µm pour ne récupérer que les phages qui se seraient possiblement amplifiés lors de la 1<sup>ère</sup> ronde d'enrichissement. À partir des lysats de 1<sup>ère</sup> amplification, une 2<sup>e</sup> ronde d'amplification a été effectuée. Dans de nouveaux tubes contenant 2 ml de milieu BHI contenant 10 mM MgCl<sub>2</sub> et CaCl<sub>2</sub>, 2,5 ml des lysats de 1<sup>ère</sup> amplification ont été ajoutés aux tubes et inoculés avec 500µl de nouvelles pré-cultures, correspondant aux mêmes souches respectives que lors de la 1<sup>ère</sup> amplification. Les tubes ont été de nouveaux incubés, centrifugés et filtrés de la même façon que lors du 1<sup>er</sup> enrichissement. Ces lysats de 2<sup>e</sup> amplification sont enrichis une 3<sup>e</sup> et dernière fois, de façon identique à la 2<sup>e</sup> amplification. Les lysats de 3<sup>e</sup> amplification sont alors conservés à 4 °C pour l'étape de la détection. D'autre part, les enrichissements des selles de patients atteints d'ICD sont effectués de façon similaire à ceux des eaux usées. Quelques modifications ont été apportées dans le processus d'enrichissement des selles. En effet, des pools constitués d'un mélange de 5 surnageants de selles (8 ml chacun) ont été préparés pour un volume total de 40 ml. Aussi, la 1<sup>ère</sup> amplification s'effectue selon les mêmes conditions que les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> enrichissements des eaux usées.

**Tableau 3.** Liste des isolats de *C. difficile* utilisés pour l'enrichissement des eaux usées et des surnageants de selles de patients atteints d'ICD.

Souches d'enrichissement et de détection	Ribotype associé
CD121	10
CD73	12
CD132	12
CD95	14
CD114	14
CD127	14
CD139	14
CD71	17
CD117	23
CD161	27
CD171	27
CD173	27
CD19	36
CD162	36
CD24	38

#### 2.4.3. Détection des phages dans les bouillons d'enrichissement

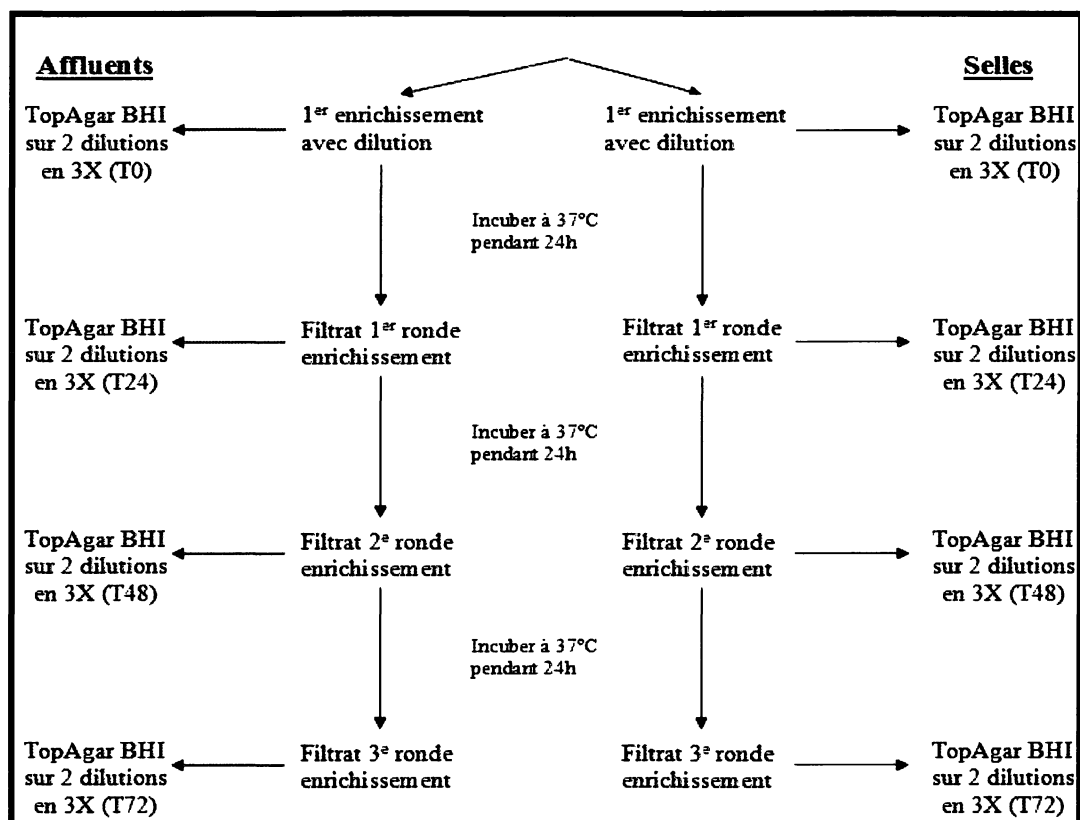
Une étape de détection a été effectuée pour déterminer si les enrichissements des eaux usées et des selles de patients atteints d'ICD contenaient un ou des phages. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique appelée gélose molle de surface ou *Top Agar*. Chacune des souches utilisées pour les enrichissements a été inoculée, à partir de pré-cultures en milieu BHI, à 2% dans du milieu BHI jusqu'à l'atteinte d'une densité optique à 600 nm entre 0,35 et 0,4 (ce qui correspond à la phase exponentielle de croissance de la bactérie). Les 15 lysats de 3<sup>e</sup> amplification ont alors été ajoutés, à raison de 50 µl, à 15 tubes d'agar mou (3 ml de milieu BHI + 0,5% agar) contenant 400 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM CaCl<sub>2</sub> et maintenus à 55°C. Ensuite, 200 µl de chacune des cultures de *C. difficile* ont été ajoutés aux tubes d'agar mou et ceux-ci ont été

rapidement déversés sur des géloses de fond BHI 1% agar qui ont ensuite été incubées toute la nuit à 37°C en anaérobiose. La présence de plages de lyse claires au travers du tapis bactérien formé dans la gélose molle nous confirmait l'amplification et l'existence d'un phage dans le lysat d'enrichissement et par conséquent, dans un des échantillons d'eau ou de selles constituant le pool initial.

#### 2.4.4. Validation de la méthode d'enrichissement

Pour démontrer que la méthode d'enrichissement successif était adéquate pour isoler des phages d'échantillons d'eaux usées et de selles de patients, nous avons validé la méthode en utilisant le protocole d'enrichissement décrit précédemment (voir section 2.4.2.2) avec quelques modifications. Premièrement, une seule souche de *C. difficile* (CD24) a été utilisée dans le protocole en tant que souche d'enrichissement et le phage  $\phi$ CD52 (disponible au laboratoire) a été ajouté aux échantillons d'affluents et de selles puisque ce phage est capable d'infecter et de lyser la souche CD24. Deuxièmement, le phage  $\phi$ CD52 a été dilué dans un milieu BHI pour obtenir des titres de  $10^4$ ,  $10^3$  et  $10^2$  pfu/ml et 300  $\mu$ l de ses dilutions ont été ajoutées à 2,7 ml des pools d'affluents ou de surnageants de selles filtrées pour obtenir des titres finaux de  $10^3$ ,  $10^2$  et  $10^1$  pfu/ml. À ces tubes, 3 ml de milieu BHI, 10 mM  $MgCl_2$  et 10 mM  $CaCl_2$  ainsi que 500  $\mu$ l de pré-culture CD24 ont été ajoutés. Les tubes ont ensuite été incubés pour les rondes d'amplifications subséquentes tel que décrit dans le protocole d'enrichissement. De plus, des aliquotes de 1 ml ont été prélevés sur les enrichissements avant la 1<sup>er</sup> ronde, après la 1<sup>er</sup>, 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> ronde d'enrichissement en

vue de les titrer (par la technique de gélose molle de surface) pour d'évaluer le nombre de phages amplifiés après chaque ronde d'enrichissement (voir figure 7).



**Figure 7. Validation de la méthode d'enrichissement successif avec la souche de *C. difficile* CD24 et le phage  $\phi$ CD52.** La validation a été effectuée avec des échantillons d'eaux usées et de selles de patients infectés à *C. difficile* préalablement filtrés sur filtres 0,45  $\mu$ m et inoculés avec différentes quantités de phages. La technique de TopAgar a été utilisée aux temps 0, 24, 48 et 72 h des enrichissements pour quantifier le nombre de phages amplifiés au cours du processus.

## 2.5. Caractérisation des phages $\phi$ MMP isolés

### 2.5.1. Purification, amplification et titration

Les phages isolés et utilisés pour toutes les expérimentations subséquentes ont dû être préalablement purifiés et amplifiés, selon le protocole décrit par Govind et al



(GOVIND et al., 2006), afin d'obtenir des quantités appréciables de phages purs. Ainsi, les phages détectés par la technique de gélose molle de surface ont été prélevés à l'aide d'un embout pour pipette P1000 (Sarstedt) stérile dont l'extrémité a été coupée, de façon stérile, à environ 1 cm de son extrémité. Le bloc de gélose ainsi prélevé a été déposé dans un tube contenant 10 ml de milieu BHI supplémenté de  $MgCl_2$  et de  $CaCl_2$  à une concentration finale située entre 5 et 50 mM. À partir de ce tube incubé à 37°C pendant 24 h, un TopAgar est coulé tel que décrit ci-bas. À partir des plages de lyse claires obtenues sur ce pétri, une seule plage de lyse est repiquée et diffusée dans 500  $\mu$ l de milieu BHI. Ensuite, un nouveau TopAgar est coulé en incorporant la plage de lyse diffusée. Après une dernière ronde de purification, le phage est considéré comme pur et peut être amplifié pour en obtenir des quantités plus importantes. Ainsi, la 1<sup>ère</sup> amplification, à partir du phage purifié, est effectuée par incubation à 37°C durant 8 h, d'une culture inoculée à 2% de la souche sensible de *C. difficile* en présence d'une solution de sels (10 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $CaCl_2$  final) et d'une certaine quantité de phages (varie entre 10  $\mu$ l à 500  $\mu$ l par 10 ml d'amplification). Lors d'une 2<sup>e</sup> amplification, les mêmes conditions de croissance que la 1<sup>ère</sup> amplification sont appliquées, à l'exception qu'un certain volume de la 1<sup>ère</sup> amplification de phages (entre 10 et 500  $\mu$ l de lysat filtré sur 0.45  $\mu$ m) est ajouté lorsque la souche sensible a atteint une valeur de  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,1 environ. Finalement, les lysats obtenus sont filtrés sur membrane 0.45  $\mu$ m et les phages sont titrés pour connaître la quantité exacte en phages. Pour ce faire, des dilutions sont effectuées sur cette amplification et incorporées à des *TopAgar*, avec la souche sensible, tel que décrit plus haut. Les plages

de lyses sont comptées et les facteurs de dilutions pris en compte pour établir le nombre de phages par ml (ufp/ml).

### 2.5.2. Profil de restriction

Pour comparer les phages entre eux, des digestions enzymatiques de l'ADNg de ceux-ci ont été effectuées et les profils de restriction ont été comparés sur gel d'agarose. L'ADNg des phages a été extrait tel que décrit à la section 2.2.2 et les digestions enzymatiques ont été effectuées sur 1 µg avec l'enzyme de restriction HindIII en suivant les recommandations du manufacturier (Roche, Mississauga, ON, Canada). Les ADNg de phages digérés ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose 0,8% dans du tampon TAE aux cotés du marqueur de poids moléculaire *DNA Logic Ladder* (BioShop). La migration des digestions enzymatiques s'est ensuite effectuée à 110 V pendant 55 min. Après coloration du gel au bromure d'éthidium et visualisation des bandes sous UV, les profils de restrictions des différents phages ont été numérisés avec l'appareil ImageQuant IQ300 et ensuite comparés.

### 2.5.3. Buvardage de type Southern

Les similarités génomiques entre les phages isolés au laboratoire ont été démontrées par buvardage de type Southern selon un protocole décrit précédemment (FORTIER et MOINEAU, 2007). Cette technique a également été utilisée pour confirmer le caractère tempéré des phages isolés, pour déterminer l'origine des phages

ainsi que comme contrôle négatif sur les souches utilisées pour les enrichissements et la détection des phages  $\phi$ MMP isolés des selles de patients atteints d'ICD.

#### 2.5.3.1. Préparation des sondes

Les sondes d'ADN ont été marquées par l'incorporation de nucléotides couplés à la digoxigénine (DIG-11-dUTP, BioShop). Les sondes ont été construites à partir des génomes complets des phages digérés par l'enzyme HindIII (FORTIER et MOINEAU, 2007). Tel que décrit à la section 2.5.2, l'ADNg de phages est digérés, purifiés et chauffé à 95°C pendant 10 min pour ensuite ajouter 4  $\mu$ l de DIG-High Prime (Roche) et incubé à 37°C pour la nuit. La sonde concentrée a alors été diluée 1:100 dans de l'eau stérile et a été chauffée à 95°C pendant 10 min. Finalement, la sonde chauffée a été de nouveau diluée 1:100 dans 20 ml de solution DIG easy hyb (Roche) puis a été filtrée sur membrane 0,22  $\mu$ m.

#### 2.5.3.2. Transfert sur membrane et hybridation

En premier lieu, l'ADN de phage ou de *C. difficile* digéré a été séparé sur gel d'agarose 0,8% tel que décrit à la section 2.5.2. Les procédures de transfert par capillarité ont toutes été effectuées à TP et sont celles décrites par Sambrook *et al.* Le transfert a été effectué toute la nuit par capillarité dans du tampon SSC 20X, sur une membrane de nylon Hybond N+ chargée positivement (Roche). L'ADN a été fixé sur la membrane par exposition aux rayons U.V. pendant 2 min de chaque côté de la

membrane. La membrane de nylon, avec l'ADN transféré et fixé, a été pré-hybridée avec 20 ml de solution de pré-hybridation (DIG easy Hyb) pendant 4 h à une température de 42°C et l'hybridation de la membrane a été effectuée dans le même volume avec une sonde marquée à la DIG (voir section 2.5.3.1) en ajoutant celle-ci à la membrane pour une incubation qui dure toute la nuit à 42°C. Après 3 lavages pour éliminer la sonde non liée et blocage de la membrane, l'anticorps secondaire anti-DIG-alkaline phosphatase (Roche) est dilué 1:10 000 dans la solution de blocage précédente et est incubé à TP pendant 30 min avec agitation. Après lavage, la membrane est incubée avec 50 ml de tampon de détection pendant 2 min à TP. Le substrat chemiluminescent CDP-star (Roche) est préparé en diluant celui-ci 1:100 dans du tampon de détection. Finalement, la membrane est recouverte du substrat chemiluminescent dilué, incubé 5 min puis l'excédent est éliminé. Ensuite, la membrane est exposée à un film Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (Amersham, GE Healthcare).

#### 2.5.4. Microscopie électronique par transmission d'électron

L'observation des phages en microscopie par transmission d'électron (TEM) permet de visualiser la morphologie de ceux-ci (ACKERMANN, 2007). Ainsi, les phages ont été préparés selon une méthode décrite précédemment (FORTIER et MOINEAU, 2007) Brièvement, les phages ont été lavés avec de l'acétate d'ammonium 0.1M pH 7,5 et révélés par coloration de contraste à l'acétate d'uranyl 2% (Cederlane Laboratories, Burlington, On, Canada). Les phages sont déposés sur une grille de cuivre *Formvar/carbon* de 400 mesh (Cederlane). La grille est ensuite observée avec

un microscope électronique Hitachi H-7500 (Hitachi Canada, Mississauga, On, Canada) à une tension de 60 kV et les photographies sont prises à l'aide d'une caméra numérique 1 mégapixel (Hamamatsu, Bridgewater, NJ, USA).

#### 2.5.5. Spectre d'hôtes des phages isolés

Nous avons évalué la sensibilité des souches de *C. difficile* à l'infection par les phages isolés au laboratoire en utilisant une technique en microplaque BHI Agar (BHIA) et aussi la technique du dépôt de la goutte sur gélose molle de surface ou «*spot test*». La technique en microplaque a été utilisée pour tester un grand nombre de souches alors que la technique en *spot test* a été utilisée pour confirmer les résultats de la 1<sup>ère</sup> technique et pour un nombre restreint de souches. En détail, la technique par microplaque BHIA consiste à préparer des pré-cultures des souches de *C. difficile* à tester dans des tubes contenant du milieu BHI. À partir de ces pré-cultures, une microplaque 96 puits (Sarstedt) contenant 200 µl de milieu BHI est inoculé à 3%. La microplaque a ensuite été incubée pendant 4 h à 37°C d'où 4 µl ont été prélevés et déposés sur une gélose BHIA coulée dans une plaque rectangulaire (Nunc, Rochester, NY, USA). Après avoir séché les gouttes de culture à TP quelques minutes en anaérobiose, 2 µl de phages suspendus dans du BHI contenant 10 mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM CaCl<sub>2</sub> ont été déposés précisément aux mêmes endroits que les gouttes de bactéries. La plaque BHIA a alors été incubée à 37°C pendant 24 h. Une plaque contrôle a été effectuée en parallèle afin de confirmer la croissance de toutes les

souches. Lorsque la souche est sensible, une zone claire est observable à l'intérieur des «colonies» formées par les bactéries, ce qui indique une lyse par le phage.

La méthode de *Spot test* est une variante de la méthode en gélose molle de surface (voir section 2.5.1) pour détecter la présence de phages, mais de façon qualitative. Au lieu d'ajouter le lysat de phages dans le tube d'agar mou 0,5%, le phage est déposé, à raison de 5  $\mu$ l, en gouttes sur la gélose molle inoculée avec la bactérie à tester et préalablement solidifiée. La gélose est alors incubée à 37°C pendant 24 h. Un tapis bactérien se formera dans la gélose et la lyse par les phages déposés formera une zone claire à l'endroit du dépôt.

#### 2.5.6. Test de lysogénie avec les phages isolés

Pour déterminer si les phages isolés des selles de patients atteints d'ICD étaient tempérés ou virulents, nous avons procédé à la création de lysogènes, c'est-à-dire des bactéries sensibles qui ont intégré le génome du phage dans leur génome. En effet, l'intégration du phage isolé dans le chromosome bactérien (prophage) démontrerait le caractère tempéré du phage en question. Pour créer et isoler des lysogènes, nous avons procédé comme suit : 500  $\mu$ l d'un lysat du phage à tester à un titre de  $10^8$ - $10^9$  ufp/ml ont été incorporés dans une gélose molle BHI (0,5%) contenant 400 mM  $MgCl_2$ , et 10 mM  $CaCl_2$  qui a ensuite été coulée sur une gélose de fond BHIA. Une fois la gélose solidifiée, 50  $\mu$ l d'une dilution d'une culture de la souche sensible au phage a été étalé à l'aide de billes de verre stériles sur le tapis de phage ainsi formé. Dans le cas où une culture en phase exponentielle était utilisée (DO<sub>600nm</sub> à  $\sim 0,35$ ), des dilutions  $10^{-2}$  et

$10^{-3}$  étaient étalées. Lorsqu'une culture en phase stationnaire était utilisée, des dilutions  $10^{-4}$  et  $10^{-5}$  étaient étalées. Après incubation en anaérobiose à  $37^{\circ}\text{C}$  durant toute la nuit, des colonies étaient observées. Celles-ci correspondaient soit à des mutants résistants au phage, soit à des lysogènes. En effet, les bactéries lysogènes sont immunisées contre l'infection et la lyse par le même phage ou un phage apparenté. Par la suite, pour purifier les lysogènes obtenus, quelques colonies ont été repiquées et striées par épuisement sur une gélose BHI et ce, à deux reprises pour éliminer toutes traces de phages libres. On cherche ensuite à confirmer que le prophage intégré dans la colonie lysogène correspond au phage isolé initialement. Ainsi, à partir de la colonie lysogène purifiée, on ensemence un bouillon BHI qui est incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  durant toute la nuit. Cette pré-culture est alors diluée  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$  et  $5\ \mu\text{l}$  est déposée, sur une gélose BHIA. Après incubation de 5 à 6 h à  $37^{\circ}\text{C}$  en anaérobiose, la gélose est irradiée aux rayons UV (302 nm) du côté ouvert du pétri pendant 10 secondes à l'aide d'un transilluminateur (appareil *ImageQuant 300*). Par la suite, un tube d'agar mou 0,05%, contenant des sels (400 mM  $\text{MgCl}_2$  et 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) et une souche sensible au phage induit, est déposé sur la gélose BHIA. Celle-ci est alors incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 h en anaérobiose. Ensuite, un bloc de gélose correspondant à une plage de lyse est prélevé, élué pour récupérer les phages et remis sur pétri BHI pour une nouvelle ronde de purification. Après deux rondes de purification à partir d'une plage de lyse isolée, une amplification est effectuée telle que décrite à la section 2.5.1. L'ADNg du phage amplifié est alors extrait (voir section 2.2.2) et un profil de restriction est effectué à des fins de comparaison. Si les deux profils de restriction sont identiques, cela confirme le caractère tempéré du phage isolé. Or, une autre façon pour confirmer la présence du

prophage à l'intérieur des colonies lysogènes s'effectue par hybridation de type Southern. À partir de l'extraction d'ADNg bactérien des colonies lysogènes, une hybridation de type Southern (tel que décrit à la section 2.5.3.2) avec la sonde correspondante au phage intégré est effectuée. Si le profil obtenu correspond à celui du phage initial (en tenant compte que son profil peut être légèrement différent suite à l'intégration), cela confirme qu'il s'agit d'un lysogène.

### 2.5.7. Inductions des phages $\phi$ MMP01-04

#### 2.5.7.1. Induction spontanée

L'induction spontanée est un phénomène où un prophage s'excise du chromosome bactérien de sa bactérie hôte sans pressions extérieures ou d'altération de l'environnement (MAIQUES *et al.*, 2006). Les essais d'inductions spontanées ont donc été réalisés dans le but d'évaluer la fréquence de prophages qui se sont excisés du génome bactérien sans stress exercé sur les lysogènes (autant les lysogènes naturels ou «sauvages» que ceux générés au laboratoire). Pour ce faire, les différents lysogènes ont été striés sur gélose BHIA et incubés à 37°C durant toute la nuit. À partir de quelques colonies isolées, des tubes *Falcon* 50 ml (Becton Dickinson, Franklin Lake, NJ, USA), contenant 40 ml de milieu TY pH 7.4, ont été inoculés et incubés à 37°C jusqu'à 72 h en anaérobiose. Des prélèvements ont été effectués au temps 0 (tout de suite après l'inoculation) ainsi qu'après 8, 16, 24, 48 et 72 h à raison de 1 ml de culture par prélèvement. Les aliquotes prélevés ont ensuite été traités par centrifugation à 14 000



xg pendant 2 min à TP puis filtrés sur membrane 0,45  $\mu\text{m}$  pour éliminer toutes traces de bactéries et ne conserver que les phages induits. Les phages ont ensuite été titrés par la méthode de gélose molle de surface décrite à la section 2.5.1. Une autre série de prélèvement a également été effectuée, à raison de 1 ml par aliquote, pour quantifier les toxines produites (voir section 2.8.2). Ces aliquotes ont été simplement centrifugés à 14 000 xg pendant 2 min et le surnageant a été récupéré pour être congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les quantifications ultérieures.

#### 2.5.7.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices d'antibiotiques (CMI) pour les souches lysogènes et non lysogènes

Il a été démontré que certains antibiotiques à des concentrations sous-inhibitrices peuvent influencer le taux d'induction des prophages (MATSUSHIRO et al., 1999; MAIQUES et al., 2006). Ainsi, dans un premier temps, nous avons déterminé les CMI sur les souches lysogènes (sauvages et de labo), de la ciprofloxacine, un antibiotique utilisé couramment dans le traitement d'infections bactériennes. Nous avons utilisé une méthode en microplaque 96 puits. Pour ce faire, une microplaque 96 puits (Sarstedt), avec 200  $\mu\text{l}$  de milieu BHI dans chaque puits, a été inoculé à 3% à partir de pré-cultures de 16 h. Différentes dilutions doublantes de ciprofloxacine (concentration entre 2 et 512  $\mu\text{g/ml}$ ) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) ont été ensuite ajoutées aux puits. La microplaque a été incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 h en anaérobiose et la CMI correspondait à la concentration dans le puits où il n'y

avait plus de croissance, lorsque la dilution précédente (concentration inférieure) montrait une croissance significative.

### 2.5.7.3. Induction provoquée

Le phénomène d'induction observé chez les phages tempérés peut parfois être provoqué ou stimulé par des conditions environnementales défavorables à la bactérie hôte ou par des dommages à l'ADNg, les phages tempérés, sous forme de prophages, vont généralement enclencher le processus d'induction (KUTTER et SULAKVELIDZE, 2005). Notamment, plusieurs agents mutagènes (rayons UV, mitomycine C, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etc) sont reconnus pour provoquer l'induction des prophages (COCHRAN *et al.*, 1998). Ici, des inductions provoquées par rayons U.V. ont été effectuées pour confirmer le caractère tempéré des phages  $\phi$ MMP01-04. Nous avons suivi la méthode établie par Babic et Little (BABIC et LITTLE, 2007) et tel que décrit à la section 2.5.6. Si l'induction provoquée aux rayons UV s'avère efficace, on devrait observer des zones de lyse dans le tapis bactérien formé dans la gélose molle aux endroits où les bactéries lysogènes irradiées ont relâché des phages.

Les inductions provoquées par la mitomycine C ont été réalisées pour évaluer si les phages  $\phi$ MMP01-04 étaient susceptibles de s'induire autrement que par irradiation aux UV. En effet, l'efficacité de l'induction peut varier de façon importante d'un phage à un autre, dépendant de la méthode utilisée. Nous avons donc adapté la méthode de Fortier et Moineaux (FORTIER et MOINEAU, 2007) pour réaliser les inductions à la mitomycine C sur les lysogènes sauvages et de labo des phages

φMMP01-04. Premièrement, un tube de 10 ml de milieu BHI a été inoculé à 3% avec le lysogène correspondant et lorsque celui-ci a atteint le début de phase exponentielle ( $DO_{600\text{ nm}} = 0,1$ ), 10 µg/ml de mitomycine C sont ajoutés au tube. Ensuite, le tube est incubé à 37°C pendant environ 8-9 h et la  $DO_{600\text{ nm}}$  est prise pour suivre l'évolution de l'induction du phage. Une baisse significative de la DO après 3-5 h d'induction est signe que le phage s'est induit et qu'il a lysé son hôte.

Finalement, des inductions provoquées par la ciprofloxacine ont également été réalisées sur les lysogènes des phages φMMP01-04 pour évaluer la pertinence et l'importance de cette induction suite à l'ajout de cet antibiotique. D'ailleurs, la ciprofloxacine est un antibiotique qui fait partie des fluoroquinolones qui représentent un facteur de risque pour les ICD puisque *C. difficile* est souvent résistant à cette classe d'antibiotiques (DENEVE et al., 2009). Pour ce faire, les différents lysogènes ont été striés sur gélose BHI et incubés à 37°C durant 24 h. À l'aide d'un écouvillon stérile et pour chacun des lysogènes, plusieurs colonies ont été grattées et ensemencées dans une bouteille contenant 70 ml de milieu TY pH 7.4. Une fois cette culture en phase exponentielle de croissance, celle-ci a été divisée dans 4 tubes, à raison de 15 ml par tube. Ensuite, trois quantités différentes de ciprofloxacine ont été ajoutées à 3 des 4 tubes pour des concentrations finales représentant la valeur de la CMI ainsi que deux dilutions doublantes supérieures correspondant à des concentrations sous-inhibitrices (voir tableau 4). Le 4<sup>e</sup> tube représente le contrôle sans antibiotique. Les valeurs de  $DO_{600\text{ nm}}$  sont alors suivies aux temps 0, 8 et 24 h après ajout de l'antibiotique et des aliquotes sont également prélevés aux mêmes temps. Ces aliquotes sont centrifugés à

14 000 xg pendant 2 min à TP, filtrés sur membrane 0,45 µm et les phages présents sont ensuite titrés tel que décrit à la section 2.5.1.

**Tableau 4.** Valeurs des concentrations en ciprofloxacines utilisées pour l'induction provoquée des phages φMMP

Souches*	Concentration ciprofloxacine		
	Inhibitrice (CMI)	Sous-inhibitrice	
Lys labo CD19/φ01	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml
Lys labo CD117/φ02	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
Lys sauvage CD343/ φ02	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml
Lys labo CD117/ φ03	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml
Lys sauvage CD368/ φ03	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml
Lys labo CD73/ φ04	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml
Lys sauvage CD380/ φ04	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml

\* Lys labo = lysogène créé en laboratoire ; Lys sauvage = bactérie lysogène isolée de selles de patients atteints d'ICD; CD19/ φ01 = bactérie CD19 lysogène pour le phage φMMP01.

### 2.6.1. Méthode de séquençage

#### 2.6.1.1. 454 pyrosequencing

Dans un premier temps, pour obtenir les séquences des génomes de phages isolés φMMP02 et φMMP04, nous avons opté pour la technique de 454 pyrosequencing. L'ADNg des phages a été extrait à l'aide des colonnes Qiagen à partir de lysats de 250 ml tel que décrit à la section 2.2.2. Environ 5 µg d'ADNg des phages φMMP02 et φMMP04, solubilisés dans 100 µl de Tris-HCl 10 mM pH 8, ont été

envoyés à McGill et séquencés sur une plateforme GS-FLX de Roche. Les séquences obtenues ont été assemblées par le service de séquençage de Génome Québec.

#### 2.6.1.2. Séquençage direct sur l'ADN de phage

À partir des contigs obtenus par *454 pyrosequencing*, nous avons utilisé le séquençage direct pour nous assurer d'avoir les génomes complets des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04. En effet, l'ADN de phage est encapsidé sous forme linéaire mais l'assemblage après séquençage de type 454 peut donner un contig linéarisé de façon arbitraire par rapport aux extrémités réelles du phage. De plus, lorsqu'il s'agit d'un phage de type *pac*, i.e. qui encapside son ADN selon un mécanisme de la tête pleine, on note habituellement la présence d'ADN permuté circulairement dans la population virale. Par conséquent, il n'existe pas d'extrémités franches détectables dans la population virale. Donc, afin de vérifier si les contigs obtenus après séquençage de type 454 représentaient le génome complet, une réaction PCR a été effectuée sur les génomes linéaires des phages purifiés en utilisant une paire d'amorces divergentes qui se fixent à ce qui correspond aux extrémités des contigs obtenus de l'Université McGill. On se trouve alors à amplifier des séquences nucléotidiques continues selon la description ci-dessus. Les amorces utilisées pour l'amplification des extrémités des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 sont LCF394/395 et LCF396/397 respectivement et se retrouvent dans le tableau A2. La réaction PCR (50  $\mu$ l) s'est déroulée sur 35 cycles où l'étape de dénaturation s'est effectuée à 94°C pendant 30 sec suivi de l'appariement des amorces à 53°C et 54°C pendant 45 sec sur l'ADN des phages  $\phi$ MMP02 et

$\phi$ MMP04 respectivement. L'étape d'élongation s'est effectuée à 72°C pendant 1,5 min sur les deux génomes suivie d'une étape finale d'élongation à 72°C pendant 5 min. La polymérase *Taq* (2,5 U d'une préparation maison) a été utilisée et la concentration finale en MgCl<sub>2</sub> pour toutes les réactions a été fixée à 1,5 mM et la quantité en ADN à environ 50 ng total. Les produits PCR ont été analysés sur gel d'agarose 2% à raison de 5  $\mu$ l d'ADN par puits. Après électrophorèses et coloration au bromure d'éthidium, les produits PCR ont été découpés du gel et purifiés avec les colonnes commerciales *Costar Spin-X* (Fisher Scientific, Ville St-Laurent, Qc, Canada) en suivant les indications du manufacturier. Le produit purifié a été récupéré et l'ADN a été concentré par précipitation à l'éthanol (voir section 2.2.1). Ces produits ont ensuite été envoyés à séquencer au CRCHUL avec les amorces utilisées pour l'amplification.

#### 2.6.1.3. Clonage des produits PCR

Le séquençage direct des produits PCR obtenus à la section précédente n'ayant pas donné des résultats clairs lors de nos essais, il a fallu cloner les produits PCR afin d'isoler un produit unique qui a ensuite été séquencé. Pour ce faire, les mêmes réactions PCR que celles décrites ci-dessus ont été effectuées sur l'ADNg des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04. Les produits PCR ont été purifiés selon la méthode de silice (voir section 2.2.3) puis ont été utilisés pour le clonage.

### 2.6.2. Préparation du vecteur pour le clonage

Nous avons utilisé le plasmide pBluescript II KS (pBS II) pour cloner les produits PCR amplifiés des extrémités des génomes des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 (voir section 2.6.1.3). La carte du plasmide se trouve en figure A1. Le plasmide pBS II (2  $\mu$ g) a été digéré avec l'enzyme SmaI (Fermentas Canada, Burlington, On, Canada) durant 15 min à 37°C dans une réaction comprenant également le tampon Fast Digest (concentration finale à 1X). La réaction enzymatique a été inactivée à 65°C pendant 10 min puis déposée dans un mélange d'eau et de glace.

### 2.6.3. Ligations

Les réactions de ligation ont été effectuées pour incorporer les produits PCR amplifiés, tel que décrit à la section 2.6.1.3, dans le vecteur pBS II. Premièrement, 50  $\mu$ l des produits PCR des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 ont été traités avec 2,5 U de la polymérase *Pfu* à une température de 72°C pendant 15 min pour éliminer les A ajoutés en 3' par la Taq polymérase, puisque la digestion enzymatique par SmaI laisse des extrémités franches au plasmide. Les produits PCR ainsi traités, ont été ensuite purifiés sur gel à l'aide des colonnes Costar, tel que décrit précédemment. Les réactions de ligations ont été effectuées avec 100 ng de vecteurs digérés, tel que décrit à la section 2.6.2, avec le tampon de ligation T4 10X (500 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 20 mM ATP et 250 mg/ml, concentration finale 1X), avec 2 U de T4 ADN ligase (préparation maison) et avec un ratio insert : vecteur de 1:1 et 3 1. Les

réactions de ligation ont été incubées à TP pendant 3h puis à 16°C pendant toute la nuit dans un appareil PCR *MasterCycler*.

#### 2.6.4. Transformations des cellules chimiocompétentes

Des cellules *E. coli* TOP10 chimiocompétentes ont été préparées en suivant un protocole à base de chlorure de rubidium (SHUBEITA *et al.*) Les produits de ligation (1 µl) ont été ajoutés à 50 µl de cellules chimiocompétentes, puis le mélange a été incubé sur glace pendant 30 min puis un choc thermique à 42°C pendant 45 sec a été effectué, suivi d'une autre incubation sur glace pour 2 min. Aux cellules transformées, 250 µl de milieu LB a été ajouté et incubé à 37°C pendant 1h avec agitation (200 rpm). Les bactéries ont ensuite été étalées à raison de 10, 30 et 100 µl sur géloses LB contenant 100 µg/ml ampicilline (BioShop) puis incubées à 37°C toute la nuit. À noter que pour visualiser l'intégration des inserts dans les vecteurs, nous avons utilisé la sélection blanc-bleu et donc 80 µl de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal, BioShop) à 20 mg/ml et 40 µl d'IPTG (BioShop) à 100 mg/ml ont été étalés sur les géloses LB avec ampicilline avant d'y étaler les bactéries. Nous avons ensuite confirmé l'intégration des inserts en sélectionnant 10-20 colonies blanches qui ont été repiquées dans 5 ml de bouillon LB contenant 50 µg/ml d'ampicilline. Après incubation des bouillons toute la nuit à 37°C avec agitation, l'ADN plasmidique a été extrait par la méthode utilisant la silice tel que décrit à la section 2.2.3. Ces ADN plasmidiques ont ensuite été déposés sur gel d'agarose 0,8% et comparés au vecteur contrôle sans insert, et des digestions enzymatiques ont été



effectuées pour confirmer la présence de l'insert dans le plasmide. L'ADN des plasmides ayant intégrés les bons inserts, ont été envoyés au CRCHUL pour être séquencés à l'aide des amorces universelles M13 *forward* et *reverse*.

## 2.7. Analyses bioinformatiques

### 2.7.1. Annotation et alignements des génomes de phages

Avec les séquences complètes des génomes des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04, nous avons utilisé plusieurs logiciels informatiques pour analyser, annoter et comparer les génomes de phages. Tout d'abord, le programme *Staden* (STADEN et al., 2000) a été utilisé pour aligner les différents contigs d'ADN issus des trois méthodes de séquençage (*454 sequencing*, séquençage direct et séquençage des inserts clonés).

Les programmes *GeneMark.hmm* (LUKASHIN et BORODOVSKI, 1998) et *GLIMMER* (DELCHER et al., 2007), disponibles gratuitement sur internet ont été utilisés afin d'identifier les cadres de lecture (ORF) dans les génomes des phages.

Le programme *Bioedit* (HALL, 1999) a été, quant à lui, utilisé pour manipuler et éditer les séquences d'ADN et les séquences protéiques, de même que pour construire les cartes génomiques.

Les applications *BLASTp* (ALTSCHUL et al., 1990), *InterProScan* (ZDOBNOV et APWEILER, 2001) et *ACLAME* (LEPLAE et al., 2010) ont été

utilisées pour comparer les séquences protéiques avec des protéines homologues dans les bases de données publiques (ex. NCBI) et ainsi tenter d'identifier leur fonction.

Les applications *Artemis* (RUTHERFORD *et al.*, 2000) *Artemis Comparaison Tool* (ACT) (CARVER *et al.*, 2005) et WebACT (<http://www.webact.org/WebACT/home>) ont été utilisées pour effectuer les alignements génomiques entre les phages  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP04 et les autres génomes de phages de *C. difficile*, déjà séquencés dans la littérature.

## **2.8. Impact des phages $\phi$ MMP sur *C. difficile***

### **2.8.1. Motilité des lysogènes comparé aux souches sauvages**

Afin de vérifier si les phages  $\phi$ MMP01-04 isolés des selles de patients ont la capacité d'influencer la motilité de leurs souches hôtes (lysogènes), nous avons comparé la motilité des lysogènes avec les mêmes souches sans prophages. Cinq microlitres d'une pré-culture de 16 h des souches lysogènes et non-lysogènes ont été déposés délicatement à environ 2-3 mm du haut d'un tube BHI contenant 0,05% agar. Les tubes ont ensuite été incubés à 37°C pendant 17 h et la croissance bactérienne a été visualisée. Plus la souche est mobile, plus elle parcourt une grande distance dans la gélose (vers le fond du tube). Les distances parcourues ont donc été mesurées à partir de 3 expériences indépendantes et la moyenne a été calculée. Les distances de migration des lysogènes ont ensuite été comparées aux souches sauvages correspondantes ne contenant pas le prophage.

### 2.8.2. Immunodétection des toxines A et B (Dot Blot)

Les toxines TcdA et TcdB de *C. difficile* ont été détectées dans les surnageants de culture des lysogènes et des souches non lysogènes correspondantes. Nous avons utilisé un protocole d'immunodot blot tel que décrit par Hawkes et al (HAWKES et al., 1982) avec quelques modifications. Une membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences), humectée quelques minutes dans de l'eau distillée, a été placée dans un appareil Dot Blot (Tyler Research, Edmonton, Al, Canada). À partir des prélèvements effectués dans le cadre de l'induction spontanée décrite à la section 2.5.7.1, 100 µl de ces aliquotes ont été déposés dans les puits de l'appareil Dot Blot et ont été aspirés sous vide et transférés sur la membrane de nitrocellulose. Les puits ont été lavés deux fois avec 150 µl de PBS 1X et la membrane de nitrocellulose a été séchée à l'air libre pendant environ 30 min. L'étape suivante consistait à bloquer la membrane avec 50 ml d'une solution PBST-5% lait écrémé pendant 5 h avec agitation. Cette étape et les suivantes ont été faites à TP. Ensuite, la membrane a été incubée toute la nuit avec agitation dans une autre solution fraîche de PBST-5% lait écrémé contenant une dilution 1 :3000 des anticorps primaires monoclonaux anti-toxine A ou anti-toxine B à 100 µg/ml (Meridian Life Science, Saco, MN, USA). Trois lavages de 5 min ont ensuite été effectués dans 20 ml de PBST, toujours avec agitation. L'anticorps secondaire anti-*mouse* IgG HRP (New England Biolabs, Pickering, ON, Canada) a été dilué 1: 3000 dans du PBST-5% lait et incubé en présence de la membrane pendant 1 h avec agitation. Les lavages avec 20 ml de PBST ont ensuite été effectués trois fois comme précédemment. Finalement, la détection a été effectuée avec la trousse commerciale ECL+ (GE Healthcare) en recouvrant la membrane de 2,5 ml

de la solution de détection tel que décrit par le fabricant. La membrane a ensuite été incubée 5 min à l'abri de la lumière et a été exposée sur film Hyperfilm ECL (High performance chemiluminescence film, GE Healthcare).

### 3. RÉSULTATS

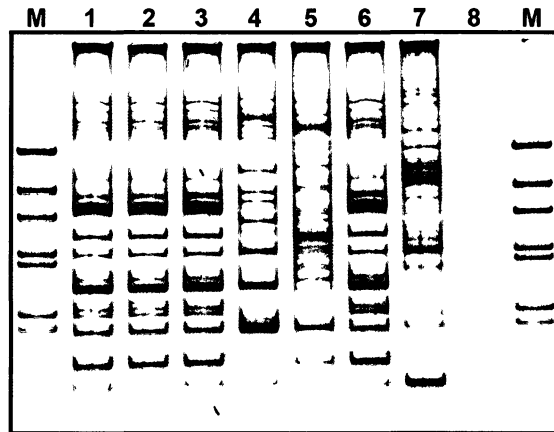
#### 3.1. Caractérisation de la collection d'isolats cliniques de *C. difficile*

##### 3.1.1. Le ribotypage des isolats cliniques par réaction PCR

Afin de caractériser et de différencier les différents isolats cliniques de *C. difficile* de notre collection, la technique de ribotypage par PCR a été utilisée. De plus, cette technique nous a permis d'identifier les ribotypes prédominants pour ensuite établir les isolats cliniques à utiliser lors de l'isolement des phages virulents dans l'environnement.

Initialement, les extractions d'ADNg bactérien ont été effectuées avec la trousse d'extraction *Purelink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Les réactions PCR se sont effectuées tel que décrit à la section 2.3.1 et l'électrophorèse de ces amplicons a été effectuée pendant 45 min à 150 V. Ces premiers essais de ribotypages n'ont pas été très concluants puisque les profils de bandes présentaient des trainées d'ADN sur gel ce qui rendait les profils difficiles à analyser (non montré ici). Par la suite, certains paramètres ont été ajustés tels que l'extraction d'ADNg bactérien effectuée avec la trousse commerciale de GE Healthcare, le temps de migration qui a été augmenté à 1h10 et le voltage de la migration qui a été ramené à 100 V. De plus, les solutions de polyacrylamide ainsi que d'ammonium persulfate 10% (APS) ont été préparées et utilisées dans un intervalle d'un mois comparativement à plus d'un mois pour les essais antérieurs. La figure 8

représente, comme exemple, quelques isolats cliniques qui ont été ribotypés par cette dernière méthode.



**Figure 8.** Profils de ribotypage observés sur gel de polyacrylamide 5%. Les puits 1-7 contiennent les isolats cliniques CD204 à CD210, respectivement. Le puits 8 contient le contrôle négatif (sans ADN) de la réaction PCR alors que les puits M contiennent le marqueur 100 pb *DNA Ladder*.

Comme on peut le constater, les différents profils sont nets et faciles à comparer entre eux ce qui permet une identification rapide des ribotypes associés aux divers isolats de *C. difficile*. L'analyse des ribotypes s'effectue à l'aide du logiciel *Gel Compar II* qui nous permet de comparer les différents profils pour ensuite établir un arbre phylogénétique (voir figure 9). La comparaison des différents profils avec le logiciel d'analyse s'est effectuée selon plusieurs paramètres, dont le coefficient de corrélation de Pearson, une mesure de la corrélation entre deux valeurs basées sur la similarité entre les courbes densitométriques. Ces courbes densitométriques sont proportionnelles à l'intensité des signaux qui correspondent aux produits PCR amplifiés. De plus, la position de tolérance, fixée à 2%, représente le déplacement maximal entre deux bandes, de deux profils différents, pour que ceux-ci soient considérés comme assortis et donc identiques. Finalement, la valeur d'optimisation,

fixée également à 2%, représente le déplacement permis, par le programme, pour avoir la meilleure comparaison possible entre les différentes bandes. D'ailleurs, les isolats cliniques présentant un degré de similarité égal ou plus grand que 85% ont été considérés comme étant du même ribotype. Un nouveau ribotype a donc été attribué aux isolats cliniques ayant une valeur inférieure à ce seuil. Par contre, tous les ribotypes ont été contre-vérifiés de façon manuelle afin d'éviter les erreurs commises par le logiciel. En effet, une altération dans la migration des échantillons ou dans la structure du gel peut entraîner une variation de la valeur de similarité donnée par *Gel Compar II*. Dans de tels cas, notre interprétation des profils de bandes prévaut sur celle du logiciel.

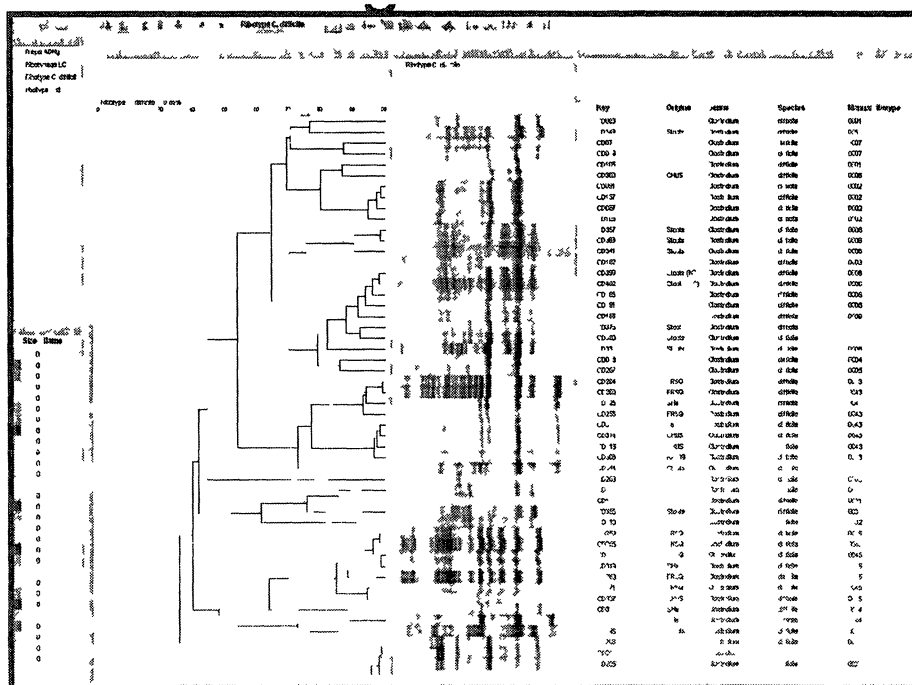
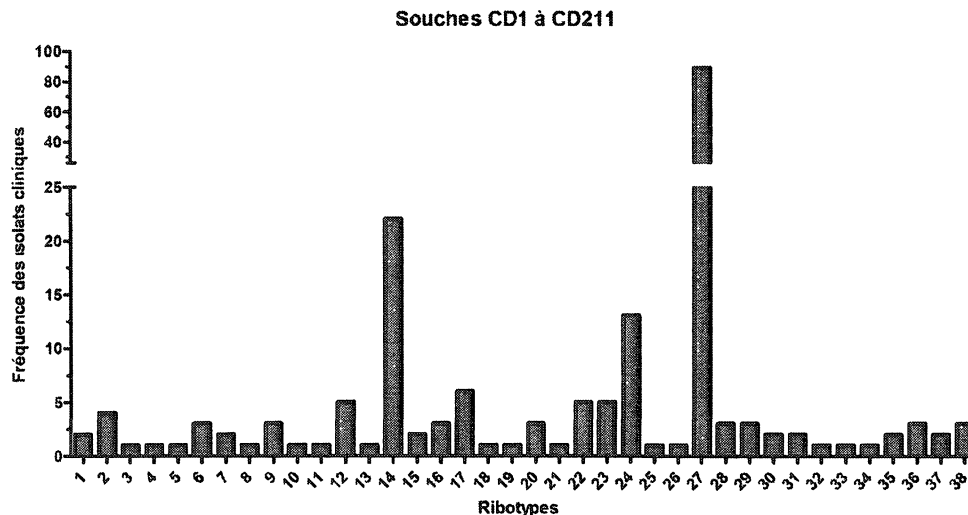


Figure 9. Arbre phylogénétique créé à l'aide du logiciel Gel Compar II. L'image représente une vue du logiciel lors de la comparaison des différents profils et l'identification des ribotypes d'une partie des isolats de *C. difficile* de la collection.

Après la mise au point de la technique de ribotypage, 211 isolats cliniques ont été initialement ribotypés de façon systématique pour obtenir 38 ribotypes différents (voir figure 10). Le ribotype 027 est le plus prédominant des ribotypes, suivis du ribotype 014, puisque ceux-ci comprennent respectivement 88 isolats (41,7%) et 22 isolats (10,4%) de tous les isolats de la collection.



**Figure 10. Répartition des isolats cliniques en fonction des différents ribotypes analysés par le logiciel Gel Compar II. A. Fréquences établies sur les isolats cliniques CD001 à CD211, souches exclusivement de provenance clinique.**

### 3.2. Isolement des bactériophages

L'utilisation de phages strictement lytiques s'avère une alternative intéressante à l'utilisation d'antibiotiques pour traiter les ICD puisque l'efficacité de ceux-ci sont très variable et on note un nombre important de rechutes dues à un traitement inefficace, ou à une réinfection par les spores présentes dans l'environnement du patient (RAZAVI *et al.*, 2007; COHEN, 2009). Ainsi, dans le cas de *C. difficile*, nous avons tenté d'isoler des phages virulents dans les eaux usées non traitées (égouts) et

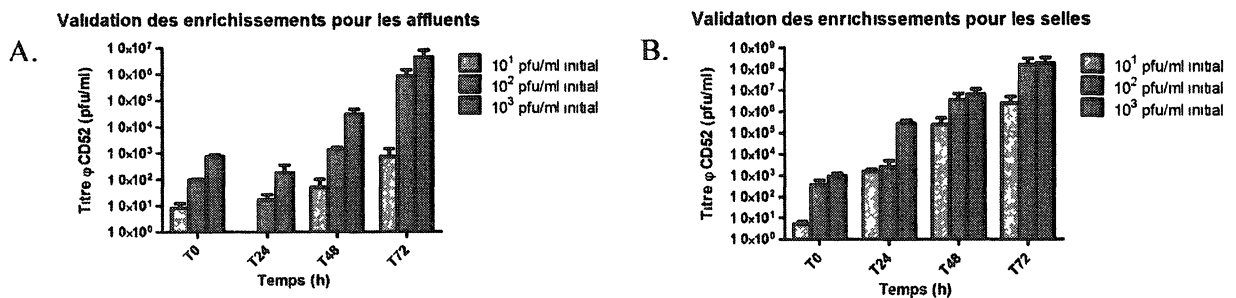


dans les selles de patients infectés par *C. difficile* puisque ces deux environnements sont les endroits les plus propices à la présence de cette bactérie.

### 3.2.1. Validation de la méthode d'enrichissement

Il est important de noter que plusieurs tentatives d'isolement de phages virulents ont été tentées par le passé et ce, par quelques groupes de recherche dans le monde (GOH *et al.*, 2005; HORGAN *et al.*, 2010) Il est possible que ces échecs aient été causés par un protocole d'isolement inadéquat. Par conséquent, avant d'utiliser le protocole pour l'isolement de bactériophages dans l'environnement et dans les selles de patients atteints d'ICD, nous avons développé et validé l'efficacité et la sensibilité d'une méthode utilisant un phage connu au laboratoire à titre de contrôle, le phage  $\phi$ CD52 ainsi que la souche sensible à ce phage, CD24. Le phage tempéré  $\phi$ CD52 a été isolé suite à l'induction de la souche de *C. difficile* CD52, avec la mitomycine C, un antibiotique reconnu pour provoquer l'excision des prophages. La méthode a été testée en ajoutant des quantités déterminées de phage autant dans les affluents (eaux usées) traités que dans les selles traitées (voir section 2.4.4). Comme on peut le voir sur la figure 11A, lorsque seulement  $10^1$  ufp/ml du phage  $\phi$ CD52 sont ajoutés dans les eaux d'affluents (temps T0), on ne peut détecter ce dernier par la méthode de gélose molle en surface après une 1<sup>ère</sup> ronde d'enrichissement. Par contre, les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> enrichissements (temps 48 et 72 h) augmentent substantiellement la quantité du phage contrôle à des valeurs de  $10^2$  et  $10^3$  ufp/ml respectivement. Ainsi, à des valeurs initialement très faibles du phage contrôle dans les affluents, l'amplification de celui-ci

est assez difficile. une augmentation de seulement 2 log est observée. Par contre, lorsque le titre initial du phage  $\phi$ CD52 est plus élevé ( $10^2$  et  $10^3$  ufp/ml), les enrichissements ont été, dans l'ensemble, plus efficaces. En effet, les titres initiaux de  $10^2$  et  $10^3$  ufp/ml du phage  $\phi$ CD52 ont augmenté après 72 h jusqu'à des titres d'environ  $10^6$  ufp/ml. Ainsi, il semble que pour les enrichissements effectués dans les affluents, trois enrichissements seront nécessaires afin de détecter les possibles phages malgré le fait qu'avec deux enrichissements, la quantité de phages semble suffisante pour les détecter. Fait intéressant, pour les trois titres initiaux du phage contrôle, une diminution a été observée après le 1<sup>er</sup> enrichissement (T24) bien que celle-ci est moins importante pour le titre initial le plus élevé ( $10^3$  ufp/ml).



**Figure 11. Validation de la méthode d'enrichissement.** Des quantités prédéterminées de phages ont été ajoutées à un échantillon d'eau usée (A) ou de surnageant de selles de patients (B) et les phages ont été amplifiés par trois rondes d'enrichissement. Les titres obtenus représentent la quantité de phage  $\phi$ CD52 détectée sur la souche sensible CD24 avant enrichissement (T0), après le 1<sup>er</sup> enrichissement (T24), le 2<sup>e</sup> enrichissement (T48) et le 3<sup>e</sup> enrichissement (T72).

### 3.2.2. Isolement et détection de phages dans les affluents et les selles de patients

Nos essais de validation montrent que les amplifications du phage  $\phi$ CD52 semblent avoir été plus efficaces dans les selles de patients comparativement aux eaux

usées (voir ci-haut). Comme le démontre la figure 11B, à un titre de  $10^1$  ufp/ml avant enrichissement (temps T0), le phage contrôle a augmenté d'environ deux log après chaque enrichissement pour un titre final d'environ  $10^7$  ufp/ml après le 3<sup>e</sup> enrichissement. L'augmentation dans les titres est aussi très importante lorsque le phage contrôle est à  $10^2$  et  $10^3$  ufp/ml initialement, atteignant des titres aussi élevés que  $5 \times 10^8$  ufp/ml après trois enrichissements. D'ailleurs, contrairement aux eaux usées, après le 1<sup>er</sup> enrichissement, aucune diminution dans les titres du phage contrôle n'a été observée. Donc, après trois rondes d'enrichissements dans les selles, les phages potentiels seront probablement présents en grande quantité et ainsi faciles à isoler et à détecter.

Après avoir validé le protocole et procédé aux enrichissements sur les affluents et les selles de patients atteints d'ICD, nous avons effectué les étapes de détection. Au total, 30 échantillons d'eaux usées ont été analysés sans qu'aucun phage ne soit détecté. Les enrichissements ont été effectués sur 15 souches de *C. difficile*, préalablement déterminées par ribotypage par PCR selon leurs fréquences et leur importance clinique (voir tableau 2). À noter que l'identification des 15 souches a été basée sur les isolats cliniques ribotypés CD1 à CD211 (voir figure 10A). Après 1 an de prélèvement sans aucun phage isolé, l'échantillonnage des affluents a été arrêté.

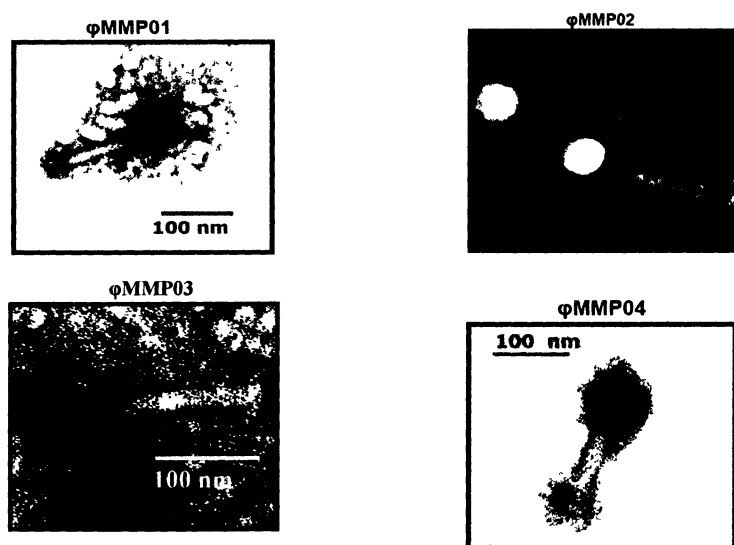
Pour les selles de patients atteints d'ICD, 59 surnageants de selles ont été enrichis, avec les mêmes 15 souches que décrit précédemment, pour isoler et détecter six phages soient  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP02b,  $\phi$ MMP02d,  $\phi$ MMP03 et  $\phi$ MMP04. Sur ces six phages isolés, 4 d'entre eux ( $\phi$ MMP02, b, d et  $\phi$ MMP03) ont été

détectés sur la souche CD117 tandis que les phages  $\phi$ MMP01 et  $\phi$ MMP04 ont été détectés sur les souches sensibles CD19 et CD73 respectivement. Les six phages  $\phi$ MMP ont été purifiés à partir d'une plaque de lyse isolée par trois repiquages successifs. Par la suite, les phages purifiés ont été amplifiés en bouillon BHI avec leur souche sensible respective et titrés avant d'être utilisés pour la suite des expériences. Les prélèvements ont été également arrêtés après 1 an d'échantillonnage pour ne caractériser que les phages déjà isolés.

### 3.3. Caractérisation microbiologique et moléculaire des phages $\phi$ MMP

#### 3.3.1. Morphologie par microscopie électronique (TEM)

Afin de déterminer la morphologie des phages  $\phi$ MMP01-04, ceux-ci ont été observés sous microscope à transmission d'électron (TEM) (voir figure 12).



**Figure 12. Morphologie des particules de phages observées par microscopie électronique (TEM).** Les particules virales ont été colorées négativement avec une solution d'uranyl acétate 2% et observées sous une tension de 60 kV. Le grossissement présenté est 200 000x.

Ainsi, tous les phages  $\phi$ MMP01-04 font partie de la famille des *Myoviridae*, famille caractérisée par la forme de la capsidie qui est isométrique et de la queue qui est longue et contractile (ACKERMANN, 2007). En effet, la queue des phages de type *Myoviridae* comporte une gaine contractile recouvrant un tube rigide par lequel l'ADN passe lors de l'éjection. On note aussi généralement la présence d'un complexe protéique à la pointe de la queue (*Baseplate*) servant d'ancrage et de fibres utilisées par le phage pour reconnaître spécifiquement son hôte (KUTTER et SULAKVELIDZE, 2005). Le phage  $\phi$ MMP01 présente une capsidie isométrique d'un diamètre de  $44,4 \pm 2,8$  nm et d'une queue contractile de  $94,4 \pm 2,8$  nm tandis que le phage  $\phi$ MMP04 possède une capsidie hexagonale légèrement plus grosse ( $57,5 \pm 2,0$  nm) et une queue contractile légèrement plus longue ( $103 \pm 11,8$  nm). Finalement, le phage  $\phi$ MMP02 est celui dont les dimensions sont les plus imposantes. Ce dernier est composé d'une capsidie isométrique de  $71,7 \pm 2,9$  nm et d'une queue contractile de  $228 \pm 5,9$  nm. Le phage  $\phi$ MMP02 semble donc être le *Myoviridae* le plus gros observé chez *C. difficile* comparé aux autres phages caractérisés antérieurement (GOVIND *et al.*, 2006; GOH *et al.*, 2007; MAYER *et al.*, 2008).

### 3.3.2. Spectre d'hôte

Pour évaluer le nombre d'isolats de *C. difficile* de notre collection sensibles aux phages  $\phi$ MMP01-04 et aux autres phages du laboratoire, la technique en microplaque BHIA a été utilisée ainsi que la technique du dépôt de la goutte ou *Spot test* (voir la section 2.5.1). Cette dernière technique a été utilisée pour confirmer les résultats de la

première technique puisque cette dernière est une méthode plutôt fastidieuse et les résultats ont parfois été difficiles à interpréter. Le tableau 5 présente le spectre d'hôte des différents phages sur les isolats de *C. difficile* ainsi que les isolats sensibles utilisés pour leurs amplifications.

**Tableau 5.** Spectre d'hôte des isolats sensibles.

Phages	Souches d'amplification (sensible)	Nombre de souches testés	Spectre d'hôte des souches sensibles
$\phi$ MMP01	CD19	211	CD19, 28, 52, 62, 72, 78, 80, 81, 89, 90, 95, 96, 104, 114, 116, 120, 126, 128, 136, 137, 139, 141, 149, 150, VPI10463
$\phi$ MMP02	CD117	13	
$\phi$ MMP03	CD117	13	
$\phi$ MMP04	CD73	13	CD337
$\phi$ CD52	CD24	211	CD19, 21, 24, 28, 37, 40, 62, 71, 72, 73, 78, 80, 81, 90, 93, 95, 104, 107, 108, 116, 119, 120, 121, 127, 139, 141, 149, 152, 210
$\phi$ CD630-1,2 <sup>a</sup>	CD24	211	CD24, 40, 62, 78, 80, 81, 90, 104, 107, 108, 114, 116, 119, 120, 127, 139, 141, 149, 152, 210
$\phi$ CD24-1,2 <sup>a</sup>	CD326	211	CD42, 47, 64, 66, 206
$\phi$ CD38-1,2 <sup>a</sup>	CD6 et QCD-32g58	211	CD5, 6, 42, 47, 48, 62, 64, 66, 77, 206

<sup>a</sup> Les lysats contiennent deux prophages identifiés et distincts mais seuls les isolats sensibles pour l'amplification des phages  $\phi$ CD630-2,  $\phi$ CD24-2 et  $\phi$ CD38-2 sont connus.

À noter que certains isolats, notamment CD630, CD38 ainsi que CD24 possèdent deux prophages distincts ( $\phi$ CD630-1,2;  $\phi$ CD38-1,2 et  $\phi$ CD24-1,2 respectivement) qui n'ont pas les mêmes spectres d'hôtes. Aucune souche sensible n'a été identifiée pour les phages  $\phi$ CD24-1 et  $\phi$ CD630-1 et la seule façon d'obtenir ces phages est d'induire l'excision des prophages tel que décrit à la section 2.5.6. Bien que les spectres d'hôtes soient partiels et que le spectre d'hôte de certains phages tels que

$\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP03 et  $\phi$ MMP04 n'a pas été analysé sur l'ensemble des souches de la collection, il semble que le phage  $\phi$ MMP01 ait un éventail très large de souches sensibles comparativement aux autres phages (211 isolats analysés). En effet, plusieurs souches semblent être sensibles à plus d'un phage tandis que d'autres sont sensibles à certains phages spécifiques (voir tableau 5). De plus, quelques espèces de Clostridies autre que *C. difficile* ont été testées pour leurs sensibilités par rapport aux quatre phages  $\phi$ MMP01-04. En effet, plusieurs articles font mention de phages ayant la capacité d'infecter d'autres espèces et même d'autres genres bactériens (SCHALLEHN, 1985; CHEN et NOVICK, 2009). Toutefois, aucune des espèces de Clostridies testées ne semble être sensible à ces phages (voir tableau 6).

**Tableau 6.** Espèces de Clostridie utilisés pour évaluer la sensibilité de ces souches aux phages  $\phi$ MMP01-04

<b>Souches du genre <i>Clostridium</i></b>	<b># ATCC</b>
<i>C. perfringens</i>	12917
<i>C. sordellii</i>	N/D
<i>C. limosum</i>	25630
<i>C. septicum</i>	12464
<i>C. bifermentans</i>	638
<i>C. ramosum</i>	25582
<i>C. tertium</i>	14573
<i>C. butyricum</i>	19398
<i>C. sporogenes</i>	692
<i>C. tetani</i>	19406
<i>C. baratii</i>	N/D
<i>C. novyi</i>	19402
<i>C. botulinum</i>	19397

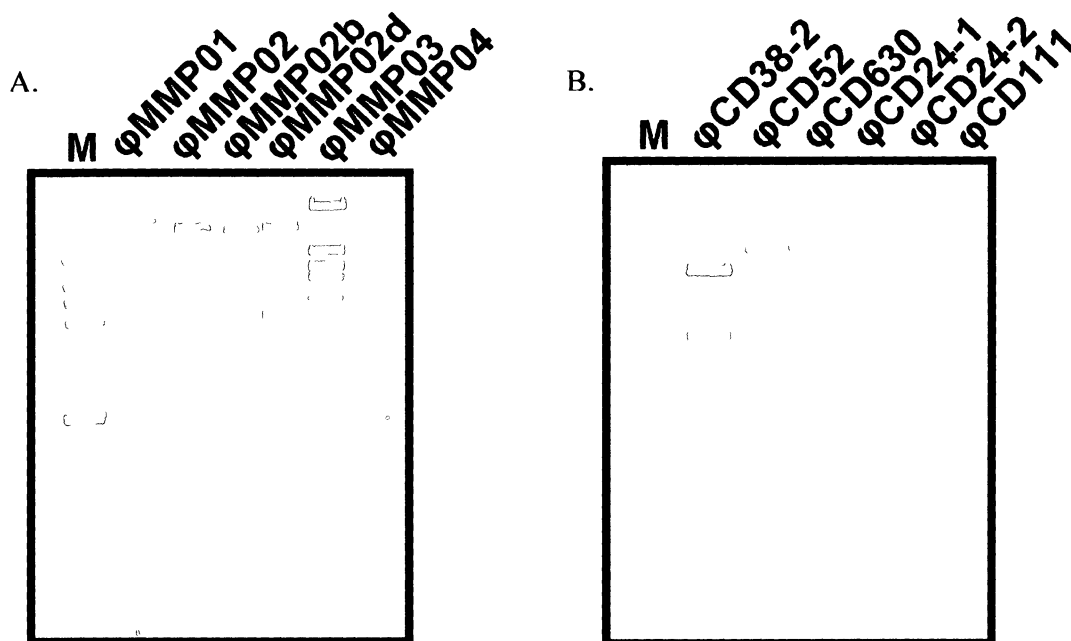
### 3.3.3. Profil de restriction des phages $\phi$ MMP

Un moyen assez simple et efficace pour différencier les phages entre eux est la comparaison de leurs profils de restriction, après digestion de l'ADN génomique des

phages avec diverses enzymes de restriction. Tous les profils de restriction ont été effectués avec l'enzyme HindIII puisque celle-ci fournit des profils assez bien définis et faciles à comparer. Comme on peut le voir sur la figure 13A, les phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP03 et  $\phi$ MMP04 présentent des profils assez différents. D'ailleurs, même si les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP03 infectent la même souche (CD117), ils présentent des profils différents et sont donc deux phages distincts. Bien que les phages  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP02b et  $\phi$ MMP02d ont été isolés à partir de surnageants de selles différentes, ils sont identiques par leurs profils et sont donc considérés comme étant le même phage. De par la position des bandes, la taille génomique des différents phages peut également être estimée par comparaison au marqueur de poids moléculaire *DNA Logic Ladder*.

Ainsi, les génomes des phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP03 et  $\phi$ MMP04 ont été estimés à 45 kb, 49 kb (idem pour  $\phi$ MMP02b et  $\phi$ MMP02d), 62 kb et 25 kb respectivement. Il semble donc que le phage  $\phi$ MMP03 soit le plus gros en termes de taille génomique et le phage  $\phi$ MMP04, le plus petit. Pour la suite des résultats, seul le phage  $\phi$ MMP02 sera retenu, étant donné que les phages  $\phi$ MMP02b et  $\phi$ MMP02d sont considérés comme identiques par rapport au  $\phi$ MMP02, bien que l'on ne puisse exclure qu'il y ait des différences mineures (mutations, petites délétions/insertions) imperceptibles suite à une analyse du profil de restriction HindIII. Les profils de restriction ont également été utiles pour différencier les phages  $\phi$ MMP01-04 par rapport aux autres phages du laboratoire tels que  $\phi$ CD630-2,  $\phi$ CD38-2,  $\phi$ CD52,  $\phi$ CD24-1,  $\phi$ CD24-2 ainsi que  $\phi$ CD111 (voir figure 13B).





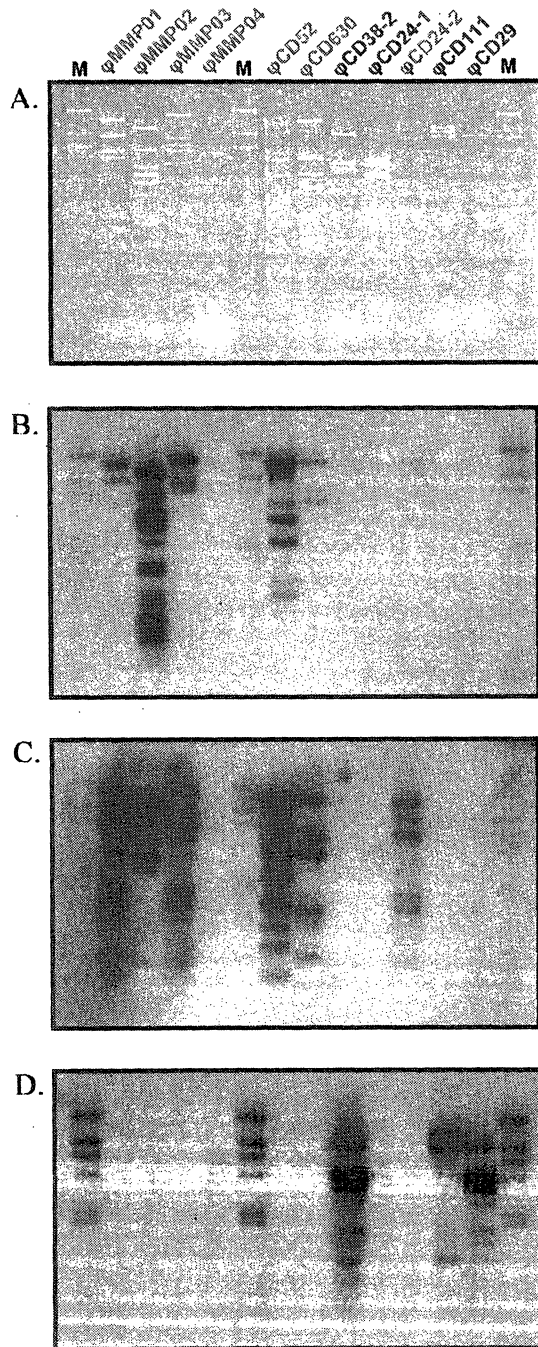
**Figure 13. Différentiation des phages par digestion enzymatique avec l'enzyme de restriction *Hind*III.** Le marqueur utilisé ici (M) est le *DNA Logic Ladder*. A. Profil de restriction des phages isolés des patients atteints d'ICD au cours de cette étude. B. Profil de restriction des phages induits d'isolats cliniques de la collection.

Ces phages ont été obtenus suite à leur induction des souches de *C. difficile* CD630, CD38, CD52, CD24 et CD111 respectivement, suite à un traitement à la mitomycine C ou aux rayons UV. On peut voir que tous ces phages sont bien différents, mais aussi que leurs profils respectifs ne ressemblent en rien à ceux obtenus pour les phages phiMMP01-04. Le phage phiCD24-1 semble être celui ayant le plus petit génome des phages induits et par rapport aux autres phages phiMMP avec une taille génomique estimée à 21 kb.

### 3.3.4. Comparaison des phages par hybridation de type Southern

La méthode d'hybridation de type Southern est une méthode utile pour comparer des génomes de phage entiers et estimer leur degré de similarité au niveau des séquences d'ADN (GOH *et al.*, 2005; FORTIER et MOINEAU, 2007). Pour ce faire, les profils de restriction de tous les phages (voir figure 14A) ont été transférés sur une membrane et hybridés avec quelques sondes correspondantes aux génomes entiers des phages correspondants (voir figure 14B, C et D). Nous avons pu constater que le phage  $\phi$ MMP02 ne montre pas beaucoup de similarité avec la majorité des autres phages isolés, hormis pour le phage  $\phi$ CD52 (figure 14B). En effet, la sonde du phage  $\phi$ MMP02 a faiblement hybridée avec les profils des phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP03,  $\phi$ CD630-2 et  $\phi$ CD24-2, bien que les quelques bandes détectées sont de haut poids moléculaire, rendant impossible l'estimation de l'étendue de la similarité. Les conditions d'hybridation permettent de détecter environ 65% et plus d'identité au niveau de l'ADN. Or, aucun signal n'a été détecté entre la sonde et les phages  $\phi$ MMP04,  $\phi$ CD38-2,  $\phi$ CD24-1,  $\phi$ CD111 et  $\phi$ CD29, ce qui laisse entrevoir une similarité très faible entre ces phages et le  $\phi$ MMP02 (similarité de moins de 65%). Cependant, les profils des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ CD52 présentent des signaux très forts avec la sonde  $\phi$ MMP02, ce qui suggère que ces deux phages sont très similaires au niveau génomique. Fait intéressant, la totalité des phages pour lesquels un signal, si faible soit il a été observé font tous partis de la même famille morphologique soit les *Myoviridae*.

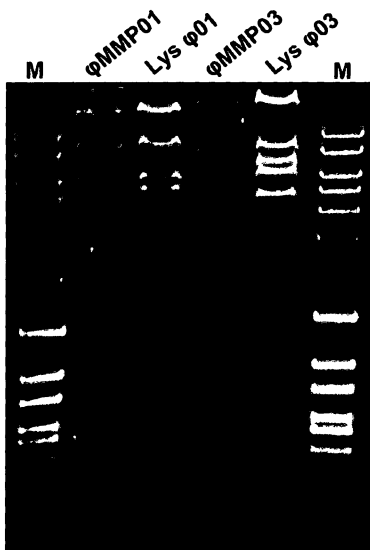
En utilisant un autre phage *Myoviridae* comme sonde, le phage  $\phi$ MMP03, les profils d'homologies entre ces phages sont quelques peu différents. En effet, le phage  $\phi$ MMP03 semble posséder beaucoup plus de similarité génomique avec les autres phages. Comme on peut le voir sur la figure 14C, la sonde  $\phi$ MMP03 a hybridé très fortement avec les génomes des phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP03,  $\phi$ CD52,  $\phi$ CD630-2 et  $\phi$ CD24-2. Aucun signal d'hybridation n'a été détecté sur les génomes des phages  $\phi$ MMP04,  $\phi$ CD38-2,  $\phi$ CD24-1,  $\phi$ CD111 et  $\phi$ CD29. Pour ce qui est de la sonde  $\phi$ CD38-2, un phage de la famille des *Siphoviridae*, celui-ci ne s'hybride fortement qu'avec les phages  $\phi$ CD38-2,  $\phi$ CD29 (probablement un phage identique puisque le profil d'hybridation est identique) et  $\phi$ CD111 (voir la figure 14D). Ces derniers sont également des phages de la famille des *Siphoviridae*. Des signaux d'hybridations très faibles sont également observés sur les phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP04,  $\phi$ CD52 et  $\phi$ CD24-1. Étonnamment, ce dernier, aussi membre de la famille des *Siphoviridae*, ne semble pas partager beaucoup de similarité avec le phage  $\phi$ CD38-2. Malgré le fait que ces deux phages soient dans la même famille morphologique, leur divergence génomique ne fait aucun doute. Finalement, on peut constater que dans l'ensemble des phages  $\phi$ MMP, le phage  $\phi$ MMP04 semble être le plus différent par rapport aux autres phages sur le plan génomique et que le phage  $\phi$ MMP03 est le plus similaire.



**Figure 14. Comparaison génomique des phages du laboratoire par hybridation ADN-ADN.** Les phages représentés en vert et en bleu appartiennent à la famille des *Myoviridae* et des *Siphoviridae* respectivement. A. Gel coloré au bromure d'éthidium montrant les profils de restriction HindIII. Les puits M contiennent le marqueur de poids moléculaire *DNA Marker II* marqué à la DIG. Buvarbage de type Southern avec la sonde  $\phi$ MMP02 (B),  $\phi$ MMP03 (C) et  $\phi$ CD38-2 (D).

### 3.3.5. Détermination du caractère virulent ou tempéré des phages $\phi$ MMP

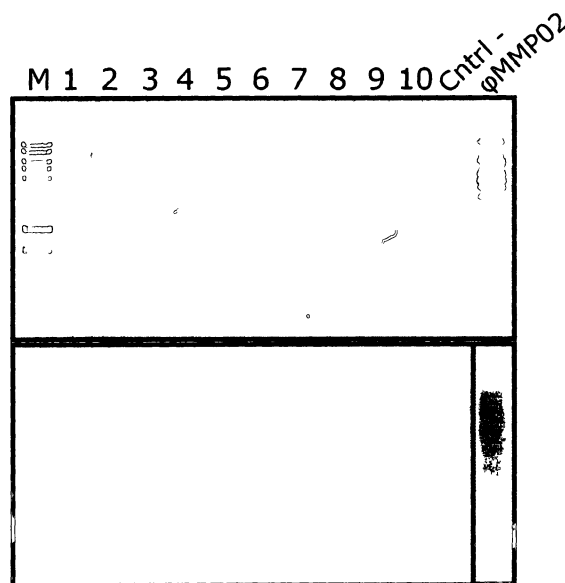
Afin de déterminer si les phages isolés étaient virulents ou tempérés, nous avons créé des bactéries lysogènes aux phages  $\phi$ MMP. Comme on peut le voir sur la figure 15, les profils des phages  $\phi$ MMP01 et  $\phi$ MMP03 et des prophages induits des colonies lysogènes correspondantes sont identiques, ce qui confirme le caractère tempéré de ces phages. Cependant, l'induction des prophages à partir des colonies obtenues avec les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 a été infructueuse. Les prophages ne sont pas tous sensibles aux agents inducteurs (UV, antibiotiques, etc) et donc, il se peut que les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 soient insensibles aux UV, du moins dans les conditions testées. Nous avons donc dû utiliser une autre méthode pour vérifier le caractère virulent ou tempéré des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04, soit par hybridation de type Southern.



**Figure 15. Comparaison des profils de restriction des phages  $\phi$ MMP01 et  $\phi$ MMP03 originaux par rapport aux prophages induits des colonies lysogènes correspondantes. Lys = prophage induit du lysogène. M= marqueur DNA Logic Ladder**

Une hybridation de type Southern, similaire à celle utilisée pour comparer les phages entre eux, a été employée (voir figure 16) à la différence que les ADN

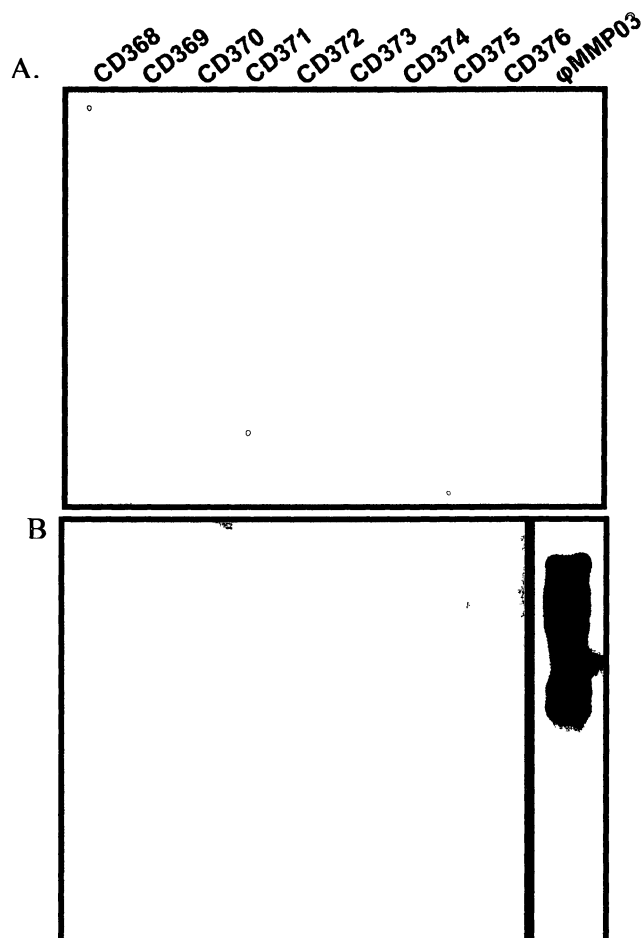
transférés sur membrane étaient ceux des colonies lysogènes et non des phages purifiés. Ainsi, pour les deux phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04, l'ADNg de plusieurs colonies lysogènes a été extrait, digéré (HindIII) et transféré sur membrane de nylon (voir section 2.5.3.2). Après hybridation avec les sondes correspondantes, des profils d'hybridation identiques aux phages purifiés ont été observés ce qui confirmait la présence des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 dans le chromosome des lysogènes analysés. La figure 16 présente les profils obtenus avec la souche  $\phi$ MMP02 seulement mais des résultats similaires ont été obtenus avec la sonde  $\phi$ MMP04 sur les lysogènes correspondants.



**Figure 16. Détection du phage  $\phi$ MMP02 (prophage) dans le chromosome des colonies lysogènes correspondantes.** A. Gel coloré au bromure d'éthidium montrant les profils de restriction HindIII de 10 colonies lysogènes. B. Hybridation ADN-ADN avec la sonde du phage  $\phi$ MMP02. Ctrl - : ADN de la souche hôte CD117 parentale (i.e. non lysogène); M : marqueur de poids moléculaire *DNA Logic Ladder*. Note : le profil du phage  $\phi$ MMP02 a été exposé moins longtemps pour compenser l'intensité des signaux détectés.

Pour écarter l'hypothèse selon laquelle les phages  $\phi$ MMP01-04 auraient été isolés et détectés suite à leur induction spontanée à partir des isolats cliniques utilisés lors des enrichissements (15 souches), une hybridation de type Southern avec les 4 sondes de phages a aussi été effectuée sur l'ADNg des 15 isolats de *C. difficile* (voir le tableau 2). L'absence de signaux d'hybridation nous a permis de confirmer que les phages  $\phi$ MMP01-04 ne sont pas présents dans le chromosome des isolats cliniques utilisés lors des rondes d'enrichissements (résultats non montrés) et qu'ils n'ont donc pas été malencontreusement induits de ceux-ci.

Étant donné le caractère tempéré des quatre phages  $\phi$ MMP, nous avons tenté de découvrir l'origine de ceux-ci, en utilisant également des hybridations de type Southern. Une des hypothèses retenue était que les phages  $\phi$ MMP ont été induits de *C. difficile in vivo*, pendant l'infection chez le patient. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons isolé les bactéries *C. difficile* présentes dans les selles individuelles qui composaient les pools desquel les phages  $\phi$ MMP01-04 ont été isolés. L'ADNg de ces bactéries a été extrait et des hybridations ADN-ADN ont été effectuées avec les sondes des phages  $\phi$ MMP01-04 correspondant. Par la présence d'un signal d'hybridation dont le profil correspond à celui du phage purifié et en tenant compte qu'il est intégré dans le chromosome bactérien, on identifie la souche d'origine et donc la souche de laquelle le phage  $\phi$ MMP s'est induit. Un signal d'hybridation a été détecté pour au moins un isolat avec les sondes correspondant aux phages  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP03 et  $\phi$ MMP04. En effet, avec l'exemple du phage  $\phi$ MMP03 à la figure 17A-B, on peut constater que sur les 9 isolats récupérés des pools de selles des enrichissements, plusieurs signaux d'hybridations ont été détectés.



**Figure 17. Détection du phage  $\phi$ MMP03 dans le chromosome de bactéries lysogènes provenant de selles de patients infectés. A.** Gel coloré au bromure d'éthidium montrant les profils de restriction HindIII des souches de *C. difficile* récupérées des selles utilisées pour l'isolement du phage  $\phi$ MMP03. B. Hybridation ADN-ADN de la membrane avec la sonde  $\phi$ MMP03. Le profil du phage purifié  $\phi$ MMP03 a été exposé à partir de la même membrane mais moins longtemps pour compenser pour les différences d'intensité des signaux.

Par contre, le signal correspondant à l'hybridation de la sonde  $\phi$ MMP03 sur la souche CD368 est le plus représentatif du profil du phage. Ce résultat confirme que le phage  $\phi$ MMP03 est bel et bien tempéré et qu'il pourrait s'être induit *in vivo* de la souche CD368 (ribotype 026). Ce résultat est appuyé par le fait que les surnageants de selles ont été filtrés sur membrane 0,45  $\mu$ m avant l'enrichissement éliminant du coup les bactéries et *C. difficile*. Par conséquent, seuls les phages déjà sous forme libre dans les fèces ont pu être amplifiés et détectés. La détection du profil correspondant au phage isolé dans le chromosome de la bactérie ayant causé l'infection élimine également la possibilité que les phages  $\phi$ MMP aient été des contaminants de l'environnement isolés lors des rondes d'enrichissement. Notons qu'il semble que



parmi les autres souches du pool de selles, d'autres prophages apparentés mais tout de même différents soient présents puisque des profils différents et de moindre intensité ont été observés. Il se peut également que les signaux d'hybridation observés soient issus d'une certaine homologie entre l'ADN de phages et l'ADN génomique des bactéries.

Des profils d'hybridation correspondant aux phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 ont également été identifiés dans le chromosome des souches CD343 (ribotype 023) et CD380 (ribotype 006), respectivement (résultats non montrés ici). Ces résultats confirment que ces deux phages auraient eux aussi été induits *in vivo*. Pour ce qui est du phage  $\phi$ MMP01, deux des cinq souches de *C. difficile* récupérées du pool de selles ont été perdues avant de pouvoir effectuer les essais d'hybridations (voir tableau 7). Par conséquent, l'absence de signal d'hybridation sur les trois souches restantes ne peut pas nous confirmer la souche d'origine de celui-ci. Notons également que le phage  $\phi$ MMP02b, considéré comme étant identique au phage  $\phi$ MMP02, s'est induit de la souche CD361 (non montré) dont le ribotype correspond à celui de la souche hypervirulente (ribotype 027). Aussi, le phage  $\phi$ MMP02d n'a pas été détecté par hybridation parmi toutes les souches du pool de selles pour l'isolement de celui-ci (non montré ici). On ne peut donc pas écarter l'hypothèse que ce dernier soit le phage  $\phi$ MMP02 d'origine qui ait été isolé suite à une contamination de l'extérieur lors des rondes d'enrichissements ou de l'étape de détection. Les informations cliniques concernant l'isolement des phages  $\phi$ MMP01-04 des pools de selles de patients atteints d'ICD sont résumées dans le tableau 7.

**Tableau 7.** Paramètres cliniques associés à la détection des phages  $\phi$ MMP01-04

Phages	Souche détection (ribotype)	Souche (ribotype)	Âge	Sexe	Traitement
$\phi$ MMP01	CD19 (036)	N/D	46	F	<b>*Ciprofloxacine</b>
		N/D	53	F	
		CD334 (037)	48	F	
		CD335 (027)	64	F	
		CD336 (037)	73	F	
$\phi$ MMP02	CD117 (014)	CD338 (17)	65	F	
		CD339 (22)	49	H	
		CD340 (29)	25	F	
		CD341 (6)	73	H	
		CD342 (38)	62	H	
		CD343 (23)	65	H	
		CD344 (43)	14	F	
		CD345 (51)	33	H	
$\phi$ MMP02b	CD117 (014)	CD358 (24)	56	F	
		CD359 (16)	94	F	
		CD360 (24)	78	F	
		CD361 (27)	4	F	
		CD362 (27)	71	H	
		CD363 (6)	65	H	
$\phi$ MMP02d	CD117 (014)	CD434 (38)	71	H	
		CD435 (24)	80	F	
		CD436 (45)	8	F	
		CD437 (42)	73	F	
		CD438 (24)	20	H	
$\phi$ MMP03	CD117 (014)	CD368 (26)	85	H	
		CD369 (16)	70	F	
		CD370 (12)	77	F	
		CD371 (16)	12	F	
		CD372 (27)	86	H	
		CD373 (27)	86	H	
		CD374 (23)	58	F	
		CD375 (37)	11	H	
$\phi$ MMP04	CD73 (12)	CD376 (6)	58	H	<b>*Ciprofloxacine</b>
		CD378 (16)	12	F	
		CD379 (16)	70	F	
		CD380 (6)	95	H	
		CD381 (27)	86	H	
		CD382 (32)	48	F	

\*La ciprofloxacine a été administrée à au moins un des patients qui compose le pool de selles.

La zone en gris pâle représente le lysogène sauvage d'où le phage  $\phi$ MMP correspondant s'est induit *in vivo*.

### 3.3.6. Lysogénisation de souches sensibles pour les phages $\phi$ MMP

Étant donné le caractère tempéré des phages  $\phi$ MMP01-04, la possibilité d'utiliser ces phages à l'état naturel comme outils thérapeutiques est pratiquement impossible. Or, considérant que ces phages se sont retrouvés dans un contexte d'infection, on peut se questionner à savoir si ces prophages peuvent avoir un impact sur divers phénotypes bactériens de *C. difficile* tels que la motilité ou la production en toxines A et B. Pour tenter de répondre à cette question, nous avons comparé les phénotypes entre les souches lysogènes de labo (avec phages) et non lysogènes (sans phage) des quatre phages  $\phi$ MMP. Les lysogènes de laboratoire Lys $\phi$ 01, Lys $\phi$ 02, Lys $\phi$ 03 et Lys $\phi$ 04 ont donc été créés à partir des souches sensibles utilisées pour l'amplification de ces quatre phages  $\phi$ MMP.

### 3.3.7. Inductions des phages $\phi$ MMP à partir des lysogènes sauvages et de labo

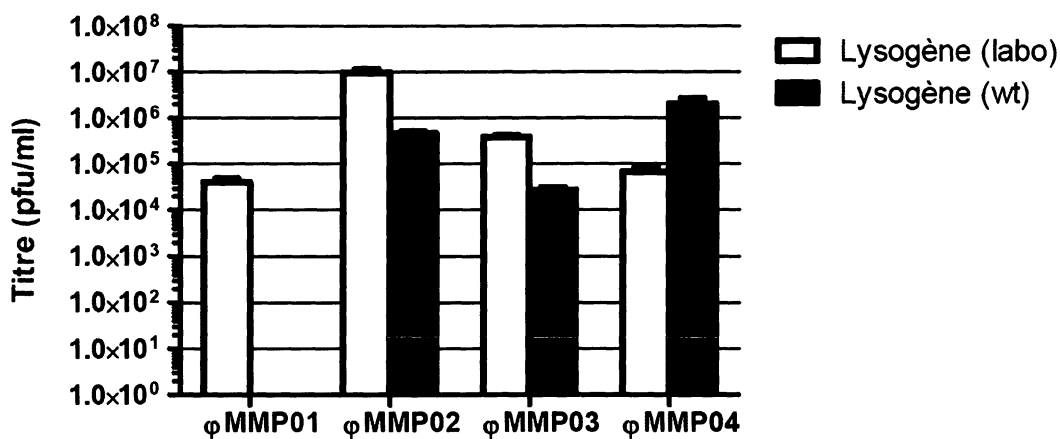
L'induction des prophages de leurs souches hôtes isolées des patients ICD nous a permis de confirmer le caractère tempéré des phages  $\phi$ MMP01-04 mais également d'évaluer l'importance de ce phénomène chez ces phages. L'induction peut être naturelle et spontanée comme elle peut être provoquée par des agents mutagènes qui endommagent l'ADN et qui induisent une réponse SOS chez l'hôte, menant à l'excision du prophage et à l'initiation du cycle lytique chez ce dernier (INGREY *et al.*, 2003).

Les hybridations ADN-ADN des phages  $\phi$ MMP01-04 sur leurs souches d'isollements respectives (voir section 3.3.5) nous a fourni un autre élément important. En effet, les phages  $\phi$ MMP02-04 se sont, de toute évidence, induits *in vivo* lors de l'épisode d'ICD chez les patients desquels les phages ont été isolés. Ce phénomène d'induction est très important, d'autant plus que les phages ont la possibilité d'avoir un impact sur le phénotype bactérien lors de l'infection d'une nouvelle souche hôte et que la co-infection de *C. difficile* chez un patient est possible (VAN DEN BERG *et al.*, 2005; TANNER *et al.*, 2010). Nous avons donc évalué, en premier lieu, le taux d'induction spontanée des phages  $\phi$ MMP02-04 à partir de leur lysogène sauvage, ie. de la souche de *C. difficile* isolée des patients d'ICD, et aussi de lysogènes obtenus en laboratoire. Nous avons ensuite évalué le taux d'induction des mêmes phages sur les mêmes lysogènes, mais en présence de quelques antibiotiques.

#### 3.3.7.1. Induction spontanée

Dans un premier temps, la quantification des phages  $\phi$ MMP01-04 relâchés de façon spontanée des lysogènes de labo et des lysogènes sauvages a été effectuée en cultivant les bactéries en bouillon, puis en titrant la quantité de phages relâchés au temps 0, 8, 16, 24, 48 et 72 h post-inoculation (résultats non montrés). Pour tous les phages  $\phi$ MMP, les taux d'inductions spontanées maximum ont été atteints à 8 h post-inoculation, à l'exception du lysogène de labo du phage  $\phi$ MMP02 où le maximum a été atteint après 16 h d'incubation ( $10^9$  ufp/ml). Ainsi, la comparaison entre les

lysogènes sauvages et les lysogènes de labo pour les 4 phages  $\phi$ MMP a été effectuée pour le temps 8 h seulement (voir figure 18).



**Figure 18. Quantification des phages  $\phi$ MMP01-04 induits spontanément après 8 h d'incubation à partir des lysogènes sauvages et de labo. Moyenne et écart-type de 3 expériences indépendantes (N=3).**

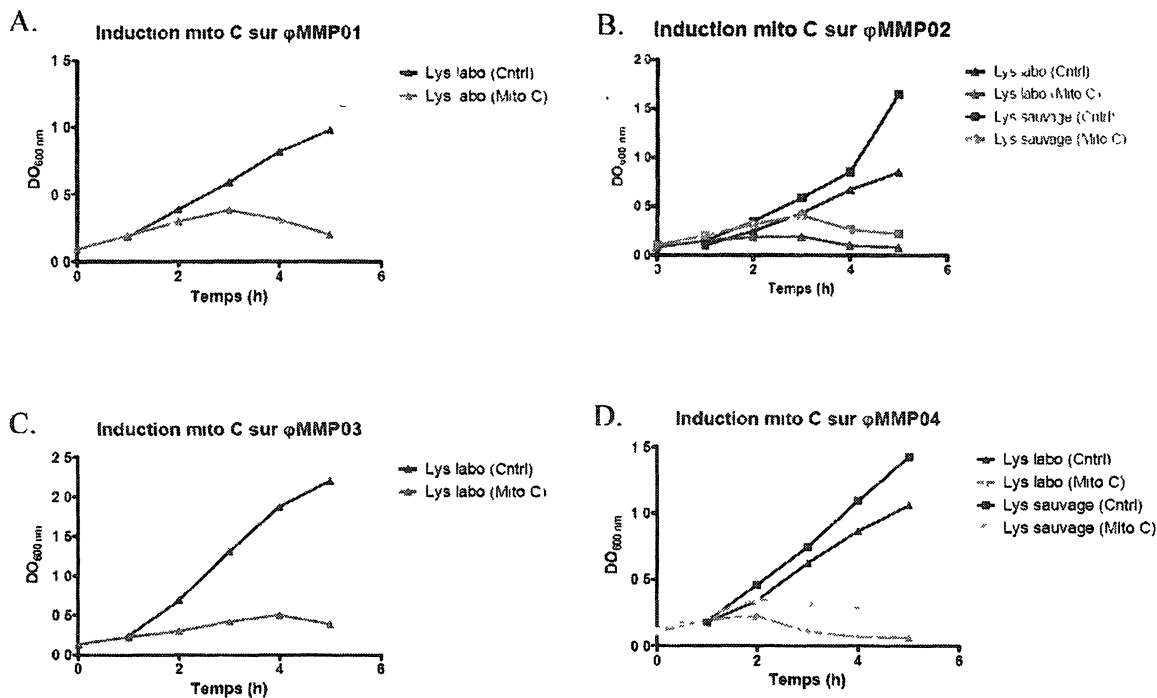
Cependant, comme le lysogène sauvage pour le phage  $\phi$ MMP01 n'a jamais été identifié (voir section 3.3.5), l'induction spontanée de celui-ci n'a pu être comparée avec l'induction du lysogène obtenu en laboratoire. Il semble donc que le phénomène d'induction spontanée relâche environ  $10^5$  ufp/ml en moyenne pour tous les lysogènes des phages  $\phi$ MMP01-04. Néanmoins, les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 semblent s'induire davantage des lysogènes de labo et sauvage, respectivement, puisqu'environ un à deux log de plus ont été détectés.

### 3.3.7.2. Induction provoquée

Étant donné que certains patients dont les selles ont été utilisées pour isoler et détecter des phages ont été traités avec la ciprofloxacine, un antibiotique de la classe des fluoroquinolones, nous avons tenté de déterminer si les phages  $\phi$ MMP01-04 ont la

capacité de s'induire en présence de cet antibiotique, ce qui pourrait expliquer éventuellement pourquoi ces phages ont été induits *in vivo* et retrouvé dans les selles de patients.

*Induction provoquée à la mitomycine C.* Depuis plusieurs années, la mitomycine C est utilisée afin d'induire les prophages, dont ceux chez *C. difficile* (GOH *et al.*, 2005; FORTIER et MOINEAU, 2007). En effet, la mitomycine C est un antibiotique qui cause des dommages à l'ADN et provoque l'induction de nombreux prophages (TOMASZ, 1995). Pour savoir si les antibiotiques peuvent stimuler davantage l'induction des phages  $\phi$ MMP01-04, nous avons d'abord tenté d'évaluer l'induction de ces phages en présence de mitomycine C. Avec une concentration établie à 3  $\mu$ g/ml de mitomycine C, (FORTIER et MOINEAU, 2007), la croissance des lysogènes pour les phages  $\phi$ MMP01-04 a été suivie par spectrophotométrie pendant cinq heures après l'ajout de l'antibiotique. Lors de l'induction massive d'un prophage, la lyse bactérienne peut être à ce point importante qu'une chute drastique de l'absorbance à 600 nm est observable après quelques heures. Comme on peut le constater à la figure 19, les courbes de croissance des lysogènes sauvages et de labo en présence de mitomycine C montrent une diminution de la  $DO_{600nm}$  après 3-4h d'incubation par rapport aux courbes des mêmes lysogènes sauvages et de labo sans antibiotiques (contrôles).

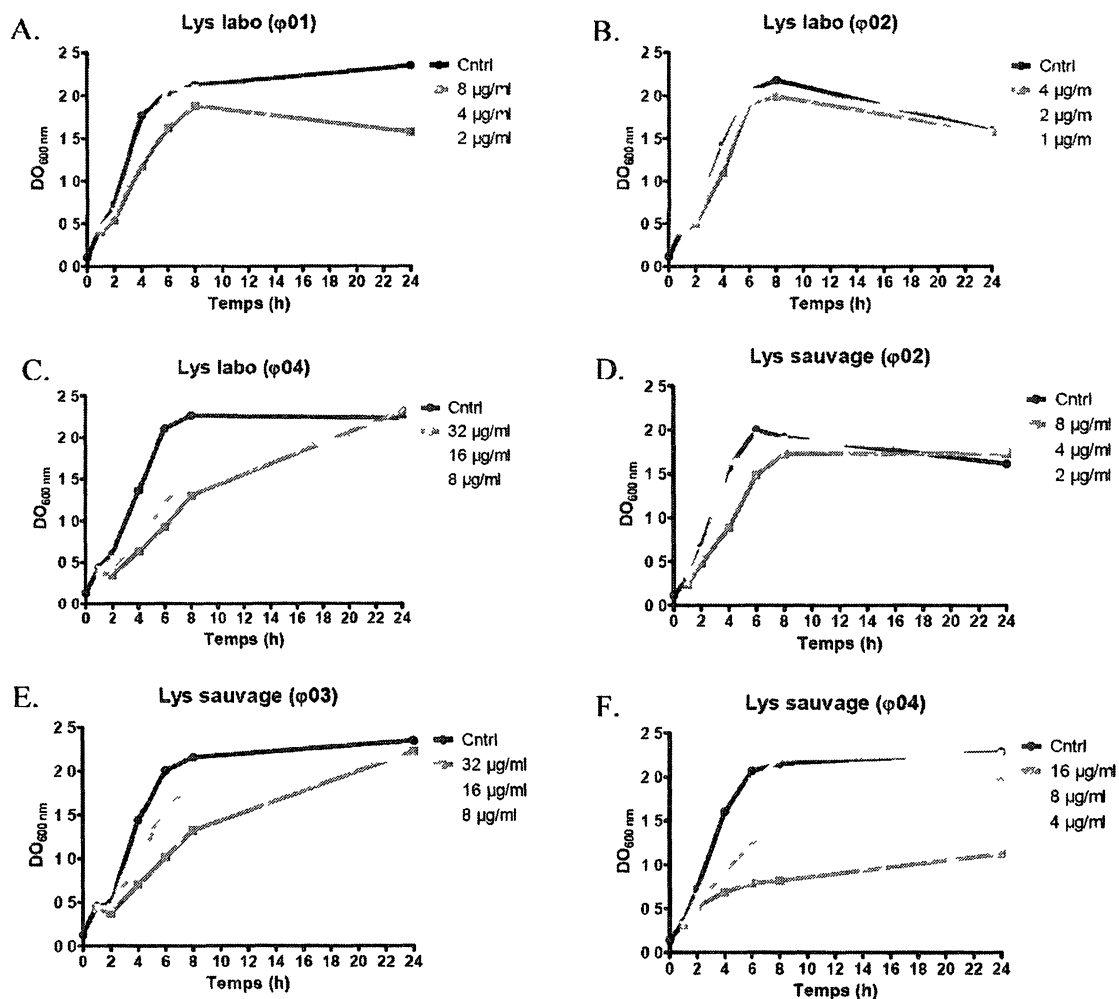


**Figure 19. Courbe de croissance des bactéries lysogènes contenant les prophages  $\phi$ MMP01-04 suite à l'induction avec la mitomycine C. La mitomycine C a été ajoutée à une concentration finale de 3  $\mu$ g/ml lorsque la culture a atteint une  $DO_{600\text{ nm}}$  de 0,1. A) Phage  $\phi$ MMP01. B) Phage  $\phi$ MMP02 C) Phage  $\phi$ MMP03 D) Phage  $\phi$ MMP04. Ctrl : culture non induite; Mito C : culture induite avec la mitomycine C.**

Les souches lysogènes, en présence de mitomycine C, n'ont jamais dépassé des valeurs d'absorbances (600nm) supérieures à 0.5 comparées aux mêmes souches sans antibiotique qui ont atteint des valeurs dépassant, au minimum, 1.0 après 5 h d'incubation. Bien que nous n'ayons pas titrés ou observés les phages induits (microscopie électronique ou profil de restriction), le profil d'induction est caractéristique et par conséquent, les phages  $\phi$ MMP01-04 semblent tous s'être induits en présence de mitomycine C.

*Induction provoquée à la ciprofloxacine.* Le mode d'action de la ciprofloxacine consiste à cibler et à inhiber les enzymes participant à la synthèse d'ADN tels que l'ADN gyrase et les topoisomérases II et IV (DRLICA et ZHAO, 1997). Ainsi, pour chacun des lysogènes sauvages et de labo pour les phages  $\phi$ MMP01-04, des inductions provoquées à la ciprofloxacine ont été effectuées avec trois concentrations d'antibiotique différentes dont l'une correspondait à la CMI déterminée plus tôt et les deux autres, à des concentrations sous-inhibitrices inférieures à la CMI (voir tableau 3). Dans un premier temps, nous avons suivi par spectrophotométrie ( $DO_{600nm}$ ), la croissance bactérienne, en présence ou non de ciprofloxacine et ce, pendant 24 h. On peut constater que pour pratiquement l'ensemble des souches lysogènes sauvages et de labo, la ciprofloxacine, n'a pas influencé de façon marquée la dynamique de croissance de *C. difficile* peu importe la concentration utilisée (figure 20). L'essai, qui n'a été réalisé qu'une seule fois, faute de temps, montre que seul le lysogène sauvage contenant le phage  $\phi$ MMP04 (CD380) a eu une croissance altérée par la présence des différentes concentrations en antibiotique (figure 20F). En effet, comparativement au contrôle sans antibiotiques (courbe en noir), les essais avec ciprofloxacine (4, 8 et 16  $\mu$ g/ml) ont montré des diminutions importantes dans les valeurs en  $DO_{600nm}$  obtenues après 24 h d'incubation. À noter que la courbe de croissance du lysogène de labo du phage  $\phi$ MMP03 n'a pas été effectuée puisque la souche en question n'a pas été en mesure de croître lors du seul essai d'induction à la ciprofloxacine.





**Figure 20. Courbe de croissance des lysogènes en présence de différentes concentrations en ciprofloxacine.** L'antibiotique a été ajouté après 1 h d'incubation à 37°C. A, B, C : lysogènes obtenus en laboratoire et contenant les phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04, respectivement. D, E, F : Lysogène sauvage contenant les phages  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP03 et  $\phi$ MMP04, respectivement.

En parallèle, la quantité de phages  $\phi$ MMP01-04 relâchés des lysogènes sauvages et de labo en présence ou non de ciprofloxacine a été déterminée aux temps 8 et 24 h (figure 21). Étant donné que les courbes de croissance pour la presque totalité des lysogènes n'ont pas présenté le profil caractéristique d'une induction efficace (voir figure 20), le dénombrement des phages induits est considéré comme non concluant,

excepté peut-être pour le lysogène sauvage du phage  $\phi$ MMP04. Malgré tout, et de façon générale, les phages  $\phi$ MMP01-04 n'ont pas semblé s'induire davantage en présence de ciprofloxacines par rapport aux contrôles sans antibiotiques du moins dans les conditions testées (voir figure 21A-F)

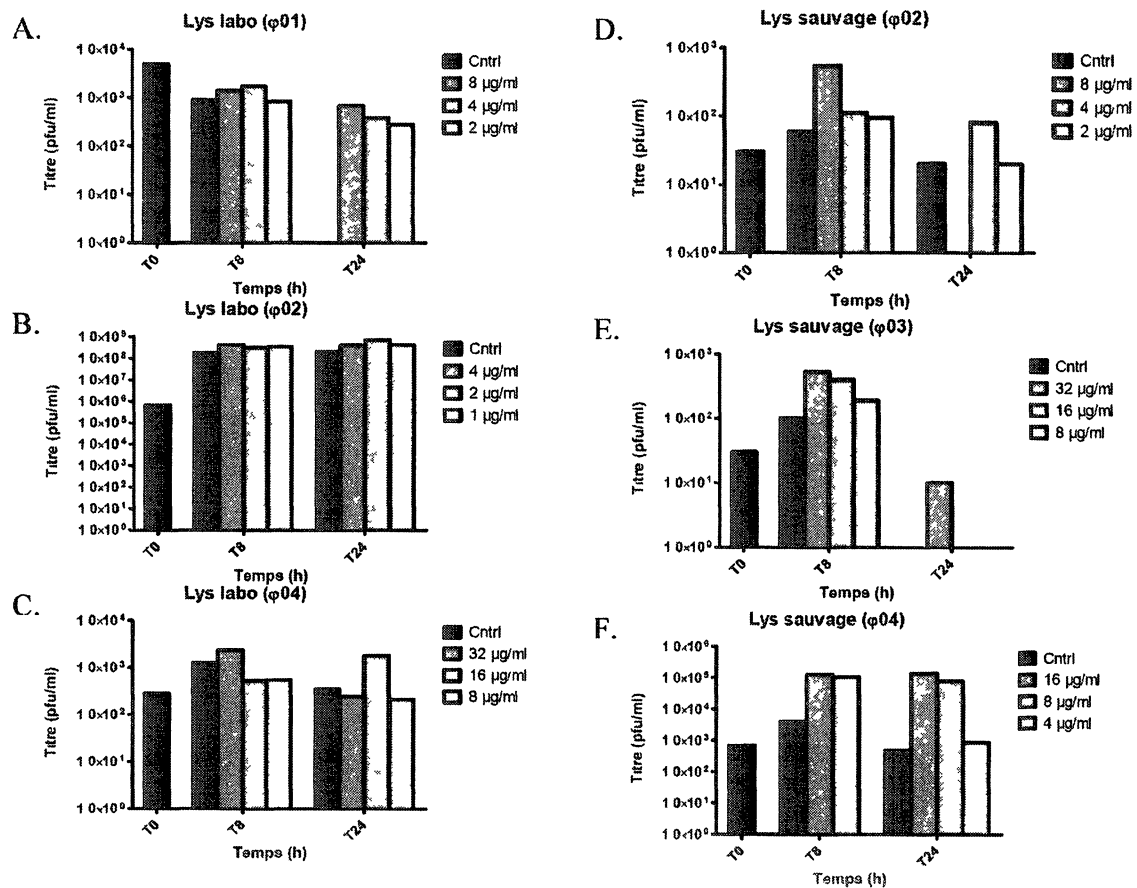


Figure 21. Quantification des phages  $\phi$ MMP dans les surnageants de culture (voir figure 20) en présence ou non de différentes concentrations de ciprofloxacin. La légende est la même qu'à la figure 20.

### 3.4. Séquençage complet et caractérisation des génomes des phages $\phi$ MMP02 et $\phi$ MMP04

#### 3.4.1. Séquençage des génomes

Les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 étant les plus distincts par rapport aux autres phages connus (voir figure 14B-C), nous avons décidé de séquencer leur génome complet pour mieux caractériser ceux-ci. Pour déterminer la séquence génomique complète, nous avons retenu les services de séquençage de Génome Québec à l'Université McGill utilisant la plateforme de séquençage 454 et un système GS-FLX de Roche. Nous avons obtenus, pour le phage  $\phi$ MMP02, un seul contig de 48 396 pb assemblé à partir de 51 685 séquences d'une longueur moyenne de 317 pb (couverture de 332x). Pour le phage  $\phi$ MMP04, un seul contig de 31 662 pb a été assemblé à partir de 23 416 fragments de 318 pb (couverture de 198x). L'étape suivante consistait à vérifier si ces contigs représentaient les génomes complets. Dans un premier temps, la tentative de vérification a été effectuée par séquençage direct, sur l'ADN génomique des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 isolé et purifié, en utilisant des amorces divergentes, conçues pour se fixer aux séquences correspondantes aux extrémités des contigs. Cette tentative a échoué car, selon le CRCHUL qui a procédé au séquençage, les séquences obtenues étaient illisibles et de mauvaises qualité, rendant impossible la comparaison de ces séquences avec le génome des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04. La technique de séquençage par clonage des régions correspondant aux extrémités des contigs a alors été choisie. La permutation circulaire des phages de type *pac* suggère que certains des génomes de phages encapsidés seront décalés au niveau des séquences correspondant

aux extrémités des contigs obtenus par séquençage 454 (CLOKIE et KROPINSKI, 2009). Ainsi, les régions situées aux extrémités des contigs ont été amplifiées par PCR sur l'ADN purifié des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04, et les produits PCR ont été insérés dans le plasmide pBS II et transformés dans *E. coli* TOP10. Le plasmide de quelques colonies obtenues a été extrait et envoyé au séquençage au CRCHUL. En comparant sur gel, la taille des plasmides avec et sans inserts, on a pu constater que le produit PCR inséré avait une taille d'environ 300 pb pour les deux phages. Or, les séquences obtenues du CRCHUL ont été alignées sur leurs contigs respectifs avec l'application *Gap4* du programme *Staden*. Une partie des séquences obtenues se sont alignées avec leurs contigs respectifs (environ 300 pb) tandis que le reste de ces séquences (environ 700 pb) s'est avéré correspondre au vecteur pBS II lui-même, confirmé par analyse BLAST avec la base de données GenBank. Par conséquent, aucune séquence nouvelle n'a été amplifiée par PCR et clonée lors de ces essais et les contigs de McGill représentaient donc les génomes complets des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04.

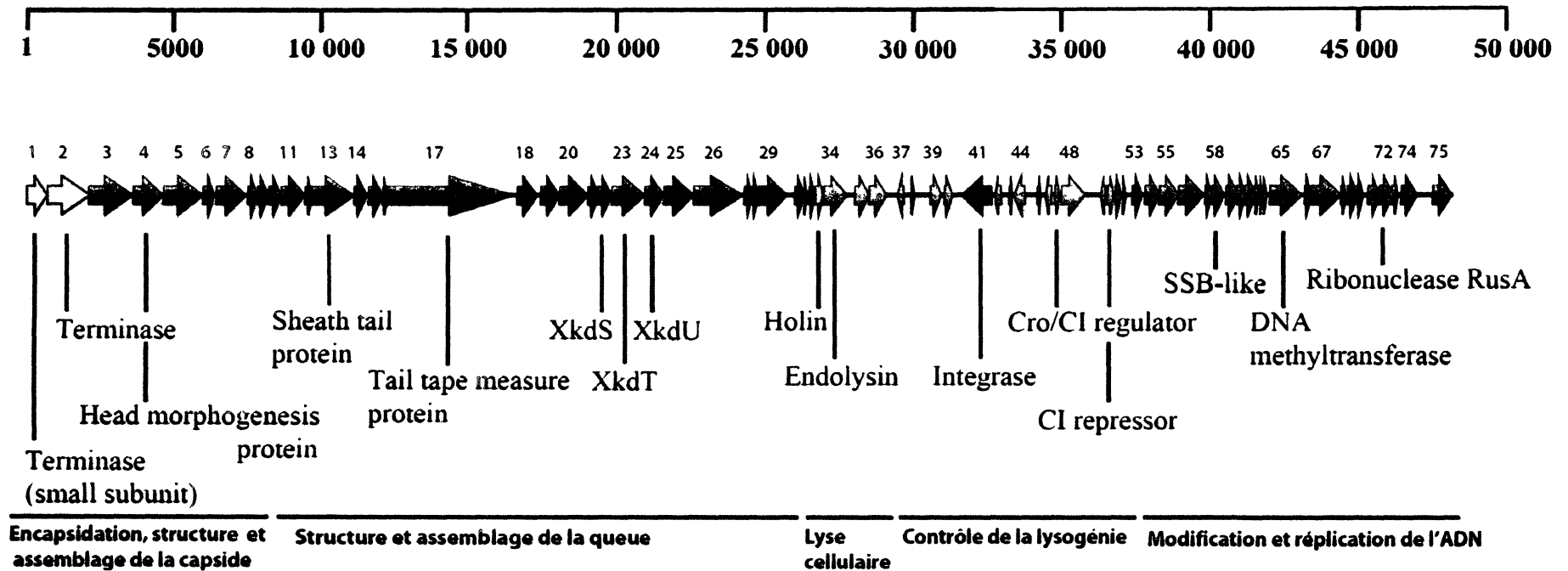
### 3.4.2. Annotations et cartes génomiques

#### 3.4.2.1. Génome du phage $\phi$ MMP02

Le génome complet du phage  $\phi$ MMP02 fait 48 396 pb et présente un contenu en % G+C de 29,6%. En comparant ce pourcentage à celui de phages déjà séquencés, on constate que ce pourcentage est légèrement supérieur à celui du génome de la

souche de *C. difficile* CD630 (29,06%) (SEBAIHIA *et al.*, 2006) et des phages  $\phi$ C2 et  $\phi$ CD119 établi pour les deux à 28,72% (GOVIND *et al.*, 2006; GOH *et al.*, 2007). Les analyses bioinformatiques ont permis l'identification et l'annotation de 75 cadres de lecture (*orfs*) ayant 32 acides aminés ou plus (voir tableau 5). La localisation de ces *orfs* a été déterminée par la présence de codons d'initiation standard (ATG) et alternatifs (TTG, GTG), et par la présence d'un site de fixation au ribosome (RBS) positionné de façon acceptable (séquence 5'-agaaggagg-3' située à environ 6-8 nucléotides en amont des codons d'initiation). La carte génomique du phage  $\phi$ MMP02 est présentée à la figure 22 et est divisée en plusieurs modules qui regroupent les gènes encodant des protéines de fonction complémentaire (ex : structure de la capsid et de la queue, encapsidation de l'ADN, lyse cellulaire, contrôle de la lysogénie et répllication et la modification de l'ADN viral).

L'organisation des différents modules du phage  $\phi$ MMP02 est très similaire à celle observée chez les autres phages de *C. difficile* connu jusqu'à présent (GOH *et al.*, 2005; GOVIND *et al.*, 2006; MAYER *et al.*, 2008). Les analyses BLASTp montrent que sur le total des 75 ORFs, 24 (32%) ne présentent aucune similarité avec des protéines retrouvées dans les bases de données NCBI, EBI et ACLAME et seulement 5 ORFs (6,7%) présentent une certaine similarité avec des phages associés au genre *Clostridium*. De ces ORFs, l'ORF34 présente 91,1% d'identité (246/270 en acides aminés identiques) avec l'endolysine du phage  $\phi$ CD27 de *C. difficile* (MAYER *et al.*, 2008). L'ORF74 partage 26,1% d'identité (40/153 en acides aminés identiques) avec un facteur sigma du phage  $\phi$ SM101 de *C. perfringens* (MYERS *et al.*, 2006) et l'ORF75 présente 50,2% d'identité (112/223 en acides aminés identiques) avec un



**Figure 22. Carte génomique et annotation du phage  $\phi$ MMP02.** Les flèches représentent les différents cadres de lecture prédits (*orfs*) et leur orientation indique le sens de la transcription. Lorsque disponible, la fonction putative est indiquée en-dessous des *orfs*. Les différents modules fonctionnels indiqués au bas de la carte sont mis en évidence par des couleurs spécifiques. L'échelle au haut de la carte est en kilo paire de base (kb).

**Tableau 8.** Cadres de lecture déduits de la séquence génomique du phage  $\phi$ MMP02 et les fonctions prédites associées

Cadre de lecture	Direction	Début	Fin	Longueur du gène en nucléotides	Taille en acides aminés	Masse moléculaire (Kda)	Fonctions prédites	BLAST hit	E-value	Alignement (% ID <sup>1</sup> )	Alignement (% ID <sup>2</sup> )
1	D	35332	36033	702	234	27 25	phage-related terminase small subunit-like protein	YP_001308765 1 [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]	2E-57	129/238 (54,2%)	129/234 (55,1%)
2	D	33930	35339	1410	470	53 32	phage terminase	YP_002318651 1 [Acinetobacter baumannii AB0057]	2E-31	120/435 (27,6%)	120/470 (25,5%)
3	D	32437	33939	1503	501	57 24	phage portal protein, SPP1 Gp6-like protein	YP_001395258 1 [Clostridium kluyveri DSM 555]	0 0	345/497 (69,4%)	345/501 (68,9%)
4	D	31437	32444	1008	336	38 67	phage head morphogenesis protein, SPP1 gp7 family	ZP_03072749 1 [Lactobacillus reuten 100-23]	5E-06	45/153 (29,4%)	45/336 (13,4%)
5	D	30083	31417	1335	445	49 66	Ribosomal protein L7Ae conserved site	IPR004037			
6	D	29684	30067	384	128	14 11	No significant hits				
7	D	28628	29665	1038	346	39 02	No significant hits				
8	D	28250	28588	339	113	12 87	No significant hits				
9	D	27876	28253	378	126	14 38	No significant hits				
10	D	27464	27874	411	137	14 89	tail component protein	YP_579211 1 [Streptomyces phage mu1/6]	1E-11	33/77 (42,9%)	33/137 (24,1%)
11	D	26642	27463	822	274	31 72	No significant hits				
12	D	26426	26629	204	68	7 73	No significant hits				
13	D	25003	26424	1422	474	52 96	sheath tail protein	YP_001920285 1 [Clostridium botulinum E3 str Alaska E43]	3E-20	127/480 (26,5%)	127/436 (29,1%)
14	D	24574	24987	414	138	15 56	XkdM-related protein	YP_001395245 1 [Clostridium kluyveri DSM 555]	3E-22	57/133 (42,9%)	57/138 (41,3%)
15	D	23999	24490	492	164	18 95	Phage XkdN-like protein	YP_001308779 1 [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]	3E-27	66/134 (49,3%)	66/143 (46,2%)
16	D	23841	23993	153	51	5 89	No significant hits				
17	D	19548	23822	4275	1425	149 91	phage tail tape measure protein, TP901 family, core region domain protein	ZP_05346830 1 [Bryantella formatexigens DSM 14469]	4E-93	242/735 (32,9%)	242/1425 (17,0%)
18	D	18722	19465	744	248	28 70	Signal-peptide (SignalP), transmembrane regions (tmhmm)				
19	D	17982	18653	672	224	25 84	peptidoglycan-binding LysM	ZP_04852125 1 [Paenibacillus sp oral taxon 786 str D14]	8E-41	93/219 (42,5%)	93/213 (43,7%)
20	D	17023	17985	963	321	36 71	XkdQ-related protein	YP_001395228 1 [Clostridium kluyveri DSM 555]	9E-84	166/324 (51,2%)	166/321 (51,7%)
21	D	16665	17030	366	122	13 45	No significant hits				
22	D	16232	16690	459	153	17 66	phage-like element pbsx protein XkdS	YP_001320371 1 [Alkaliphilus metalliredigens QYMF]	9E-32	64/143 (44,8%)	64/153 (41,8%)
23	D	15087	16223	1137	379	41 47	XkdT related phage protein	YP_001395225 1 [Clostridium kluyveri DSM 555]	1E-104	193/357 (54,1%)	193/376 (51,3%)
24	D	14461	15090	630	210	23 89	XkdU related phage protein	YP_001395224 1 [Clostridium kluyveri DSM 555]	1E-56	104/206 (50,5%)	104/210 (49,5%)
25	D	13426	14448	1023	341	37 60	phage tail fiber protein	YP_001254244 1 [Clostridium botulinum A str ATCC 3502]	8E-48	104/209 (49 8%)	104/341 (30,5%)

Cadre de lecture	Direction	Début	Fin	Longueur du gene en nucléotides	Taille en acides aminés	Masse moléculaire (Kda)	Fonctions prédites	BLAST hit	E-value	Alignement (% ID <sup>1</sup> )	Alignement (% ID <sup>2</sup> )
26	D	11729	13411	1683	561	60 51	hypothetical protein CdrfA_19608	ZP_05352971 1 [Clostridium difficile ATCC 43255]	0 0	456/570 (80,0%)	456/561 (81,3%)
27	D	11419	11712	294	98	11 20	No significant hits				
28	D	11237	11419	183	61	6 84	No significant hits				
29	D	10266	11204	939	313	35 4	carbohydrate binding domain protein	ZP_02621726 1 [Clostridium botulinum C str Eklund]	7E-05	47/141 (33,3%)	47/313 (15,0%)
30	D	9677	9976	300	100	11 5	phage protein	YP_001254245 1 [Clostridium botulinum A str ATCC 3502]	3E-06	33/78 (42,3%)	33/100 (33,3%)
31	D	9538	9675	138	46	5 32	phage uncharacterized protein, XkdX family	YP_003010319 1 [Paenibacillus sp JDR-2]	6E-04	19/43 (44,2%)	19/46 (41,3%)
32	D	9276	9506	231	77	8 75	Di-/tripeptide transporter	ZP_02616064 1 [Clostridium botulinum Bf]	3E-11	30/64 (46,9%)	30/77 (39,0%)
33	D	9000	9257	258	86	9 42	phage holin	ZP_05331400 1 [Clostridium difficile QCD-63q42]	6E-40	85/85 (100%)	85/85 (100%)
34	D	8188	9000	813	271	30 01	endolysin	YP_002290910 1 [Clostridium phage phiCD27]	4E-142	246/270 (91,1%)	246/270 (91,1%)
35	D	7447	7938	492	164	19 55	No significant hits				
36	D	6879	7445	567	189	22 02	transmembrane regions (tmhmm)				
37	R	6280	6468	189	63	7 31	putative phage-related DNA-directed RNA polymerase 7 kDa polypeptide	YP_001087734 1 [Clostridium difficile 630]	8E-04	21/53 (39,6%)	21/63 (33,3%)
38	D	5877	6020	144	48	5 40	Signal-peptide (SignalP), transmembrane regions (tmhmm)				
39	D	4980	5369	390	130	15 85	CopY family transcriptional regulator	ZP_06117175 1 [Clostridium hathewayi DSM 13479]	5E-06	34/119 (28,6%)	34/123 (27,6%)
40	D	4606	4887	282	94	10 92	transcriptional regulator	ZP_04525540 1 [Clostridium butyncum E4 str BoNT E BL5262]	2E-11	40/87 (46,0%)	40/94 (42,6%)
41	R	3245	4291	1047	349	41 27	phage integrase family protein	ZP_05349367 1 [Clostridium difficile ATCC 43255]	0 0	306/348 (87,9%)	306/349 (87,7%)
42	R	2953	3168	216	72	8 67	conserved domain protein	ZP_04822949 1 [Clostridium botulinum E1 str 'BoNT E Beluga']	0 056	23/48 (47,9%)	23/71 (32,4%)
43	D	2536	2667	132	44	5 20	No significant hits				
44	R	2118	2519	402	134	15 33	Transcriptional regulator, MerR	ZP_04320904 1 [Bacillus cereus ATCC 10876]	2E-15	43/75 (57 3%)	43/129 (33,3%)
45	D	1591	1686	96	32	3 68	Signal-peptide (SignalP), transmembrane regions (tmhmm)				
46	R	1228	1446	219	73	8 38	transcriptional regulator, Cro/CI family	ZP_00784773 1 [Streptococcus agalactiae COH1]	1E-09	32/69 (46,4%)	32/73 (43 8%)
47	D	921	1115	195	65	7 48	Cro/CI family transcriptional regulator	NP_815804 1 [Enterococcus faecalis V583]	5E-04	24/62 (38,7%)	24/65 (36,9%)
48	D	85	879	795	265	30 42	prophage antirepressor	YP_002290925 1 [Clostridium difficile ATCC 255]	8E-66	122/125 (97,6%)	122/262 (46,6%)
49	R	47878	48027	150	50	5 06	No significant hits				



Cadre de lecture	Direction	Début	Fin	Longueur du gène en nucléotides	Taille en acides aminés	Masse moléculaire (Kda)	Fonctions prédites	BLAST hit	E-value	Alignement (% ID <sup>1</sup> )	Alignement (% ID <sup>2</sup> )
50	D	47619	47816	198	66	7.34	repressor protein cl	NP_958701.1 [Bordetella phage BPP-1]	3E-05	25/60 (41,7%)	25/66 (37,9%)
51	D	47374	47580	207	69	7.87	phage protein	ZP_03930768.1 [Anaerococcus tetradius ATCC 35098]	2E-07	25/54 (46,3%)	25/64 (39,1%)
52	D	47199	47303	105	35	3.99	No significant hits				
53	D	46644	46961	318	106	12.57	No significant hits				
54	D	46052	46561	510	170	19.24	phage protein	YP_001087390.1 [Clostridium difficile 630]	3E-84	162/169 (95,9%)	162/170 (95,3%)
55	D	45434	46042	609	203	22.87	single-stranded DNA-binding protein, ERF family	ZP_05349382.1 [Clostridium difficile ATCC 43255]	3E-109	196/202 (97,0%)	196/202 (97,0%)
56	D	44543	45424	882	294	34.09	Phage replication protein	YP_001425587.1 [Bacillus virus 1]	5E-26	89/288 (30,9%)	89/288 (30,9%)
57	D	44309	44482	174	58	6.74	putative phage resolvase/integrase (partial)	ZP_05349384.1 [Clostridium difficile ATCC 43255]	3E-24	57/57 (100%)	57/57 (100%)
58	D	43877	44293	417	139	15.73	Phage related SSB-like protein	NP_348542.1 [Clostridium acetobutylicum ATCC 824]	8E-17	52/143 (36,4%)	52/133 (39,1%)
59	D	43393	43806	414	138	16.02	No significant hits				
60	D	43155	43406	252	84	10.00	No significant hits				
61	D	42784	43137	354	118	13.02	No significant hits				
62	D	42675	42809	135	45	5.04	No significant hits				
63	D	42562	42678	117	39	4.36	Signal-peptide (SignalP)				
64	D	42383	42559	177	59	6.83	No significant hits				
65	D	41200	42273	1074	358	40.59	DNA-cytosine methyltransferase	ZP_04805758.1 [Clostridium cellulovorans 743B]	2E-103	210/443 (47,4%)	210/358 (58,7%)
66	D	40911	41120	210	70	8.20	No significant hits				
67	D	39895	40899	1005	335	39.00	phage protein	ZP_05332136.1 [Clostridium difficile QCD-63q42]	4E-154	276/334 (82,6%)	276/331 (83,4%)
68	D	39719	39886	168	56	6.51	No significant hits				
69	D	39362	39634	273	91	10.79	gp23 major head protein	NP_944113.1 [Aeromonas phage Aeh1]	1.6	21/76 (27,6%)	21/91 (23,1%)
70	D	39109	39339	231	77	8.95	asch domain protein	ZP_04648509.1 [Enterococcus faecalis TUSoD Ef11]	2E-16	46/76 (60,5%)	46/77 (59,7%)
71	D	38557	38955	399	133	15.64	phage protein	YP_001715892.1 [Clostridium botulinum A3 str Loch Maree]	4E-07	38/124 (30,6%)	38/133 (28,6%)
72	D	38124	38567	444	148	16.92	endodeoxyribonuclease RusA family protein	YP_002862582.1 [Clostridium botulinum Ba4 str 657]	1E-24	62/142 (43,7%)	62/133 (46,6%)
73	D	37925	38134	210	70	8.23	No significant hits				
74	D	37314	37820	507	169	19.30	probable sigma factor	YP_699949.1 [Clostridium phage phiSM101]	4E-05	40/141 (28,4%)	40/153 (26,1%)
75	D	36096	36773	678	226	26.83	antirepressor	YP_002265431.1 [Clostridium phage 39-O]	6E-54	112/226 (49,6%)	112/223 (50,2%)

<sup>1</sup>Alignement sur le hit le plus significatif (en acides aminés)

<sup>2</sup>Alignement sur la protéine totale du hit le plus significatif (en acides aminés)

anti-répresseur du phage  $\phi$ 39-O également chez *C. perfringens* (non publié, numéro d'accès NC\_011318.1). De plus, les ORFs 1 et 3, retrouvés dans le module d'écapsidation et de structure de la capsid partagent beaucoup de similarité (55,1%, 129/234 et 68,9%, 345/501 respectivement) avec les protéines prédites de la petite sous-unité de la terminase et la protéine portale, identifiés chez ce qui pourrait représenter des prophages des bactéries *C. beijerinckii* et *C. kluyveri* respectivement. De plus, 9 *orfs* (12%) du phage  $\phi$ MMP02 codent pour des protéines similaires chez *C. difficile*. Par contre, une fonction putative a pu être attribuée à 5 de ces ORFs seulement (33, 37, 41, 48 et 57) et les fonctions correspondent à une holine, ARN polymérase, intégrase, anti-répresseur et résolvasse/intégrase respectivement. Les pourcentages d'identités en acides aminés varient entre 33,3% et 100% (tableau 5)

Également, plusieurs ORFs du génome du phage  $\phi$ MMP02, codent pour des protéines ayant une certaine similarité avec des protéines provenant d'autres espèces que *C. difficile* (voir tableau 5). Quatre autres ORFs entrant dans la structure de la queue (13, 20, 23 et 25) possèdent une similarité avec les protéines prédites *Sheath tail* (29,1%, 127/436), *XkdQ* (51,7%, 166/321), *XkdT* (51,3%, 193/376) et *Tail Fiber* (30,5%, 104/341) respectivement, retrouvés chez *C. botulinum* et *C. kluyveri*. D'une part, plusieurs protéines prédites du phage  $\phi$ MMP02 ont été identifiées (pourcentage d'identité entre 13,4% et 43,8%) chez d'autres genres bactériens que *Clostridium* (voir tableau 5). D'autre part, les ORFs 10, 50, 56 et 69 codent pour des protéines similaires à des protéines de phages associés à d'autres genres bactériens tels que *Streptomyces* (24,1%, 33/137), *Bordetella* (37,9%, 25/66), *Bacillus* (30,9%, 89/288) et *Aeromonas* (23,1%, 21/91). Ces derniers ORFs sont situés dans les modules de structure de la

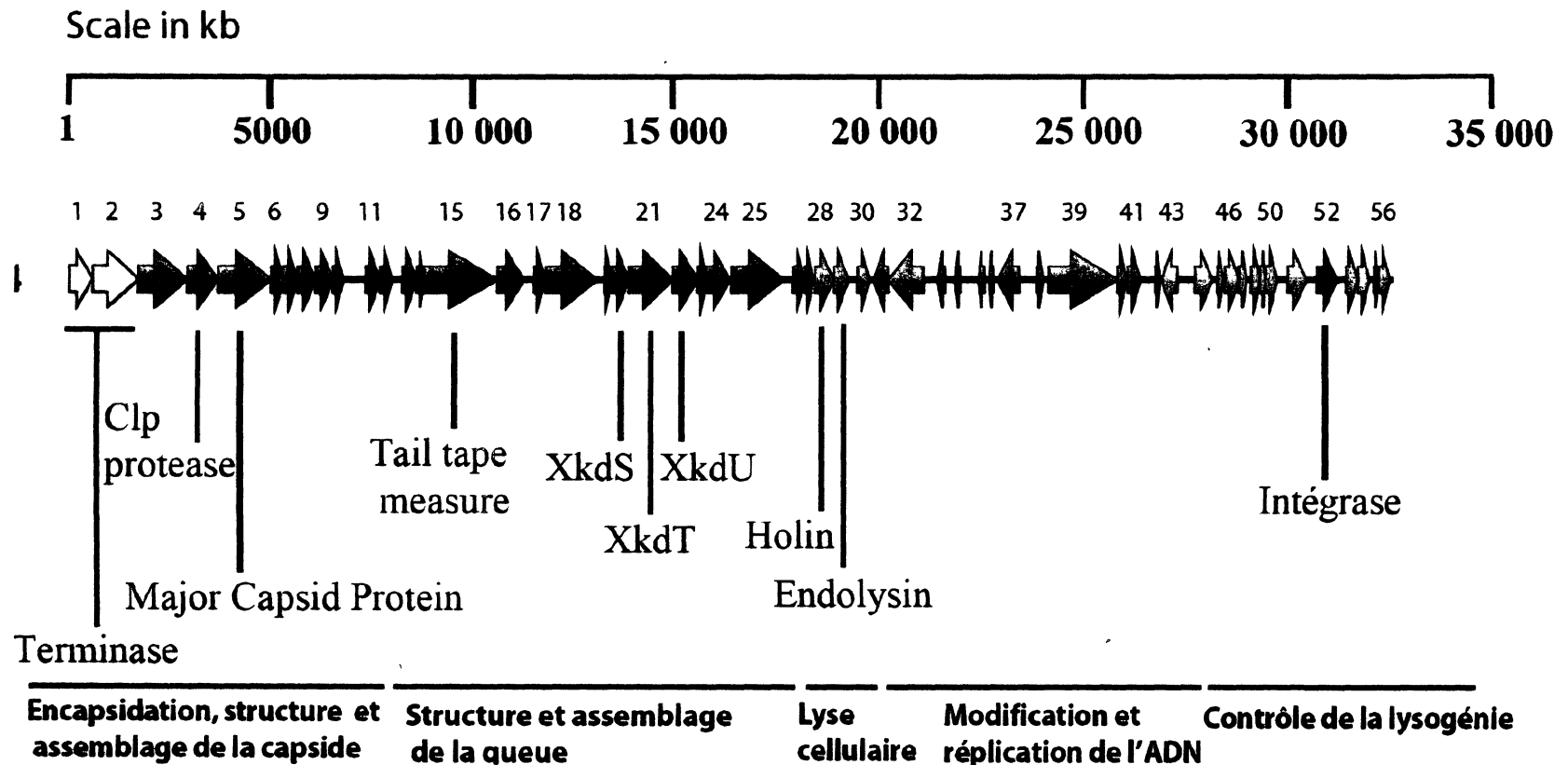
queue, du contrôle de la lysogénie et de la réplication et modification de l'ADN respectivement.

#### 3.4.2.2. Génome du phage $\phi$ MMP04

Le même type d'analyses que pour le phage  $\phi$ MMP02 a été effectué pour caractériser le génome du phage  $\phi$ MMP04. Le génome de ce phage fait 31 662 pb et son contenu en % G+C est de 30,0%. Le phage  $\phi$ MMP04 est donc celui dont le génome a la plus petite taille et le plus haut % G+C par rapport aux phages rapportés dans la littérature, incluant  $\phi$ MMP02 (cette étude-ci),  $\phi$ C2 (GOH *et al.*, 2005),  $\phi$ CD630 (SEBAIHIA *et al.*, 2006),  $\phi$ CD119 (GOVIND *et al.*, 2006) et  $\phi$ CD27 (MAYER *et al.*, 2008).

Les analyses bioinformatiques ont permis d'identifier 56 *orfs* codant pour des protéines de 35 acides aminés et plus (voir tableau 6). Les différents gènes qui composent le génome sont également regroupés sous forme de modules fonctionnels (voir figure 23).

Cependant, l'organisation génomique du phage  $\phi$ MMP04 est sensiblement différente du phage  $\phi$ MMP02 et des autres phages de *C. difficile* puisque le module du contrôle de la lysogénie n'est pas situé immédiatement après celui de la lyse cellulaire alors que le module responsable de la réplication et de la modification de l'ADN se retrouve entre les modules de lyse et du contrôle de la lysogénie.



**Figure 23. Carte génomique et annotation du génome du phage  $\phi$ MMP04.** Les flèches représentent les différents cadres de lecture prédits (*orfs*) et leur orientation indique le sens de la transcription. Lorsque disponible, la fonction putative est indiquée en-dessous des *orfs*. Les différents modules fonctionnels indiqués au bas de la carte sont mis en évidence par des couleurs spécifiques. L'échelle au haut de la carte est en kilo paire de base (kb).

**Tableau 9** Cadres de lecture déduits de la séquence génomique du phage φMMP04 et les fonctions prédites associées

Cadre de lecture	Direction	Debut	Fin	Longueur du gène en nucléotides	Taille en acides aminés	Masse moléculaire (Kda)	Fonctions prédites	BLAST hit	E-values	Alignement (%ID <sup>1</sup> )	Alignement (%ID <sup>2</sup> )
1	D	25130	25699	570	190	22 11	Terminase	ZP_04807017 1 [Clostridium cellulovorans 743B]	1,00E-70	130/189 (68,8%)	130/190 (68,4%)
2	D	25708	26778	1071	357	41 74	Terminase	ZP_04807017 1 [Clostridium cellulovorans 743B]	4E-171	286/359 (79,7%)	286/357 (80,1%)
3	D	26794	27948	1155	385	43 88	HK97 family phage portal protein	YP_001646231 1 [Bacillus weihenstephanensis KBAB4]	5E-143	233/384 (60,7%)	233/385 (60,5%)
4	D	27954	28691	738	246	27 94	Clp protease	YP_002339940 1 [Bacillus cereus AH187]	6,00E-66	120/231 (51,9%)	120/230 (52,2%)
5	D	28684	29952	1269	423	46 85	phage major capsid protein, HK97 family	YP_001884294 1 [Clostridium botulinum B str Eklund 17B]	7,00E-21	100/385 (26,0%)	100/408 (24,5%)
6	D	29962	30249	288	96	11 10	DNA packaging protein	protein vir 102083	5,00E-06	37%	
7	D	30251	30589	339	113	13 4	bacteriophage head-tail adaptor	YP_001219864 1 [Clostridium kluyven DSM 555]	4,00E-05	36/104 (34,6%)	36/113 (31,9%)
8	D	30582	30995	414	138	15 81	No significant hits				
9	D	31007	31423	417	139	16 02	No significant hits				
10	D	31441	31662	222	73	8 53	phage-like element pbsx protein XkdK	YP_001320233 1 [Alkaliphilus metalliredigens QYMF]	1,00E-07	34/77 (44,2%)	34/73 (46,6%)
11	D	517	846	330	109	12 84	phage-like element pbsx protein XkdK	YP_001310480 1 [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052]	2,00E-25	57/111 (51,4%)	57/109 (52,3%)
12	D	859	1137	279	93	10 33	Phage-like element PBSX protein xkdM	ZP_00144879 1 [Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii ATCC 49256]	8,00E-14	43/80 (53,8%)	43/93 (46,2%)
13	D	1373	1738	366	122	13 76	phage XkdN-like protein	ZP_06260929 1 [Lactobacillus gassen 224-1]	0 054	19/60 (31,7%)	19/122 (15,6%)
14	D	1756	1929	174	58	6 53	No significant hits				
15	D	1922	3691	1770	590	63 24	Phage-related minor tail protein-like protein	ZP_02170316 1 [Bacillus selenitireducens MLS10]	2,00E-07	42/133 (31,6%)	42/590 (7,1%)
16	D	3675	4310	636	212	24 31	XkdP protein	YP_529571 1 [Clostridium phage phi CD119]	2,00E-39	82/129 (63,6%)	82/128 (64,1%)
17	D	4550	4828	279	93	10 24	XkdQ protein	YP_529574 1 [Clostridium phage phi CD119]	6,00E-41	83/90 (92,2%)	83/93 (89,2%)
18	D	4825	6069	1245	415	45 75	cell wall-associated hydrolase, invasion-associated protein	YP_003132957 1 [Saccharomonospora viridis DSM 43017]	3,00E-26	65/133 (48,9%)	65/332 (19,6%)
19	D	6233	6409	177	59	6 80	No significant hits				
20	D	6409	6837	429	143	16 42	XkdS protein	YP_529577 1 [Clostridium phage phi CD119]	6,00E-60	111/121 (91,7%)	111/122 (91,0%)
21	D	6830	7882	1053	351	39 41	XkdT protein	YP_529578 1 [Clostridium phage phi CD119]	0 0	315/350 (90,0%)	315/350 (90,0%)
22	D	7882	8499	618	206	23 75	XkdU related phage protein	YP_001395224 1 [Clostridium kluyven DSM 555]	2,00E-22	63/198 (31,8%)	63/206 (30,6%)
23	D	8500	8721	222	74	7 80	phage tail fiber protein	YP_001254244 1 [Clostridium botulinum A str ATCC 3502]	1,00E-15	39/164 (23,8%)	39/74 (52,7%)

Cadre de lecture	Direction	Début	Fin	Longueur du gène en nucléotides	Taille en acides aminés	Masse moléculaire (Kda)	Fonctions prédites	BLAST hit	E-values	Alignement (%ID <sup>1</sup> )	Alignement (%ID <sup>2</sup> )
24	D	8667	9281	615	205	22 03	tail fiber protein H	YP_002804790 1 [Clostridium botulinum A2 str Kyoto]	1,00E-25	71/173 (41,0%)	71/205 (34,6%)
25	D	9298	10563	1266	422	47 47	No significant hits				
26	D	10783	11076	294	98	10 99	No significant hits				
27	D	11076	11258	183	61	6 90	No significant hits				
28	D	11320	11751	432	144	16 14	toxin secretion/phage lysis holin	YP_003308078 1 [Sebaldella termitidis ATCC 33386]	4,00E-05	37/132 (28,0%)	37/135 (27,4%)
29	D	11751	12134	384	128	14 31	endolysin	YP_002290910 1 [Clostridium phage phiCD27]	2,00E-51	98/119 (82,4%)	98/128 (76,6%)
30	D	12341	12598	258	86	9 53	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (cell wall hydrolase) (partial)	ZP_05331981 1 [Clostridium difficile QCD-63q42]	3,00E-40	79/83 (95,2%)	79/86 (91,9%)
31	R	12723	13082	360	120	13 82	No significant hits				
32	R	13084	13902	819	273	31 24	ParA-like	gbj ABA12835 1 [Lactobacillus paracasei subsp paracasei]	4,00E-16	51/154 (33,1%)	51/233 (21,9%)
33	R	14253	14435	183	61	6 95	No significant hits				
34	R	14675	14803	129	43	5 04	No significant hits				
35	R	15236	15388	153	51	5 89	No significant hits				
36	R	15509	15613	105	35	3 97	No significant hits				
37	R	15696	16229	534	178	20 48	DNA polymerase III, alpha subunit	YP_002940603 1 [Kosmotoga oleana TBF 19 5 1]	1,00E-21	52/107 (48,6%)	52/178 (29,2%)
38	D	16662	16793	132	44	5 33	No significant hits				
39	D	16926	18593	1668	556	63 36	putative deoxyribonuclease	ZP_05331934 1 [Clostridium difficile QCD-63q42]	0 0	490/541 (90,6%)	490/556 (88,1%)
40	D	18580	18813	234	78	9 26	No significant hits				
41	D	18834	19172	339	113	13 11	No significant hits				
42	D	19513	19620	108	36	4 38	No significant hits				
43	R	19650	20024	375	125	14 34	transcriptional regulator, xre family protein	ZP_05331920 1 [Clostridium difficile QCD-63q42]	4,00E-38	77/117 (65,8%)	77/125 (61,6%)
44	D	20446	20871	426	142	16 36	No significant hits				
45	D	20982	21131	150	50	5 93	No significant hits				
46	D	21145	21498	354	118	14 00	No significant hits				
47	D	21510	21683	174	58	6 96	No significant hits				
48	D	21777	22034	258	86	10 47	No significant hits				
49	D	22010	22162	153	51	5 81	No significant hits				
50	D	22152	22412	261	87	10 21	No significant hits				
51	D	22656	23123	468	156	18 42	No significant hits				
52	D	23368	23871	504	168	19 43	integrase family protein	ZP_04807023 1 [Clostridium cellulovorans 743B]	2,00E-67	124/167 (74,3%)	124/168 (73,8%)
53	D	24069	24359	291	97	11 4	No significant hits				
54	D	24359	24652	294	98	11 09	HNH endonuclease	ZP_04240697 1 [Bacillus cereus Rock1-15]	5,00E+19	44/96 (45,8%)	44/98 (44,9%)
55	D	24747	24860	114	38	4 43	No significant hits				
56	D	24865	25143	279	93	10 94	No significant hits				

<sup>1</sup>Alignement sur le hit le plus significatif (en acides aminés)

<sup>2</sup>Alignement sur la protéine totale du hit le plus significatif (en acides aminés)

Le phage  $\phi$ MMP04 est composé de 56 ORFs pour lesquels 27 ORFs (48,2%) ne présentent aucune similarité avec des protéines dans les bases de données publiques mentionnées précédemment. De plus, seulement 5 ORFs (8,9 %) codent pour des protéines apparentées à des phages retrouvés chez *C. difficile*. En effet, les ORFs 16, 17, 20 et 21 du phage  $\phi$ MMP04 codent respectivement pour des protéines de structures de la queue soit XkdP, XkdQ, XkdS et XkdT identifiés chez le phage  $\phi$ CD119 (GOVIND *et al.*, 2006). Ces ORFs présentent des niveaux d'identité de 64,1% (82/128), 89,2% (83/93), 91% (111/122) et 90% (315/350) respectivement. De plus, l'ORF29 est identique à 76,6% (98/128) avec l'endolysine du phage  $\phi$ CD27 (MAYER *et al.*, 2008). Seulement trois ORFs (30, 39 et 43) auraient des fonctions protéiques correspondant à une amidase (91,9%, 79/86), une déoxyribonucléase (88,1%, 490/556) et un régulateur transcriptionnel (61,6%, 77/125) chez la souche de *C. difficile* QCD-63q42 (numéro d'accèsion NZ\_ABHD02000027.1).

Plusieurs *orfs* ont également prédit des protéines identifiées chez d'autres espèces de Clostridie. Ces ORFs sont principalement répartis dans les modules de structure de la capsid (protéine *Terminases*, *Phage Major Capsid*, *Head-Tail Adaptor*) et de la queue (*XkdK*, *XkdU*, *Tail Fiber* et *Tail Fiber protein H*). Les pourcentages d'identités se situent respectivement entre 24,5% et 80,1% et entre 30,6% et 52,7%. Le génome du phage  $\phi$ MMP04 contenait également des ORFs dont l'identification en protéines a présenté des similarités protéiques à d'autres genres bactériens dont le pourcentage d'identité se situe entre 7,1% et 60,3% (voir tableau 6). À noter que l'*orf* 22 semble coder pour une protéine *ParA-like* de la bactérie *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* ([gb|ABA12835.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl/AB12835.1)|(DESMOND *et al.*, 2005)), protéine qui aurait

possiblement un rôle à jouer dans la ségrégation des plasmides et des chromosomes bactériens démontrés chez *E. coli* et *B. subtilis* respectivement (DAVEY et FUNNELL, 1994; MARSTON et ERRINGTON, 1999).

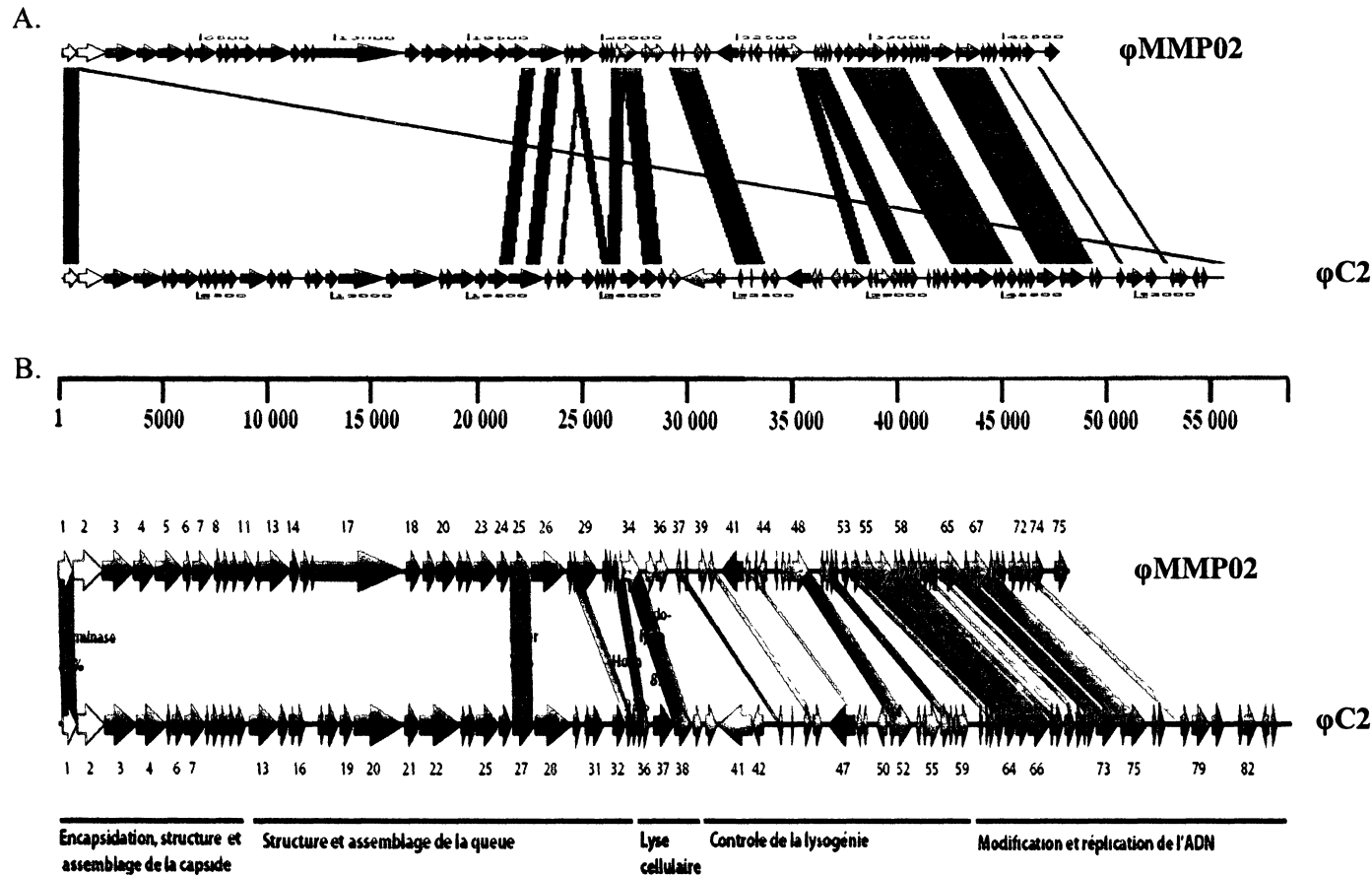
### 3.4.3. Comparaisons génomiques

#### 3.4.3.1. Alignements avec le phage $\phi$ MMP02

Afin de mieux visualiser les similarités entre le génome entier du phage  $\phi$ MMP02 et les six autres génomes de phage de *C. difficile* déjà séquencés ( $\phi$ C2,  $\phi$ CD119,  $\phi$ CD27,  $\phi$ CD630-1,2 et  $\phi$ CD38-2), des alignements ont été effectués sur les séquences nucléotidiques, dans un premier temps, en utilisant les applications BLASTn de WebACT et l'outil de visualisation ACT (*Artemis Comparison Tool*). La figure 24A présente le meilleur alignement obtenu avec le phage  $\phi$ C2. Comme on peut le constater, la majorité des *orfs* du module de réplication et de modification de l'ADN, quelques *orfs* du module de contrôle de la lysogénie, de la structure de la queue et du module d'encapsidation du phage  $\phi$ MMP02 peuvent être alignés de façon significative avec le génome du phage  $\phi$ C2 (alignement en bleu).

Ensuite, en utilisant l'application BLASTp, l'alignement des protéines entre les deux génomes nous a permis de mieux visualiser l'importance de la similarité entre ces deux phages (figure 24B). Premièrement, le module responsable de la modification et de la réplication de l'ADN est le plus conservé entre les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ C2 puisque la majorité des ORFs présentent un pourcentage d'identité en acides aminés



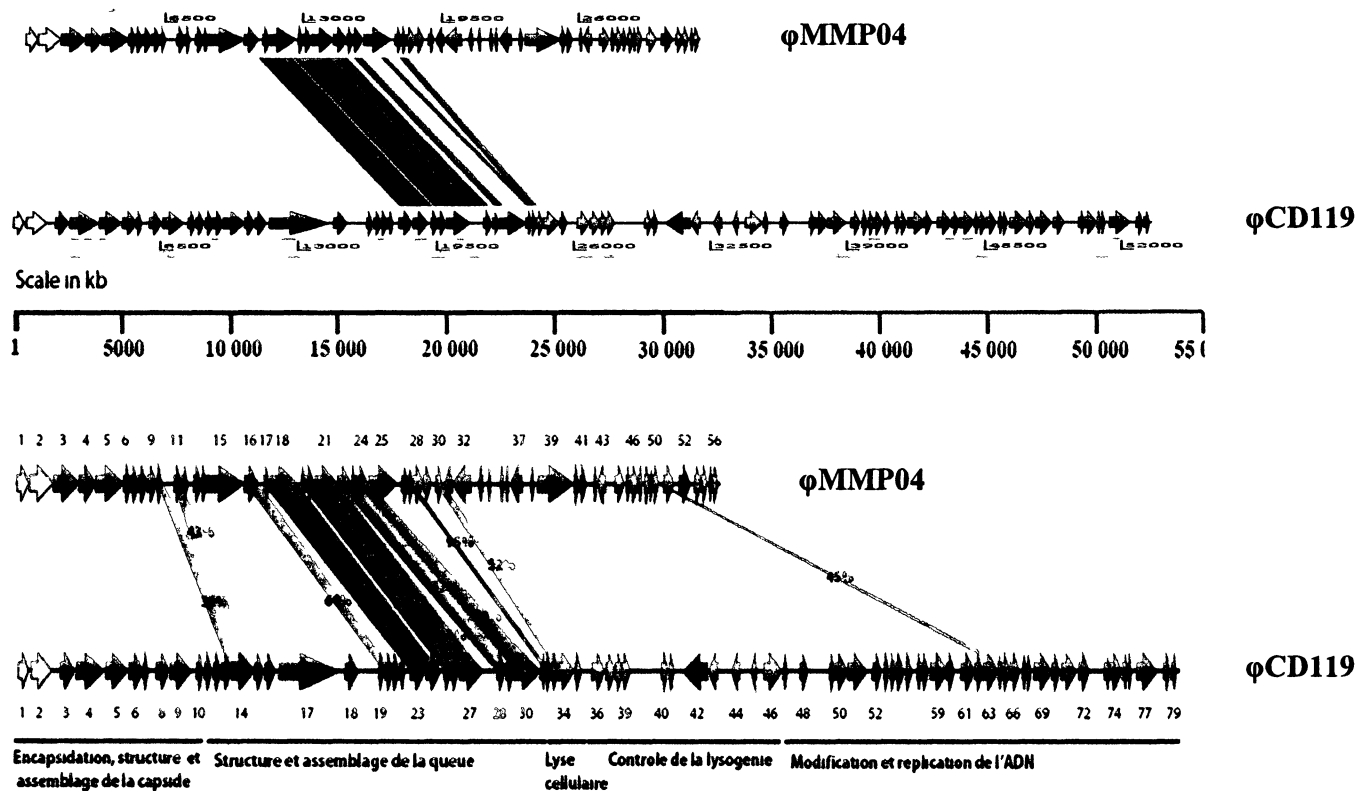


**Figure 24. Comparaison des phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ C2.** A. Alignement entre les séquences nucléotidiques avec le programme *Artemis Comparison Tool*. Les zones représentées en bleu montrent un alignement significatif avec un score égal ou supérieur à 100. B. Alignement des séquences protéiques. Les zones en gris foncé représentent un alignement ayant un pourcentage d'identité égal ou supérieur à 75% tandis que les zones en gris pâle représentent les alignements ayant un pourcentage d'identité compris entre 30 et 74%.

égal ou supérieur à 75%. Par contre, la plupart des cadres de lecture du module de lysogénie partage entre 30 et 74% d'identités. Finalement, les modules de structure de la queue et de la capsid partagent très peu de similarité.

#### 3.4.3.2. Alignement avec le phage $\phi$ MMP04

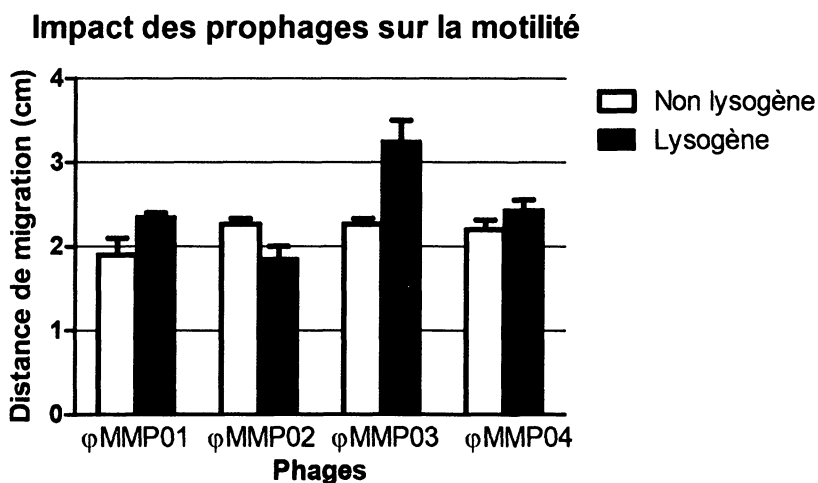
Le même genre d'analyse que pour le phage  $\phi$ MMP02 a été effectué avec le phage  $\phi$ MMP04. Comme on peut le constater sur la figure 25A, le phage ayant le plus de similarité avec le phage  $\phi$ MMP04 est le phage  $\phi$ CD119. Toutefois, le peu de similarité existant entre ces deux phages est presque exclusivement situé dans le module de structure de la queue. Les alignements en protéines de la figure 25B, montrent que l'essentiel des protéines du module de structure de la queue dépasse largement 75% d'identités contrairement aux autres modules ou l'identité avec le génome du phage  $\phi$ CD119 est pratiquement inexistante.



### 3.5. Analyses phénotypiques des lysogènes $\phi$ MMP01-04

#### 3.5.1. Motilité

Les gènes encodés par les prophages chez *C. difficile* pourraient éventuellement altérer la régulation ou interférer avec le phénotype de motilité. C'est pourquoi nous avons tenté de vérifier la différence de migration en cm, entre la souche lysogène créée en laboratoire et la souche non lysogène ayant poussé dans un milieu à faible concentration en agar (0,05%). Comme on peut le constater à la figure 26, de façon générale, la distance de migration des bactéries se situe entre 2 et 2,5 cm. De plus, la différence de motilité entre les souches lysogènes pour les phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 et les souches non lysogènes correspondantes ne semble pas très importante. Toutefois, une différence de migration de 1 cm a été notée entre la souche lysogène pour le phage  $\phi$ MMP03 et la souche non lysogène correspondante. Cependant, une analyse statistique à l'aide d'un test de Student a démontré que cette différence n'est pas significative statistiquement.

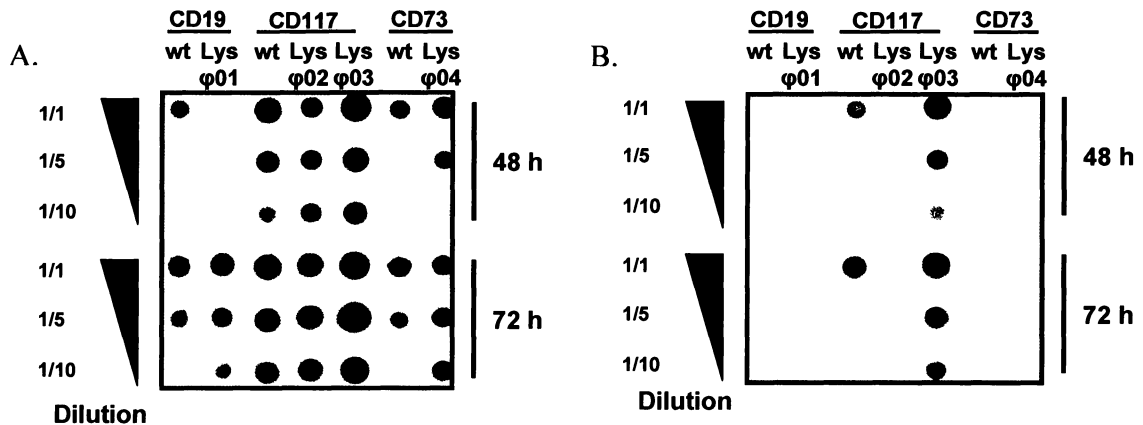


**Figure 26. Motilité des souches lysogènes et non lysogènes pour les phages  $\phi$ MMP01-04.** Les bactéries ont été inoculées à la surface d'un tube contenant du milieu BHI + 0,05% agar et la distance de migration des bactéries dans la gélose a été mesurée après 17 h de croissance à 37°C.

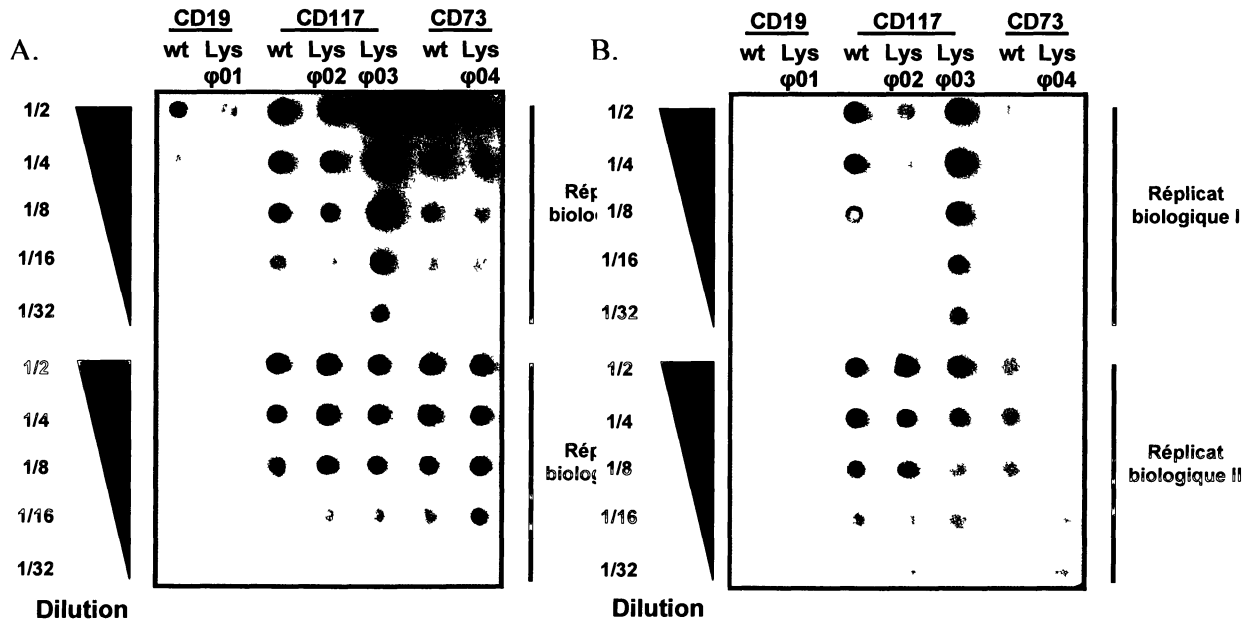
### 3.5.2. Impact des phages $\phi$ MMP sur la production des toxines A et B

Depuis quelques années, il est reconnu que les principaux facteurs de virulences de la bactérie *C. difficile* sont la production de deux exotoxines, TcdA et TcdB (VOTH et BALLARD, 2005) et que l'expression de celles-ci est modulée par des régulateurs spécifiques (MATAMOUROS et al., 2007; DUPUY et al., 2008). Or, il semble que la production des toxines A et B pourrait aussi être régulée par la présence de prophages dans le génome de la bactérie (GOH *et al.*, 2005; GOVIND *et al.*, 2009; SEKULOVIC *et al.*, Soumis). Nous avons donc comparé la production en toxines A et B entre les lysogènes et les souches non lysogènes correspondantes pour les phages  $\phi$ MMP01-04.

Dans un premier temps, la production en toxines A et B a été évaluée sur des dilutions 1/1, 1/5 et 1/10 des surnageants récupérés après 48 et 72 h d'incubation (voir figure 27A-B). Ensuite, pour avoir une idée plus précise de l'impact des phages  $\phi$ MMP sur la production de toxines, une autre membrane a été effectuée avec les mêmes surnageants mais au temps 72 h seulement et avec des dilutions différentes et avec deux réplicats biologiques différents du premier essai (voir figure 28A-B). L'expérience a donné des résultats dont il était parfois difficile de comparer de façon précise l'intensité des points et d'établir une corrélation valide. Néanmoins, pour ces trois essais (répartis sur 2 membranes), une certaine tendance semble se dessiner bien que d'autres expériences seront nécessaires pour confirmer ces résultats.



**Figure 27.** Détection par immunodot blot des toxines A et B produites par les souches lysogènes et non lysogènes après 48 et 72 h de croissance en milieu TY. A. Détection de la toxine A avec l'anticorps anti-toxine A. B. Détection de la toxine B avec l'anticorps anti-toxine B. Lys : bactérie lysogène contenant le phage indiqué. Les dilutions indiquées à gauche ont été effectuées sur les surnageants de culture déposés sur la membrane. L'expérience a été répétée 3 fois avec des résultats similaires et une seule expérience représentative est présentée ici.



**Figure 28.** Détection par immunodot blot des toxines A et B produites par les souches lysogènes et non lysogènes après 72 h de croissance en milieu TY. A. Détection de la toxine A avec l'anticorps anti-toxine A. B. Détection de la toxine B avec l'anticorps anti-toxine B. Lys : bactérie lysogène contenant le phage indiqué. Les dilutions indiquées à gauche ont été effectuées sur les surnageants de culture déposés sur la membrane. L'expérience a été répétée 3 fois avec des résultats similaires et une seule expérience représentative est présentée ici.

Par exemple, la quantité maximale de toxines semblent être atteinte à 48 h et ne semble pas augmenter de façon marquée entre 48 et 72 h. De plus, les phages  $\phi$ MMP01 et  $\phi$ MMP04 ne semblent pas affecter grandement la production en toxines A et B puisque sur la moyenne des trois essais, la différence d'intensité des points est sensiblement la même entre la souche non lysogène et la souche lysogène. Par contre, le phage  $\phi$ MMP02 semble diminuer la quantité de toxine A produites après 48 et 72 h et l'effet semble encore plus marqué pour la toxine B, lorsque l'on compare le lysogène du phage  $\phi$ MMP02 à la souche non lysogène CD117. À l'inverse, le phage  $\phi$ MMP03 semble augmenter la production en toxines A et B puisque l'intensité des points correspondant au lysogène est plus intense par rapport à la souche non lysogène CD117, la même que celui du phage  $\phi$ MMP02. Les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP03, bien qu'ils infectent la même souche, semblent avoir des effets contraires sur la production de toxines chez *C. difficile*.

## 4. DISCUSSIONS

### 4.1. Isolement des bactériophages tempérés $\phi$ MMP01-04

Les infections nosocomiales causées par *Clostridium difficile* sont devenues particulièrement problématiques suite à l'apparition d'une souche hypervirulente vers 2001 mais également par l'apparition de récurrence chez certains patients (BAINES et al., 2008) et de résistance au métronidazole de certains isolats (PELAEZ et al., 2008). Ainsi, l'utilisation de nouvelles approches thérapeutiques pour traiter les infections à *C. difficile*, tel que la phagothérapie, est à considérer avec attention. Malheureusement, dans le cadre de ma maîtrise, aucun phage virulent n'a été isolé.

#### 4.1.1. Détection des phages $\phi$ MMP01-04

Depuis plusieurs années, certaines techniques ont été mises aux points pour isoler ces phages de l'environnement tel que par filtration (GOYAL et al., 1980) ou par concentration au PEG (COLOMBET et al., 2007). D'une part, *C. difficile*, qui est une bactérie anaérobe stricte, à la capacité de former des spores en conditions de stress. Or, cet état de la bactérie la protège contre l'infection et la lyse bactérienne de phages virulents tout comme l'induction de phages tempérés. Ainsi, il est logique de penser que les chances de retrouver dans l'environnement des phages (tempérés ou virulents) infectant *C. difficile* existent mais sont relativement minces. D'ailleurs, à ce jour, aucun phage virulent contre *C. difficile* n'a été isolé malgré de nombreuses tentatives alors que plusieurs prophages ont été isolés à partir d'isolats cliniques de patients



atteints d'ICD (GOH *et al.*, 2005; GOVIND *et al.*, 2006; SEBAIHIA *et al.*, 2006; FORTIER et MOINEAU, 2007; MAYER *et al.*, 2008; HORGAN *et al.*, 2010). Nous avons donc utilisé, en premier lieu, une technique d'enrichissements successifs plutôt que l'ultracentrifugation ou la concentration au PEG. L'amplification des phages dans nos échantillons a l'avantage d'augmenter nos chances de les détecter, même s'ils ne sont pas en très grand nombre au départ et du même coup nous procure une souche sensible pour la propagation de ceux-ci. D'ailleurs, avant d'utiliser le protocole d'enrichissement pour l'isolement et la détection des phages, ce protocole a été validé avec une souche de *C. difficile* (CD24), reconnue pour être sensible au phage  $\phi$ CD52. Ainsi, même à des titres en phages initiaux très faibles (aussi bas que  $10^1$  ufp/ml), autant dans les eaux usées que dans les selles de patients atteints d'ICD, les enrichissements successifs nous permettent de dépasser largement le seuil de détection. Le protocole d'enrichissement semble donc être adéquat pour isoler et détecter les phages de *C. difficile* s'il y a lieu.

En deuxième lieu, les eaux usées non traitées ont été choisies, comme milieu de prélèvement pour isoler les phages virulents, puisque ces eaux usées sont constituées, en outre, de bactéries entériques, tel que *C. difficile* (FLORES et OKHUYSEN, 2009; VISWANATHAN *et al.*, 2009). Étant donné que les bactériophages sont retrouvés généralement dans des environnements propices à la croissance de leurs bactéries hôtes et que plusieurs équipes de recherches ont réussi à isoler des bactériophages contre une multitude de bactéries dans les eaux usées (PUIG *et al.*, 2000; COLE *et al.*, 2003; MCLAUGHLIN *et al.*, 2006; ZEMB *et al.*, 2008), on peut penser que des phages virulents contre *C. difficile* seraient également retrouvés dans les eaux usées. De plus,

les selles de patients atteints d'ICD ont également été ciblées pour isoler les phages virulents contre *C. difficile* puisque les selles de ces patients sont une autre source importante de la bactérie hôte (BAINES *et al.*, 2008) et donc un endroit propice pour détecter ces phages.

Dans un premier temps, la technique de ribotypage par PCR, utilisée de façon courante pour typer les différents isolats de *C. difficile* à travers le monde (BRAZIER, 1998), nous a permis de classifier de façon sommaire les isolats cliniques des patients atteints d'ICD de notre collection de *Clostridium difficile*. Cette classification nous a permis de déterminer la fréquence d'occurrence des isolats cliniques en fonction des différents ribotypes. Par exemple, le ribotype 027 est reconnu comme étant le ribotype correspondant à la souche hypervirulente, responsables de nombreuses épidémies au Québec et aux États-Unis, mais également à travers le monde durant les 10 dernières années (VALIQUETTE *et al.*, 2007; FENNER *et al.*, 2008; ARVAND *et al.*, 2009). Ainsi, grâce à l'histogramme de la fréquence des isolats cliniques en fonction des ribotypes, nous avons pu identifier les ribotypes les plus dominants en nombres d'isolats cliniques et en importance cliniques. À partir de ces données, les souches de *C. difficile* utilisées pour l'isolement des phages virulents dans les affluents et les selles ont été sélectionnées. Par contre, d'autres souches représentant des ribotypes moins fréquents ont également été utilisées afin de couvrir un spectre plus large d'isolats sensibles aux phages à isoler. C'est pourquoi, sur les 15 souches de *C. difficile* utilisées pour l'isolement et la détection de phages, 50% de ces souches proviennent des deux ribotypes les plus importants (027 et 014) tandis que la moitié restante est distribuée sur six autres ribotypes moins fréquents (10, 12, 17, 23, 36 et 38).

Sur les échantillons d'eaux usées et de selles de patients atteints d'ICD, six phages ont été isolés dont quatre totalement différents (identifiés par profil de restriction) et tous dans les selles de patients. Un article publié par Goh et al (GOH *et al.*, 2005) a démontré que sur 56 isolats cliniques de *C. difficile*, 4 phages tempérés ont été isolés de ces souches (7,1%) par induction. Or, par enrichissement successif, nous avons réussi à augmenter le pourcentage de phages isolés sur des isolats cliniques à 10,2%. Cette dernière méthode nous a probablement permis de détecter les phages qui n'étaient pas en grand nombre comparativement à la méthode utilisée par Goh et al. D'ailleurs, ce dernier a également tenté, sans succès, d'isoler des phages virulents à partir d'échantillons d'eaux usées puisés dans une usine de traitement des eaux usées urbaines en Australie. Plusieurs raisons pourraient expliquer l'absence de phages isolés dans les eaux usées. En effet, le très grand débit d'affluents des réseaux d'aqueducs de la ville de Sherbrooke a probablement dilué les phages contre *C. difficile*, rendant très difficile la détection de ceux-ci, même avec un protocole d'enrichissement. D'ailleurs, l'ultrafiltration tangentielle et le prélèvement de plusieurs litres d'eaux auraient probablement augmenté nos chances de retrouver ces phages parmi les affluents. Il est également possible que des phages contre *C. difficile* se soient retrouvés dans les affluents, mais que le nombre restreint de souches potentiellement sensible, du protocole d'isolement et de détection de phages dans les affluents, soit à l'origine de l'absence de phages détectés. D'autre part, la forme sporulée est probablement la forme la plus fréquente retrouvée hors de l'organisme, rendant ainsi l'amplification en milieu naturel pour ainsi dire impossible, ce qui diminue donc la quantité de phages contre *C. difficile* dans l'environnement, tel que les eaux usées (BEST *et al.*). Une

dernière raison pouvant expliquer l'absence de phages dans les eaux usées est le milieu très hétérogène des affluents. Étant donné que les affluents recueillent une multitude de produits chimiques, biologiques et domestiques, il est probable que la stabilité des phages contre *C. difficile* dans ce milieu ne soit pas optimale et que le phénomène de dégradation des phages soit important. Donc, si la quantité de ces phages est très faible au départ, cela réduit d'autant plus leur nombre. D'ailleurs, comme on peut le voir sur la figure 11 de la validation du protocole d'enrichissement, les titres en phages  $\phi 52$  sur la souche sensible dans les eaux usées après 8 h diminuent de façon significative, ce qui donne du poids à l'hypothèse de la stabilité précaire de ces phages dans les eaux usées.

Il serait intéressant, pour la suite de ces travaux, de continuer à isoler de nouveaux phages, en utilisant un nombre plus important de souches de détection dont les ribotypes ne sont pas très courant afin d'augmenter l'isolement de nouveaux phages, différents de ceux isolés jusqu'à maintenant. De plus, il serait pertinent d'isoler des phages dont les souches hôtes de *C. difficile* auraient comme origine les animaux pour tenter de comprendre le caractère évolutif des phages chez *C. difficile*.

#### **4.2. Détermination du caractère tempéré des phages $\phi$ MMP01-04**

Étant donné l'objectif initial qui était d'isoler et d'utiliser les phages virulents contre *C. difficile* pour éventuellement en faire un outil thérapeutique, la confirmation du caractère virulent ou tempéré des phages isolés était une étape essentielle. Or, l'obtention de bactéries lysogènes pour ces phages et la détection de ces derniers dans

les chromosomes bactériens par hybridation de type Southern a confirmé qu'aucun des phages  $\phi$ MMP01-04 n'est strictement lytique. Les six phages isolés sont tous tempérés et ont tous été isolés des selles de patients atteints d'ICD. Le fait qu'aucun des phages ne soit strictement lytique est peut-être en lien avec le style de vie de la bactérie (voir ci-haut). Les phages tempérés, sous forme de prophages, ont peut-être intérêt à rester sous cette forme afin de ne pas se retrouver libres à l'extérieur du tube digestif et donc être incapables d'infecter les bactéries qui vont rapidement mourir si elles ne sont pas sous forme sporulée (insensible au phage). Cependant, suite à un stress quelconque sur la bactérie ou à un système mis en place par le phage pour assurer un certain taux de relâchement de nouveaux virions, l'induction spontanée des prophages a permis à ceux-ci d'être présents en assez grand nombre dans les selles pour y être détectés. De plus, étant donné que jusqu'à maintenant, aucun phage virulent n'a été découvert, il est possible qu'il soit plutôt rare d'observer ces phages sous forme libre à l'état naturel. Il est maintenant peu probable que les phages  $\phi$ MMP01-04 soient utilisés à des fins thérapeutiques, du moins sous leurs formes actuelles. Les phages tempérés ayant la capacité de s'intégrer dans le génome de leur souche hôte, il est fort possible que l'utilisation de ces phages tempérés provoque la lysogénie des isolats cliniques à éliminer. Ainsi, la lysogénie diminue le pouvoir bactéricide des phages utilisés, mais également augmente les chances d'acquisition de matériels génétiques favorables à la bactérie pouvant avoir un impact sur la virulence de celle-ci (WAGNER et al., 2002; BRUSSOW et al., 2004).

À long terme, malgré le caractère tempéré des phages isolés, il serait très intéressant d'utiliser un système de conjugaison efficace tel que le Clostron (HEAP *et al.*, 2007) qui nous permettrait d'inactiver des gènes spécifiques aux phages  $\phi$ MMP et ainsi, tenter de transformer ces phages tempérés en phages virulents.

#### 4.3. Origine des phages tempérés $\phi$ MMP01-04

D'une part, les hybridations de type Southern sur les ADN bactériens des souches utilisées pour isoler les phages  $\phi$ MMP nous ont permis de constater que ceux-ci ont été induits *in vivo*. Par ailleurs, lors des hybridations ADN-ADN pour déterminer l'origine des phages  $\phi$ MMP (voir section 3.3.5., figure 17), d'autres profils d'hybridation ont été observés, différents par rapport au profil d'hybridation de la sonde sur l'ADNg du phage correspondant. Il est fort probable que d'autres prophages, qui n'ont pas été nécessairement isolés et caractérisés, soient présents dans les autres souches de *C. difficile* et que ces phages présentent un certain degré de similarité. Ce résultat supporte certaines études antérieures qui suggèrent qu'il existe une grande diversité de phages tempérés chez *C. difficile* (FORTIER et MOINEAU, 2007). La recombinaison homologue entre des phages apparentés augmenterait encore plus leur diversité génomique, ce qui est appuyé par l'observation de plusieurs profils différents partageant une certaine similarité avec nos phages  $\phi$ MMP.

D'autre part, les phages tempérés  $\phi$ MMP02,  $\phi$ MMP02b et  $\phi$ MMP02d ont été considérés identiques sur le plan génomique, si on se fit aux profils de restriction et ils ont tous été détectés sur la même souche (CD117, ribotype 014). Ces phages ont donc

la capacité d'infecter au moins une souche du deuxième ribotype en importance (voir figure 10A-B). Cependant, le phage  $\phi$ MMP02 a été induit d'un lysogène sauvage ayant un ribotype peu fréquent (023) tandis que le phage  $\phi$ MMP02b provient d'une souche ayant le ribotype correspondant à la souche hypervirulente (027). Ainsi, deux phages apparemment identiques ont été détectés sur la même souche, mais ne proviennent pas de souches du même ribotype. Ainsi, on peut supposer que ces deux phages soient le même et que ce phage possède un spectre d'hôte plus large, permettant à celui-ci d'infecter et de lysogénéiser plusieurs souches de ribotypes différents. Ce phage aurait donc une facilité à se déplacer de souche en souche, possiblement dans un contexte *in vivo*. Cependant, il est aussi possible que les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP02b soient en fait deux phages différents dont les différences génomiques n'ont pas été détectées par les analyses réalisées ici. En effet, les deux phages pourraient être très similaires, mais contenir des différences génétiques mineures, comme de petites insertions et délétions ou des mutations ponctuelles qui n'altèrent pas le profil de restriction. De plus, le phage  $\phi$ MMP02d a également été détecté sur la même souche que les deux autres phages  $\phi$ MMP02 à la différence que la souche lysogène sauvage (souche d'origine) de ce dernier n'a pu être identifiée. On ne peut donc pas exclure la contamination de cet essai d'enrichissement par un des autres phages  $\phi$ MMP02 déjà isolés, tout comme on ne peut exclure que le phage  $\phi$ MMP02d ne se soit tout simplement pas induit de façon *in vivo* et qu'il se soit retrouvé dans les selles des patients par un processus inconnu.

Pour ce qui est du phage  $\phi$ MMP03, celui-ci a été détecté sur la même souche que pour les phages  $\phi$ MMP02 mais s'est induit d'une souche lysogène sauvage qui ne fait pas partie d'un ribotype fréquent (CD368, ribotype 026). Ceci nous laisse croire

que ce phage possède également un spectre d'hôte élargie et qu'un certain degré de similarité existe avec les phages  $\phi$ MMP02 en ce qui concerne la reconnaissance des souches de *C. difficile* sensibles.

Le phage  $\phi$ MMP01 a quant à lui été détecté sur une souche dont le ribotype ne contient pas beaucoup d'isolats cliniques et malheureusement, la souche sauvage n'a pu être identifiée, ce qui nous empêche de tirer toute conclusion concernant son origine.

Finalement, le phage  $\phi$ MMP04 s'est induit *in vivo* et a été détecté sur des souches dont les ribotypes sont plus ou moins fréquents et donc de moindre importance au niveau clinique.

En résumé, bien qu'ils ne soient pas virulents, les phages  $\phi$ MMP01-04 ont été caractérisés au niveau microbiologique et moléculaire et ont apporté de nouvelles données sur les phages tempérés de *C. difficile*. De plus, à notre connaissance, il s'agit possiblement de la première démonstration de l'induction de prophages de *C. difficile* *in vivo* chez des patients infectés par la bactérie. Ces inductions se sont déroulées dans un contexte d'ICD causées par des souches lysogènes pour les phages  $\phi$ MMP.

Pour la suite de ces expérimentations, une démonstration de l'induction spontanée et le transfert d'un phage  $\phi$ MMP à une nouvelle souche hôte *in vivo* dans un modèle animal serait une preuve supplémentaire appuyant l'hypothèse de l'induction *in vivo* des phages  $\phi$ MMP01-04 et leur origine chez les patients infectés par *C. difficile*.



#### 4.4. Caractérisation des phages $\phi$ MMP01-04

##### 4.4.1. Spectre d'hôte

Dans un premier temps, nous avons tenté de connaître le spectre d'hôte des phages  $\phi$ MMP01-04 sur les souches de *C. difficile* de notre collection dans le but d'évaluer la capacité de ces phages à infecter et lysogénéiser plusieurs isolats sensibles. Nous avons donc pu établir que ce phage est en mesure d'infecter et de lyser une multitude de souches de plusieurs ribotypes différents (voir tableau 4). D'ailleurs, dans le cas des phages de l'ordre des *Caudovirales* (phages possédant une queue) dont ceux de la famille des *Myoviridae*, plusieurs études ont été publiées sur la structure de la queue, impliquée dans la reconnaissance du phage à la bactérie hôte (TETART *et al.*, 1998; PLISSON *et al.*, 2007; SCIARA *et al.*, 2010). La présence de certaines protéines (*Tail Fiber*, *Spike*, *baseplate*, etc), fixées à la base de la queue, interagissent directement avec les structures extérieures de la bactérie et permet l'étape d'adsorption du phage à sa bactérie hôte. Dans le cas des bactéries Gram + et donc de *C. difficile*, les acides teichoïques et les lipoprotéines semblent jouer ce rôle (KUTTER et SULAKVELIDZE, 2005). On peut donc penser que d'une part, les protéines de la queue du phage  $\phi$ MMP01 lui permettent de reconnaître et d'infecter plusieurs souches de *C. difficile* différentes et d'autre part que les protéines bactériennes de surface servant de point d'ancrage au phage possèdent certains motifs conservés entre plusieurs souches, ce qui augmente le spectre d'hôte du phage en question. Le spectre d'hôte des autres phages  $\phi$ MMP02-04 n'a pas été testé systématiquement principalement dû à la quantité de travail imposante que représente l'analyse du spectre

d'hôte sur des centaines d'isolats avec une méthode basées sur les géloses molles de surface. L'utilisation d'équipements spécialisés, comme un lecteur de microplaque à 96 puits qui pourrait être installé dans la chambre anaérobique et qui permettraient une analyse rapide et à grande échelle du spectre d'hôte des phages en culture liquide est pour l'instant impossible, mais l'acquisition d'un tel appareil permettra prochainement d'étudier le spectre d'hôte des phages  $\phi$ MMP. En somme, nous ne pouvons pas tirer de conclusion définitive quant au spectre d'hôte des phages  $\phi$ MMP02-04. De plus, quelques espèces de *Clostridium* autre que *C. difficile* (voir tableau A4) ont également été testées pour leur sensibilité aux phages  $\phi$ MMP01-04. En 1985, un article a été publié sur l'existence d'un phage tempéré, retrouvé chez *C. sordellii*, ayant la capacité d'infecter la bactérie *C. difficile*. Ainsi, les protéines virales responsables de l'adsorption et de la reconnaissance d'une bactérie hôte peuvent éventuellement permettre la reconnaissance d'espèces bactériennes différentes, mais probablement apparentées, permettant la réplication du phage en question. Or, aucune des espèces du genre *Clostridium* testées ne s'est révélée être sensible aux phages  $\phi$ MMP01-04, ce qui peut indiquer une différence importante des protéines de surface ou des structures reconnues par les phages  $\phi$ MMP lors du processus d'adsorption.

#### 4.4.2. Morphologie par microscopie électronique

Dans un deuxième temps, les phages  $\phi$ MMP01-04 ont été observés sous microscope électronique afin de les classer selon leur morphologie pour conclure que les quatre phages  $\phi$ MMP font tous partie de la famille des *Myoviridae*. De plus, les

dimensions observées pour les phages  $\phi$ MMP01 et  $\phi$ MMP04 sont pratiquement équivalentes aux autres phages de *C. difficile* de cette famille caractérisés dans la littérature (GOH *et al.*, 2005; GOVIND *et al.*, 2006; SEBAIHIA *et al.*, 2006; MAYER *et al.*, 2008). Cependant, les dimensions de la capsid et de la queue du phage  $\phi$ MMP02 sont plus importantes que tous les phages de la famille *Myoviridae* caractérisés chez *C. difficile* à ce jour. Fait intéressant, le gène *Tail Tape Measure* de ce phage (voir figure 22, ORF11, section 3.4.2.1) est environ deux fois plus grand que le gène correspondant chez le phage  $\phi$ C2. Ce gène code pour la protéine déterminant la longueur de la queue qui est directement proportionnelle à la taille du gène (MC GRATH et VAN SINDEREN, 2007).

#### 4.4.3. Similarité génomique entre les phages $\phi$ MMP

Afin d'avoir un aperçu des similarités et différences génomiques entre les phages  $\phi$ MMP et ceux induits d'isolats du laboratoire ( $\phi$ CD52,  $\phi$ CD630-2,  $\phi$ CD38-2,  $\phi$ CD24-1 et 2,  $\phi$ CD29, et  $\phi$ CD111), la technique d'hybridation de type Southern a été utilisée. Rappelons que l'ADN entier des génomes des phages a été digéré avec l'enzyme de restriction HindIII pour être ensuite transféré sur membrane et hybridé avec les sondes marquées à la DIG de ces mêmes phages. Ainsi, le phage  $\phi$ MMP02 qui fait partie de la famille des *Myoviridae*, possède une certaine similarité avec les autres phages de la même famille, mais aucune homologie avec les phages de la famille des *Siphoviridae* dont la morphologie est assez différente de la famille des *Myoviridae* (voir figure 14B). Chez nos phages étudiés, environ la moitié du génome code pour

l'ensemble des protéines de structure, ce qui explique, en partie, le peu de similarité observé par hybridation entre des phages de familles différentes Or, bien que le phage semble posséder une certaine similarité avec tous les autres phages de la famille des *Myoviridae* ( $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP03,  $\phi$ CD52,  $\phi$ CD630-2 et  $\phi$ CD24-2), cette similarité n'est pas aussi forte qu'entre le phage  $\phi$ MMP03 et les autres *Myoviridae* (voir figure 14C). De plus, les hybridations entre les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP03 démontrent l'existence d'une certaine similarité mais que ces deux phages sont relativement différents et que le phage  $\phi$ MMP03 s'apparente beaucoup plus aux autres phages de la même famille que le phage  $\phi$ MMP02, qui semble être plus distant au niveau génomique. D'ailleurs, lorsque l'on compare les deux phages *Myoviridae*  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 entre eux et avec les autres phages de notre collection, pratiquement aucun signal d'hybridation n'est observé entre ceux-ci, ce qui indique que ces deux phages présentent également des génomes différents malgré leurs appartenances à la même famille morphologique. Il semble donc que le phage  $\phi$ MMP04 soit dans une classe à part et est probablement très éloigné du plan de vue génomique de tous les phages *Myoviridae* qui ont été isolés au laboratoire. On peut aussi présumer que le phage  $\phi$ MMP02 partage une certaine similarité avec les autres phages  $\phi$ MMP01,  $\phi$ MMP03,  $\phi$ CD52,  $\phi$ CD630-2 et  $\phi$ CD24-2 et que ceux-ci partagent une origine commune. Le phage  $\phi$ MMP04 aurait pu également avoir évolué sans l'intervention des autres phages ou avoir perdu ou échangé la majorité du matériel génétique partagé avec les autres phages.

#### 4.4.4. Inductions des $\phi$ MMP01-04

Du fait que trois des quatre phages tempérés ( $\phi$ MMP02-04) aient été induits *in vivo* de patients atteints d'ICD, nous avons tenté de comprendre l'importance de ces inductions. En effet, le phénomène d'induction est assez intéressant puisque les prophages ont la possibilité de s'induire de façon spontanée ou provoquée par un stress exercé sur la bactérie (BOSSI *et al.*, 2003; LIVNY et FRIEDMAN, 2004). Étant donné que plusieurs phages sont connus pour transporter, dans leur génome, des gènes de virulence tels que des toxines (CANCHAYA *et al.*, 2003; CHEN et NOVICK, 2009; CHOI *et al.*, 2009), l'induction de ceux-ci leur donne la possibilité de transférer horizontalement, du matériel génétique susceptible d'avoir un impact sur la virulence de la bactérie lysogène (CANCHAYA *et al.*, 2003; BRUSSOW *et al.*, 2004; CHEN et NOVICK, 2009). D'ailleurs, les phages tempérés sont reconnus pour participer activement à l'évolution des génomes bactériens et ainsi, augmenter la diversité microbienne (WEINBAUER, 2004; THURBER, 2009).

##### 4.4.4.1. Induction spontanée

Dans un premier temps, l'induction spontanée a été étudiée sur les phages  $\phi$ MMP pour connaître la stabilité de leur cycle lysogénique ou la facilité de ces phages à s'induire en absence de stress environnemental. En ce qui concerne les phages  $\phi$ MMP01-04, ceux-ci ne semblent pas s'induire de façon spontanée avec la même intensité. En effet, le phage  $\phi$ MMP02 lorsqu'introduit dans une souche de laboratoire, semble s'induire légèrement plus que lorsque ce phage est présent dans la souche

lysogène sauvage d'origine. Toutefois, étant donné que ce phage a été introduit volontairement dans la souche lysogène de labo, il se peut que les répresseurs responsables du maintien du prophage dans le génome de la bactérie soient moins efficaces que dans la souche dite sauvage où une certaine adaptation a pu avoir lieu au cours de l'évolution. D'ailleurs, l'induction du phage lambda chez *E. coli* est régulée par un répresseur, la protéine CI, qui maintient le cycle lysogénique et réprime l'excision du phage (cycle lytique). Or, une diminution de la stabilité entre CI et les régions promotrices des gènes impliqués dans le cycle lytique provoque généralement le déclenchement de ce dernier (BABIC et LITTLE, 2007; ANDERSON et YANG, 2008). Également, le phage  $\phi$ MMP02 semble s'induire spontanément davantage que les autres phages  $\phi$ MMP (jusqu'à  $10^9$  ufp/ml pour le phage  $\phi$ MMP02 comparativement à environ  $10^6$  ufp/ml pour les autres phages  $\phi$ MMP après 16 h). Toutefois, il se peut que ce ne soit pas le taux d'induction comme tel qui soit en cause, mais le temps de latence pour la production de nouveaux virions qui est peut-être plus courte et la quantité de phages relâchée (progéniture) après un cycle de réplication qui est peut-être plus importante comparativement aux autres phages  $\phi$ MMP. Certains auteurs ont suggéré que l'induction spontanée de prophages seraient un acte « altruiste » d'une certaine sous-population bactérienne pour maintenir et transférer des conditions lysogéniques qui procurent un avantage pour les lysogènes de cette population (BOSSI *et al.*, 2003). Dans le cas du phage  $\phi$ MMP03, le lysogène de labo semble, lui aussi, induire davantage de phages que le lysogène sauvage correspondant bien que la quantité de phages relâchés est moindre que pour le phage  $\phi$ MMP02. Or, les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP03 ont la capacité d'infecter la même souche (CD117)

alors que le taux d'induction propre à chacun de ces phages sur la même souche est sensiblement différent. Cela conforte l'idée que les phages  $\phi$ MMP ont probablement davantage d'influence sur leur propre induction que la souche hôte elle-même et que ce phénomène favorise la propagation des phages tempérés et la diversité de ceux-ci chez *C. difficile*. Fait intéressant, à l'inverse des deux derniers phages, l'induction spontanée du phage  $\phi$ MMP04 est plus importante pour le lysogène sauvage que pour le lysogène de labo. Cela indique que la stabilité du prophage est probablement moins grande chez le lysogène d'origine (sauvage) et que le maintien de ce phage dans le génome de cette dernière est plus efficace. Or, ce phénomène est assez important d'autant plus que l'induction spontanée atteint des titres assez élevés ( $10^7$  ufp/ml) pour le lysogène sauvage, et il est fort possible qu'*in vivo*, cette induction soit aussi plus importante. D'ailleurs, le phage  $\phi$ MMP04 contient des gènes susceptibles d'avoir un impact ou non sur la virulence ou la croissance de sa bactérie hôte tels que *Clp protease* et *Hydrolase invasion associated protein*. En effet, les *Clp protease* sont impliqués au niveau de la régulation d'autres facteurs de virulences (INGMER et BRONDSTED, 2009) mais peuvent également être utilisées dans la maturation de la capsid de la progéniture virale. De plus, l'*hydrolase invasion associated protein* peut potentiellement être impliquée dans le processus d'invasion de la bactérie (numéro d'ascension NC\_013159.1) même si l'hypothèse la plus probable est que cette protéine soit utilisée par le phage au cours du processus d'infection, prêt à jouer le rôle de lyse cellulaire au contact de la queue à la paroi bactérienne pour faciliter l'entrée du génome viral. Bien qu'on ne connaisse pas l'étendue du spectre d'hôte pour le phage  $\phi$ MMP04 ni l'impact de ces gènes sur le phénotype bactérien, sa grande capacité

d'induction spontanée lui confère la possibilité d'infecter d'autres souches de *C. difficile* et de lysogéniser celles-ci *in vivo* avec la possibilité de modifier le phénotype de la souche hôte, le cas échéant. Une étude ayant déjà démontré qu'une co-infection, avec au moins deux souches différentes de *C. difficile* chez un patient est possible (TANNER *et al.*, 2010), la présence d'un prophage dans l'une des souches pourrait permettre à ce phage de s'induire et de lysogéniser la seconde souche, pendant une infection, *in vivo*. Toutefois, les données sur les taux d'induction spontané *in vitro* ne sont peut-être pas représentatives de ce qui se déroule *in vivo* et cette hypothèse serait à étudier car l'importance de ce phénomène pourrait être grande au niveau biologique.

#### 4.4.4.2. Induction provoquée

Plusieurs scientifiques ont également démontré que la présence de certains antibiotiques avaient la capacité d'induire et de moduler le comportement de certains prophages dans leurs souches hôtes (MATSUSHIRO *et al.*, 1999; KOHLER *et al.*, 2000; HEROLD *et al.*, 2005). Ainsi, pour vérifier si les phages  $\phi$ MMP01-04 ont la possibilité de s'induire en présence d'antibiotiques, nous avons étudié l'induction des phages après l'ajout de mitomycine C ou de ciprofloxacine, antibiotiques susceptibles de provoquer le cycle lytique chez les lysogènes sauvages et de labo. En effet, l'induction des prophages peut être provoquée par la présence d'antibiotiques qui affectent la stabilité de l'ADN génomique bactérien tel que la mitomycine C, un antibiotique bien connu dans la littérature pour induire l'excision des prophages de leurs souches hôtes (RAYA et H'BERT E, 2009) mais également par des antibiotiques



qui ciblent la paroi bactérienne (MAIQUES *et al.*, 2006). Tous d'abord, pour s'assurer que les phages  $\phi$ MMP01-04 soient sensibles à l'induction par les antibiotiques, la mitomycine C, a été utilisée sur les lysogènes sauvages et de labo correspondant aux phages  $\phi$ MMP01-04. Bien que nous n'ayons pas titré les phages libérés après traitement, tous les phages  $\phi$ MMP semblent avoir répondu à la présence de l'antibiotique par une induction caractéristique de leur souche sauvage et lysogène respectives (FORTIER et MOINEAU, 2007), ce qui laisse supposer que d'autres antibiotiques, ayant un mécanisme d'action similaire, auront aussi des effets sur l'induction des phages  $\phi$ MMP01-04.

Fait intéressant, la ciprofloxacine a été administrée aux deux patients atteints d'ICD chez qui les phages  $\phi$ MMP01 et  $\phi$ MMP04 ont été isolés des selles. Ainsi, la croissance bactérienne a été suivie et les phages ont été quantifiés suite à l'induction provoquée à la ciprofloxacine pour les différents lysogènes sauvages et de labo des phages  $\phi$ MMP01-04. Dans un premier temps, selon les courbes de croissances obtenues suite au suivi en densité optique des souches lysogènes et sauvages, la présence de la ciprofloxacine n'a pas influencée, pour la majorité d'entre eux, la croissance de ceux-ci. En effet, à l'exception du lysogène sauvage (CD380) du phage  $\phi$ MMP04, toutes les autres souches n'ont démontré aucune inhibition de croissance à la CMI et encore moins aux autres concentrations sous-inhibitrices. Ainsi, il semble que l'interprétation des observations correspondant aux valeurs des CMI pour les souches lysogènes aient été erronés. De plus, l'induction provoquée par la ciprofloxacine n'a pas semblé être concluante puisque l'antibiotique n'a eu aucun effet inhibiteur et que beaucoup de variations ont été observées aux différents temps (voir

figure 21, section 3.3.7.2). Cependant, le lysogène sauvage (CD343), à des concentrations inhibitrices et sous-inhibitrices en ciprofloxacine (16, 8 et 4  $\mu\text{g/ml}$ ), a induit environ 100 X plus de phages  $\phi\text{MMP02}$  que par rapport au contrôle. Le phage  $\phi\text{MMP02}$  semble donc s'être induit davantage en présence de l'antibiotique, ce qui pourrait expliquer la raison de l'isolement de deux autres phages, potentiellement identiques ( $\phi\text{MMP02b}$  et  $\phi\text{MMP02d}$ ). Le traitement des infections bactériennes avec certains antibiotiques aurait donc la possibilité d'induire les phages de *C. difficile* et d'augmenter les chances de transfert horizontal de matériels génétiques entre espèces. Dans le cas des phages  $\phi\text{MMP01-04}$ , il faudra, par contre, évaluer de façon plus poussée et rigoureuse l'induction provoquée avec plusieurs autres antibiotiques puisque les essais avec la ciprofloxacine n'ont été réalisés qu'une seule fois pour l'instant.

En perspective, la caractérisation des phages  $\phi\text{MMP}$  devrait être complétée, en outre, par la mise au point d'une technique rapide et à grande échelle pour l'étude du spectre d'hôte et également par l'ajout d'autres concentrations en ciprofloxacine lors des essais d'induction provoquée. L'utilisation d'autres antibiotiques de la famille des fluoroquinolones seraient également souhaitables pour déterminer si ces antibiotiques ont la capacité d'induire les phages  $\phi\text{MMP}$ .

#### **4.5. Diversité génétique des phages $\phi\text{MMP02}$ et $\phi\text{MMP04}$**

Depuis quelques années, malgré le nombre croissant de séquences génomiques de phages disponibles dans les bases de données publiques, celles de phages de *C.*

*difficile* demeurent très limitées. Ici, seuls les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04 ont été séquencés puisque ceux-ci semblaient présenter le plus de différence génomiques par hybridations de type Southern (voir section 3.3.4).

#### 4.5.1. Caractérisation et comparaison génomique

##### 4.5.1.1. Génome du phage $\phi$ MMP02

Ainsi, l'annotation du génome du phage  $\phi$ MMP02 a permis de déterminer que celui-ci est assez semblable de par son organisation génomique comparativement aux autres phages de *C. difficile* isolés et séquencés tels que  $\phi$ C2,  $\phi$ CD119,  $\phi$ CD630-1,2 et  $\phi$ CD27 (GOH *et al.*, 2005; GOVIND *et al.*, 2006; SEBAIHIA *et al.*, 2006; MAYER *et al.*, 2008). La taille, le nombre d'ORFs et les différents modules du phage  $\phi$ MMP02 sont similaires à ces derniers. De plus, un peu plus de 40% des gènes prédits sur le génome de ce phage sont associés à des protéines du genre *Clostridium* et *C. difficile* mais seulement 8% de ces gènes codent pour des protéines de phages associés à *C. difficile*. Le phage  $\phi$ MMP02 n'a donc pas beaucoup d'homologie avec les autres prophages séquencés jusqu'à maintenant et indique d'une part le manque de séquences disponibles en phages de *C. difficile* et d'autre part que ce dernier phage semble partager davantage de similarité avec des phages de différentes espèces de Clostridies. De plus, aucun ORF du génome du phage  $\phi$ MMP02 ne semble coder pour un facteur de virulence connu, bien que près de la moitié des ORFs n'ont pas de fonctions identifiées. Compte tenu que moins de 10 % d'un génome de phages encoderaient des

facteurs de virulence (BOSSI *et al.*, 2003), il est donc probable que des facteurs de virulence possiblement encodé sur le génome du phage  $\phi$ MMP02 se retrouvent parmi les ORFs dont la fonction n'a pas été identifiée.

Ensuite, une comparaison génomique entre le phage  $\phi$ MMP02 et le phage  $\phi$ C2, celui possédant le plus de similarité d'ADN (voir figure 24, section 3.4.3.1) a révélé que le module responsable de la modification et de la réplication de l'ADN est particulièrement bien conservé. Il semble donc logique de penser que ce module, chez ces deux phages, proviennent d'un ancêtre commun et que ce dernier a été acquis par recombinaison homologe, puisque le reste du génome est plutôt différent.

#### 4.5.1.2. Génome du phage $\phi$ MMP04

Pour le génome du phage  $\phi$ MMP04, les différences avec les phages de *C. difficile* déjà caractérisés dans la littérature sont plus importantes. Premièrement, ce phage est exceptionnellement petit, avec une taille de 31662 pb, ce qui le place au rang du plus petit *Myoviridae* isolé et caractérisé chez *C. difficile* à ce jour. D'ailleurs, le nombre d'ORFs dans chacun des modules est environ la moitié de celui des autres phages de type *Myoviridae* connus. Ce phage semble donc avoir « épuré » son génome tout en conservant les gènes dont la fonction était essentielle pour le phage.

D'autre part, les modules responsables du contrôle de la lysogénie et de la modification et réplication de l'ADN sont positionnés différemment sur le génome par rapport aux autres phages de *C. difficile* (voir figure 23, section 3.4.2.2). Pour tous les

autres phages dont le génome a été caractérisé jusqu'à maintenant, le module de lysogénie est situé immédiatement en aval du module de lyse. Le génome du phage  $\phi$ MMP04 semble donc avoir subi des événements de recombinaison qui ont entraînés un déplacement du module responsable du contrôle du cycle lysogénique. L'avantage de cette nouvelle organisation reste un mystère. De plus, peu de gènes codent pour des protéines ayant des homologues dans d'autres phages du genre *Clostridium* (moins de 10%) et plusieurs protéines (*SSB-like*, *DNA methylase*, *RusA nuclease*, etc) retrouvés chez la majorité des phages de *C. difficile* séquencés ( $\phi$ C2,  $\phi$ CD119 et  $\phi$ CD27 notamment) n'ont pas été identifiés dans le génome du phage  $\phi$ MMP04. Cela indique que ce phage est très éloigné au niveau génomique par rapport aux autres phages de *C. difficile*, ce qui était évident lors des hybridations ADN-ADN (voir figure 14B-C). Cependant, des alignements de génomes et de séquences protéiques avec différents phages connus chez *C. difficile* ont révélé que le module de structure de la queue est relativement bien conservé avec celui du phage  $\phi$ CD119 alors que le reste du génome du phage  $\phi$ MMP04 partage peu de similarité avec les autres phages. Finalement, puisque près de la moitié des ORFs n'ont aucune fonction prédite par analyse bioinformatique, il n'est peut-être pas surprenant qu'aucun facteur de virulence n'ait été identifié dans le génome de ce phage.

Il sera donc intéressant, pour la suite des choses, d'effectuer des études plus poussées afin de déterminer la fonction biologique du produit de ces gènes et de séquencer les deux autres phages  $\phi$ MMP pour ajouter de l'information et améliorer les analyses d'identification des génomes de phages chez *C. difficile*.

#### 4.6. Impact des phages $\phi$ MMP01-04 sur le phénotype de *C. difficile*

Depuis plusieurs années, il est connu que les phages tempérés, lorsqu'ils sont sous forme de prophages, peuvent affecter le phénotype du lysogène correspondant (CANCHAYA *et al.*, 2004). L'impact de ces prophages peut se traduire par l'expression de facteurs de virulence ou de facteurs d'adaptabilité qui procurent un avantage compétitif à la bactérie dans son milieu (BAE *et al.*, 2006; CHEN et NOVICK, 2009). Les phages tempérés peuvent également encoder des gènes qui affectent de façon positive ou négative et à distance (en *trans*) la régulation de gènes bactériens (GOVIND *et al.*, 2009). Nous avons donc cherché à déterminer si les phages  $\phi$ MMP01-04 avaient la capacité de modifier certains phénotypes chez *C. difficile*, notamment la motilité et la production des toxines.

##### 4.6.1. Motilité

Récemment, la motilité a été étudiée chez diverses souches de *C. difficile* et des différences notables ont été observées entre celles-ci, possiblement à cause d'éléments génétiques mobiles présent chez les souches les plus mobiles, mais absent de ceux qui ne sont pas mobiles (STABLER *et al.*, 2009). Pour les 4 phages  $\phi$ MMP, aucune différence notable n'a été observée entre les souches lysogènes et non lysogènes même si le lysogène du phage  $\phi$ MMP03 semble être plus mobile (voir figure 26). Or, certains travaux (LOGAN, 2006; TWINE *et al.*, 2009) ont démontré que la présence de certains gènes, responsables du métabolisme des hydrates de carbone, peut entraîner des

modifications post-traductionnelles comme la glycosylation des protéines des flagelles. Ces modifications entraîneraient une plus grande motilité de la souche. Bien que, à notre connaissance, ces gènes n'aient jamais été identifiés dans le génome d'un phage, aucun des deux génomes séquencés ( $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP04) ne porte de gènes ayant une fonction connue reliée aux métabolismes des sucres. Néanmoins, les gènes associés aux flagelles chez *C. difficile* sont situés sur plusieurs loci et sont soumis à des variations génomiques importantes (STABLER *et al.*, 2009). Il est donc possible de penser que certaines souches mobiles sont plus susceptibles d'être modifiées par les phages  $\phi$ MMP01-04 dans ces régions par rapport à d'autres souches moins mobiles. Il est également possible que la présence d'un prophage n'influence en rien la motilité chez *C. difficile*.

#### 4.6.2. Production des toxines A et B

La modulation de la production des toxines A et B de *C. difficile* par la présence de prophages a fait l'objet d'études récemment (GOH *et al.*, 2005; GOVIND *et al.*, 2009; SEKULOVIC *et al.*, Soumis). Nous avons également tenté de déterminer l'impact des phages  $\phi$ MMP01-04 sur la production des toxines dans les mêmes souches lysogènes et non lysogènes utilisées pour les essais de motilité. Dans un premier temps, pour toutes les souches lysogènes et non lysogènes des phages  $\phi$ MMP01-04, l'expression des toxines A et B était détectable après 24 h (non montré) pour devenir plus importante après 48 et 72 h (voir figure 27 et 28, section 3.5.2). Ce résultat est logique puisqu'il a été démontré que les toxines A et B de *C. difficile* sont

exprimées majoritairement lors de la phase stationnaire de croissance de la bactérie (HUNDSBERGER *et al.*, 1997; DUPUY et SONENSHEIN, 1998). Ainsi, la présence des prophages ne semble pas accélérer la production des toxines, même si l'induction spontanée des prophages a été observée dans les 8 premières heures d'incubation (voir figure 18) et sachant que certains phages tempérés augmentent l'expression des toxines lors d'épisode d'induction (WAGNER *et al.*, 2002; LIVNY et FRIEDMAN, 2004). Cependant, les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP03 semblent avoir eu un effet sur la production totale des toxines A et B alors qu'aucune différence significative n'a pas été observée entre les lysogènes et souches non lysogènes des phages  $\phi$ MMP01 et  $\phi$ MMP04. En effet, le phage  $\phi$ MMP02 semble légèrement diminuer la quantité de toxines A et B produite par le lysogène après 48 et 72 h tandis que le phage  $\phi$ MMP03 semble provoquer l'effet inverse sur son lysogène respectif. Une étude récente a démontré que le gène *RepR*, retrouvé chez le phage  $\phi$ CD119 de *C. difficile*, régule négativement l'expression des gènes du PaLoc (*TcdA*, *TcdB*, *TcdR*, *TcdC* et *TcdE*) en liant la région promotrice en amont du gène *tcdR* codant pour un facteur sigma alternatif jouant le rôle de régulateur positif des toxines (GOVIND *et al.*, 2009). Il n'est donc pas exclu que les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP03 encodent un régulateur transcriptionnel jouant un rôle similaire à *RepR* chez le phage  $\phi$ CD119. De plus, on ne peut écarter l'hypothèse que l'expression de la protéine holine, encodée par les phages  $\phi$ MMP02 et  $\phi$ MMP03, pourrait contribuer à l'augmentation de la production des toxines A et B. En effet, la protéine *TcdE*, située dans le PaLoc de *C. difficile* et ayant d'importantes similarités génomiques en acides aminés avec les holines de phages, est essentielle pour la sécrétion des toxines à l'extérieur de la bactérie (TAN *et al.*, 2001).



Par contre, aucune expérience présentée ici ne peut démontrer cette hypothèse. Évidemment, nos observations par immunoblot ne sont pas quantitatives et nous avons observé une certaine variabilité dans les résultats.

Donc nous pouvons dire qu'il y a une tendance observable des phages  $\phi$ MMP02 et 03 à altérer la production de toxines, mais des études quantitatives seraient nécessaires (ex : essais ELISA, PCR quantitatif en temps réel). De plus, la régulation de la transcription de ces toxines pourrait également être étudiée par PCR quantitatif en temps réel ou par retardement sur gel (EMSA) pour déterminer si des protéines du phage sont exprimés et altèrent les processus de transcription et de traduction des toxines chez *C. difficile*.

#### 4.7. Conclusion

Le but de ce projet était d'isoler et de caractériser des phages virulents afin de développer une alternative thérapeutique à l'antibiothérapie chez *C. difficile*. Or, l'absence de phages virulents détectés dans les échantillons environnementaux, appuyés par les nombreuses études qui font mention de l'absence de ces phages détectés, ont modifié quelques peu les objectifs de ce projet. En effet, quatre phages isolés et détectés dans les selles de patients atteints d'ICD ( $\phi$ MMP01-04) ont été confirmés comme tempérés et trois d'entre eux se sont induits de façon *in vivo* de leurs isolats cliniques respectifs. Dans un premier temps, étant donné que peu de données sont disponibles sur les phages chez *C. difficile*, les phages  $\phi$ MMP ont été caractérisés au niveau morphologique, génomique et sur le phénomène d'induction. Les phages

$\phi$ MMP ont également été comparés aux autres phages chez *C. difficile* pour établir qu'une grande diversité semble régner parmi ces phages. Dans un deuxième temps, les phages  $\phi$ MMP ont été évalués pour leur influence sur certains facteurs de virulence chez *C. difficile* et il semble que deux des phages  $\phi$ MMP, sous forme de prophages, soient en mesure de moduler la production des toxines de la bactérie. Évidemment, les phages sont, en partie, responsables de l'évolution de leurs bactéries hôtes, mais il est fort probable que d'autres facteurs tels que la température (KARLSSON et al., 2003), les nutriments du milieu (KARLSSON et al., 2008), la présence de plasmides (SEBAIHIA *et al.*, 2006), de transposons (ADAMS et al., 2002) ou de riboswitch (SUDARSAN et al., 2008) puisse influencer les différents phénotypes de *C. difficile*.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier particulièrement le Dr Louis-Charles Fortier d'avoir cru en moi et de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Ses conseils, son soutien et son dévouement auront su me guider pendant ma maîtrise et faire de moi, un meilleur scientifique qu'auparavant. Je remercie aussi les Dr François Malouin et Dr Eric Frost d'avoir accepté de faire parti du comité d'évaluation de ce mémoire.

Je remercie également Ognjen Sekulovic, Stéphanie Mauler, Stéphanie Sirard et les membres du laboratoire avec qui j'ai partagé des moments inoubliables, tant dans un contexte scientifique que social. Je constate que ces collègues sont devenus, au fil de ces années, de véritables amis dont j'espère garder leur amitié à jamais.

Un merci aux membres du département dont Nancy Laterreur, David Faucher et Simon Lévesque, qui m'ont aidé sur plusieurs aspects techniques et avec qui j'ai eu de bonnes discussions. Je remercie aussi les secrétaires Carole Picard et Mylène Ledoux qui ont été patiente et qui ont toujours su être disponibles pour tous les problèmes administratifs que j'ai rencontrés.

Un autre merci aux groupes de musique Pink Floyd, Radiohead et Godspeed You Black Emperor qui, par leur musique, m'ont permis d'écrire ce mémoire jusqu'à la fin.

Finalement, je remercie la personne la plus chère à mes yeux qui m'a supporté, m'a encouragé et qui, malgré la distance, n'a cessé de m'aimer, mon amour, Kim. Je remercie également ma famille et mes amis pour leur appui indéfectible.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Ackermann, H. W. (2007). "5500 Phages examined in the electron microscope." Arch Virol **152**(2): 227-43.
- Adams, V., D. Lyras, et al. (2002). "The clostridial mobilisable transposons." Cell Mol Life Sci **59**(12): 2033-43.
- Alam, T. I., B. Draper, et al. (2008). "The headful packaging nuclease of bacteriophage T4." Mol Microbiol **69**(5): 1180-90.
- Alam, T. I. and V. B. Rao (2008). "The ATPase domain of the large terminase protein, gp17, from bacteriophage T4 binds DNA: implications to the DNA packaging mechanism." J Mol Biol **376**(5): 1272-81.
- Altschul, S. F., W. Gish, et al. (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Anderson, L. M. and H. Yang (2008). "DNA looping can enhance lysogenic CI transcription in phage lambda." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(15): 5827-32.
- Arroyo, L. G., S. A. Kruth, et al. (2005). "PCR ribotyping of *Clostridium difficile* isolates originating from human and animal sources." J Med Microbiol **54**(Pt 2): 163-6.
- Arvand, M., A. M. Hauri, et al. (2009). "*Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany." Euro Surveill **14**(45).
- Babic, A. C. and J. W. Little (2007). "Cooperative DNA binding by CI repressor is dispensable in a phage lambda variant." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(45): 17741-6.
- Bae, T., T. Baba, et al. (2006). "Prophages of *Staphylococcus aureus* Newman and their contribution to virulence." Mol Microbiol **62**(4): 1035-47.
- Baines, S. D., R. O'Connor, et al. (2008). "Comparison of oritavancin versus vancomycin as treatments for clindamycin-induced *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 infection in a human gut model." J Antimicrob Chemother **62**(5): 1078-85.

- Banks, D. J., S. B. Beres, et al. (2002). "The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence." Trends Microbiol **10**(11): 515-21.
- Bartlett, J. G. and D. N. Gerding (2008). "Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection." Clin Infect Dis **46 Suppl 1**: S12-8.
- Bartlett, J. G., N. Moon, et al. (1978). "Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis." Gastroenterology **75**(5): 778-82.
- Bauer, M. P. and J. T. van Dissel (2009). "Alternative strategies for *Clostridium difficile* infection." Int J Antimicrob Agents **33 Suppl 1**: S51-6.
- Bauer, M. P., D. Veenendaal, et al. (2009). "Clinical and microbiological characteristics of community-onset *Clostridium difficile* infection in The Netherlands." Clin Microbiol Infect **15**(12): 1087-92.
- Bergh, O., K. Y. Borsheim, et al. (1989). "High abundance of viruses found in aquatic environments." Nature **340**(6233): 467-8.
- Best, E. L., W. N. Fawley, et al. "The potential for airborne dispersal of *Clostridium difficile* from symptomatic patients." Clin Infect Dis **50**(11): 1450-7.
- Bidet, P., F. Barbut, et al. (1999). "Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing." FEMS Microbiol Lett **175**(2): 261-6.
- Bidet, P., V. Lalande, et al. (2000). "Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*." J Clin Microbiol **38**(7): 2484-7.
- Blossom, D. B. and L. C. McDonald (2007). "The challenges posed by reemerging *Clostridium difficile* infection." Clin Infect Dis **45**(2): 222-7.
- Bonilla, N., T. Santiago, et al. "Enterophages, a group of phages infecting *Enterococcus faecalis*, and their potential as alternate indicators of human faecal contamination." Water Sci Technol **61**(2): 293-300.
- Borie, C., I. Albala, et al. (2008). "Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens." Avian Dis **52**(1): 64-7.
- Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska, et al. (2006). "Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents." Exp Biol Med (Maywood) **231**(4): 366-77.
- Bossi, L., J. A. Fuentes, et al. (2003). "Prophage contribution to bacterial population dynamics." J Bacteriol **185**(21): 6467-71.

- Brazier, J. S. (1998). "The epidemiology and typing of *Clostridium difficile*." J Antimicrob Chemother **41 Suppl C**: 47-57.
- Breitbart, M. and F. Rohwer (2005). "Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?" Trends Microbiol **13**(6): 278-84.
- Brussow, H., C. Canchaya, et al. (2004). "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 560-602.
- Bryan, M. J., N. J. Burroughs, et al. (2008). "Evidence for the intense exchange of MazG in marine cyanophages by horizontal gene transfer." PLoS One **3**(4): e2048.
- Canchaya, C., G. Fournous, et al. (2004). "The impact of prophages on bacterial chromosomes." Mol Microbiol **53**(1): 9-18.
- Canchaya, C., G. Fournous, et al. (2003). "Phage as agents of lateral gene transfer." Curr Opin Microbiol **6**(4): 417-24.
- Capparelli, R., N. Nocerino, et al. (2010). "Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy." J Infect Dis **201**(1): 52-61.
- Carter, G. P., D. Lyras, et al. (2007). "Binary toxin production in *Clostridium difficile* is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator." J Bacteriol **189**(20): 7290-301.
- Carver, T. J., K. M. Rutherford, et al. (2005). "ACT: the Artemis Comparison Tool." Bioinformatics **21**(16): 3422-3.
- Casjens, S. (2003). "Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?" Mol Microbiol **49**(2): 277-300.
- Chen, J. and R. P. Novick (2009). "Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes." Science **323**(5910): 139-41.
- Choi, S., D. Dunams, et al. (2009). "Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters." J Appl Microbiol.
- Clokier, M. R. and A. M. Kropinski, Eds. (2009). Bacteriophages : methods and protocols. NY, USA, Humana Press.

- Cochran, P. K., C. A. Kellogg, et al. (1998). "Prophage induction of indigenous marine lysogenic bacteria by environmental pollutants." Marine Ecology-Progress Series **164**: 125-133.
- Cohen, M. B. (2009). "*Clostridium difficile* infections: emerging epidemiology and new treatments." J Pediatr Gastroenterol Nutr **48 Suppl 2**: S63-5.
- Cole, D., S. C. Long, et al. (2003). "Evaluation of F+ RNA and DNA coliphages as source-specific indicators of fecal contamination in surface waters." Appl Environ Microbiol **69**(11): 6507-14.
- Colombet, J., A. Robin, et al. (2007). "Virioplankton 'pegylation': use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems." J Microbiol Methods **71**(3): 212-9.
- Court, D. L., A. B. Oppenheim, et al. (2007). "A new look at bacteriophage lambda genetic networks." J Bacteriol **189**(2): 298-304.
- Crutz-Le Coq, A. M., B. Cesselin, et al. (2002). "Sequence analysis of the lactococcal bacteriophage bIL170: insights into structural proteins and HNH endonucleases in dairy phages." Microbiology **148**(Pt 4): 985-1001.
- Dang, T. H., L. Riva Lde, et al. (2010). "Chemical probes of surface layer biogenesis in *Clostridium difficile*." ACS Chem Biol **5**(3): 279-85.
- Davey, M. J. and B. E. Funnell (1994). "The P1 plasmid partition protein ParA. A role for ATP in site-specific DNA binding." J Biol Chem **269**(47): 29908-13.
- Delcher, A. L., K. A. Bratke, et al. (2007). "Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer." Bioinformatics.
- Deneve, C., S. Bouttier, et al. (2009). "Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on colonization factor expression by moxifloxacin-susceptible and moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* strains." Antimicrob Agents Chemother **53**(12): 5155-62.
- Deneve, C., C. Janoir, et al. (2009). "New trends in *Clostridium difficile* virulence and pathogenesis." Int J Antimicrob Agents **33 Suppl 1**: S24-8.
- Desmond, C., R. P. Ross, et al. (2005). "Sequence analysis of the plasmid genome of the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* NFBC338 which includes the plasmids pCD01 and pCD02." Plasmid **54**(2): 160-75.
- Donnelly, J. J., M. A. Liu, et al. (2000). "Antigen presentation and DNA vaccines." Am J Respir Crit Care Med **162**(4 Pt 2): S190-3.

- Donta, S. T. and M. G. Myers (1982). "*Clostridium difficile* toxin in asymptomatic neonates." J Pediatr **100**(3): 431-4.
- Drlica, K. and X. Zhao (1997). "DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones." Microbiol Mol Biol Rev **61**(3): 377-92.
- Dubberke, E. R., K. A. Reske, et al. (2007). "Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities." Am J Infect Control **35**(5): 315-8.
- Dupuy, B., R. Govind, et al. (2008). "*Clostridium difficile* toxin synthesis is negatively regulated by TcdC." J Med Microbiol **57**(Pt 6): 685-9.
- Dupuy, B. and A. L. Sonenshein (1998). "Regulated transcription of *Clostridium difficile* toxin genes." Mol Microbiol **27**(1): 107-20.
- Egerer, M., T. Giesemann, et al. (2007). "Auto-catalytic cleavage of *Clostridium difficile* toxins A and B depends on cysteine protease activity." J Biol Chem **282**(35): 25314-21.
- Emerson, J. E., C. B. Reynolds, et al. (2009). "A novel genetic switch controls phase variable expression of CwpV, a *Clostridium difficile* cell wall protein." Mol Microbiol **74**(3): 541-56.
- Fagan, R. P., D. Albesa-Jove, et al. (2009). "Structural insights into the molecular organization of the S-layer from *Clostridium difficile*." Mol Microbiol **71**(5): 1308-22.
- Fenner, L., A. F. Widmer, et al. (2008). "First cluster of clindamycin-resistant *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 in Switzerland." Clin Microbiol Infect **14**(5): 514-5.
- Fischetti, V. A. (2005). "Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives." Trends Microbiol **13**(10): 491-6.
- Flores, J. and P. C. Okhuysen (2009). "Genetics of susceptibility to infection with enteric pathogens." Curr Opin Infect Dis **22**(5): 471-6.
- Fokine, A., V. A. Kostyuchenko, et al. (2005). "A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage phiKZ head." J Mol Biol **352**(1): 117-24.
- Fortier, L. C. and S. Moineau (2007). "Morphological and genetic diversity of temperate phages in *Clostridium difficile*." Appl Environ Microbiol **73**(22): 7358-66.



- Fortuna, W., R. Miedzybrodzki, et al. (2008). "Bacteriophage therapy in children: facts and prospects." Med Sci Monit **14**(8): RA126-32.
- Freitag, T., R. A. Squires, et al. (2008). "Naturally occurring bacteriophages lyse a large proportion of canine and feline uropathogenic *Escherichia coli* isolates in vitro." Res Vet Sci **85**(1): 1-7.
- Garcia, P., B. Martinez, et al. (2008). "Bacteriophages and their application in food safety." Lett Appl Microbiol **47**(6): 479-85.
- Gardiner, D. F., T. Rosenberg, et al. (2009). "A DNA vaccine targeting the receptor-binding domain of *Clostridium difficile* toxin A." Vaccine **27**(27): 3598-604.
- Genth, H., S. C. Dreger, et al. (2008). "*Clostridium difficile* toxins: more than mere inhibitors of Rho proteins." Int J Biochem Cell Biol **40**(4): 592-7.
- George, R. H. (1986). "The carrier state: *Clostridium difficile*." J Antimicrob Chemother **18 Suppl A**: 47-58.
- Gerding, D. N., C. A. Muto, et al. (2008). "Treatment of *Clostridium difficile* infection." Clin Infect Dis **46 Suppl 1**: S32-42.
- Gerhard, R., S. Nottrott, et al. (2008). "Glucosylation of Rho GTPases by *Clostridium difficile* toxin A triggers apoptosis in intestinal epithelial cells." J Med Microbiol **57**(Pt 6): 765-70.
- Geric, B., M. Rupnik, et al. (2004). "Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital." J Med Microbiol **53**(Pt 9): 887-94.
- Ghosh, P., L. A. Bibb, et al. (2008). "Two-step site selection for serine-integrase-mediated excision: DNA-directed integrase conformation and central dinucleotide proofreading." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(9): 3238-43.
- Gino, E., J. Starosvetsky, et al. (2007). "Bacteriophage ecology in a small community sewer system related to their indicative role in sewage pollution of drinking water." Environ Microbiol **9**(10): 2407-16.
- Goh, S., B. J. Chang, et al. (2005). "Effect of phage infection on toxin production by *Clostridium difficile*." J Med Microbiol **54**(Pt 2): 129-35.
- Goh, S., P. F. Ong, et al. (2007). "The complete genome sequence of *Clostridium difficile* phage phiC2 and comparisons to phiCD119 and inducible prophages of CD630." Microbiology **153**(Pt 3): 676-85.

- Goh, S., T. V. Riley, et al. (2005). "Isolation and characterization of temperate bacteriophages of *Clostridium difficile*." Appl Environ Microbiol **71**(2): 1079-83.
- Goorhuis, A., D. Bakker, et al. (2008). "Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078." Clin Infect Dis **47**(9): 1162-70.
- Gorski, A. and B. Weber-Dabrowska (2005). "The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens." Cell Mol Life Sci **62**(5): 511-9.
- Govind, R., J. A. Fralick, et al. (2006). "Genomic organization and molecular characterization of *Clostridium difficile* bacteriophage PhiCD119." J Bacteriol **188**(7): 2568-77.
- Govind, R., G. VEDIYAPPAN, et al. (2009). "Bacteriophage-mediated toxin gene regulation in *Clostridium difficile*." J Virol **83**(23): 12037-45.
- Goyal, S. M., K. S. Zerda, et al. (1980). "Concentration of coliphages from large volumes of water and wastewater." Appl Environ Microbiol **39**(1): 85-91.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- Hanlon, G. W. (2007). "Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections." Int J Antimicrob Agents **30**(2): 118-28.
- Hawkes, R., E. Niday, et al. (1982). "A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies." Anal Biochem. **119**(1): 142-147.
- Heap, J. T., O. J. Pennington, et al. (2007). "The ClosTron: a universal gene knock-out system for the genus *Clostridium*." J Microbiol Methods **70**(3): 452-64.
- Hecht, D. W., M. A. Galang, et al. (2007). "In vitro activities of 15 antimicrobial agents against 110 toxigenic *Clostridium difficile* clinical isolates collected from 1983 to 2004." Antimicrob Agents Chemother **51**(8): 2716-9.
- Hedge, D. D., J. D. Strain, et al. (2008). "New advances in the treatment of *Clostridium difficile* infection (CDI)." Ther Clin Risk Manag **4**(5): 949-64.
- Hendrix, R. W., G. F. Hatfull, et al. (2003). "Bacteriophages with tails: chasing their origins and evolution." Res Microbiol **154**(4): 253-7.

- Herold, S., J. Siebert, et al. (2005). "Global expression of prophage genes in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 in response to norfloxacin." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 931-44.
- Holst, E., I. Helin, et al. (1981). "Recovery of *Clostridium difficile* from children." Scand J Infect Dis **13**(1): 41-5.
- Horgan, M., O. O'Sullivan, et al. (2010). "Genome analysis of the *Clostridium difficile* phage PhiCD6356, a temperate phage of the Siphoviridae family." Gene.
- Huang, H., S. Wu, et al. (2009). "*Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes." Int J Antimicrob Agents **33**(4): 339-42.
- Hubert, B., V. G. Loo, et al. (2007). "A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Quebec." Clin Infect Dis **44**(2): 238-44.
- Hundsberger, T., V. Braun, et al. (1997). "Transcription analysis of the genes *tcdA-E* of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile*." Eur J Biochem **244**(3): 735-42.
- Imamovic, L., J. Jofre, et al. (2009). "Phage-mediated Shiga toxin 2 gene transfer in food and water." Appl Environ Microbiol **75**(6): 1764-8.
- Ingmer, H. and L. Brondsted (2009). "Proteases in bacterial pathogenesis." Res Microbiol **160**(9): 704-10.
- Ingrey, K. T., J. Ren, et al. (2003). "A fluoroquinolone induces a novel mitogen-encoding bacteriophage in *Streptococcus canis*." Infect Immun **71**(6): 3028-33.
- Jank, T., T. Giesemann, et al. (2007). "*Clostridium difficile* glucosyltransferase toxin B-essential amino acids for substrate binding." J Biol Chem **282**(48): 35222-31.
- Johnson, R. P., C. L. Gyles, et al. (2008). "Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs." Anim Health Res Rev **9**(2): 201-15.
- Karlsson, S., L. G. Burman, et al. (2008). "Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism." Microbiology **154**(Pt 11): 3430-6.
- Karlsson, S., B. Dupuy, et al. (2003). "Expression of *Clostridium difficile* toxins A and B and their sigma factor TcdD is controlled by temperature." Infect Immun **71**(4): 1784-93.

- Kim, H., S. H. Rhee, et al. (2007). "Inflammation and apoptosis in *Clostridium difficile* enteritis is mediated by PGE2 up-regulation of Fas ligand." Gastroenterology **133**(3): 875-86.
- Kohler, B., H. Karch, et al. (2000). "Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains." Microbiology **146** ( Pt 5): 1085-90.
- Kuijper, E. J., F. Barbut, et al. (2008). "Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008." Euro Surveill **13**(31).
- Kuijper, E. J., B. Coignard, et al. (2006). "Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe." Clin Microbiol Infect **12** Suppl 6: 2-18.
- Kutateladze, M. and R. Adamia (2008). "Phage therapy experience at the Eliava Institute." Med Mal Infect **38**(8): 426-30.
- Kutter, E. and A. Sulakvelidze, Eds. (2005). Bacteriophages: Biology and applications. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Kyne, L. and C. P. Kelly (1998). "Prospects for a vaccine for *Clostridium difficile*." BioDrugs **10**(3): 173-81.
- Kyne, L., M. Warny, et al. (2001). "Association between antibody response to toxin A and protection against recurrent *Clostridium difficile* diarrhoea." Lancet **357**(9251): 189-93.
- Labbe, A. C., L. Poirier, et al. (2008). "*Clostridium difficile* infections in a Canadian tertiary care hospital before and during a regional epidemic associated with the BI/NAP1/027 strain." Antimicrob Agents Chemother **52**(9): 3180-7.
- Labrie, S. J., J. E. Samson, et al. (2010). "Bacteriophage resistance mechanisms." Nat Rev Microbiol **8**(5): 317-327.
- Leal, J., D. B. Gregson, et al. (2008). "Epidemiology of *Clostridium* species bacteremia in Calgary, Canada, 2000-2006." J Infect **57**(3): 198-203.
- Lee, J. Y., H. R. Park, et al. (2007). "Effects of transcription factor activator protein-1 on interleukin-8 expression and enteritis in response to *Clostridium difficile* toxin A." J Mol Med **85**(12): 1393-404.
- Leplae, R., G. Lima-Mendez, et al. (2010). "ACLAME: A CLAssification of Mobile genetic Elements, update 2010." Nucl. Acids Res. **38**: 57-61.

- Lindsay, J. A. "Genomic variation and evolution of *Staphylococcus aureus*." Int J Med Microbiol **300**(2-3): 98-103.
- Little, J. W., D. P. Shepley, et al. (1999). "Robustness of a gene regulatory circuit." EMBO J **18**(15): 4299-307.
- Livny, J. and D. I. Friedman (2004). "Characterizing spontaneous induction of Stx encoding phages using a selectable reporter system." Mol Microbiol **51**(6): 1691-704.
- Loc Carrillo, C., R. J. Atterbury, et al. (2005). "Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens." Appl Environ Microbiol **71**(11): 6554-63.
- Loessner, M. J. (2005). "Bacteriophage endolysins--current state of research and applications." Curr Opin Microbiol **8**(4): 480-7.
- Logan, S. M. (2006). "Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire?" Microbiology **152**(Pt 5): 1249-62.
- Loo, V. G., L. Poirier, et al. (2005). "A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality." N Engl J Med **353**(23): 2442-9.
- Lopes, A., J. Amarir-Bouhram, et al. (2010). "Detection of novel recombinases in bacteriophage genomes unveils Rad52, Rad51 and Gp2.5 remote homologs." Nucleic Acids Res.
- Lukashin, A. and M. Borodovski (1998). "GeneMark.hmm: new solutions for gene finding." Nucl. Acids Res. **26**(4): 1107-15.
- Lyras, D., J. R. O'Connor, et al. (2009). "Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*." Nature **458**(7242): 1176-9.
- Lyzen, R., M. Kochanowska, et al. (2008). "IHF- and SeqA-binding sites, present in plasmid cloning vectors, may significantly influence activities of promoters." Plasmid **60**(2): 125-30.
- Maiques, E., C. Ubeda, et al. (2006). "beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **188**(7): 2726-9.
- Mandilara, G. D., E. M. Smeti, et al. (2006). "Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge." FEMS Microbiol Lett **263**(1): 119-26.

- Marston, A. L. and J. Errington (1999). "Dynamic movement of the ParA-like Soj protein of *B. subtilis* and its dual role in nucleoid organization and developmental regulation." Mol Cell **4**(5): 673-82.
- Martinez, B., J. M. Obeso, et al. (2008). "Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*." Int J Food Microbiol **122**(3): 253-8.
- Matamouros, S., P. England, et al. (2007). "*Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC." Mol Microbiol **64**(5): 1274-88.
- Matsushiro, A., K. Sato, et al. (1999). "Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin." J Bacteriol **181**(7): 2257-60.
- Matte, I., D. Lane, et al. (2009). "Antiapoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-XL inhibit *Clostridium difficile* toxin A-induced cell death in human epithelial cells." Infect Immun **77**(12): 5400-10.
- Mayer, M. J., A. Narbad, et al. (2008). "Molecular characterization of a *Clostridium difficile* bacteriophage and its cloned biologically active endolysin." J Bacteriol **190**(20): 6734-40.
- Mc Grath, S. and D. Van Sinderen, Eds. (2007). Bacteriophage: genetics and molecular biology. Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- McFarland, L. V. (2009). "Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections--epidemiology and current treatment strategies." Curr Opin Gastroenterol **25**(1): 24-35.
- McLaughlin, M. R., M. F. Balaa, et al. (2006). "Isolation of *salmonella* bacteriophages from swine effluent lagoons." J Environ Qual **35**(2): 522-8.
- McMaster-Baxter, N. L. and D. M. Musher (2007). "*Clostridium difficile*: recent epidemiologic findings and advances in therapy." Pharmacotherapy **27**(7): 1029-39.
- Merrigan, M. M., S. P. Sambol, et al. (2009). "New approach to the management of *Clostridium difficile* infection: colonisation with non-toxigenic *C. difficile* during daily ampicillin or ceftriaxone administration." Int J Antimicrob Agents **33 Suppl 1**: S46-50.
- Meyer, G. K., A. Neetz, et al. (2007). "*Clostridium difficile* toxins A and B directly stimulate human mast cells." Infect Immun **75**(8): 3868-76.
- Mulhbacher, J., E. Brouillette, et al. (2010). "Novel riboswitch ligand analogs as selective inhibitors of guanine-related metabolic pathways." PLoS Pathog **6**(4): e1000865.

- Myers, G. S., D. A. Rasko, et al. (2006). "Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*." Genome Res **16**(8): 1031-40.
- Nagiec, M. J., B. Lei, et al. (2004). "Analysis of a novel prophage-encoded group A *Streptococcus* extracellular phospholipase A(2)." J Biol Chem **279**(44): 45909-18.
- Noren, T., I. Alriksson, et al. (2009). "In vitro susceptibility to 17 antimicrobials among clinical *Clostridium difficile* isolates collected 1993 - 2007 in Sweden." Clin Microbiol Infect.
- Oliver, K. M., P. H. Degnan, et al. (2009). "Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism." Science **325**(5943): 992-4.
- Oppenheim, A. B., O. Kobiler, et al. (2005). "Switches in bacteriophage lambda development." Annu Rev Genet **39**: 409-29.
- Parkes, G. C., J. D. Sanderson, et al. (2009). "The mechanisms and efficacy of probiotics in the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea." Lancet Infect Dis **9**(4): 237-44.
- Parua, P. K., A. Mondal, et al. "HflD, an *Escherichia coli* protein involved in the lambda lysis-lysogeny switch, impairs transcription activation by lambdaCII." Arch Biochem Biophys **493**(2): 175-83.
- Pelaez, T., E. Cercenado, et al. (2008). "Metronidazole resistance in *Clostridium difficile* is heterogeneous." J Clin Microbiol **46**(9): 3028-32.
- Pepin, J., L. Valiquette, et al. (2004). "*Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity." CMAJ **171**(5): 466-72.
- Petrinca, A. R., D. Donia, et al. (2009). "Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants." J Appl Microbiol **106**(5): 1608-17.
- Plisson, C., H. E. White, et al. (2007). "Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection." EMBO J **26**(15): 3720-8.
- Puig, M., S. Pina, et al. (2000). "Description of a DNA amplification procedure for the detection of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* HSP40 in environmental samples." J Virol Methods **89**(1-2): 159-66.

- Pukatcki, S., A. T. Ma, et al. (2007). "Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15508-13.
- Radman-Livaja, M., T. Biswas, et al. (2006). "DNA arms do the legwork to ensure the directionality of lambda site-specific recombination." Curr Opin Struct Biol **16**(1): 42-50.
- Raya, R. R. and M. H'Bert E (2009). "Isolation of Phage via Induction of Lysogens." Methods Mol Biol **501**: 23-32.
- Razavi, B., A. Apisarnthanarak, et al. (2007). "*Clostridium difficile*: emergence of hypervirulence and fluoroquinolone resistance." Infection **35**(5): 300-7.
- Rice, S. A., C. H. Tan, et al. (2009). "The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage." ISME J **3**(3): 271-82.
- Roberts, A. P. and P. Mullany (2009). "A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements." Trends Microbiol **17**(6): 251-8.
- Rupnik, M., M. H. Wilcox, et al. (2009). "*Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis." Nat Rev Microbiol **7**(7): 526-36.
- Rutherford, K., J. Parkhill, et al. (2000). "Artemis: sequence visualization and annotation." Bioinformatics **16**(10): 944-5.
- Sambol, S. P., M. M. Merrigan, et al. (2000). "Toxin gene analysis of a variant strain of *Clostridium difficile* that causes human clinical disease." Infect Immun **68**(10): 5480-7.
- Sambol, S. P., M. M. Merrigan, et al. (2002). "Colonization for the prevention of *Clostridium difficile* disease in hamsters." J Infect Dis **186**(12): 1781-9.
- Sambrook, J. and D. W. Russell, Eds. (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. NY, USA, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawstrom, C., J. Lisle, et al. (2008). "Bacteriophage in polar inland waters." Extremophiles **12**(2): 167-75.
- Schallehn, G. (1985). "*Clostridium sordellii* bacteriophage active on *Clostridium difficile*." Lett Appl Microbiol **1**: 71-74.



- Schwan, C., B. Stecher, et al. (2009). "*Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria." PLoS Pathog **5**(10): e1000626.
- Sciara, G., C. Bebeacua, et al. (2010). "Structure of lactococcal phage p2 baseplate and its mechanism of activation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(15): 6852-7.
- Sebaihia, M., B. W. Wren, et al. (2006). "The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome." Nat Genet **38**(7): 779-86.
- Sekulovic, O., M. Meessen-Pinard, et al. (Soumis). "Prophage-stimulated toxin production in *Clostridium difficile* NAP1/027 lysogens." J Bacteriol.
- Shedlock, D. J. and D. B. Weiner (2000). "DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity." J Leukoc Biol **68**(6): 793-806.
- Shimizu, T., Y. Ohta, et al. (2009). "Shiga toxin 2 is specifically released from bacterial cells by two different mechanisms." Infect Immun **77**(7): 2813-23.
- Shubeita, H. E., J. F. Sambrook, et al. (1987). "Molecular cloning and analysis of functional cDNA and genomic clones encoding bovine cellular retinoic acid-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5645-9.
- Sorg, J. A. and A. L. Sonenshein (2008). "Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores." J Bacteriol **190**(7): 2505-12.
- St-Pierre, F. and D. Endy (2008). "Determination of cell fate selection during phage lambda infection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20705-10.
- Stabler, R. A., M. He, et al. (2009). "Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* 027 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium." Genome Biol **10**(9): R102.
- Staden, R., K. F. Beal, et al. (2000). "The staden package, 1998." Methods Mol Biol **132**: 115-30.
- Sudarsan, N., E. R. Lee, et al. (2008). "Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP." Science **321**(5887): 411-3.
- Sunenshine, R. H. and L. C. McDonald (2006). "*Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen." Cleve Clin J Med **73**(2): 187-97.
- Suttle, C. A. (2005). "Viruses in the sea." Nature **437**(7057): 356-61.

- Tan, K. S., B. Y. Wee, et al. (2001). "Evidence for holin function of tcdE gene in the pathogenicity of *Clostridium difficile*." J Med Microbiol **50**(7): 613-9.
- Tanner, H. E., K. J. Hardy, et al. (2010). "Coexistence of Multiple Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Subtypes of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 027 Strains within Fecal Specimens." J Clin Microbiol **48**(3): 985-7.
- Tasteyre, A., T. Karjalainen, et al. (2000). "Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (fliC) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups." J Clin Microbiol **38**(9): 3179-86.
- Tasteyre, A., T. Karjalainen, et al. (2001). "Molecular characterization of fliD gene encoding flagellar cap and its expression among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups." J Clin Microbiol **39**(3): 1178-83.
- Terhes, G., E. Urban, et al. (2009). "First isolation of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 from a patient with severe persistent diarrhoea in Hungary." Clin Microbiol Infect **15**(9): 885-6.
- Tetart, F., C. Desplats, et al. (1998). "Genome plasticity in the distal tail fiber locus of the T-even bacteriophage: recombination between conserved motifs swaps adhesin specificity." J Mol Biol **282**(3): 543-56.
- Thurber, R. V. (2009). "Current insights into phage biodiversity and biogeography." Curr Opin Microbiol **12**(5): 582-7.
- Tomasz, M. (1995). "Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)." Chem Biol **2**(9): 575-9.
- Twine, S. M., C. W. Reid, et al. (2009). "Motility and flagellar glycosylation in *Clostridium difficile*." J Bacteriol **191**(22): 7050-62.
- Valiquette, L., B. Cossette, et al. (2007). "Impact of a reduction in the use of high-risk antibiotics on the course of an epidemic of *Clostridium difficile*-associated disease caused by the hypervirulent NAP1/027 strain." Clin Infect Dis **45 Suppl 2**: S112-21.
- van den Berg, R. J., H. A. Ameen, et al. (2005). "Coexistence of multiple PCR-ribotype strains of *Clostridium difficile* in faecal samples limits epidemiological studies." J Med Microbiol **54**(Pt 2): 173-9.
- van Regenmortel, M. H., M. A. Mayo, et al. (2000). "Virus nomenclature: consensus versus chaos." Arch Virol **145**(10): 2227-32.

- Viswanathan, V. K., K. Hodges, et al. (2009). "Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea." Nat Rev Microbiol 7(2): 110-9.
- Voth, D. E. and J. D. Ballard (2005). "*Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease." Clin Microbiol Rev 18(2): 247-63.
- Wagner, P. L., J. Livny, et al. (2002). "Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*." Mol Microbiol 44(4): 957-70.
- Waldor, M. K., D. I. Friedman, et al., Eds. (2005). Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology. Washington, DC, ASM Press.
- Weinbauer, M. G. (2004). "Ecology of prokaryotic viruses." FEMS Microbiol Rev 28(2): 127-81.
- Weiss, K., L. Bergeron, et al. (2007). "*Clostridium difficile*-associated diarrhoea rates and global antibiotic consumption in five Quebec institutions from 2001 to 2004." Int J Antimicrob Agents 30(4): 309-14.
- Zdobnov, E. M. and R. Apweiler (2001). "InterProScan--an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro." Bioinformatics 17(9): 847-8.
- Zemb, O., L. Urios, et al. (2008). "Efficient method to isolate and purify viruses of bacteria from marine environments." Lett Appl Microbiol 47(1): 41-5.
- Zheng, Y., D. K. Struck, et al. (2008). "Evolutionary dominance of holin lysis systems derives from superior genetic malleability." Microbiology 154(Pt 6): 1710-8.

ANNEXE A

Carte du vecteur utilisé pBS II KS

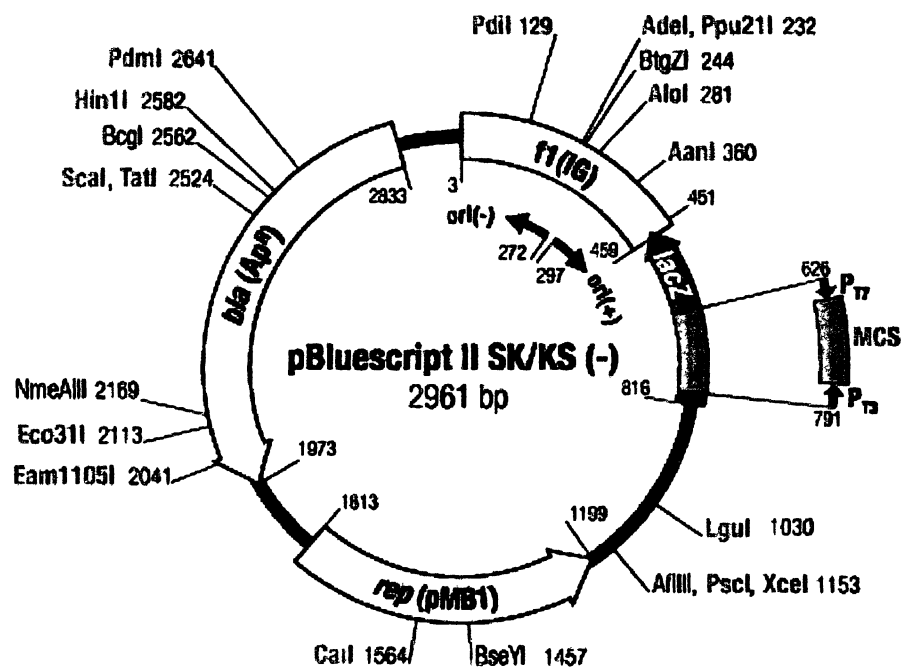


Figure A1. Carte du vecteur pBS II KS (+/-)

## ANNEXE B

### Liste de facteurs de virulence encodés par des phages tempérés

Tableau A1. Liste de facteurs de virulence encodés par des phages tempérés

Protein	Gene	Phage	Bacterial host
<b>Extracellular toxins</b>			
Diphtheria toxin	<i>tox</i>	β-Phage	<i>C diphtheriae</i>
Neurotoxin	<i>C1</i>	Phage C1	<i>C botulinum</i>
Shiga toxins	<i>stx1, stx2</i>	H-19B	<i>E coli</i>
Enterohaemolysin	<i>hly2</i>	φFC3208	<i>E coli</i>
Cytotoxin	<i>ctx</i>	φCTX	<i>P aeruginosa</i>
Enterotoxin	<i>see, sel</i>	NA	<i>S aureus</i>
Enterotoxin P	<i>sep</i>	φN315	<i>S aureus</i>
Enterotoxin A	<i>entA</i>	φ13	<i>S aureus</i>
Enterotoxin A	<i>sea</i>	φMu50A	<i>S aureus</i>
Exfoliative toxin A	<i>eta</i>	φETA	<i>S aureus</i>
Toxin type A	<i>speA</i>	T12	<i>S pyogenes</i>
Toxin type C	<i>speC</i>	CS112	<i>S pyogenes</i>
Cholera toxin	<i>ctxAB</i>	CTXφ	<i>V cholerae</i>
Leukocidin	<i>pvl</i>	φPVL	<i>S aureus</i>
Superantigens	<i>speA1, speA3, speC, spe1, speH, speM, speL, speK, ssa</i>	8232 1	<i>S pyogenes</i>
Cytolethal distending toxin	<i>cdt</i>	Unnamed	<i>E coli</i>
<b>Proteins altering antigenicity</b>			
Membrane proteins	Mu-like	Pnm1	<i>N meningitidis</i>
Glucosylation	<i>rfb</i>	ε <sup>14</sup>	<i>S entenca</i>
Glucosylation	<i>gtr</i>	P22	<i>S entenca</i>
O-antigen acetylase	<i>oac</i>	Sf6	<i>S flexneri</i>
Glucosyl transferase	<i>gtrII</i>	SfII, Sfv, Sfx	<i>S flexneri</i>
<b>Effector proteins involved in invasion</b>			
Type III effector	<i>sopE</i>	SopEφ	<i>S entenca</i>
Type III effector	<i>sse1 (gtgB)</i>	GIFSY 2	<i>S entenca</i>
Type III effector	<i>sspH1</i>	GIFSY-3	<i>S entenca</i>
<b>Enzymes</b>			
Superoxide dismutase	<i>sodC</i>	Sp4, 10	<i>E coli</i> O157
Superoxide dismutase	<i>sodC-I</i>	GIFSY-2	<i>S entenca</i>
Superoxide dismutase	<i>sodC-III</i>	Fels-1	<i>S entenca</i>
Neuraminidase	<i>nanH</i>	Fels-1	<i>S entenca</i>
Hyaluronidase	<i>hylP</i>	H4489A	<i>S pyogenes</i>
Leukocidin	<i>pvl</i>	φPVL	<i>S aureus</i>
Staphylokinase	<i>sak</i>	φ13	<i>S aureus</i>
Phospholipase	<i>sla</i>	315 4	<i>S pyogenes</i>
DNase/streptodornase	<i>sdn, sda</i>	315 6, 8232 5	<i>S pyogenes</i>
<b>Serum resistance</b>			
OMP <sup>a</sup>	<i>bor</i>	λ	<i>E coli</i>
OMP	<i>eib</i>	λ-like	<i>E coli</i>
<b>Adhesions for bacterial host attachment</b>			
Vir	<i>vir</i>	MAV1	<i>M arthritidis</i>
Phage coat proteins	<i>pbLA, pbLB</i>	SM1	<i>S muts</i>
<b>Others</b>			
Mitogenic factors	<i>mf2, mf3, mf4</i>	370 1, 370 3, 315 3	<i>S pyogenes</i>
Mitogenic factor	<i>toxA</i>	Unnamed	<i>P multocida</i>
Mitogenic factor	Unnamed	phisc 1	<i>S canis</i>
Virulence	<i>gigE</i>	GIFSY 2	<i>S entenca</i>
Antivirulence	<i>grvA</i>	GIFSY 2, Fels-1	<i>S entenca</i>

Brussow H et al, 2004, Microbiol Mol Biol Rev.