****

**Chapitre 3 : Principes de base des phages**

**Les phages sont des virus**

Les bactériophages (également appelés phages) sont des virus qui infectent les hôtes bactériens et ont des propriétés communes à tous les virus. Premièrement, ils sont incapables de se répliquer par eux-mêmes. Ils ont besoin d'un hôte bactérien pour se reproduire, tirant parti de la machinerie cellulaire de l'hôte et le redirigeant vers la reproduction virale. Deuxièmement, comme tous les virus, les phages sont spécifiques à des hôtes particuliers. La gamme d'hôtes peut être limitée à une seule souche bactérienne, ou elle peut s'étendre à différentes espèces bactériennes, voire même à différents genres. Cependant, il y a peu de phages, voire aucun, qui peuvent infecter une gamme d'hôtes provenant de différents ordres bactériens. Encore moins probable est l’existence de phages qui infectent des hôtes provenant de différents embranchements.

**Le monde des bactériophages**

Les particules de bactériophages constituent la majorité de toutes les entités biologiques de la biosphère. La population mondiale de phages est non seulement vaste (environ 1031 particules) mais aussi très dynamique et très ancienne. Elle est également très diversifiée sur le plan génétique. Nous avons une compréhension détaillée de quelques phages, mais dans l’ensemble, nos connaissances des populations de phages demeurent obscures. Ainsi, trois questions générales sur les phages émergent : que sont-ils ? comment sont-ils apparentés entres eux ? comment ont-ils ? Explorer leur diversité virale et les mécanismes évolutifs à l'origine de cette diversité sont les enjeux scientifiques centraux du programme SEA-PHAGES.

**Cent ans bien comptés**

Les bactériophages ont été découverts il y a environ 100 ans (1915–1917), et deux des principaux contributeurs à cette découverte étaient Frederick Twort et Félix D’Hérelle. D'autres peuvent avoir observé un comportement bactériophage avant cela, et même Twort n'a pas pleinement reconnu la nature des propriétés virales dont il a été témoin. D’Hérelle a caractérisé la nature particulaire des bactériophages en partie grâce à la technique des plages de lyse qu’il a mis au point et qui est encore largement utilisée aujourd’hui.

Ce test fournit un moyen simple de visualiser la présence de particules de phage dans un échantillon. En bref, une seule particule de phage présente dans une couche mince, ou « tapis », de bactéries qui poussent dans une boîte de Pétri peut se propager dans les bactéries environnantes pour former une zone clarifiée, appelée plage de lyse (Figure 3.0-1). En bref, une plage de lyse est causée par la destruction des cellules bactériennes par des particules de phages. La formation de plages de lyse nécessite plusieurs cycles d'infection et de croissance des phages, et chaque plage peut contenir 108 particules ou plus au moment où les cellules bactériennes ont formé un tapis confluent. Ces premières études D’Hérelle et de ses collègues étaient abstraites mais solides sur le plan expérimental et, à la fin des années 40, les morphologies de divers types de phages ont finalement été visualisées avec l’invention du microscope électronique.

|  |
| --- |
| [https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%203_0_1%20(1).jpg](https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%203_0_1%20(1).jpg?width=750&height=726) |
| Figure 3.0-1. Tapis bactérien avec des plages de lyse visibles. |

**Simple et élégant**

Les particules de bactériophages se présentent sous de nombreuses formes et tailles, mais la majorité sont des virus à queue contenant des génomes d'ADN double brin (ADNdb) (l'ordre des Caudovirales). Dans ces phages, le génome d’ADN linéaire est contenu dans une coquille protéique (la tête ou la capside), qui est attachée à une queue (Figure 3.0-2). Les phages appartenant à d'autres ordres peuvent avoir de l'ADN simple brin (ADNsb) ou de l'ARN, et peuvent être enveloppés d'une membrane lipidique, avoir un ou plusieurs chromosomes ou avoir une variété d'autres configurations. Les phages peuvent n’avoir que quelques gènes ou plus de 500, mais les phages à queue d'ADNdb ont généralement entre 50 à 250 gènes. (Notez que c'est beaucoup moins que leurs hôtes bactériens, qui peuvent avoir plus de 6 000 gènes.)

|  |
| --- |
| C:\Users\vtrembl2\Desktop\Traduction Phages\Images icones\phages a queue.png |
| Figure 3.0-2. Structure d’un phage. Les phages sont composés d'une tête, d'une queue, et de fibres caudales utilisées pour l’arrimage aux cellules hôtes. |

**Manger des bactéries ?**

Le terme « bactériophage » a été inventé à partir du mot grec phaegin (φαγεῖν), qui signifie « manger », car les phages semblent « manger » les bactéries lorsqu'ils les infectent. Ce n'est pas tout à fait le cas, bien que de nombreux phages réutilisent et recyclent les composants cellulaires et les utilisent pour se répliquer. Typiquement, l'infection d'une seule cellule bactérienne par un seul phage entraîne la génération de nombreuses particules de phages descendantes. Cela s'accompagne d'une rupture complète de l'intégrité cellulaire de la bactérie, appelée lyse, qui libère les nouveaux phages afin qu'ils puissent se disperser et trouver de nouvelles cellules à infecter. Le processus par lequel un phage génère de nouvelles particules de phages via l'infection et la lyse de la cellule hôte est appelé cycle lytique et est expliqué plus en détail ci-dessous.

**Cycle lytique des bactériophages**

Le processus de croissance lytique peut être décomposé en plusieurs phases (voir Figure 3.0-3). La première phase est l'adsorption, dans laquelle le phage reconnaît la cellule hôte bactérienne et se fixe à sa surface à l'aide de ses fibres caudales. Ensuite, l'ADN du phage est injecté dans la cellule hôte tandis que la structure protéique du phage (tête et queue) reste attachée à l'extérieur de la cellule. L'ADN du phage passe de la tête, à travers la queue, et à travers la paroi cellulaire et la membrane cellulaire de l'hôte dans le cytoplasme. Une fois que l'ADN du phage linéaire est complètement entré dans le cytoplasme, il se circularise pour éviter les défenses de la cellule hôte contre l'ADN linéaire.

|  |
| --- |
| C:\Users\vtrembl2\Desktop\Traduction Phages\Images icones\Cycle lytique.png |
| Figure 3.0-3. Le cycle de vie lytique du phage. (1) Un phage se fixe et s'adsorbe sur une cellule hôte à l'aide de ses fibres caudales et injecte son chromosome linéaire dans la bactérie. (2) Le chromosome du phage se circularise à l'intérieur de la cellule hôte. (3) L'ADN du phage est répliqué. (4) Des têtes et des queues de phage sont produites. (5) De nouveaux virions sont assemblés. (6) La cellule hôte bactérienne est lysée et les nouveaux virions libérés. |

Une fois que l'acide nucléique du phage atteint le cytoplasme, l'expression de certains des gènes du phage commence. Dans certains phages, cela peut même se produire avant que le génome ne soit complètement entré dans la cellule ! Ces gènes qui sont transcrits et traduits en premier (voir « Aperçu : Introduction à la bioinformatique » pour une description détaillée de ces processus) sont appelés gènes « précoces ». Les protéines exprimées à partir de gènes précoces peuvent inclure des polymérases nécessaires à la réplication de l'ADN du phage, des facteurs de transcription nécessaires à l'expression d'autres gènes phagiques et des enzymes qui dégradent l'ADN de la cellule hôte.

Suite à l'expression précoce des gènes, un nouvel ensemble de gènes phagiques est exprimé. Ceux-ci sont connus comme des gènes « tardifs ». Les produits des gènes tardifs incluent les protéines structurales qui composent les nouvelles particules de phages, ou virions. La composition protéique de chaque particule de phage comprend environ 20 types de protéines différents, dont chacun est incorporé dans la particule de virion dans un ordre et un nombre de copies spécifiques. Le nombre de copies est le nombre total de molécules de la même protéine trouvées dans une seule particule de virion. Les protéines de capside ont un nombre de copies très élevé. Un phage dont la taille du génome est de 50 kb aura environ 400 copies de la protéine de capside par tête, tandis que le nombre de copies de la protéine des fibres caudales peut être assez faible, de l’ordre de 3 à 18 par queue. Habituellement, les têtes et les queues de phages sont assemblées en sous-structures distinctes, puis l'ADN est emballé dans les têtes, et les queues sont attachées (Figure 3.0-3). Enfin, la lyse cellulaire se produit lorsque les enzymes codées par les phages dégradent la paroi cellulaire et que la membrane cellulaire se brise. Une seule cellule infectée peut produire 100 particules de phage ou plus lors de la lyse, un paramètre défini comme la « taille de la progéniture » du phage (« burst size » en anglais).

**Phages virulents et phages tempérés**

Les phages virulents (également appelés phages lytiques) sont ceux qui utilisent uniquement le cycle lytique, pour se reproduire. Cependant, certains phages ont la possibilité de choisir un cycle de vie différent – le cycle lysogénique. Ces phages sont appelés phages tempérés. Les phages tempérés diffèrent des phages lytiques en ce que, après l'injection de l'ADN, il existe deux options possibles pour la suite de l'infection (Figure 3.0-4). Dans environ 80 à 90% des cas, lors de l’infection d’une cellule, le phage passera par le cycle lytique et créera de nombreux phages descendants. Cependant, dans 10 à 20% des infections, le phage entrera dans le cycle lysogène (Figure 3.0-5). Dans le cycle lysogénique, les gènes nécessaires au cycle lytique sont réprimés, plutôt qu'exprimés, et le génome du phage est maintenu de manière stable dans la cellule, même à travers de nombreuses générations ultérieures de division cellulaire. Le génome du phage dans la cellule est appelé un prophage, et une cellule qui porte un prophage est appelée un lysogène. Un mécanisme commun utilisé par un prophage pour assurer sa stabilité est l'intégration dans le chromosome hôte par un processus connu sous le nom de recombinaison homologue.

|  |
| --- |
| C:\Users\vtrembl2\Desktop\Traduction Phages\Images icones\Cycles French.png |
| Figure 3.0-4. Décision d'un phage tempéré. Après l'injection de son ADN dans une cellule hôte, un phage tempéré peut entrer dans le cycle lytique ou devenir un prophage (représenté en rouge) et réprimer ses fonctions lytiques. Cette décision est contrôlée par un ensemble de gènes et de séquences régulatrices appelés collectivement « interrupteur génétique » (« genetic switch » en anglais). |

Une fois intégré, le prophage est répliqué par les ADN polymérases de l'hôte et transmis aux deux cellules filles pendant la division cellulaire normale. Dans certains phages tempérés, le prophage ne s'intègre pas dans le génome hôte mais est plutôt établi comme un grand plasmide extrachromosomique. Ces prophages codent et expriment plusieurs protéines de « partition » qui garantissent que chaque cellule fille reçoit une copie du plasmide prophage.

|  |
| --- |
| C:\Users\vtrembl2\Desktop\Traduction Phages\Images icones\LYSE .png |
| Figure 3.0-5. Cycle de vie d'un phage tempéré. (1) Un phage s'attache à une bactérie hôte à l'aide de ses fibres caudales et injecte son chromosome linéaire. (2) Le chromosome du phage se circularise et il est, soit maintenu dans l'hôte sous forme de prophage (montré ici intégré dans le chromosome bactérien en rouge), soit entre dans le cycle lytique. L'expression des gènes lytiques est empêchée par l'expression constante d’un répresseur (favorisant l’immunité contre son propre phage) (représentée sous forme de rectangles jaunes). Lorsque le lysogène est stressé, le prophage peut s'exciser et commencer le cycle lytique. (3) L'ADN du phage est répliqué. (4) De nouvelles queues et capsides sont produites. (5) De nouveaux virions sont assemblés. (6) La cellule bactérienne est lysée et les nouveaux virions sont libérés. |

En laboratoire, il est parfois possible de distinguer les phages lytiques des phages tempérés en examinant les différences d'apparence des plages de lyse formées par les phages sur les tapis bactériens. Les phages lytiques forment des plages claires (Figure 3.0-6 A) à la suite de l'infection et de la mort des cellules bactériennes. En revanche, les phages tempérés forment des plages troubles, moins bien définies (Figure 3.0-6 B) qui contiennent un mélange de cellules tuées et de lysogènes. Cependant, il est important de noter que d'autres facteurs jouent un rôle dans l'apparence ou la « morphologie » d'une plage, et il existe des phages NON tempérés qui produisent également des plages troubles. De même, les mutants des phages tempérés perdent parfois leur capacité à former des lysogènes et ne produisent que des plages claires. Sans information génomique, il peut être difficile de distinguer toutes ces possibilités. Voir le Chapitre 11 pour des informations plus détaillées.

|  |
| --- |
| [https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%203_0_6%20clear%20vs%20turbid%20copy.jpg](https://dzf8vqv24eqhg.cloudfront.net/userfiles/11001/13941/ckfinder/images/Figure%203_0_6%20clear%20vs%20turbid%20copy.jpg?width=1525&height=748) |
| Figure 3.0-6. Deux morphologies de plages de lyse, l'une claire (A) et l'autre trouble (B). Fréquemment, les phages lytiques produisent des plages claires (comme dans A) tandis que les phages tempérés produisent des plages troubles (comme dans B). Notez que l'apparence ou la « morphologie » de la plage de lyse est influencée par de nombreux facteurs, notamment le type de milieu, le nombre de cellules et de phages présents, et le temps et la température d'incubation. Dans la collection de mycobactériophages, il existe de nombreux exemples de phages qui produisent des plages de lyse qui ne sont pas claires et ne sont pas capables de former des lysogènes. |

Alors que seule une fraction de la population mondiale de phages a été séquencée et examinée, l'analyse génomique de milliers de souches bactériennes hôtes montre que beaucoup portent des prophages. Et certaines souches contiennent simultanément des dizaines de prophages différents, tous intégrés à différents endroits du chromosome. Certains de ces prophages codent pour des toxines ou d'autres gènes qui confèrent une pathogénicité à la bactérie hôte (le choléra en est un bon exemple). Ces preuves suggèrent que le cycle de vie des phages tempérés est peut-être la « norme ».

**Gamme d’hôtes de phages**

La gamme de types bactériens qui peuvent être infectés par un phage particulier constitue la gamme d’hôtes de ce phage. De nombreux phages ont une gamme d'hôtes limitée et ne peuvent infecter qu'une seule souche de bactéries, même à l’intérieur de la même espèce bactérienne. D'autres phages ont de larges gammes d'hôtes et peuvent infecter des bactéries de différentes espèces, voire de différents genres.

Il existe de nombreux facteurs qui influencent la capacité d’un phage particulier à infecter une bactérie spécifique. Ces déterminants de la spécificité de l'hôte comprennent la présence d'un récepteur dans la paroi cellulaire de l'hôte que le phage peut reconnaître et s’y fixer (absorption). Le phage doit également pouvoir interagir avec la machinerie cellulaire de l'hôte, y compris les systèmes de transcription et de traduction de l'hôte. De plus, il est relativement facile pour les phages de modifier leur gamme d'hôtes, parfois avec aussi peu qu'une mutation d’une simple base dans leur séquence génomique. Sans surprise, les mutations menant à la modification de la gamme d’hôtes possibles pour un phage se produisent fréquemment dans certains phages (aussi souvent que 1 sur 100 000 ou 1 sur 1 000 000 de particules dans un lysat). Il n’existe généralement pas de moyen facile de prédire avec certitude la gamme d’hôtes d’un phage à partir de sa séquence génomique seulement, de sorte que la gamme d’hôtes doit être déterminée expérimentalement.

**La grande guerre**

La population de phages est non seulement vaste mais aussi très dynamique, la population globale totale de phages pouvant se modifier en quelques jours. La relation phage-bactérie implique une pression sélective constante pour que les hôtes bactériens deviennent insensibles à l'infection des phages, ainsi que la nécessité pour les phages de co-évoluer afin qu'ils aient toujours des hôtes capables de soutenir leur réplication. C'est cette lutte, qui dure peut-être depuis plusieurs milliards d'années, qui donne naissance à une population aussi diversifiée. Il existe de nombreuses façons connues par lesquelles les bactéries peuvent devenir insensibles à l'infection, et il existe probablement bien d'autres façons encore à découvrir. Les voies connues comprennent la perte ou l'altération du récepteur de l'hôte, les systèmes de restriction-modification de l'hôte, l'immunité de surinfection, les systèmes CRISPR et l'exclusion de surface. Il existe également de nombreux exemples de systèmes d'infection avortée dans lesquels une cellule hôte bactérienne se sacrifie pour empêcher une particule de phage de se reproduire, épargnant ainsi d'autres cellules bactériennes à proximité. Ceux-ci sont décrits plus en détail ci-dessous et au Chapitre 11.

**Mécanismes d'insensibilité : immunité, exclusion et résistance**

*Immunité et exclusion*

L'immunité de surinfection fait référence à la capacité d'un lysogène à résister à l'infection d'un phage envahisseur en réprimant les gènes lytiques de l'envahisseur. La capacité d’un lysogène à résister à l’infection passe par trois processus : l’expression constitutive de la protéine répressive de l’immunité du prophage, sa liaison subséquente à l’ADN du prophage et la répression de la transcription des gènes lytiques. La protéine du répresseur d'immunité peut également se lier à l'ADN des phages qui tentent d'infecter le lysogène (« surinfection ») et réprimer l'expression des gènes lytiques de l'ADN injecté de l'envahisseur, accordant au lysogène une « immunité ».

En plus de l'immunité de surinfection médiée par le répresseur, un prophage dans une cellule hôte peut conférer une insensibilité à l'infection phagique par exclusion. L'**exclusion** fait référence aux protéines codées et exprimées par le prophage qui modifient la surface de la cellule hôte de telle manière que d'autres phages sont « exclus », ne pouvant s'absorber sur l’hôte et injecter leur ADN.

*Résistance*

La résistance bactérienne à l'infection phagique décrit l'insensibilité d'une cellule hôte à l'infection due à une mutation ou à une perte du récepteur phagique, ou par l'action d'un ou plusieurs systèmes de défense bactérienne. Les systèmes les mieux caractérisés sont la restriction, l'infection avortée et le CRISPR, cependant, il y en a probablement encore beaucoup d'autres à découvrir.

Les systèmes de restriction bactériens ont d'abord été découverts par l'observation qu'un phage particulier était « restreint » à infecter une souche apparentée de son hôte préféré. Après investigation, il a été découvert que l'hôte codait pour une endonucléase qui coupait l'ADN double brin à une séquence de paires de bases spécifique. L'ADN de l'hôte est protégé de la digestion au niveau de ces séquences par l'ajout de groupement méthyl à son ADN. Des investigations ultérieures ont révélé qu'il existe un grand nombre de systèmes de restriction différents qui reconnaissent différentes séquences ; chaque système contient à la fois une endonucléase et une enzyme de modification de l'ADN qui reconnaissent la même séquence d'ADN. Typiquement, ces séquences ont une longueur de 4 à 6 pb. Les nucléases ont depuis été appelées « endonucléases de restriction » ou simplement « enzymes de restriction », et sont devenues des outils couramment utilisés dans les laboratoires de biologie moléculaire.

Les mécanismes d'infection abortive permettent aux cellules de se sacrifier délibérément lorsqu'elles sont infectées par un phage. Un exemple est le système toxine-antitoxine. Pendant la croissance cellulaire normale, la toxine et l'antitoxine sont exprimées, et l'antitoxine empêche la toxine de tuer la cellule, généralement en s'y liant et en régulant à la baisse son expression. L'infection par les phages peut entraîner l'arrêt de l'expression des gènes des cellules hôtes, y compris celle de la toxine et de l'antitoxine. Cependant, dans beaucoup de ces systèmes, l'antitoxine est moins stable que la toxine et se dégrade plus rapidement. La dégradation de l'antitoxine libère la toxine et provoque la mort de la cellule. De cette façon, la cellule se sacrifie pour empêcher le phage de se multiplier, épargnant ainsi les autres cellules bactériennes de la population.

Les courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (CRISPR) et leurs protéines Cas (Cas, pour CRISPR-associé) se trouvent dans les génomes procaryotes et sont un moyen de défense contre des phages par le biais de l'immunité acquise. Les régions CRISPR sont constituées de courtes séquences palindromiques (30–40 pb) répétées qui sont séparées par de courts fragments d'ADN appelés « espaceurs » (~ 40 pb). Ces espaceurs d'ADN sont identiques aux courts segments d'ADN présents dans les génomes des bactériophages. Grâce aux actions du système CRISPR-Cas, un hôte peut utiliser la bibliothèque de séquences d'espacement présentes dans le réseau CRISPR pour empêcher l'infection par un bactériophage dont le génome contient l'une de ces séquences. Récemment, les systèmes CRISPR-Cas ont été utilisés pour éditer facilement et spécifiquement des séquences de gènes eucaryotes et procaryotes. Par conséquent, ils ont un énorme potentiel en tant qu'outils moléculaires dans des domaines tels que la santé humaine et la production alimentaire.

Les génomes de prophages peuvent également porter des systèmes de restriction, des gènes toxine-antitoxine, des gènes d'exclusion et même des systèmes CRISPR. Parce que les phages doivent également contrecarrer des mécanismes de résistance, ils peuvent coder des gènes antirestriction et des gènes anti-CRISPR, entre autres.

**L’origine des phages**

Lorsque nous comparons les génomes de deux phages qui infectent des hôtes bactériens phylogénétiquement éloignés, nous constatons qu'ils partagent généralement peu ou pas de séquences communes. Alors que davantage de génomes de phages sont séquencés, les connexions génétiques entre les phages commencent à émerger, ce qui suggère que les phages ont partagé un pool génétique commun, mais en ont eu un accès inégal. Mais notre connaissance de la génomique des phages reste limitée. Actuellement (à l'été 2016), seules les séquences d'environ 2 000 génomes de phages d'ADNdb sont disponibles. Le nombre de 50 000 génomes bactériens déjà séquencés éclipse largement celui des phages.

Néanmoins, les connexions génétiques entre les phages peuvent être élucidées en approfondissant nos connaissances sur les phages qui infectent des hôtes particuliers et en étendant ces connaissances à des hôtes phylogénétiquement proximaux. C'est la stratégie employée par le programme SEA-PHAGES, qui a particulièrement approfondi l’étude des phages qui infectent *Mycobacterium smegmatis* mc2155 et explore actuellement les phages d'autres hôtes au sein de l’embranchement des Actinobactéries.

**A quoi cela sert-il ?**

Les bactériophages ont joué un rôle central dans ce que nous savons aujourd'hui des bases fondamentales de la biologie moléculaire. Parce que les bactériophages sont simples, structurellement et génétiquement, et se multiplient rapidement en un grand nombre, les mutants avec des phénotypes spécifiques peuvent être isolés, schématisés et caractérisés. Ensuite, en utilisant la puissance impressionnante de la génétique des phages, nous pouvons aborder des questions fondamentales sur la structure, l'organisation, la régulation et la fonction des gènes. Cette grande diversité génétique des bactériophages représente un répertoire infini de nouvelles fonctions et nouvelles perspectives intéressantes et utiles à découvrir.

Les phages ont de nombreuses applications potentielles, soit en tant que particules entières, soit pour ce que leur composante génétique peut nous apprendre et nous apporter. Par exemple, l'utilisation thérapeutique des phages – qui a captivée l'imagination des scientifiques au cours des 95 dernières années environ – demeure un domaine d'intérêt, en particulier à la lumière de l'émergence de la résistance aux antibiotiques parmi les agents pathogènes bactériens. Les phages se sont également révélés utiles pour le diagnostic de maladies, depuis les premières études sur le typage des phages (en utilisant les gammes d'hôtes de phages pour identifier les isolats cliniques) jusqu'à l'utilisation de phages rapporteurs pour des tests rapides de sensibilité d’échantillons cliniques aux médicaments. L'utilisation d'outils dérivés de phages en génétique bactérienne est également extensive, notamment dans le développement de vecteurs, d'ordinateurs microbiens, de la construction de mutants et la livraison de transposons.

**Droit devant**

La population de phages est grande (1031 particules) et sa diversité génétique est énorme. Avec seulement environ 2 x 103 génomes séquencés à ce jour, nous n'avons pas encore fait de progrès significatifs dans la définition de la diversité virale. Et en raison de sa grande nouveauté génétique et d’un nombre énorme de génomes disponibles, la population de phages abrite le plus grand réservoir d'informations génétiques encore non découvertes de la biosphère. L'élucidation des fonctions de tous ces gènes encore à découvrir demeure un défi de taille, mais le potentiel de progrès en biotechnologie et en médecine est incontestable. Mettez-vous au travail !