



Exploitation du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P. aeruginosa*

Vanessa Magin

► To cite this version:

Vanessa Magin. Exploitation du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P. aeruginosa*. Ingénierie de l'environnement. Ecole nationale supérieure Mines-Télécom Atlantique, 2019. Français. NNT : 2019IMTA0146 . tel-02391184

HAL Id: tel-02391184

<https://theses.hal.science/tel-02391184>

Submitted on 3 Dec 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'ÉCOLE NATIONALE SUPERIEURE MINES-TELECOM ATLANTIQUE
BRETAGNE PAYS DE LA LOIRE - IMT ATLANTIQUE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 602
Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité : Génie des Procédés et Bioprocédés

Par **Vanessa MAGIN**

Exploration du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P.aeruginosa*

Thèse présentée et soutenue à Nantes le 6 Septembre 2019

Unité de recherche : GEPEA UMR CNRS 6144

Thèse N° : 2019IMTA0146

Rapporteurs avant soutenance :

Didier Hocquet	Professeur, Université de Franche-Comté
Djamel Drider	Professeur, Institut Charles Violette, Université de Lille

Composition du Jury :

Président :	Pierre Le Cann Professeur, Ecole des Hautes Etudes en Santé Publique, Rennes
Examineurs :	Nathalie van der Mee-Marquet, Hygiéniste, UMR 1282 Infectiologie Santé Publique, CHR de Tours
	Didier Hocquet, Professeur, Université de Franche-Comté
	Djamel Drider, Professeur, Institut Charles Violette, Université de Lille
Dir. de thèse :	Yves Andrès
Encadrante :	Nathalie Garrec
	Professeur, CNRS, Institut des Mines-Télécom Atlantique, Nantes
	Ingénieure Recherche et expertise, CSTB, Nantes

REMERCIEMENTS

« La valeur d'une personne se mesure non pas à la quantité de ses actes mais
au degré d'amour et de persévérance qu'elle met pour les accomplir. »

-Cécile Fortier Keays

« Si tu transformes tes erreurs en leçons et tes peurs en courage,
alors tout est réalisable. »

« Il faut toujours viser la lune car même en cas d'échec, on atterit dans les
étoiles. »

-Oscar wilde

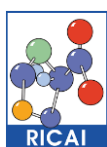
A tous ceux qui m'ont accompagnés de près ou de loin durant ces trois années,
À celui qui est à mes côtés chaque matin,
Et enfin, à la plus brillante des étoiles,

MERCI

PUBLICATION SCIENTIFIQUE

2019 Magin V., Garrec N., Andrès Y., Selection of bacteriophages to control 24h-old biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking and thermal water, *Viruses*, 13 Aout 2019.

POSTERS



2017 Magin V., Andrès Y., Garrec N., Infections associées aux soins, Bactériophages anti-*Pseudomonas aeruginosa*: Une stratégie complémentaire pour le traitement des points d'eau ? **RICAï 2017**, 37^{ème} Réunion interdisciplinaire de Chimiothérapie anti infectieuse, Palais des Congrès, Paris.



2017 Magin V., Andrès Y., *Pseudomonas aeruginosa* phages to disinfect plumbing materials and surfaces in contact with drinking and thermal water, **Meeting Phages sur Yvette**, Gif sur Yvette.

COMMUNICATIONS



2018 Magin V., Lutte anti-*Pseudomonas* dans les réseaux d'eau: Potentiel des phages, **Séminaire des doctorants de l'ED Sciences pour l'ingénieur**, Polytech, Nantes.



2018 Magin V., Lutte anti-*Pseudomonas* dans les réseaux d'eau: Potentiel des phages, **Journée des doctorants du CSTB**, Paris.



2017 Garrec N., Magin V., Andrès Y., *Pseudomonas aeruginosa* phages to disinfect plumbing materials and surfaces in contact with water: Screening of phages efficiency, **Meeting Phages sur Yvette**, Gif sur Yvette.

SOMMAIRE GENERAL

REMERCIEMENTS	0
SOMMAIRE GENERAL	0
LISTE DES FIGURES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	III
LISTE DES GRAPHIQUES	V
LISTE DES ABREVIATIONS	VI
INTRODUCTION GENERALE	1
PARTIE I : BIBLIOGRAPHIE	4
CHAPITRE 1 : LES BACTERIOPHAGES	4
1. Découverte et histoire de la phagothérapie (Figure 1) :	4
1.1 Découverte :.....	4
1.2 Les débuts de la phagothérapie :.....	5
1.2.1 L'âge d'or :.....	5
1.2.2 Le déclin dans l'Occident :.....	6
1.2.3 Un nouvel Essor mondiale :	7
2. Structure et classification :.....	9
2.1 Composition et structure :.....	9
2.1.1 Morphologie générale :	9
2.1.2 Génome viral :.....	9
2.1.3 Diversité des capsides :	10
2.2 Taxonomie :.....	11
2.2.1 Bref historique de la taxonomie phagique :.....	11
2.2.2 La taxonomie contemporaine :	11
2.2.3 L'ordre des <i>Caudovirales</i> :.....	12
3. Les différents cycles de multiplication :	16
3.1 Le cycle lysogénique :.....	16
3.2 Le cycle lytique :	17
3.3 Etapes du cycle lytique :.....	18
3.3.1 L'adsorption :	18
3.3.2 Transfert du génome phagique :.....	18
3.3.3 Réplication du génome phagique :	20
3.3.4 Assemblage des particules virales :.....	20
• L'encapsidation du génome viral :	21
• Etapes finales de l'assemblage des virions :	23
3.3.5 Libération des virions	25
• Dernière étape :	28
3.4 Les autres cycles :.....	29

3.4.1 Le cycle pseudo-lysogénique :	29
3.4.2 Le cycle chronique :	30
4. Isolement et caractérisation de bactériophages de l'environnement :	31
4.1 Les différentes méthodes de purification des phages :	34
4.1.1 Purification par gradient de densité au chlorure de césium :	34
4.1.2 Purification par précipitation au polyéthylène glycol:	34
4.1.3 Purification par chromatographie par échange d'ions:	35
4.2 Facteurs influençant la préservation des bactériophages :	35
4.3 Les nouvelles technologies pour des investigations plus poussées	35
4.3.1 Cristallographie et Résonance Magnétique Nucléaire :	35
4.3.2 Microscopie électronique (ME):	36
5. Coévolution des phages et des bactéries	38
5.1 Systèmes de résistance innée :	38
5.1.1 Prévenir l'adsorption des phages :	38
5.1.2 Bloquer l'entrée de l'ADN phagique :	42
5.1.3 Restriction/ modification de l'ADN du phage :	42
5.1.4 Interruption du cycle infectieux :	45
5.1.5 Interférer avec l'assemblage viral:	46
5.1.6 Le système BREX (Bactériophage Exclusion) :	47
5.2 Système de résistance adaptative :	48
5.2.1 Le CRISPR-Cas:	48
5.2.2 Composition et fonctionnement d'un locus CRISPR-CAS type :	49
5.2.3 La contre-attaque des phages :	53
5.2.4 Applications biotechnologiques du CRISPR-Cas:	53
 CHAPITRE 2 : <i>P. AERUGINOSA</i> DANS LES RESEAUX D'EAU	 54
1. Généralités sur la bactérie :	54
1.1 Génome :	54
1.2 Morphologie et culture de la bactérie :	54
1.3 Niches écologiques	54
2. Pathogénicité : les réseaux d'eau, sources et vecteurs de contaminations :	55
2.1 Qualité microbiologique de l'EDCH :	56
2.2 Cas des établissements thermaux :	56
2.3 Cas des établissements de santé :	57
3. Le développement des biofilms dans les réseaux d'eau :	60
3.1 Le biofilm :	60
3.1.1 Les caractéristiques d'un biofilm :	60
3.1.2 Les étapes de formation du biofilm sur une surface inerte :	61
3.1.3 La résistance du biofilm :	64
3.2 Le biofilm, son origine dans le réseau et son impact sur la qualité de l'eau :	65

4. Gestion de la qualité de l'eau potable et de l'eau minérale naturelle :	66
4.1 Gestion de la qualité des eaux minérales naturelles destinées aux activités thermales :	66
4.1.1 Les traitements autorisés de l'eau minérale :	66
4.1.2 L'entretien du réseau de distribution des eaux minérales naturelles :	67
4.2 Gestion de la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine :	70
4.2.1 Les différents procédés de désinfection existants :	70
• Les traitements chimiques :	70
• Les traitements physiques :	71
4.2.2 Actions préventives et traitements complémentaires sur les réseaux d'eau intérieurs :	71
• Actions préventives pour limiter l'implantation des biofilms :	71

CHAPITRE 3 : LES PHAGES COMME ALTERNATIVE AUX BIOCIDES ET AUX ANTIBIOTIQUES ? 73

1. La phagothérapie : l'utilisation des bactériophages à des fins thérapeutiques :	73
1.1 En thérapie, seuls ou combinés à d'autres molécules :	73
1.2 Pour lutter contre les contaminations dans l'environnement médical :	74
1.3 L'absence de cadre réglementaire :	75
2. Le biocontrôle : L'utilisation des phages pour des usages non thérapeutiques ou médicaux :	76
• Avant récolte :	77
• Après récolte :	78
3. L'action des phages sur le biofilm :	80
3.1 Quel mode d'action ?	80
3.2 Facteurs influençant l'efficacité d'infection du biofilm par les phages :	81
3.2.1 Facteurs biologiques :	81
• Biofilms mono espèce/ multi espèces :	81
• Structure du biofilm, physiologie et métabolisme des cellules :	81
3.2.2 Facteurs biochimiques :	83
• Expression par les phages d'enzymes dépolymérase :	83
• Environnement de croissance du biofilm :	84
• Le pH du milieu :	84
• La température du milieu :	84
• Le flux hydraulique :	85
4. L'utilisation des phages et les risques environnementaux associés :	90

SYNTHESE ET POSITIONNEMENT DU SUJET :..... 92

SOMMAIRE PARTIE II..... 95

PARTIE II : SELECTION DES COUPLES PHAGES/BACTERIES..... 96

II.1 Introduction :	96
----------------------------	-----------

II.2 Matériel et méthodes :	97
1. Matériel biologique:	97
2. Constitution d'un panel de phages :	97
3. Mise au point d'un inoculum standardisé en milieu LB :	100
4. Amplification et suivi du titre des phages :	100
4.1 Principe général de l'amplification / extraction :	100
4.2 Principe général de titration :	100
5. La méthode « spot test » pour sélectionner les phages infectieux :	101
II.3 Résultats :	102
1. Amplification, extraction et suivi dans le temps des suspensions de phages en milieu LB:	102
3. Résultats des essais en spot test :	104
3.1 Premier screening : détermination de la gamme d'hôtes de chacun des phages :	104
3.2 Deuxième screening : sélection des phages infectieux les plus efficaces :	107
II.4 Discussion :	111
SOMMAIRE PARTIE III	115
PARTIE III : EVALUATION DU POTENTIEL INFECTIEUX DES PHAGES SUR DES CULTURES DE <i>P. AERUGINOSA</i> EN MILIEU MINIMUM PLANCTONIQUE	116
III.1 Introduction :	116
III.2 Matériel et méthodes :	118
1. Mise au point d'un milieu minimum :	118
2. Culture des souches et amplification des phages en milieu minimum :	119
3. Caractérisation des phages 14.1, LUZ7 et B1:	120
3.1 Cinétique de multiplication des phages : « One Step Growth Curve »	120
3.2 Microscopie électronique à transmission :	120
• Purification des extraits :	120
• Coloration négative :	121
4. Préparation des solutions de phages et modalités d'infection par les phages :	121
5. Efficacité des phages sur <i>P. aeruginosa</i> en milieu liquide : plan expérimental :	122
III.3 Résultats :	125
1. Milieu de culture et amplification des phages :	125
1.1 Validation de la croissance des souches en milieu minimum :	125
1.2 Amplification, extraction et titre des phages en milieu minéral minimum :	125
2. Paramètres de lyse des phages 14.1, LUZ7 et B1 :	126
3. Morphologie des phages	129
4. Efficacité des phages sur les souches cultivées en milieu minimum planctonique :	132
3.1 Efficacité des phages sur la souche PAO1 :	132
3.2 Efficacité des phages sur la souche MLM :	135
3.3 Efficacité des phages sur la souche ST395E :	140

3.4 Efficacité des phages sur la souche D1 :	143
III.4 Conclusion.....	146
SOMMAIRE PARTIE IV	151
PARTIE IV : EVALUATION DU POTENTIEL DES PHAGES POUR ELIMINER LE BIOFILM DE <i>P. AERUGINOSA</i> DEVELOPPE A LA SURFACE DE COUPONS EN INOX IMMERGES ...	152
IV.1 Introduction :	152
IV.2 Matériel et méthodes :	154
1. Matériel biologique :	154
2. Formation du biofilm et paramètres d'infection :	154
2.1. Préparation des coupons en INOX :	154
2.2. Développement du biofilm sur les coupons en INOX :	154
2.3. Traitement par les phages du biofilm âgé de 24 h développé sur les coupons en Inox :	155
3. Utilisation de la PCR quantitative :	155
3.1 Principe de la PCR viable quantitative (q-PCR viable) :	155
3.2 Protocole de traitement des échantillons :	157
3.3 Paramètres des PCR quantitatives :	158
3.3.1 Amorces et sonde utilisées pour les PCR quantitatives :	158
3.3.2 Préparation des milieux réactionnels et programmation du thermocycler :	159
3.4 Réalisation de la gamme étalon de référence :	159
IV.3 Résultats :	161
1. Droites de standardisation :	161
2. Evaluation de l'activité bactéricide des phages 14.1 et LUZ7 sur le biofilm de 24h de <i>P. aeruginosa</i> :.....	163
2.1 Efficacité du traitement par les phages 14.1 sur le biofilm des souches PAO1 et D1 :	163
2.2 Efficacité du traitement par les phages LUZ7 sur le biofilm de 24h des souches PAO1 et D1 :	165
IV.4 Discussion :	170
IV.5 Conclusion :	175
CONCLUSION GENERALE :	176
ANNEXE 1	180
ANNEXE 2	181
ANNEXE 3	182
ANNEXE 4	184
ANNEXE 5	185
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	187

Liste des figures

Figure 1 : Frise chronologique retraçant les grandes phases de la découverte des phages et de leur utilisation en biologie moléculaire et en tant qu'agents antibactériens	8
Figure 2 : Principaux composants d'un phage caudé.....	10
Figure 3 : Les 6 morphotypes de bases définis par Bradeley (Bradley, 1967)	11
Figure 4 : Représentation des trois familles de phages caudés	13
Figure 5 : Taxonomie des phages : Représentation des différents morphotypes connus (King et al., 2012)	15
Figure 6 : Schéma des cycles de reproduction phagique (lytique et lysogénique)	17
Figure 7 : Equipement enzymatique des phages caudés impliqué dans le processus de « tunnélisation » de la paroi bactérienne.....	19
Figure 8 : Analogie des structures de la queue hélicoïdale des phages et du système T6SS de sécrétion bactérien (Braun and Patzer, 2013)	20
Figure 9 : Représentation schématique des étapes d'assemblage des phages caudés à ADN double brin (Aksyuk and Rossmann, 2011).....	21
Figure 10 : Modèle d'assemblage puis d'expansion de la procapside prenant en compte le principe de répulsion électrostatique. D'après (Parker and Prevelige, 1998).....	22
Figure 11 : Structure du connecteur chez le bactériophage SPP1	24
Figure 12 : Formation des pores dans la membrane bactérienne d'après (White et al., 2011).....	26
Figure 13 : Architecture de la cassette de lyse du bactériophage λ	27
Figure 14 : Model de fonctionnement et de structure des complexes spanins	28
Figure 15 : Courbe de multiplication des virus en présence de leur hôte bactérien.....	33
Figure 16A : Stratégies utilisées par les bactéries pour limiter l'adsorption des phages	39
Figure 17 : Schématisation de la co-évolution des mécanismes de résistance phages/bactéries impliquant les systèmes de modification/restriction du génome viral	43
Figure 18 : Schéma de la co-évolution des mécanismes de résistance phages/bactéries impliquant les systèmes de modification/restriction du génome viral.	44
Figure 19 : Synthèse des mécanismes de résistance innés retrouvés chez les bactéries pour lutter contre les bactériophages tout au long du cycle infectieux	47
Figure 20 : Représentation schématique du locus CRISPR Cas chez <i>E. coli</i> K12.....	48
Figure 21 : Composition protéique des différents types de CRISPR Cas.....	51

Figure 22 : Représentation des principales étapes de la réponse adaptative du CRISPR Cas chez les bactéries après infection par un phage.....	52
Figure 23 : Développement des biofilms dans les réseaux d'eau : impact sur la qualité de l'eau potable et risques sanitaires associés.....	63
Figure 24 Applications de phages permettant de contrôler les contaminations tout au long de la chaîne alimentaire (adaptée de Mills <i>et al</i> , 2017).....	77
Figure 25 : Stratégies d'utilisation des phages pour lutter contre les biofilms de surfaces inertes	80
Figure 26 : Démarche de la thèse	94
Figure 27 : Procédure de préparation des échantillons et méthode en double couche pour isoler des phages à partir de prélèvements d'eau	98
Figure 28 : Préparation de l'inoculum : culture standardisée en milieu LB	100
Figure 29 : Préparation en plaque 96 puits des dilutions de chacune des suspensions de phages.....	101
Figure 30 : Patrons utilisés pour les différents essais en « spot test ».....	102
Figure 31 : Amplification des phages Luz7 sur PAO1 en milieu LB	102
Figure 32 : Numération des bactériophages Luz7, B1, 14.1, Luz19, Pev2 et LDK16 conservés à -4 °C en milieu LB	103
Figure 33 : Résultats d'un essai en spot test.....	106
Figure 34 Résultats par souche <i>P. aeruginosa</i> de l'essai en spot test à partir des extraits purs et des dilutions de 10^{-2} à 10^{-10}	109
Figure 35 : Résultats par souche <i>P. aeruginosa</i> de l'essai en spot test à partir des solutions de phages de titre 10^9 PFU.mL-1 et des dilutions de 10^{-1} à 10^{-5}	110
Figure 36 : Préparation de l'inoculum : culture standardisée en milieu minimum	119
Figure 37 : Etapes du protocole de coloration négative des grilles (d'après les recommandations du fournisseur Delta microscopies).....	121
Figure 38 : Diagramme dans le temps des actions à mener depuis la réalisation d'une pré-culture en milieu minimum pour une souche de <i>P. aeruginosa</i> , jusqu' à l'obtention des données traitées sous la forme de graphiques $DO_{600nm} = f(\text{temps})$	122
Figure 39 : Etapes du protocole permettant de tester la virulence des phages Luz7, 14.1 et B1 sur les souches de <i>P. aeruginosa</i> en milieu liquide.....	124
Figure 40 : Amplifications des phages 14.1 en milieu minéral minimum	126
Figure 41 : Observation par MET des phages Luz7 (cadres bleu) et 14.1 (cadre orange) après coloration négative	130
Figure 42 : Observation par MET des phages B1 après coloration à l'Uranyless.....	131

Figure 43 : Efficacité des phages B1, 14.1 et Luz7 sur la souche PAO1 de référence cultivée en milieu liquide minimum.....	133
Figure 44 : Comparaison des cultures de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 avec et sans ajout de phages	135
Figure 45 : Efficacité des phages B1, 14.1 et Luz7 sur la MLM cultivée en milieu liquide minimum.....	137
Figure 46 : Efficacité des phages B1 14.1 et Luz7 sur la souche ST395E cultivée en milieu liquide minimum ...	141
Figure 47 : Efficacité des phages B1, 14.1 et Luz7 sur la souche D1 cultivée en milieu liquide minimum	144
Figure 48 : Etapes de préparation des coupons en INOX : décontamination des surfaces par immersion dans l'éthanol puis par rinçage dans l'eau déminéralisée.....	154
Figure 49 : Etapes expérimentales et analytiques permettant d'évaluer l'action des phages sur le biofilm de <i>P. aeruginosa</i> à la surface de coupons INOX immergés.....	156
Figure 50 : Agent intercalant PEMAX™ utilisé pour inhiber l'amplification des cellules métaboliquement inactive	157
Figure 51 : Protocole de traitement des échantillons au PEMAX™ réalisé avant l'extraction de l'ADN.....	158
Figure 52 : Etape de réalisation de la droite d'étalonnage.....	162
Figure 53 . Chronologie des différentes étapes réalisées au cours de l'expérience et observation du milieu dans lequel les coupons étaient immergés après 14 h en présence de phages 14.1 (à droite) ou sans traitement (à gauche).....	164
Figure 54 : Efficacité du traitement par les phages 14.1 sur le biofilm de la souche PAO1(A) et de l'isolat D1 (B).	165
Figure 55 : Chronologie des différentes étapes réalisées au cours de l'expérience en présence de phages Luz7 (à droite) ou sans traitement (à gauche).	166
Figure 56 : Efficacité du traitement par les phages Luz7 sur le biofilm de l'isolat D1 (A) de la souche PAO1(B)	168

Liste des tableaux

Tableau 1 : Publications des rapports ICTV et évolution de la taxonomie (adapté de King et al. 2012)	12
Tableau 2 : Tableau de classification des principaux ordres de phages détaillant le type de génome et les spécificités qui sont associées.....	14
Tableau 3 : Récepteurs spécifiques de <i>P. aeruginosa</i> reconnus par les phages.....	18
Tableau 4 : Bactériophages portés à l'étude pour leur méthode d'encapsulation	22
Tableau 5 : Les différents cycles d'infections et les caractéristiques à prendre en compte pour une utilisation en biotechnologie	30
Tableau 6 : Tableau de synthèse des mécanismes, faisant intervenir différentes molécules, prévenant l'adsorption des phages à la surface de leurs hôtes bactériens.	41

Liste des tableaux

Tableau 7 : Paramètres microbiologiques à surveiller dans un établissement de santé, en fonction du type d'eau :	58
Tableau 8 : Traitements de l'eau autorisés en amont des points d'usage et fréquence des contrôles, selon les types de soins.....	67
Tableau 9 : Opérations de nettoyage et de désinfection des réseaux, susceptibles d'être utilisées, en préventif ou curatif.....	69
Tableau 10 Ensemble des préparations reconnues comme « GRAS » par la FDA pour lutter contre les contaminations de l'environnement alimentaire (adapté de (Ryan <i>et al.</i> , 2011)).....	76
Tableau 11 : Principales classes d'enzymes exprimées chez les phages présentant une activité dépolymérase (Pires <i>et al.</i> , 2016)	83
Tableau 12 : Caractéristiques des différents régimes d'écoulement d'après (Busscher and van der Mei, 2006) 85	
Tableau 13 : Quelques études rapportant l'utilisation des phages pour éliminer les biofilms implantés sur différentes surfaces inertes	87
Tableau 14 : Panel des souches <i>P. aeruginosa</i> de l'étude	97
Tableau 15 : Caractéristiques génétiques, moléculaires et morphologiques des phages de l'étude.....	99
Tableau 16 : Suivi du titre (en PFU.mL ⁻¹) des suspensions de phages conservées en milieu LB à 4°C.....	103
Tableau 17 : Synthèse des résultats obtenus pour les 3 essais réalisés en spot tests à partir des extraits purs de phages.....	105
Tableau 18 : Mise en évidence des couples phages / souches de <i>P. aeruginosa</i> pouvant être utilisés par la suite comme modèles d'infectiosité.....	114
Tableau 19 : Paramètres physicochimiques et microbiologiques d'une eau minérale naturelle embouteillée, faiblement minéralisée (D'après la thèse de C. Pessereau 2015).....	118
Tableau 20 : Caractéristiques des phages sélectionnés	121
Tableau 21 : Préparation des solutions de phages B1, 14.1 et LUZ7.....	122
Tableau 22 : Paramètres de lyse des phages 14.1, LUZ7 et B1.....	129
Tableau 23 : Origine, séquences et paramètres des amorces et de la sonde oligonucléotidiques	158
Tableau 24 : Composition des milieux réactionnels de la qPCR quantitative.....	159
Tableau 25 : Synthèse des équations correspondantes aux différentes qPCR de la gamme réalisées en sonde TaqMan.....	161
Tableau 26 . Répartition des phages 14.1 dans le système étudié.....	163
Tableau 27 . Dénombrement des cellules de <i>P.aeruginosa</i> présentes dans les biofilms des souches PAO1 et D1, traités ou non par les phages 14.1.....	164
Tableau 28 . Quantification des cellules d'un biofilm de 24 h pour la souche PAO1 et l'isolat D1	167

Tableau 29. Répartition des phages LUZ7 dans le système étudié.....	167
Tableau 30. Dénombrement des cellules de <i>P. aeruginosa</i> présentes dans les biofilms des souches PAO1 et D1, traités ou non par les phages LUZ7.....	168
Tableau 31 : Impacte du traitement par les phages 14.1 et LUZ7 sur les souches PAO1 et D1 : suivi des paramètres biologiques.....	169

Liste des graphiques

Graphique 1 : Evolution du titre des phages conservés en milieu LB dans le temps à 4°C	103
Graphique 2: Croissance de la souche PAO1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en milieu minimum liquide	119
Graphique 3 : Croissance de la souche référence PAO1 et des souches MLM1, D1 et ST395 en milieu minéral minimum	125
Graphique 4 : Evolution du titre des phages conservés en milieu minimum en fonction du temps.....	126
Graphique 5 : « One step growth curve » pour les phages 14.1 en présence de la souche PAO1	127
Graphique 6 : « One step growth curve » pour les phages Luz7 en présence de la souche PAO1	127
Graphique 7 : « One step growth curve » pour les phages B1 en présence de la souche PAO1	129
Graphique 8 : Droite de standardisation obtenues à partir des différentes amplifications de la gamme faites par qPCR en sonde TaqMan® (n=10).....	162

Liste des abréviations

A

ADN: Acide désoxyribonucléique
 Abi: Abortive infection systems
 ANSM: Agence Nationale de Sécurité du
 Médicament et des produits de santé
 ARN: Acide ribonucléique
 ARS: Agence Nationale de Santé
 ATUn: Autorisation Temporaire d'Utilisation
 nominative

B

BREX: Bacteriophages Exclusion

C

COFRAC: Comité Français d'accréditation
 CRISPR: Clustered Regularly Interspaced
 Palindromic Repeats
 Ct: Cycle Threshold

D

DGS: Direction générale de la santé
 DO: Densité Optique
 DTM: Domaine Trans-membranaire

E

EDHC: Eau Destinée à la Consommation
 Humaine
 EMN: Eau Minérale Naturelle
 EOP: Efficiency Of Plating

F

FDA: Food and Drugs Administration

G

GFP: Green Fluorescent Protein

I

ICTV: International Committee on Taxonomy of
 Viruses

K

KB: King B

L

LB: Luria broth

M

MDSs: Modification Dependant Systems
 ME: Microscopie Electronique à Transmission
 MEC: Matrice Extracellulaire
 MOI: Multiplicity of Infection

O

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

P

PAM: Protospacer Adjacent Motif
 PBS: Phosphate Buffer Saline
 PCA: Plate Count Agar
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PFU: Plaque Forming Units
 PICIs: Phage Inducible Chromosomal Islands
 ppm: particules par million
 PSK: Post-Segregational Killing

R

RBP : Receptor Binding Protein
 RFLP: Restriction Fragment Length
 Polymorphism
 rpm : rotations par minute
 RMN: Raisonance Magnétique Nucléaire

S

SAR: Signal Anchor Release
 SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate
 Polyacrylamide Gel Electrophoresis
 SIE: Superinfection exclusion system
 SPD : Sous-Produit de Désinfection

T

T6SS: Type 6 Secretion System

U

UFC: Unité Formant Colonies
 UV: Ultraviolet

V

VBNC : Viable But Non Cultivable

INTRODUCTION GENERALE

Pseudomonas aeruginosa ou bacille pyocyanique, est une bactérie à Gram négatif capable de coloniser de nombreuses niches écologiques avec un tropisme particulier pour les surfaces humides et les réseaux d'eau. *P. aeruginosa* est qualifiée de pathogène opportuniste et est à l'origine de maladies nosocomiales. Dotée d'un flagelle et de pili, elle est capable de se mouvoir dans un milieu puis de s'implanter sur des surfaces biotiques ou abiotiques sous la forme de colonies agrégées, enchâssées dans une matrice complexe d'exopolymères autoproduite, appelée biofilm. Ainsi, chez l'homme les biofilms de *P. aeruginosa* peuvent coloniser le système respiratoire (patients atteints de mucoviscidose ou placés sous ventilation mécanique), le tractus urinaire (patients avec sondes urinaires), certaines plaies ou lésions de l'épiderme (grands brûlés) et parfois les prothèses implantées. Dans les réseaux d'eau, le biofilm se développe dans des zones où la bactérie rencontre des conditions favorables à son développement au niveau de la robinetterie, des antennes terminales voire sur l'ensemble d'un réseau d'eau. Lorsque celle-ci parvient à s'implanter sur une surface d'un réseau d'eau, sa persistance sous la forme de biofilm peut être à l'origine de sa dissémination et de la contamination de personnes vulnérables. Dans les hôpitaux et les centres thermaux, la présence de *P. aeruginosa* dans les réseaux d'eau fait donc l'objet d'une attention particulière et a nécessité la mise en place de procédures spécifiques de surveillance ainsi que d'actions préventives et curatives.

1

Parmi les agents antibactériens disponibles pour lutter contre cette bactérie, les antibiotiques sont très couramment utilisés en médecine humaine ou animale, ainsi que les produits désinfectants, regroupés sous l'appellation biocides, pour tous les autres usages. Dans le cas des réseaux d'eau, l'application de ces produits bien souvent chimiques n'est pas toujours suffisamment efficace et peut entraîner la corrosion des matériaux. La capacité de *P. aeruginosa* à s'adapter à ces différentes molécules utilisées parfois de façon peu raisonnée, ainsi que la difficulté à l'éliminer des réseaux d'eau contaminés, nécessite donc le développement et la mise en place de solutions alternatives.

Dans ce contexte, l'intérêt pour les phages, longtemps oubliés au détriment des antibiotiques, renaît dans les pays Occidentaux dès les années 80 et plusieurs équipes scientifiques ont réalisés des expérimentations *in vitro* permettant d'isoler des phages et de vérifier leur efficacité principalement dans le domaine des infections cliniques et vétérinaires. Des articles décrivent également l'effet bénéfique des phages pour limiter l'implantation des bactéries dans les dispositifs médicaux et ces études laissent entrevoir les phages comme une alternative à l'utilisation des antibiotiques pour contourner les résistances bactériennes. Aux USA, leur utilisation est autorisée dans les industries agroalimentaires par la FDA (Food and Drug Administration) depuis 2006 et en France des essais cliniques sur des patients ont été autorisés à partir de 2013 par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé). Dès lors, l'utilisation des phages pour des applications plus larges de lutte biologique est très largement explorée.

Ces virus ont pour principaux avantages d'infecter exclusivement des cellules procaryotes pour se multiplier en utilisant leur machine transcriptionnelle. La dernière étape de leur cycle de multiplication s'achève par la libération de nouveaux virions qui engendre, de ce fait, la lyse de l'hôte bactérien. En présence de son hôte, un phage est donc capable de s'auto-répliquer, ce qui, dans le cas d'un traitement permettrait l'application d'une mono-dose. De plus, les phages sont capables de cibler spécifiquement une espèce bactérienne sans s'attaquer aux autres micro-organismes. Ainsi, leur utilisation pourrait être envisagée pour traiter des surfaces ou des éléments amovibles d'un réseau en ciblant spécifiquement la ou les souches installées et diminuer l'utilisation de substances chimiques délétères pour les installations. Ce travail s'attache à explorer le potentiel des bactériophages en tant qu'agent de bio contrôle des contaminations de *P. aeruginosa* présentes sur les surfaces en contact avec l'eau.

Le manuscrit se décompose en quatre parties. L'étude bibliographique en première partie est scindée en trois chapitres :

(i) **Le premier chapitre** présente les caractéristiques générales des phages ainsi que les modalités d'infection de leurs hôtes. Il détaille également les techniques d'isolement et de caractérisation. La co-évolution des bactériophages et de leurs hôtes bactériens est abordée à la fin de ce chapitre et souligne l'évolution permanente des mécanismes de résistances entre les deux entités.

2

(ii) **Le second chapitre** présente la bactérie *P. aeruginosa* et souligne l'importance des problématiques liées à sa présence dans les environnements hospitaliers et thermaux. Il apporte également des éléments de compréhension sur les mécanismes de formation des biofilms, ainsi que les différents facteurs à l'origine de leur colonisation et persistance dans les réseaux d'eau froide. Enfin, une partie présente les solutions de traitements existantes pour lutter contre leur développement selon l'environnement considéré (thermal, hospitalier, EDCH).

(iii) **Le troisième chapitre** rassemble les éléments de bibliographie qui mettent en avant le potentiel des bactériophages comme alternative aux antibiotiques en médecine et aux biocides en industrie agro-alimentaire. Cette dernière partie souligne la complexité des interactions entre les virus et leurs hôtes bactériens dont il faut tenir compte. Les différents facteurs biologiques et biochimiques susceptibles d'impacter l'action bactéricides des virus sur le biofilm sont finalement détaillés.

La suite du manuscrit présente l'étude expérimentale qui se décompose en trois autres parties et qui ont permis :

(i) d'isoler de nouveaux phages et de sélectionner parmi le panel ceux susceptibles d'être infectieux vis-à-vis d'isolats de *P. aeruginosa* provenant de réseaux d'eau potable et thermale.

(ii) de caractériser les phages sélectionner auparavant et d'évaluer leur efficacité bactéricide sur les isolats bactériens les plus sensibles, en milieu liquide.

(iii) d'évaluer l'action de deux phages, sélectionnés sur la base de leur profil bactéricide en milieu liquide, sur des biofilms de 24 h de la souche de référence PAO1 et d'un isolat thermal, implantés à la surface de coupons en INOX, matériau susceptible d'être retrouvé dans les établissements thermaux mais également très présent en industrie agroalimentaire.

Chacunes de ces parties présente le matériel biologique ainsi que les méthodes utilisées suivis des résultats et d'une discussion. Les principaux résultats sont finalement repris dans une conclusion générale à la fin du manuscrit.

Partie I : BIBLIOGRAPHIE

Chapitre 1 : LES BACTERIOPHAGES

1. Découverte et histoire de la phagothérapie (Figure 1) :

1.1 Découverte :

La découverte des bactériophages fait l'objet d'une controverse. Selon la source, elle est attribuée au bactériologiste anglais Frederick Twort ou au biologiste Franco-canadien Félix Hubert D'Hérelle. Dès 1896 des études faisaient allusion à l'existence de « phagelike » ayant une activité antibactérienne. A l'époque, Ernest Hanbury Hankin (bactériologiste britannique) s'intéresse de près aux propriétés bactéricides des eaux de la Jumna et du Gange, deux fleuves d'Inde, lorsqu'il constate que les colonies de bactéries de choléra (*Vibrio cholerae*) qui ont prospéré dans l'eau du robinet meurent rapidement dans l'eau du Gange. Il poursuit donc son expérience en utilisant l'eau du Gange filtrée ou bouillie (30 min à 115 °C). À sa grande surprise, tandis que l'eau filtrée continue à montrer un effet antibactérien, l'eau bouillie n'a plus cette propriété. Ceci indiquait clairement que le facteur responsable de l'action bactéricide de l'eau était thermolabile, mais pas non filtrable avec le filtre Pasteur utilisé dans son expérience. E-H. Hankin publie ces travaux en français dans les annales de l'institut Pasteur (Born *et al.*, 2015; Hankin M.E., 1896). Malgré ses observations, il ne détermine ni l'origine ni la nature de cette substance active présente dans les deux fleuves.

4

Frederick William Twort quand à lui, a déjà relevé en 1914 plusieurs de ces caractéristiques au cours de ses travaux sur le virus de la vaccine qu'il publie dans le journal *The Lancet* (Twort F.W., 1915). Il a obtenu sur certains tubes de gélose inclinée, une culture d'un microcoque dont certaines colonies prenaient un aspect vitreux et transparent. Néanmoins il abandonne ses recherches sur ce phénomène.

En 1916, au cours de ses recherches au sein de l'institut Pasteur à Paris, Félix Hubert D'Hérelle observe la formation de cercles de lyse sur des cultures de *Shigella dysenteriae*, bactérie responsable de la dysenterie bacillaire. Intrigué par la ou les causes de ce phénomène, il poursuit ses recherches et parvient ainsi à isoler un « microbe » qu'il nomme anti-Shiga à partir de selle de personnes malades. Le filtrat actif de selles mis au contact d'un bouillon de culture de bacilles de Shiga provoque leur lyse dans un laps de temps très court (D'Herelle F., 1917). La poursuite de ses travaux lui permet de déduire qu'il s'agit d'un microorganisme vivant, capable de se multiplier en présence de bactéries intègres, capable de traverser les filtres utilisés à l'époque, transmissible d'une culture à l'autre et non pathogène à l'égard des animaux (D'Herelle F., 1917; 1918a). Persuadé que ce micro-organisme est unique et qu'il appartient à un genre nouveau, il le nomme «*Bacteriophagum intestinalis*» (D'Herelle F., 1918b) et envisage de l'utiliser pour combattre les épidémies bactériennes qui faisaient des ravages à cette époque.

Suite à ces découvertes, de nombreuses études sont entreprises sur les « virus de bactérie » dans la continuité des travaux de Félix Hubert D'Hérelle et génèrent beaucoup de publications. Raettig Hansjürgen, recense ainsi dans une bibliographie, près de 11 405 articles, livres et chapitres de livre traitant du sujet de 1917 à 1965 (Raettig H., 1967). Si beaucoup concernent la caractérisation de ces nouvelles entités, la majeure partie est dédiée à l'exploration de nouveaux traitements anti-bactériens d'abord chez l'animal, puis très rapidement chez l'homme (Dublanche A., 2007). On assiste alors à la naissance de la Phagothérapie ou « Phage Therapy ».

1.2 Les débuts de la phagothérapie :

Malgré les premiers travaux de Félix D'Hérelle, l'émergence de cette nouvelle thérapie encore mal connue et peu caractérisée est à l'origine de plusieurs débats dans le monde scientifique avant d'atteindre son âge d'or entre les deux Guerres Mondiales.

1.2.1 L'âge d'or :

Les débuts de l'âge d'or ont été marqués par les 1^{ers} essais thérapeutiques de Félix Hubert D'Hérelle sur les animaux en 1918 puis rapidement sur de jeunes enfants de l'hôpital Necker à Paris atteints de dysenterie bacillaire en 1919 (**Figure 1**). Il publie alors ses résultats positifs de phagothérapie deux ans après, dans son ouvrage intitulé *Le bactériophage : son rôle dans l'immunité* (D'Hérelle F., 1921). A partir de ce moment, convaincu de l'innocuité de cette thérapeutique, il décide de se consacrer à la lutte des diverses infections bactériennes connues aux moyens de préparations bactériophagiques. La même année, son travail est publié par l'américain André Gratia dans une revue scientifique américaine « *Journal of Experimental Medicine* » ce qui lui permet probablement de rayonner à l'échelle mondiale et d'accroître la renommée des phages par la même occasion.

5

A Paris, il fonde le Laboratoire du Bactériophage en 1933 pour le développement de la « Phage Therapy ». Les premières commercialisations de préparations phagiques à usage thérapeutique via les entreprises pharmaceutiques telles que, Robert & Carrière en France (future filiale de l'Oréal), Parke-Davis, Eli Lilly, Abbott et Squibb en Amérique du Nord, sont apparues ensuite. Cinq préparations à base de phages sont créées et connaissent un franc succès pendant les années 1930 : bacté-staphy-phage, bacté-intesti-phage, bacté-rhino-phage, bacté-coli-phage ou encore bacté-pyo-phage.

Dans le reste du monde, l'application de « la phagothérapie selon Félix Hubert D'Hérelle » permet de traiter la dysenterie au Brésil ainsi que dans certains pays Africains (Sénégal, Egypte). En Angleterre, en Italie et en Grèce, les effets des phages contre la fièvre typhoïde ou paratyphoïde sont étudiés. A l'Université de Stanford (Californie, USA) et au laboratoire de Santé Publique du Michigan (Detroit, USA), des suspensions de phages anti-staphylocoques sont produites et distribuées dans plusieurs hôpitaux. Entre 1934 et 1936, Félix Hubert D'Hérelle ouvre trois nouveaux laboratoires de production à Kiev, Kharkov et Tbilissi (Eliava Institute of bactériophage) en Union Soviétique sur invitation du gouvernement. En Inde, des investigations à grande échelle sont menées entre 1927 et

1936. Le but étant d'évaluer les propriétés des phages dans le traitement et la prophylaxie du choléra et de la peste.

En 1940, Helmut Ruska, grâce à l'avènement du microscope électronique, met en évidence pour la première fois un bactériophage de la bactérie *Escherichia coli* ainsi que son action lytique (Kruger *et al.*, 2000). Mais l'arrivée de la Seconde Guerre Mondiale complique les communications scientifiques. Publiées dans un journal allemand, ces images de microscopie ne seront pas publiées dans la presse française avant 1942, laissant ainsi les débats s'installer tant sur la nature du bactériophage que sur leur utilité thérapeutique.

Aux Etats Unis, le Conseil de la Pharmacie et de la Chimie (l'équivalent de la Food and Drugs Administration actuelle) est saisi pour réaliser une « méta-analyse bibliographique » sur la phagothérapie dans le but de rédiger des conclusions permettant de concilier des courants de pensée divergents et parfois conflictuels. Deux rapports ont ainsi été publiés dans le prestigieux Journal de l'association (JAMA : Journal of American Medical Association) en 1934 puis en 1941 (**Figure 1**). Les deux aboutissaient aux mêmes conclusions visant à stopper la phagothérapie en affirmant son caractère potentiellement dangereux.

Face à un tel rejet, Félix Hubert D'Hérelle émigre en Géorgie où il a déjà le soutien des dirigeants du pays et la reconnaissance scientifique à travers l'Institut fondé avec Georges Eliava (collègue de l'Institut Pasteur) à Tbilissi. Ce centre de recherche existe toujours actuellement et est spécialisé dans la phagothérapie.

6

1.2.2 Le déclin dans l'Occident :

Entre 1920 et 1940, la phagothérapie connaît donc son âge d'or, mais elle sera mise rapidement de côté par les pays occidentaux, alors que les pays de l'Est continuent à mener des travaux de recherche. Cette période correspond à la Seconde Guerre Mondiale prolongée par la Guerre Froide qui coupe le monde en deux. Époque trouble durant laquelle les deux grands blocs s'opposent pendant des années limitant les contacts y compris scientifiques.

Dans les pays occidentaux, le déclin de la phagothérapie réside dans l'avènement des antibiotiques au milieu du XX^{ème} siècle (Aminov, 2010) (**Figure 1**). D'autres molécules actives issues le plus souvent de bactéries du sol ou de champignons, sont également découvertes. Ainsi en Europe occidentale, les nombreux avantages apportés par les antibiotiques à leur large spectre d'action ainsi que leur facilité d'utilisation et leur stabilité concourent à l'abandon de la phagothérapie (Summers, 2012) .

A l'inverse, dans certains pays de l'Europe de l'Est, notamment ceux de l'ex-Union Soviétique (Géorgie, Pologne et Russie), l'utilisation de préparations phagiques reste prépondérante dans le système de santé de l'URSS.

1.2.3 Un nouvel Essor mondiale :

A partir des années 1950, la recherche sur les bactériophages joue un rôle important dans l'essor de la biologie moléculaire (**Figure 1**). Ainsi, l'expérience de Hershey et Chase permet de confirmer que l'ADN est le support de l'information génétique (Hershey and Chase 1952).

La première identification de l'ARN (ARNm), comme intermédiaire lors de la synthèse des protéines, est accomplie par Volkin et Astrachan à la fin des années 50 (Volkin E. I., Astrachan L., 1956), à l'aide de l'étude de l'infection d'*E. coli* par le bactériophage T2. De même, les travaux de Dussoix et Arber (Dussoix and Arber, 1962) qui essaient de comprendre les mécanismes bactériens impliqués dans la résistances à l'infection phagique permettent la découverte des premières enzymes de restriction. En 1977, Sanger *et al.* (Sanger F. *et al.*, 1977) séquencent la première molécule d'ADN simple brin du phage ϕ X174 et développent alors ce qu'on appelle encore aujourd'hui le « séquençage de Sanger ». Par la suite, des phages ou des enzymes de phages sont couramment utilisés en biologie moléculaire et en biotechnologie (Murphy, 2012). Parmi les applications directes, nous pouvons noter la technique du *phage display* (Smith, 1985), l'utilisation du phage λ comme vecteur de clonage pour insérer de l'ADN dans les bactéries (Chauthaiwale V.M. *et al.*, 1992), l'utilisation de ligases (phage T4) (Pascal, 2008), et de polymérases (phages T7 et T4) lors des réactions de PCR par exemple (Kubista *et al.*, 2006).

En parallèle, de leurs utilisations pour la recherche fondamentale qui ont conduit à mettre en place les piliers de la génétique moderne, certains chercheurs scientifiques sont toujours convaincus du potentiel des bactériophages pour lutter contre les infections ou pour leurs propriétés prophylactiques mais il faut attendre les années 80 pour que la phagothérapie suscite un nouvel intérêt en Occident, et 2004 pour assister au 1^{er} meeting international sur la biologie des Phages.

Si les antibiotiques ont connu une époque prospère à partir 1940, période à laquelle de nombreuses molécules anti-infectieuses sont mises sur le marché, par la suite, cette commercialisation de nouveaux antibiotiques se raréfie. Ceci s'explique notamment par un déficit d'investissements de la part des entreprises pharmaceutiques dans la recherche qui préfèrent se tourner vers les pathologies chroniques, plus rentables. De plus, parmi les nouveaux médicaments en phase de recherche, rares sont ceux qui représentent une nouvelle classe d'antibiotiques, la plupart étant seulement des modifications chimiques et structurales de molécules déjà existantes (Aminov, 2010). Selon un rapport publié en 2014 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'ère « post-antibiotique » approche. L'efficacité décroissante des antibiotiques et autres agents antimicrobiens est un problème mondial. La surutilisation d'antibiotiques en agriculture - pour favoriser la croissance du bétail - et dans les hôpitaux, a conduit rapidement à la prolifération des bactéries résistantes aux traitements. Conscients de la nécessité de trouver des méthodes alternatives, certains scientifiques ont rapidement considéré les phages comme une issue à envisager.

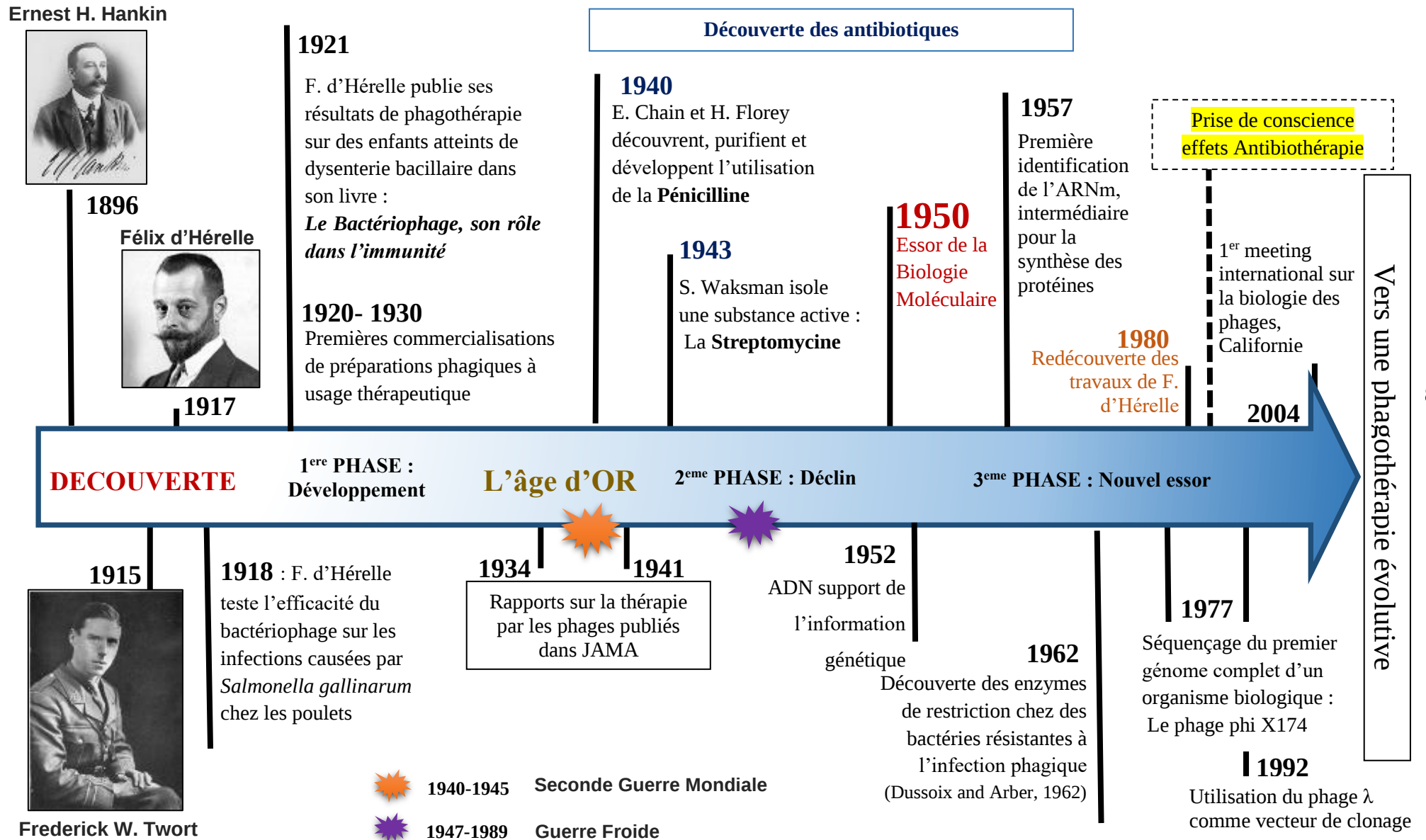


Figure 1 : Frise chronologique retraçant les grandes phases de la découverte des phages et de leur utilisation en biologie moléculaire et en tant qu'agents antibactériens

2. Structure et classification :

Le terme bactériophage, d'origine grecque, est constitué de la racine « phagos » qui signifie « manger » et du suffixe « baktéria » qui signifie « bâton », la notion de bâton faisant référence aux bactéries à cette époque. C'est donc Félix Hubert d'Hérelle qui employa ce terme pour la première fois pour qualifier ce « microbe invisible » capable de « manger » des bactéries. Egalement appelés phages, ils font partis de l'ensemble des virus. Les phages, parasites intracellulaires obligatoires, utilisent ainsi toute, ou partie, de la machinerie biosynthétique de leur hôte procaryote pour se reproduire et se multiplier. Par conséquent, ils sont inoffensifs pour les cellules eucaryotes (humaines, animales et végétales) et peuplent tous les écosystèmes où l'on retrouve des bactéries tels que les eaux d'égouts, les eaux douces, le sol, le corps humain, etc.. (Breitbart, 2012). Ils sont ainsi de très loin l'entité biologique la plus abondante sur Terre. D'après M. Breitbart qui ne s'intéresse pourtant qu'à une seule des niches écologiques des phages ; le milieu marin, il souligne dans une revue que les virus y sont de loin les prédateurs les plus abondants avec un nombre estimé à 10^{30} soit une concentration de 7 femto-molaire (fM), les procaryotes étant au second rang. Par comparaison, si toute la population humaine plongeait simultanément dans les océans, leur concentration n'atteindrait que les 10^{-20} fM. Malgré leur petite taille (~ 100 nm) la biomasse des virus océaniques se classe au second rang après la biomasse totale des procaryotes (Suttle, 2005). Chacun mesurant environ 100 nm de long, tous ces phages, mis bout à bout constitueraient une chaîne correspondant de 100 à 1000 fois le diamètre de notre galaxie.

9

2.1 Composition et structure :

2.1.1 Morphologie générale :

Le bactériophage est d'une manière générale, constitué d'acide nucléique porteur de l'information génétique, sous la forme d'ADN ou d'ARN. Un arrangement de protéines selon des motifs précis permet de protéger cette information génétique en formant la capside. L'acide nucléique associé à la capside forme la nucléocapside que l'on appelle aussi « tête » du bactériophage (**Figure 2**). Dans certains cas, cette dernière peut être entourée de lipides et de protéines virales formant une enveloppe, on parle alors de phages « fragiles », *a contrario* des phages non enveloppés qui sont qualifiés de « résistants » (Guttman *et al.*, 2005).

2.1.2 Génome viral :

L'information génétique portée par le génome viral est à l'origine de la synthèse des protéines virales. Ce dernier est constitué d'une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui peut être bi-caténaire (double brin) ou monocaténaire (simple brin), segmenté ou non, mais également linéaire ou circulaire. La majorité des phages connus ont une molécule d'ADN bi-caténaire. La taille du génome, qui varie de plusieurs dizaines à quelques centaines de paires de bases, est directement liée à la complexité morphologique du phage. Deux types de protéines sont codées par le génome et indispensables lors de la multiplication intracellulaire du phage: les protéines structurales et les protéines

non structurales. Leurs fonctions seront détaillées en même temps que le cycle viral. Depuis la fin du 20^e siècle, environ 200 génomes phagiques ont été séquencés.

2.1.3 Diversité des capsides :

La capside, est une coque de nature protéique qui entoure le génome et est capable d'assurer sa protection et sa persistance dans le milieu extérieur. Selon l'architecture de la capside, quatre types de symétries sont représentées parmi les phages :

- Symétrie hélicoïdale : la capside est cylindrique. Les bactériophages ont alors une forme de filaments ou de bâtonnets,
- Symétrie cubique ou icosaèdre : la capside est à symétrie icosaédrique. Les bactériophages peuvent alors apparaître sphériques,
- Symétrie binaire ou phage caudé : la capside ou « tête » est à symétrie icosaédrique et la « queue » est à symétrie hélicoïdale,
- Symétrie complexe : la capside est de forme très diverse, on parle alors de phage pléomorphe,

Les variations de forme, de taille, de symétrie dans la morphologie des phages permettent de les classer en sept groupes différents, eux- mêmes scindés en vingt et un sous-groupes, parfois composés d'éléments très polymorphes.

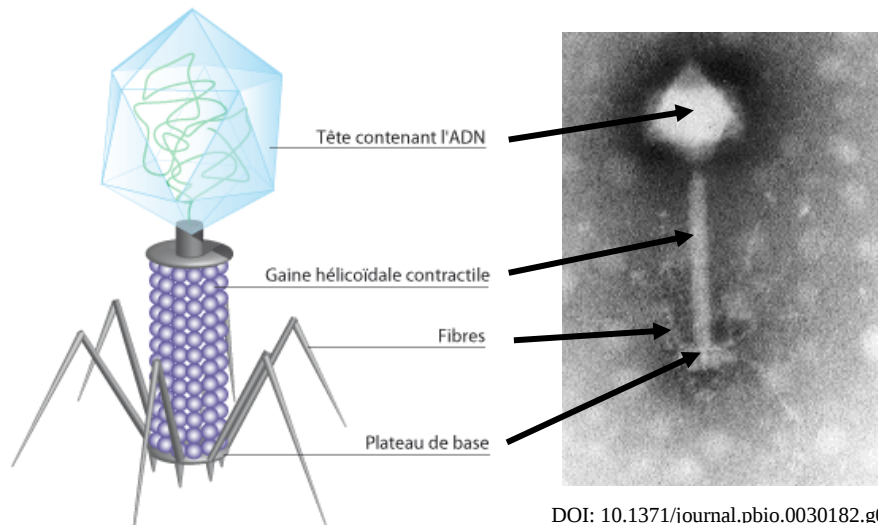


Figure 2 : Principaux composants d'un phage caudé

Schéma d'un phage caudé faisant figurer les éléments suivants : une tête contenant le génome relié à une gaine hélicoïdale portant à l'extrémité un plateau et les fibres caudales généralement impliquées dans l'adhésion du bactériophage à la surface de son hôte. A droite, une image de microscopie électronique à transmission obtenue après coloration négative. (D'après Mann N. H., 2005).

2.2 Taxonomie :

2.2.1 Bref historique de la taxonomie phagique :

Suite à la découverte des phages en 1918, Puis les résultats de différents travaux multiplient les critères qui lui sont attribués : la taille, les capacités de résistance aux contraintes du milieu extérieur (chaleur, détergents, pH), les cibles bactériennes et d'autres propriétés. Il paraît dès lors, de plus en plus évident, qu'il n'y a pas un phage unique mais plusieurs types de phages. Chacun tente alors de les classer selon leurs propres critères et donc de manière désorganisée.

En 1948, Holmes est le premier à classer les phages dans un unique sous ordre de la famille des *Virales*, en ne prenant en compte que les symptômes provoqués par la maladie. Cette classification ne sera pas adoptée par la communauté scientifique. Il faut attendre l'arrivée et l'utilisation de la microscopie puis de la coloration négative pour améliorer la connaissance des bactériophages. En 1960, le système L.H.T tiré du nom de ses auteurs Lwoff, Horne et Tournier, est publié et permet une classification standardisée des virus basée sur leur morphologie et le type d'acide nucléique.

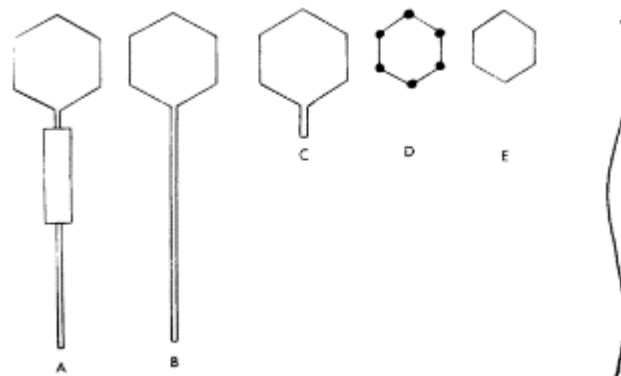


Figure 3 : Les 6 morphotypes de bases définis par Bradeley (Bradley, 1967)

Néanmoins, une autre étape importante est marquée par les travaux de Bradley D. E., en 1967. A cette date, 111 phages différents ont été décrits depuis les débuts de la microscopie électronique. Bradley les divise en six grands morphotypes (de A à F) (**Figure 3**): une première classification consensuelle se dessine.

2.2.2 La taxonomie contemporaine :

Le système L.H.T. ainsi que la classification initiée par Bradley constituent la base de la taxonomie moderne des phages. Elle sera reprise et améliorée par H-W. Ackermann tout au long de sa carrière comme médecin et professeur émérite du Département de microbiologie, immunologie et infectiologie de la Faculté de médecine de l'Université Laval (H. W. Ackermann, 2011, 2003). En 1971

elle sera adoptée par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV) chargé de nommer et classer les virus, dont Ackermann fût le vice-président.

Tableau 1 : Publications des rapports ICTV et évolution de la taxonomie (adapté de King *et al.* 2012)

	Lieux et dates des Congrès internationaux de virologie :	Contenus publiés	Références
I	Helsinki, 1968	43 familles et groupe	
II	Budapest, 1971 at Madrid, 1975	47 familles et groupe	
III	Le Haye, 1978	50 familles et groupe	
IV	Strasbourg, 1981	54 familles et groupe	
V	Sendai, 1984, Edmonton, 1987 et Berlin 1990	2420 virus appartenant à 73 familles et groupes	
VI	Glasgow, 1993	1 ordre, 50 familles, 9 sous-familles, 164 genres et plus de 3600 espèces de virus	
VII	Jérusalem, 1996	3 ordres, 63 familles, 9 sous familles, 240 genres, 1550 espèces	
VIII	Sydney, 1999, Paris, 2002	3 ordres, 73 familles, 11 sous-familles, 289 genres, 1898 espèces	(Fauquet and Fargette, 2005)
IX	Leiden, 2009	6 ordres, 87 familles, 19 sous-familles, 349 genres, 2285 espèces	

En 2011, L'ICTV, établit son IX^{ème} rapport (

Tableau 1) faisant état de l'art de la nomenclature des virus et de la taxonomie (King, Adams, Carstens, 2012). En revanche depuis cette date, des modifications ont été ratifiées par le Comité exécutif après un vote général des membres, la dernière datant de juillet 2014. Ces modifications sont publiées sur le site de l'ICTV (<http://www.ictvonline.org/>) et permettent de suivre l'évolution de la taxonomie en temps réel et de classer plus de 6 000 phages à l'heure actuelle.

12

2.2.3 L'ordre des *Caudovirales* :

Il est distingué un ordre principal, celui des *Caudovirales* qui regroupe la majorité des bactériophages (96%) et notamment tous ceux ayant une symétrie binaire (phage caudé). Les virions (particules virales) sont constitués d'une « tête » à symétrie icosaédrique et d'une « queue » à symétrie hélicoïdale. De plus, ils ne sont pas enveloppés et le génome est formé d'une molécule d'ADN bicaténaire, non segmentée et linéaire. Cet ordre est divisé en trois familles (**Figure 4** et **Figure 5**) : les *Siphoviridae* (61%), les *Myoviridae* (25%), et les *Podoviridae* (14%), chacune de ces appellations latines faisant référence aux propriétés physiques et structurales des phages que l'on y retrouve. Cette très forte proportion de phages caudés connue, dans les classifications actuelles n'est peut-être pas le reflet de la réalité. En effet, ils parasitent des bactéries très étudiées dans de nombreuses branches de la biologie (médecines humaine et vétérinaire, agronomie, écologie), or ces bactéries cultivables ne représentent qu'une fraction du monde bactérien.

Dans ces familles les différentes espèces de phages présentent des variations de taille (24 à 400 nm) et de taille de génome (18 à 400 Kb).

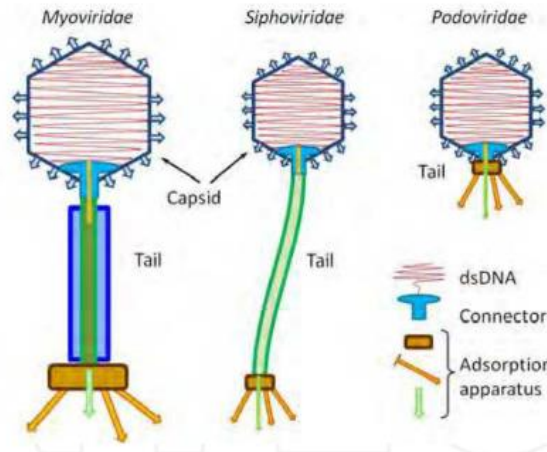


Figure 4 : Représentation des trois familles de phages caudés

A) Les *Myoviridae* avec une queue contractile constituée d'une gaine et d'un tube central; B) Les *Siphoviridae* avec une longue queue non contractile; C) Les *Podoviridae* avec une queue courte (Orlova, 2012)

Chez les phages caudés, la queue permet au phage d'adhérer à l'hôte et sert de conduit pour l'injection du génome. Les queues sont composées d'hélices (ou des piles de disques, de sous-unités) variant de 3 à 825 nm de longueur. Elles ont généralement des plaques de base « base plates », des pointes « spikes », et des fibres terminales « terminal fibres » à leur extrémité distale. La longue queue, des *Myoviridae* (exemple, le phage T4) peut être contractile contrairement à celle des *Siphoviridae* (exemple, le phage λ) qui ne l'est pas. Tous les phages à longue queue possèdent un gène (généralement > 2 kb) codant pour une « tape measure protein », qui détermine avec précision la longueur de la queue. Les queues contractiles sont souvent des structures très complexes; par exemple, la queue de T4 est composé de 22 protéines différentes (Mesyanzhinov *et al.*, 2004). Un tube central est entouré d'une enveloppe protéique, lors de l'infection, cette dernière se contracte permettant au tube central de pénétrer la paroi bactérienne (Leiman *et al.*, 2004). Le tube des queues non contractiles, quant à lui, se compose principalement de copies multiples d'une protéine majeure. Lors de l'infection, la forme générale de la queue non contractile est maintenue. Concernant les *Podoviridae* à queue courte, le coliphage T7 possède des protéines d'infection clés présentes dans la capside qui peuvent former une queue extensible pour établir le contact avec l'hôte (Molineux, 2001).

13

Contrairement aux phages caudés, les virus cubiques, filamenteux ou pléomorphiques sont plus rares et constituent moins de 4 % des bactériophages. Ces phages sont classés dans 15 familles (**Tableau 2**). Aucun ordre permettant de les regrouper ne leur a été attribué en raison de leur extrême diversité. Par exemple, *Microviridae* correspond à la famille des phages les plus petits. On trouve aussi, les *Tectiviridae* qui sont recouverts d'une bicouche protéique. Certains phages ont une structure en forme de gouttelette (*Guttaviridae*). D'autres possèdent deux queues bilatérales (*Bicaudaviridae*). Enfin une famille, dont le nom reste indéfini, contient le genre *Salterprovirus* qui présente une forme ovoïde semblable à la famille des *Fuselloviridae*.

Chapitre 1 : LES BACTERIOPHAGES

Tableau 2 : Tableau de classification des principaux ordres de phages détaillant le type de génome et les spécificités qui sont associées

ORDRES	Familles	Symétrie	Spécificités	Génome	Genres / Espèces	Exemple	
Caudovirales	Myoviridae	Capsides	Queue longue et contractile		6 sous-familles /39 genres	T4	
	Siphoviridae	icosaédriques et queue	Queue longue mais non contractile	ADN db non segmenté et linéaire	6 sous-familles / 94 genres	λ	
	Podoviridae	hélicoïdales	Queue courte et non contractile		3 sous-familles / 20 genres	T7, P22	
Ligamenvirales	Lipothrixiviridae	Capsides	Enveloppe lipoprotéique		3 genres / 8 espèces	TTV1	
	Rudiviridae	hélicoïdales	Dépourvu d'enveloppe	ADN db linéaire	1 genre / 3 espèces	SIRV-1	
Autres	Familles n'étant rattachées à aucun ordre / phages regroupés selon la géométrie de leur capsid						
Cubiques	Corticoviridae		Capside complexe		circulaire	1 genre / 1 espèce	PM2
	Cystoviridae		Enveloppe lipidique	ADN db	linéaire	1 genre / 1 espèce	φ6
	Leviviridae	Capsides icosaédriques	Pas d'enveloppe	ARN sb	linéaire	2 genres / 4 espèces	MS2
	Microviridae		Petite capsid non enveloppée	ADN sb	circulaire	4 genres / 12 espèces	φX174
	Tectiviridae		Pas d'enveloppe	ADN db	linéaire	1 genre / 5 espèces	PRD1
Filamenteux	Inoviridae	hélicoïdales	Pas d'enveloppe	ADN sb	circulaire	2 genres / 43 espèces	M13
Pléomorphes	Plasmiviridae		Enveloppe lipidique / pas de capsid			1 genre / 1 espèce	L2
	Fuselloviridae			ADN db	circulaire	2 genres / 9 espèces	SSV1
	Bicaudaviridae	Capsides à	le seul genre			1 genre / 1 espèce	ATV
	pas rattaché à une famille	symétries				Salterprovirus / 1 espèce	His1
	Ampullaviridae	complexes		ADN db	linéaire	1 genre / 1 espèce	ABV
	Globuloviridae					1 genre / 2 espèces	PSV
	Guttaviridae		Enveloppe lipidique	ADN db		2 genres / 2 espèces	SNDV

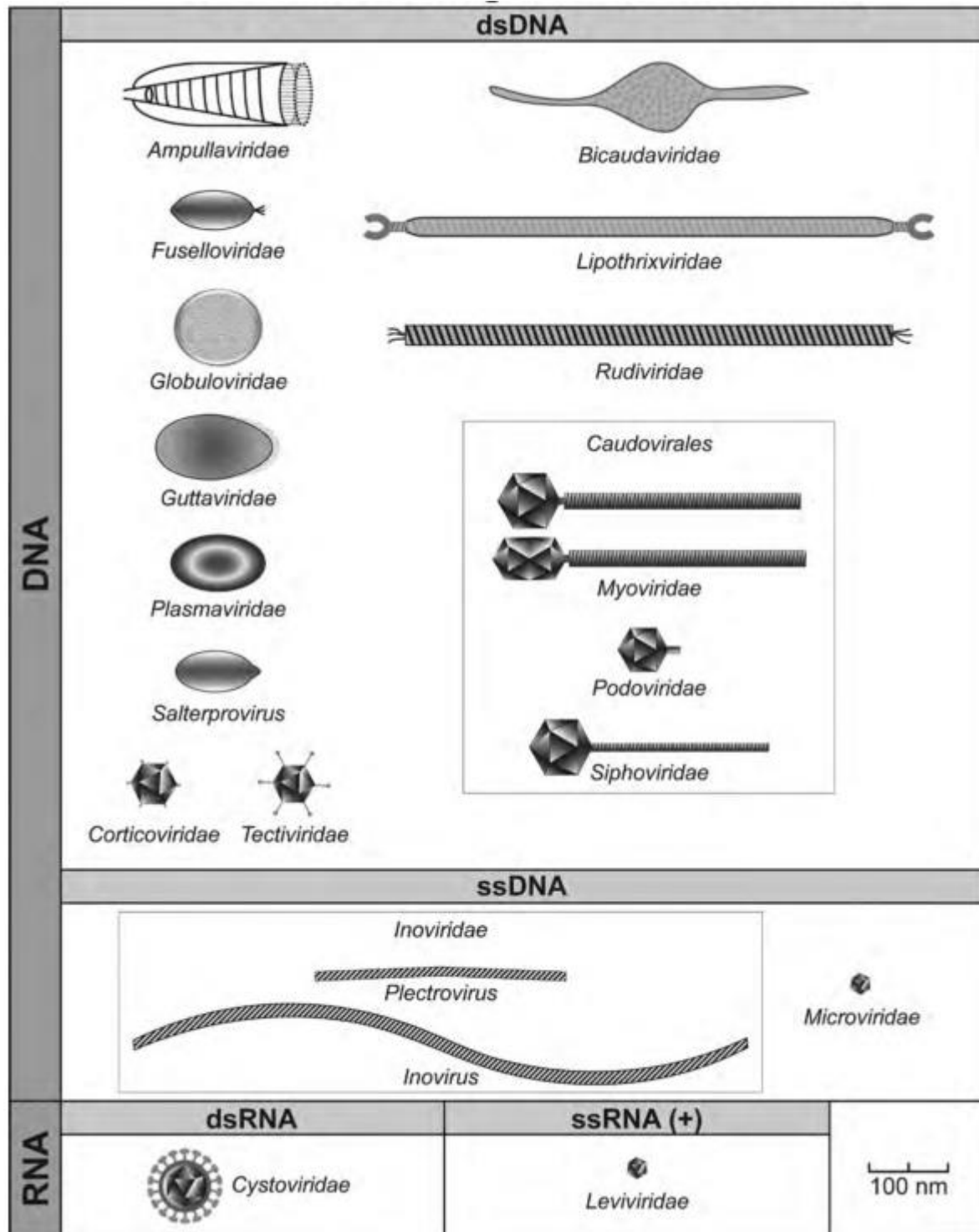


Figure 5 : Taxonomie des phages : Représentation des différents morphotypes connus (King *et al.*, 2012)

3. Les différents cycles de multiplication :

Tous les phages connus peuvent être divisés en deux groupes principaux en fonction du type d'infection qu'ils induisent lors de leur parasitisme (Kutter E. *et al.*, 2005). Un groupe se caractérise par une infection lytique et l'autre est représenté par un cycle lysogène également appelé tempéré (**Figure 6**).

Dans la première forme d'infection, la libération de l'ADN induit un détournement de la machinerie enzymatique de la bactérie hôte pour le bénéfice des agents infectieux aboutissant à la synthèse de 50 à 200 nouveaux phages. Cette abondante synthèse nécessite une réquisition des ressources de la cellule hôte. S'en suivra une lyse, causant la mort de la cellule bactérienne hôte et la libération de nouveaux virions sur le site infectieux.

L'autre mode d'infection, lysogène, se caractérise par l'intégration de l'ADN du phage dans le génome de la cellule hôte. L'ADN de phage incorporé sera répliqué en même temps que le génome des bactéries hôtes et de nouvelles bactéries hériteront de ce fragment d'ADN viral. Cette transmission pourrait avoir lieu à travers plusieurs générations de bactéries sans grandes conséquences métaboliques pour elles. En revanche, en présence d'un stress tels que les UV ou un environnement non favorable pour la bactérie, l'ADN du phage est capable de revenir à un cycle lytique, conduisant à la libération de phages complètement assemblés (**Figure 6**).

16

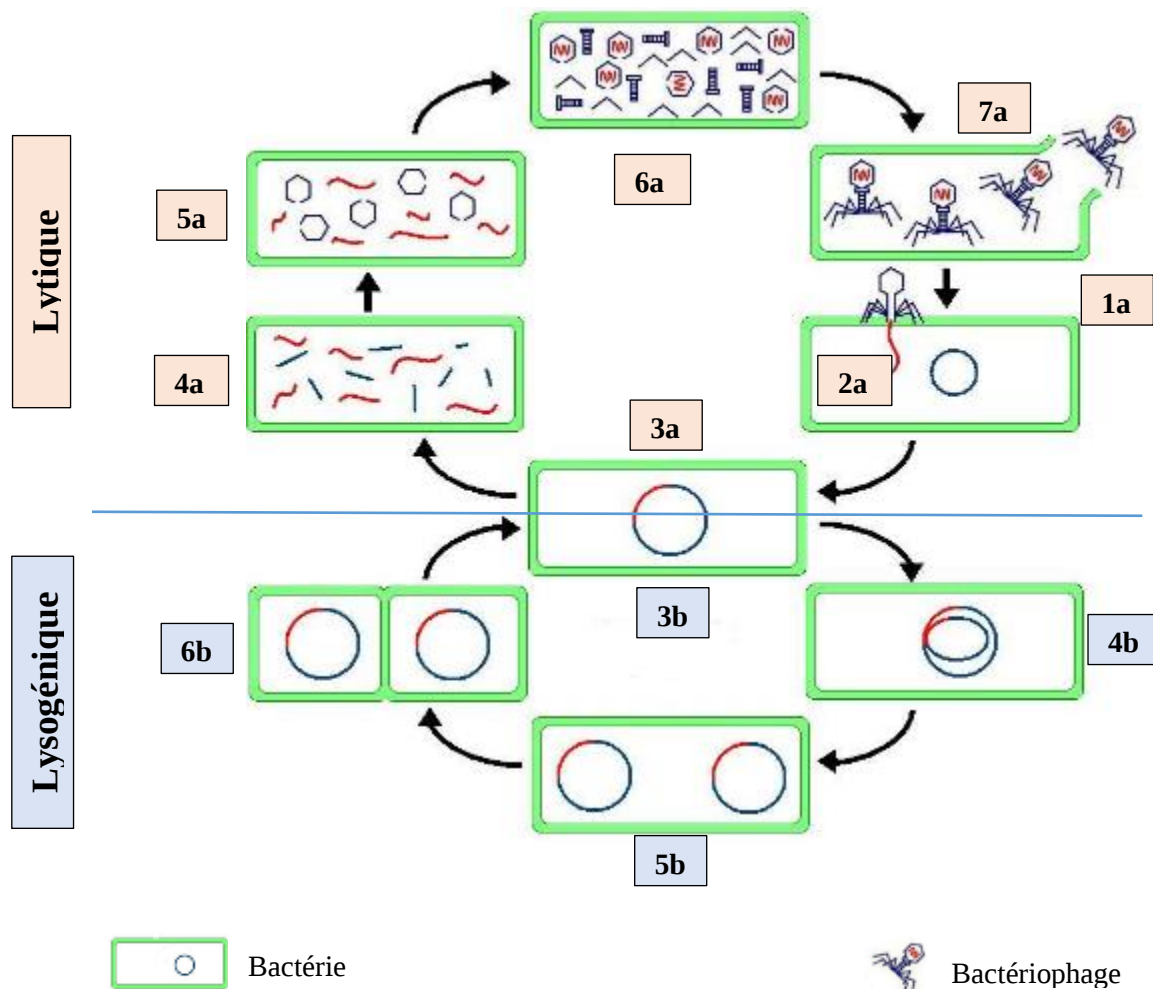
3.1 Le cycle lysogénique :

Les phages tempérés sont capables de subir un cycle de vie lysogène (**Figure 6**). Dans ce cas, le phage ne se multiplie pas, mais intègre son génome dans le chromosome de l'hôte pour établir un état de prophage (**Figure 6.3b**) (Campbell, 1992). Par conséquent, le phage est répliqué à chaque division de la bactérie tout en étant dans un « état de repos » (**Figure 6.4, 5, 6b**). Le signal permettant d'entrer dans le cycle de vie lytique ou lysogène par ces phages de descendance tempérée est basé sur un interrupteur génétique qui détecte les conditions environnantes dans lesquelles il devra évoluer. Des déclencheurs environnementaux tels que, le pH, la température, la concentration en sel, une carence nutritionnelle ou des déclencheurs cellulaires peuvent induire le passage au cycle lytique (**Figure 6.3a**) et libérer des progénitures de phages en établissant un cycle lytique complet (**Figure 6.3a-7a**). Plus récemment, des travaux ont mis en évidence la production de peptides par les phages eux-mêmes, leur permettant d'osciller entre cycles lytiques et cycles lysogéniques (Erez *et al.*, 2017).

3.2 Le cycle lytique :

Les phages virulents sont limités à un cycle de vie lytique qui se termine finalement par la lyse de leur hôte pour libérer les virions de la descendance (**Figure 6**). La plupart des phages qui sont problématiques pour les industries de fermentation et de bioprocédés sont de type lytique strict. A l'inverse nous verrons qu'ils peuvent également être d'un grand intérêt pour d'autres applications.

Après la phase d'adsorption à la surface de la cellule hôte (**Figure 6.1a**), le phage introduit son génome dans le cytoplasme de l'hôte (**Figure 6.2 et 3a**), où l'ensemble des protéines codées par son génome est exprimé permettant en suite la réplication du génome phagique (**Figure 6.4a**) et en dernier lieu, la synthèse des protéines structurales (**Figure 6.5a**).



17

Figure 6 : Schéma des cycles de reproduction phagique (lytique et lysogénique)

1a. Adsorption du phage aux récepteurs de la surface bactérienne. **2a.** Injection du génome viral dans le cytoplasme bactérien. **3a et b.** Intégration du génome viral au génome bactérien. **Cas du cycle lytique :** **4a.** Synthèse des protéines précoces virales et réplication du génome grâce à la machinerie cellulaire de l'hôte. **5a.** Synthèse des protéines structurales des virions. **6a.** Encapsidation des génomes viraux. **7a.** Lyse de la bactérie et sortie des nouveaux virions. **Cas du cycle lysogénique :** **3b.** En présence d'un stress extérieur le génome viral est maintenu comme prophage dans la cellule hôte. **4b.** Réplication du génome bactérien et viral. **5b et 6b.** Multiplication des bactéries en conservant le génome du phage.

3.3 Etapes du cycle lytique :

3.3.1 L'adsorption :

Une souche de bactériophage spécifique est connue pour être capable d'infecter une gamme d'hôtes étroite. Cette spécificité de l'interaction de la cellule bactérienne avec le phage est déterminée par la spécificité d'adsorption, qui à son tour dépend de la nature et de la structure des récepteurs de la surface cellulaire bactérienne (Rakhuba *et al.*, 2010). Les phages s'adsorbent en deux étapes. La première, réversible, implique des interactions faibles de type Van der Waals. À ce stade, le phage peut ne pas poursuivre l'infection de la bactérie si les conditions environnementales ou intrinsèques ne le permettent pas. Parfois deux récepteurs sont impliqués dans l'adsorption. Le premier fixe le phage très en surface, par exemple une flagelline d'un flagelle bactérien. Puis des changements conformationnels engendrés par cette liaison modifient l'organisation du support du récepteur qui va alors « tracter » le phage au contact d'un second récepteur plus proche de la membrane bactérienne. L'emplacement et le type de récepteur de surface des cellules bactériennes peuvent varier (Fokine and Rossmann, 2014) : chez les bactéries Gram -, il peut s'agir des acides téichoïques de la paroi cellulaire, des protéines flagellaires ou des lipopolysaccharides (LPS). Le site d'interaction phagique quant à lui peut être situé au niveau des fibres caudales (courtes ou longues) ou au niveau de la capsid. Cette fixation, réversible à son début via des interactions électrostatiques, devient donc rapidement irréversible.

Outre l'adsorption via le flagelle bactérien, certains phages peuvent également débiter leur infection en s'attachant au pili. Plus particulièrement, les phages MPK7 et M22 de *P. aeruginosa* qui utilisent les pilis de type IV comme récepteurs. De ce fait, des souches de *Pseudomonas* dont le génome n'exprime pas le gène *pilA* sont donc résistants à ce type de phages (Bae and Cho, 2013; Heo *et al.*, 2007). Les récepteurs reconnus par les phages infectant *P. aeruginosa* sont listés dans le tableau qui suit:

18

Tableau 3 : Récepteurs spécifiques de *P. aeruginosa* reconnus par les phages

	Récepteurs spécifiques de l'Hôte	Références
<i>P. aeruginosa</i>	Antigènes de surface	
	O-antigen	(Le <i>et al.</i> , 2013)
	Vi-antigen	(Jarrell and Kropinski, 1976) (Hanlon <i>et al.</i> , 2001)
	Pilis de type IV	
	PilA	(Heo <i>et al.</i> , 2007) (Bae and Cho, 2013)

3.3.2 Transfert du génome phagique :

Une fois l'adsorption terminée le processus de « tunnélisation » de la paroi bactérienne débute immédiatement. Les phages disposent d'un équipement enzymatique et glycoprotéique, adjacent à leurs sites de fixation, capable de perforer la paroi des bactéries. En effet, contrairement à un virus de cellule

eucaryote qui n'a que la membrane cellulaire à franchir, les phages vont être confrontés au peptidoglycane bactérien. L'activation des équipements enzymatiques est déclenchée par la cascade de modifications structurales de la paroi du phage, provoquée par la deuxième étape de l'adsorption (Orlova, 2012; Plisson *et al.*, 2007). La digestion du peptidoglycane se poursuit jusqu'à la membrane bactérienne qui sera perforée de la même manière. L'adhésion irréversible produit un signal en cascade qui est transmis le long de la queue du phage, entraînant l'ouverture du canal du connecteur et permettant à l'acide nucléique du virus d'être transporté dans le cytoplasme bactérien tandis que la capsid reste à l'extérieur (Plisson *et al.*, 2007).

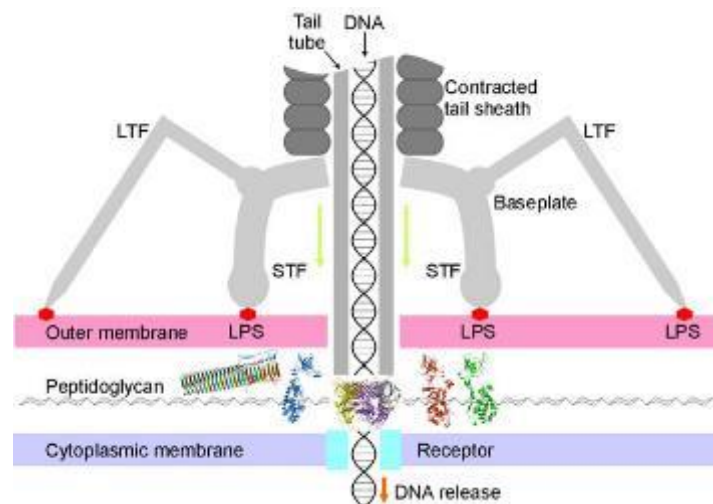


Figure 7 : Equipement enzymatique des phages caudés impliqué dans le processus de « tunnélisation » de la paroi bactérienne

Le mécanisme de transduction du signal le long de la queue hélicoïdale du phage s'applique également à d'autres structures creuses en réponse à des stimuli. En ce point, une analogie intéressante peut être faite avec les systèmes de sécrétion T6SS (« Type 6 secretion system ») bactériens. Ces structures présentes à la surface des bactéries pathogènes font environ 10 nm d'épaisseur et sont ressemblantes à des « aiguilles ». Comme la queue des phages, elles ont un canal interne de 2-3 nm entouré d'un ruban protéique (**Figure 8**). Au contact d'une cellule eucaryote cible, un signal est transmis le long de la structure hélicoïdale pour activer la machinerie de sécrétion qui est située dans la membrane bactérienne (Orlova, 2015). Les facteurs de virulence transitent ensuite à travers « l'aiguille » creuse jusque dans le cytoplasme des cellules de mammifères, très semblable au transport de l'ADN d'un phage, via le cylindre central de la queue, dans le cytoplasme de l'hôte bactérien.

Leiman *et al.* (Leiman *et al.*, 2009) sont parvenus à montrer via la cristallographie qu'il existe de fortes homologues de structures entre les deux systèmes. Cette conservation de la structure mais également de la fonction de certaines protéines suggère qu'ils partagent une origine évolutive commune.

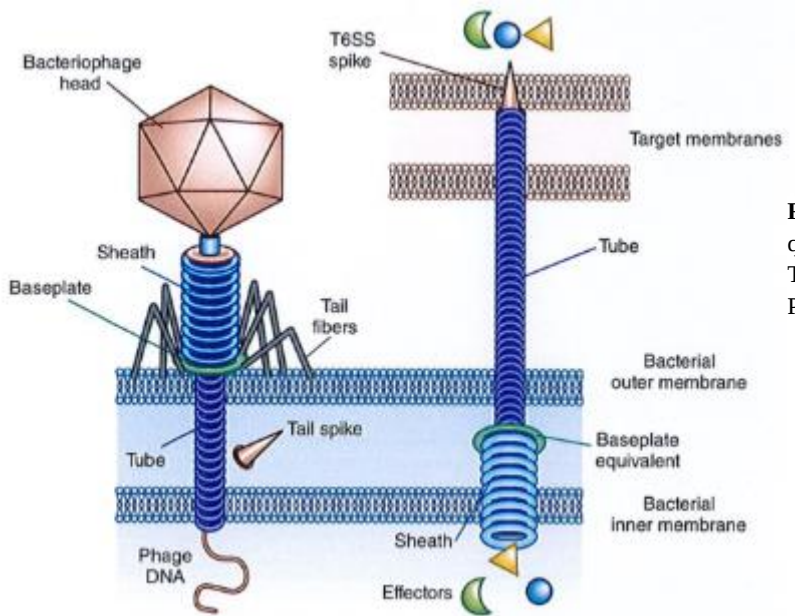


Figure 8 : Analogie des structures de la queue hélicoïdale des phages et du système T6SS de sécrétion bactérien (Braun and Patzer, 2013)

3.3.3 Réplication du génome phagique :

Une fois internalisé, le matériel génétique peut être intégré dans le génome bactérien (1992) ou rester libre dans le cytoplasme, tel un plasmide. Quels que soient les modes de transfert, la phase de vulnérabilité du génome lors de son transfert dans l'hôte avise le génome bactérien. Les bactéries pourraient alors profiter de ce matériel infectieux par l'action d'endonucléases. Pour éviter cette attaque les bactéries en même temps ou juste avant l'entrée du génome phagique synthétisent des endonucléases. Ainsi protégé l'acide nucléique phagique peut commencer sa réplication. Les gènes précoces codent notamment pour la réparation de l'ADN. Parmi les gènes plus tardifs, on trouve ceux codant pour des protéines structurales qui sont exprimées puis des gènes de lyse.

3.3.4 Assemblage des particules virales :

Les capsides des phages caudés sont constituées de multiples copies d'une protéine majeure de tête, qui forment leur architecture icosaédrique. Cette protéine ayant une forme d'anneau formant le port d'entrée et de sortie de l'ADN. Des protéines additionnelles, appelées protéines accessoires. L'organisation de la capside est partagée par de nombreux virus d'Eucaryotes et d'Archaea. Chez les *Caudovirales*, le processus d'assemblage des virions infectieux est complexe et est présenté (**Figure 9**). Il y a d'abord assemblage des différentes sous-unités en procapside vide ceci par l'intermédiaire de protéines d'échafaudage. Le montage de la capside par un réarrangement conformationnel des protéines non structurales est appelé expansion et est concomitant à l'entrée de l'ADN.

cas l'ajout de protéines accessoires vient renforcer la stabilité de la capside. Des protéines de décoration peuvent également venir se fixer en surface. A la fin de l'encapsidation, selon les phages, une ou plusieurs protéines de fermeture se fixeraient empêchant ainsi une sortie prématurée de l'ADN du virion.

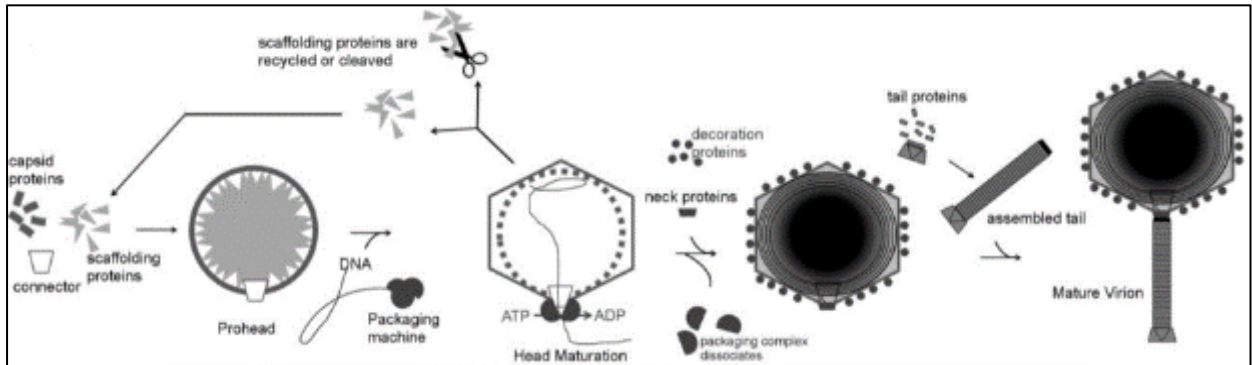


Figure 9 : Représentation schématique des étapes d'assemblage des phages caudés à ADN double brin (Aksyuk and Rossmann, 2011)

Tableau 4 : Bactériophages portés à l'étude pour leur méthode d'encapsidation

<i>Caudovirales</i>	Nom bactériophages	Références
<i>Myoviridae</i>	T4	(Ray <i>et al.</i> , 2009)
<i>Syphoviridae</i>	λ , HK97	(Dokland and Murialdo, 1993) (Conway <i>et al.</i> , 1995)
<i>Podoviridae</i>	P22	(Jiang <i>et al.</i> , 2003)

Les données obtenues *in vitro* chez P22 présentées par Parker et Prevelige en 1998 montraient qu'une force ionique élevée interférait sur les liaisons entre protéines d'échafaudage et protéines de la procapside, par conséquent l'expansion de la procapside de P22 était inhibée. Ce qui suggérait que des interactions électrostatiques étaient misent en jeux (Parker and Prevelige, 1998). Leurs analyses par SDS-PAGE révélaient qu'en passant de 25 mM à 1000 mM de NaCl dans le tampon, les procapsides contenaient jusqu'à trois fois moins de protéines d'échafaudage. Une explication fût que, la protéine d'échafaudage chargée positivement sur son groupement carboxyl- terminal devait pouvoir se lier aux résidus complémentaires de charges négatives de la procapside, pour permettre un assemblage correct puis une expansion de la capsid (Figure 10).

Une fois les protéines d'échafaudage relarguées, un grand nombre de résidus chargés négativement tapisse donc la cavité interne de la procapside. Partant de ces observations et dans l'état actuel des connaissances, le passage de l'état de procapside à capsid mature via les mécanismes d'expansion est largement attribué au principe de répulsion électrostatique (Figure 10). En effet, l'entrée de l'ADN qui est également chargé négativement viendrait déstabiliser la procapside et par répulsion des charges, modifier la conformation structurale des sous unités protéiques de la capsid (Jiang *et al.*, 2003). Chez le phage T4, l'initiation de l'encapsidation de l'ADN est nécessaire et suffisante pour provoquer l'expansion des capsides (Jardine and Coombs, 1998).

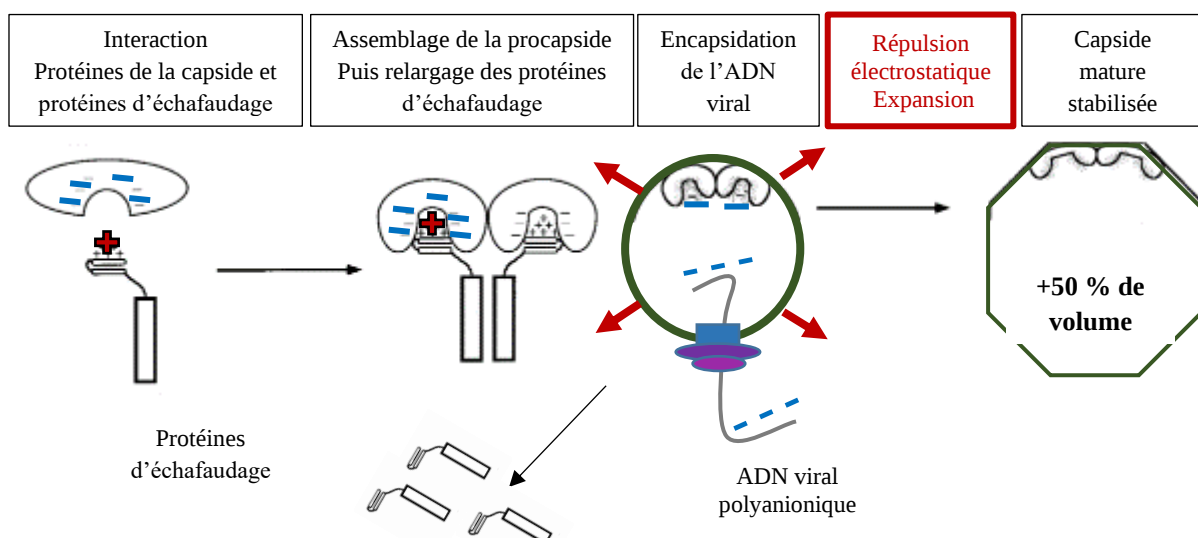


Figure 10 Modèle d'assemblage puis d'expansion de la procapside prenant en compte le principe de répulsion électrostatique. D'après (Parker and Prevelige, 1998)

- Etapes finales de l'assemblage des virions :

La dernière étape de l'assemblage de la capside est sa fermeture par des protéines spécifiques qui viennent ainsi stabiliser l'ADN nouvellement empaqueté, empêchant toute sortie prématurée. Ce processus peut varier selon les phages, néanmoins une étude par cryo-microscopie électronique a permis d'analyser la structure multi-protéique de ce complexe (~900 kDa) chez le bactériophage SPP1 (Orlova *et al.*, 2003). Appelé connecteur, ce dernier se compose de la protéine portale gp6, et de deux protéines complémentaires gp15 et gp16, formant un pore central (**Figure 11**). Chez SPP1, bien que la protéine portale gp6 seule soit responsable de l'encapsidation de l'ADN viral (Isidro *et al.*, 2004), l'attachement de gp15 et gp16 est nécessaire pour retenir l'ADN dans la capside. La comparaison des structures de gp6 au sein du complexe et gp6 seule (avant fixation de gp15 et gp16) a permis d'identifier un changement conformationnel de la protéine portale concomitant avec la fin de l'encapsidation et permettant la fixation de gp15. Cette dernière recrutant à son tour gp16, responsable de l'encombrement physique du pore central et donc de la fermeture de la capside. Le repliement en feuillets bêta parallèles d'une boucle flexible de cette dernière est à l'origine de l'obstruction du pore (**Figure 11**). Des ponts disulfures au sein de cette structure secondaire permettent de stabiliser et maintenir cette conformation clé (Lhuillier *et al.*, 2009). Cette fermeture est réversible et permet lors d'un futur cycle infectieux de délivrer le génome viral dans le cytoplasme bactérien.

23

Finalement, la dernière extrémité d'ADN emballée reste fixée à la partie basale du connecteur. De 19 à 29 nm du génome de SPP1 sont ainsi protégés par cette structure (Lurz *et al.*, 2001; Tavares *et al.*, 1996). Cette caractéristique du génome viral a également été observée chez d'autres phages, suggérant un rôle important dans la physiologie du cycle viral (Thomas, 1974). Il semblerait que ceci permette une sortie polarisée de l'ADN viral lors de l'infection. In vitro, il a été montré que cette partie de l'ADN est la première expulsée du phage. De plus, des phages λ mutants ne présentant plus d'interaction entre cette extrémité de l'ADN et la queue ne sont plus capables d'expulser leur ADN de la capside (Thomas *et al.*, 1978).

La protéine gp16 quant à elle, sert également d'interface de fixation pour la queue, étape qui termine l'assemblage des virions. Cette fixation est dépendante de la protéolyse de quelques acides aminés de gp16 (Orlova *et al.*, 2003).

L'ubiquité de la protéine portale chez les phages caudés suggère fortement que les mécanismes moléculaires décrits ici s'appliquent également à de nombreux autres virus tels que le phage ϕ 29 (Simons *et al.*, 2000), la phage T3 (Valpuesta *et al.*, 2000), le phage T7 (Agirrezabala *et al.*, 2005).

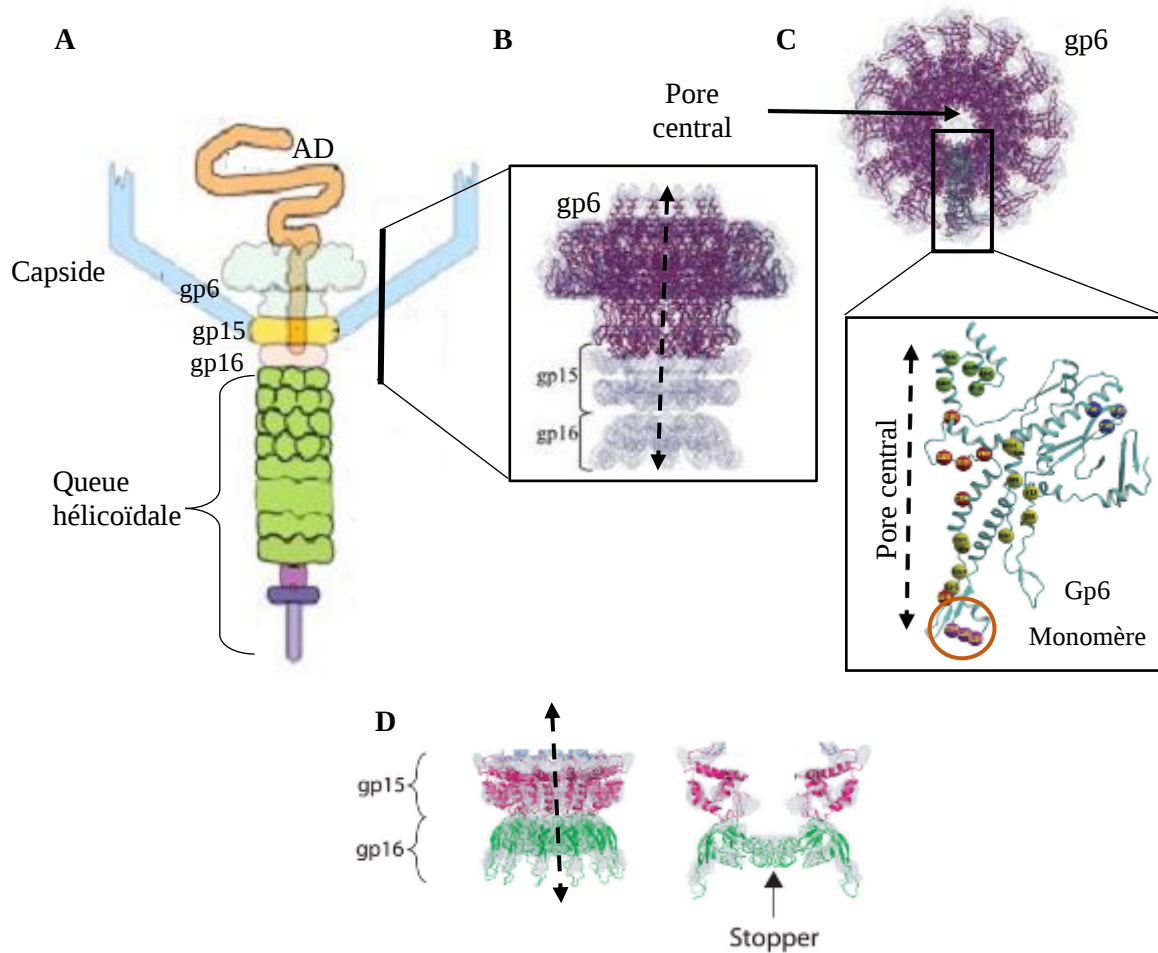


Figure 11 : Structure du connecteur chez le bactériophage SPP1

A. Représentation des principaux éléments d'assemblage : la capside mature expansée (en bleu) contenant l'ADN viral, la protéine portale gp6 ainsi que les protéines complémentaires gp15 et gp16, la queue hélicoïdale (en verte) se terminant par un appendice pour percer les parois bactériennes (en violet). **B.** Analyse par cryo-microscopie électronique de la structure du connecteur chez le phage SPP1 (résolution 10 Ångström) : gp6 en magenta et gp15 gp16 en gris. La protéine gp6 est un assemblage de 13 monomères (Orlova *et al.*, 2003). **C.** Vue orthogonale de la protéine portale gp16 uniquement. Les 13 sous unités sont assemblées sous forme d'un anneau formant un pore au centre. Chaque monomère est constitué de structures identiques en feuillets bêta et hélices alpha. Des mutations dans ces structures (sphères de couleurs) inhibent l'encapsidation de l'ADN (Isidro *et al.*, 2004). La structure encerclée en orange correspond à la zone impliquée dans le recrutement de la protéine gp15. **D.** Structures des protéines gp15 et gp16 déterminées par RMN. Le « Stopper » est issu du repliement d'une boucle flexible de gp16 formant deux hélices bêta parallèle à l'origine de la fermeture du pore centrale du connecteur (Lhuillier *et al.*, 2009).

3.1.5 Libération des virions :

À l'exception des bactériophages filamenteux, dont les particules virales sont libérées à partir de l'hôte par un mécanisme lié à la sécrétion qui maintient l'intégrité des cellules bactériennes (Russel, 1995), les phages induisent généralement une lyse de bactéries infectées pour permettre l'échappement efficace de la descendance vers le milieu extracellulaire. Les phages lytiques procèdent essentiellement par deux mécanismes de base. Les phages icosaoédriques avec de petits génomes simple brin semblent utiliser un seul effecteur de lyse, dont la fonction est d'inhiber une étape donnée de la synthèse du peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne (Bernhardt *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2000). Cette stratégie requiert une croissance active des cellules et la lyse semble être une conséquence de la rupture de la paroi cellulaire en développement, au niveau du septum (Bernhardt *et al.*, 2002). Les phages à ADN double brin, qui représentent plus de 95 % des virus bactériens connus, emploient au moins deux protéines dont l'action coordonnée aboutit à la lyse efficace de la cellule hôte au bon moment. Il s'agit d'une petite protéine hydrophobe appelée holine qui s'oligomérisent dans la membrane cytoplasmique provoquant la formation de pores, et d'une endolysine, enzyme clivant des liaisons du peptidoglycane de la paroi cellulaire. La lyse des bactéries Gram - infectées est, par nécessité, sous l'influence de deux processus chronologiques finement régulés, aboutissant à la destruction des trois couches de l'enveloppe cellulaire bactérienne : la membrane interne, le peptidoglycane de la paroi cellulaire et la membrane externe. Toujours en adéquation avec la diversité des phages, les premières étapes de la lyse font appel à un système à double composants (Catalao *et al.*, 2013).

25

1^{ères} étapes de la lyse : deux variantes :

Le système holine-endolysine (ex : phage λ)

Chez la majorité des phages à ADN double brin, les gènes impliqués dans la lyse bactérienne sont regroupés sous la forme de « cluster » au sein du génome viral. On parle ainsi de cassettes virales (Saier and Reddy, 2015). Toutefois, il existe d'autres phages pour lesquels l'organisation spatiale et temporelle des gènes impliqués dans la lyse est sensiblement différente et ce pour des phages infectant des bactéries de Gram + ou - (Catalao *et al.*, 2013).

Ces gènes codent pour des protéines exprimées tardivement dans le cycle du phage « late expressed genes ». Les endolysines, ainsi nommées car elles s'accumulent à l'intérieur du cytoplasme, sont donc produites en fin de cycle et acquièrent leur conformation finale avant d'être exportées vers l'espace péri-plasmique de la paroi via des petites protéines transmembranaires (< 150 aa) appelées holines. Les holines sont classées en sept super familles (Reddy and Saier, 2013) et possèdent un domaine C-terminal très hydrophile ainsi que des domaines transmembranaires (de 1 à 4 DTM). Ces dernières jouent deux rôles : elles permettent aux endolysines de franchir la membrane interne via la formation de larges pores ~340 nm à 1 μ m de diamètre (Dewey *et al.*, 2010; Savva *et al.*, 2014), tout en enclenchant la fin du cycle viral « clock function ». Les holines s'oligomérisent dans la membrane, sous

la forme de dimères puis d'agrégats excluant les lipides (Wang *et al.*, 2003). La formation de ces « rafts » entraîne petit à petit une diminution de la force motrice protonique (Gründling *et al.*, 2001). Cette dépolarisation de la membrane catalyse alors des changements d'interactions protéine-protéine entre les structures hélicoïdales des holines enchâssées dans la membrane, aboutissant à la formation de pores au sein des rafts (**Figure 12**).

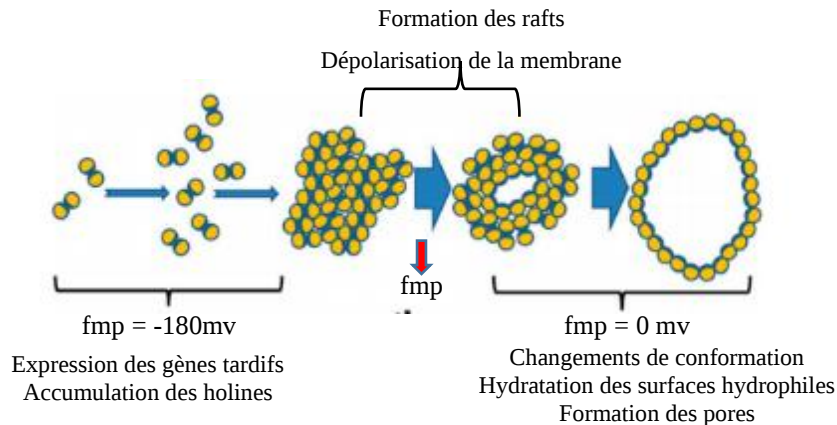


Figure 12 Formation des pores dans la membrane bactérienne d'après (White *et al.*, 2011).

Une fois dans l'espace péri-plasmique, les endolysines exercent leurs actions hydrolases en clivant différentes liaisons du polymère de peptidoglycane. Quatre types d'activités muralytiques sont associés aux différentes endolysines : glucosaminidase, muraminidase, endopeptidase ou amidase. Ces quatre activités sont dirigées contre les trois principaux liens covalents retrouvés dans le peptidoglycane (Young *et al.*, 2000). Les deux premiers types d'activité permettent le clivage au niveau des sucres. Les endopeptidases clivent au niveau des peptides, tandis que les amidases permettent l'hydrolyse du lien amide entre les unités de glycans et les groupements peptidiques.

La cassette de lyse du phage λ comprend quatre gènes, S, R, Rz et Rz1 transcrits à partir d'un promoteur tardif, codant pour cinq protéines (**Figure 13**).

- Le gène S possède à lui seul un double motif d'initiation de la traduction aboutissant à la synthèse de deux protéines aux fonctions opposées (Bläsi *et al.*, 1989), la holine S_{105} (105 aa) et l'anti-holine S_{107} (107 aa), qui comme son nom l'indique, vient bloquer l'activité de la holine jusqu'au moment opportun (Gründling *et al.*, 2000). Chez d'autres phages ces deux fonctions peuvent être encodées par deux gènes distincts (Rydman and Bamford, 2003). Des structures secondaires en 5' des ARN codant pour la holine et l'anti-holine permettent de réguler un ratio d'environ 2 pour 1 respectivement. La protéine S_{105} est intégrée dans la membrane cytoplasmique via trois DTM. La protéine S_{107} diffère de S_{105} par la présence deux résidus en N-ter (Méthionine et Lysine). Ces résidus basiques protonés empêchent l'insertion de son premier domaine trans-membranaire dans la membrane interne et lui confèrent son effet inhibiteur sur la holine S_{105} . La dépolarisation de la membrane, en perturbant les interactions protéines-protéines,

annule l'effet inhibiteur de S₁₀₇ sur S₁₀₅, augmente la quantité de holines actives et actionne la formation des pores en quelques secondes (Grundling *et al.*, 2000). La réorganisation des DTM des holines permet aux hélices des domaines 1 et 3 d'orienter leurs acides aminés hydrophiles vers le lumen du futur canal, le DTM 2 ne pouvant interagir qu'avec les lipides de la bicouche (To and Young, 2014; White *et al.*, 2011).

- Le gène R en aval code pour l'endolysine R active, dont le passage est facilité par la formation des pores.

- Rz et Rz1 sont les deux derniers gènes de la cassette de lyse du phage λ . Tous deux codent pour des protéines qui interagissent ensemble et forment un complexe impliqué dans la fusion de la membrane interne avec la membrane externe.

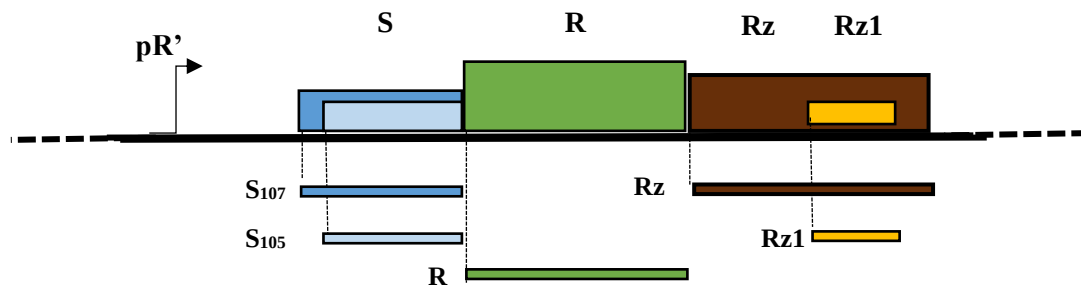


Figure 13 : Architecture de la cassette de lyse du bactériophage λ

Dans le cas d'une infection réalisée par un phage λ , la lyse de la cellule hôte est effective environ 50 minutes après que l'expression des gènes tardifs ait débutée.

27

Le système pinholine-SAR endolysine (ex : phage 21, phage P1)

Ce mécanisme de translocation de l'endolysine, sous la dépendance de l'holine observée lors d'une infection par le phage λ , a été longtemps considéré comme une caractéristique de la lyse des bactériophages (Wang *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2000). Cependant, des études sur fOg44, un phage qui infecte la bactérie Gram + *Oenococcus oeni*, ont mis en évidence un nouveau mécanisme de ciblage des endolysines au peptidoglycane (Sao-Jose *et al.*, 2000). Par la suite, Xu *et al.* (Xu *et al.*, 2004) ont montré que ce type de système intervient également chez les bactéries Gram - infectées par le phage P1 ou encore le phage 21.

Dans ce système, un type différent de holine, appelé « pinholine » et accumulé en fin de cycle viral dans le cytosol bactérien avant de former des petits canaux heptamériques « les pinholes » (~5nm de diamètre) dans la membrane interne de la bactérie. Les pinholines fonctionnent de paire avec des endolysines spécifiques qui s'accumulent dans le périplasme sous la forme d'enzymes inactives associées à la membrane, les SAR-endolysines. Elles possèdent un domaine transmembranaire nommé Signal-Anchor-Release (SAR) en N-terminal leur permettant d'être exportée du cytoplasme (lieu de

synthèse) vers la bicouche lipidique (lieu d'ancrage) par l'intermédiaire du système de sécrétion sec de l'hôte (Xu *et al.*, 2004). En effet, dans ce cas, la taille des « pinholes » ne permet pas le passage des endolysines. En revanche, ils suffisent à faire chuter la force proton motrice provoquant une dépolarisation puis disruption de la membrane interne. Les SAR-endolysines sont alors relarguées dans l'espace péri-plasmique, leur permettant de se replier dans leur conformation active (Xu *et al.*, 2005). Tout comme dans le premier système, les SAR-endolysines activées vont alors hydrolyser les liaisons du peptidoglycane fragilisant la paroi cellulaire de l'hôte.

- Dernière étape :

La fusion des membranes interne et externe

Holines et endolysines ont été considérés depuis longtemps comme les seules protéines essentielles pour réaliser la lyse des cellules hôtes bactériennes. Bien que cela puisse être vrai en conditions *in vitro* (Berry *et al.*, 2012), le fait est que, au travers de leur évolution, les phages semblent avoir conservé des fonctions de lyse accessoires qui leur sont indispensables *in vivo* (Berry *et al.*, 2012; Saier and Reddy, 2015).

Dans cette troisième étape, un complexe composé d'une petite lipoprotéine liée à la membrane externe bactérienne (o-spanin) s'associe de manière covalente à une protéine intégrée dans la membrane interne (i-spanin). Bien que les mécanismes ne soient finement décrits, ce système à double composants permet aux virions de s'affranchir de la membrane externe en la fusionnant avec la membrane interne (Figure 14).

28

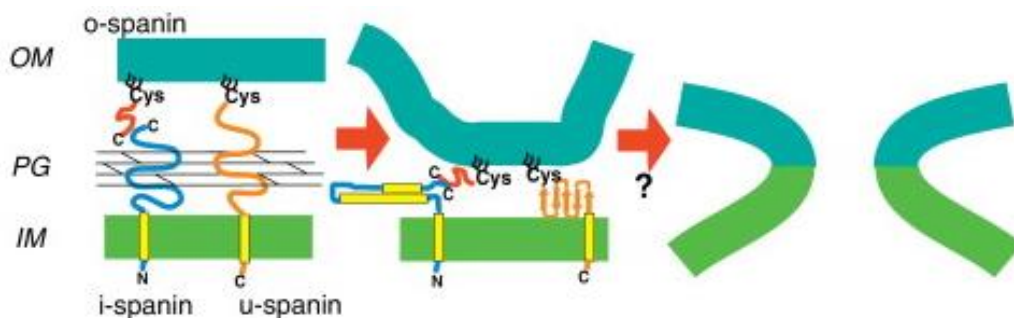


Figure 14 Model de fonctionnement et de structure des complexes spanins

Pour simplifier le schéma, le système spanin à deux composants est représenté ici sous la forme de monomères qui interagissent par leurs domaines C-terminaux, bien qu'en fait i-spanin et o-spanin soient des homodimères (Young, 2013). Chez le phage T1, une seule protéine (u-spanin), possédant à elle seule un ancrage à la membrane externe en N-ter et un ancrage à la membrane interne en C-ter, permet le rapprochement puis la fusion des deux membranes.

Chez le bactériophage λ , les « spanin » sont codées par les gènes *Rz* et *Rz1*. La protéine *Rz* est une protéine de 153aa, qui s'intègre dans la membrane interne bactérienne via son DTM situé en N-ter (Taylor *et al.*, 1983). La lipoprotéine *Rz1* quant à elle, est plus petite avec seulement 40 aa dont 25 %

de proline et se retrouve au niveau de la membrane externe (Berry *et al.*, 2010; Kędzierska *et al.*, 1996; Summer *et al.*, 2007). Des essais de co-précipitation ont montré que le complexe Rz-Rz1 s'assemble dans l'enveloppe de l'hôte en fin de cycle d'infection en interagissant par leurs domaines C-ter présents dans l'espace périplasmique (Berry, Summer, Struck, & Young, 2008). Plus récemment, Berry *et al.* (Berry *et al.*, 2013) ont mis en évidence que ce complexe s'organisait en tétramère $Rz^2:Rz1^2$. En effet, les protéines Rz et Rz1 s'accumulent sous la forme d'homodimères par l'intermédiaire de trois ponts disulfures intramoléculaires (deux dans le dimère Rz et un seul dans le dimère Rz1). Suite à l'action des holines puis des endolysines sur le peptidoglycane, les complexes i-spanin /o-spanin diffusent librement dans l'espace périplasmique, s'accumulent et par des changements de conformation, rapprochent les membranes l'une de l'autre puis les fusionnent (Young, 2013). Ceci n'est pas sans rappeler la dynamique du système SNARE qui fait partie intégrante du trafic endo-membranaire des vésicules d'endo- et d'exocytose (Risselada and Grubmüller, 2012). Les protéines SNARE subissent une oligomérisation de leurs domaines hélicoïdaux, rapprochant ainsi la membrane de la vésicule de la membrane cellulaire du compartiment de destination.

Une fois de plus, la diversité des phages a permis de mettre en avant des variations moléculaires. Summer *et al.* (Summer *et al.*, 2007) parviennent ainsi, en réalisant une veille de tous les génomes séquencés disponibles, à identifier chez la plupart des phages infectant des hôtes Gram - deux gènes, codant pour des protéines aux structures proches de Rz et Rz1 « Rz- et Rz1-like ». Chez le phage T1, en revanche, un seul gène code pour une protéine unimoléculaire de 131aa (u-spanin) regroupant à elle seule les caractéristiques de Rz et Rz1 : une lipobox en N-terminal et un DTM en C-terminal. Au niveau génétique, chez le phage λ et de nombreux autres, le gène Rz1 (ou Rz1-like) est totalement intégré dans la même séquence nucléotidique que Rz « ou Rz-like » mais possède un cadre de lecture différent (ex : Phage T7). Pour d'autres, les deux gènes se chevauchent au sein du génome (ex : Phage P2). Une dernière famille correspond aux phages pour lesquels o-spanin et i-spanin sont codées par deux gènes bien distincts (ex : Phage T4).

29

3.4 Les autres cycles :

3.4.1 Le cycle pseudo-lysogénique :

Le phage injecte son génome dans la cellule hôte mais celui-ci ne s'intègre pas et reste latent dans le cytoplasme. Ce cycle, également décrit dans le **Tableau 5**, reste mal compris et interviendrait chez les bactéries ne possédant pas assez d'énergie disponible pour le phage, cela lui permettrait ainsi de survivre dans des environnements défavorables en attendant des conditions plus propices pour mettre en place un cycle lytique ou un cycle lysogénique (Ripp and Miller, 1997). Plus récemment, Latino *et al.* (Latino *et al.*, 2016) ont mis en évidence le fait que le maintien à long terme du génome de certains phages lytiques à l'intérieur de la bactérie *P. aeruginosa* PAO1, lors de la pseudolysogénie, pourrait favoriser le transfert de gènes responsables de l'apparition de résistances bactériennes.

3.4.2 Le cycle chronique :

Le cycle chronique n'a été décrit que pour une espèce de phages, les phages M13 du genre *inovirus*. En effet, dans leur cas, la libération de nouveaux virions se fait par bourgeonnement. La bactérie est alors préservée de la lyse et reste porteuse de façon chronique du génome phagique.

Tableau 5 : Les différents cycles d'infections et les caractéristiques à prendre en compte pour une utilisation en biotechnologie

Type de cycle	Phages	Caractéristiques	Avantages	Limitations
Lytique	ADN db, <i>Caudovirales</i>	Efficacité lytique : MOI, « burst size », plus efficaces sur des cellules en croissance.	Auto réplcatifs Accroissement de la concentration sur le site infectieux Faible MOI suffisant	Relargage de toxines possible durant la lyse cellulaire
Chronique	ADN sb, <i>Inoviridae</i> <i>Enterobacteria</i> (Phage M13) <i>Pseudomonas</i> (Phage Pf3)	Phages filamenteux : pas de lyse de la cellule, sortie des virions par bourgeonnement	Auto réplcatifs Limite le relargage de toxines	Cellules bactériennes infectées restent viables Apparition rapide de résistance par modification/perte des récepteurs (Pili)
Pseudo-lysogénique	ADN db, <i>Siphoviridae</i> <i>Pseudomonas</i> (phages DMS3, MP22, D3112)	Intégration dans le génome bactérien. Réalisation d'un cycle lysogénique sans lyse de l'hôte	Inhibition des facteurs de virulence bactériens Disruption des gènes de l'hôte lors de l'intégration dans le génome Limite le relargage de toxines	Transfert possible de gènes (Transfert horizontal)

4. Isolement et caractérisation de bactériophages de l'environnement :

Il n'est pas difficile de trouver des bactériophages étant donné la diversité des niches écologiques qu'ils colonisent. Le protocole permettant d'isoler un phage ne diffère que peu de celui jadis utilisé par Félix D'Hérelle et repose sur l'effet visible du phénomène lytique (Kuhl and Mazure, 2011). Cependant il est plus facile de les extraire à partir d'échantillons liquides. Mers, océans, rivières, eaux usées, eaux minérales, effluents domestiques, etc...sont potentiellement de grands réservoirs de bactériophages qui reflètent la diversité microbienne qui y vit. C'est pour cette raison que les phages ont d'ailleurs rapidement été utilisés comme indicateurs de contamination des eaux (Havelaar and Butler, 1991).

D'une manière générale, des méthodes de culture et des milieux de croissance spéciaux ne sont pas nécessaires pour l'isolement et la production de bactériophages. Seules les conditions de croissance optimales pour la souche bactérienne hôte ainsi que l'apport des éléments nutritifs indispensables doivent être respectés. Il y a cependant, une technique mise au point par Gratia en 1936, qui constitue la base de la plupart des procédures d'isolement, de croissance, et de titrage, utilisées dans les études de bactériophages. Il s'agit de la méthode en double couche d'agar « the double-agar-layer method », décrite en détail par Adams en 1959.

Selon l'origine des échantillons, une étape de décantation ou centrifugation permet d'éliminer des débris ou résidus macroscopiques, s'en suit une étape de filtration à 0,22 µm nécessaire pour s'affranchir des bactéries. Le filtrat peut ensuite être stocké à 4 °C et à l'abri de la lumière jusqu'à son utilisation. L'étape suivante correspond au mélange de quelques millilitres de la suspension à quelques microlitres d'une suspension en phase exponentielle de la bactérie hôte du phage recherché et à l'incubation pendant 5 min à 25 °C pour permettre la phase d'adsorption des phages. Le mélange est coulé sur des boîtes de pétri contenant déjà quelques mL d'un milieu nutritif gélosé. Les boîtes sont ensuite incubées la nuit à 25 °C. La présence de phage lytique est détectée via la formation de plages de lyses encerclées ou non de halos. Les halos sont provoqués par la diffusion de molécules enzymatiques et indiquent la présence d'un phage (K.A. Hughes *et al.*, 1998) .

Une bactérie infectée est lysée, relargant ainsi des dizaines de phages infectant les bactéries voisines. Une plage de lyse traduit donc la mort de bactéries de proche en proche, causée par l'infection d'un type de phage. L'analyse de chaque plage de lyse permet d'identifier le type de phage. Un échantillon de chaque plage est prélevé via une pipette pasteur pour inoculer une nouvelle culture en phase exponentielle de bactéries hôtes avant d'être de nouveau étalé sur boîte. L'opération est répétée trois fois afin de purifier le phage. Une étape de centrifugation (5 000 g pendant 15 min) élimine les bactéries. Les

phages sont ensuite sédimentés 2 h à 3 000 g et peuvent être stockés dans du tampon SM (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 99 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0,01% de gélatine) à 4 °C ou à -80 °C dans du tampon SM à 50 % de glycérol. Des méthodes plus sophistiquées d'ultra-centrifugation en gradient de densité (Yamamoto *et al.*, 1970), de colonne échangeuse d'ions, de précipitation au sulfate d'ammonium ou à l'hydroxyde de zinc (Newton and Bevis, 1959) peuvent également être utilisées pour purifier des volumes plus importants de cultures (cf partie 4.1).

Afin d'optimiser l'utilisation des phages, différents paramètres peuvent être déterminés permettant l'établissement de protocoles standardisés (Yu *et al.*, 2013) :

- La titration est possible par dénombrement des plages de lyse obtenues après dépôt, sur un milieu gélosé contenant les bactéries hôtes, des suspensions de phages diluées. Le titre est exprimé en PFU.mL⁻¹ « Plaque-Forming Units » incrémenté des facteurs de dilution initiaux (Bonilla *et al.*, 2016).
- L'indice de MOI (Multiplicity Of Infection) a été défini comme étant le rapport entre le nombre de particules phagiques et le nombre de cellules hôtes potentielles (Lu *et al.*, 2003). Des bactéries hôtes en phase exponentielle de croissance sont infectées par différents titres de suspensions de phages. Après une incubation à 25 °C pendant 3h30, le lysat est centrifugé à 9000 g pendant 3 min. Le surnageant est filtré et analysé pour déterminer le titre phagique de chaque suspension. Le plus élevé définit l'indice de MOI optimal. MOI et PFU sont liés par la formule suivante :

$$\text{MOI} = \text{nombre de virus utilisés pour l'infection (PFU)} / \text{nombre cellules hôtes (UFC)}$$

En cas de production à grande échelle, les cellules hôtes sont alors infectées par les phages en respectant le MOI optimal prédéfini.

- Il est possible, de plus, d'établir la gamme d'hôtes de chacun des phages isolés. Le terme d'EOP pour « Efficiency Of Plaque formation » est alors utilisé pour décrire l'efficacité de lyse du phage vis à vis d'une souche bactérienne donnée. La valeur d'EOP est obtenue en divisant le titre phagique obtenue lors d'essais chez d'autres bactéries par le titre obtenu chez la souche bactérienne d'origine.
- L'expérience de croissance en une seule étape « single step growth curve » d'Ellis et Delbrück (Ellis and Delbrück, 1939) met en évidence la réplication cyclique du phage et permet de quantifier et surveiller la croissance des phages dans un hôte spécifique (**Figure 15**). Ces auteurs ont mis au point une méthode afin d'isoler une des étapes de réplication du phage. Pour ce faire, ils diluent de manière drastique le mélange après fixation du phage à des bactéries, de sorte que lorsque les cellules infectées sont lysées, aucune nouvelle cellule hôte ne puisse être trouvée pour un deuxième cycle d'infection. Ils réussirent ainsi à suivre le nombre moyen de phages relargués par bactérie ou « burst size », mais également à déterminer trois phases qui sont très proches de celles retrouvées pour la croissance bactérienne : 1) la phase de latence ou d'éclipse, 2) la phase exponentielle de relargage et

3) la phase de plateau. Par la suite un certain nombre de modifications ont été proposées par rapport à l'expérience originale (Yu *et al.*, 2013). Des anticorps spécifiques dirigés contre les fibres caudales du phage peuvent être par exemple ajoutés au mélange pour le neutraliser et donc rendre l'ensemble des phages libres incapables de s'adsorber à une bactérie.

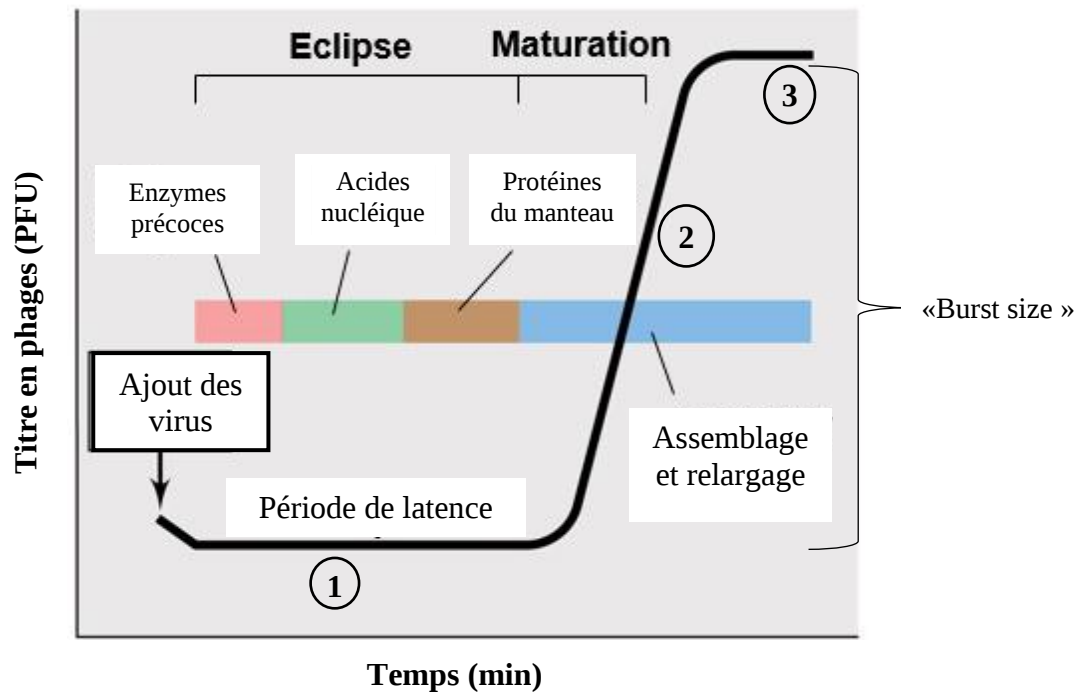


Figure 15 : Courbe de multiplication des virus en présence de leur hôte bactérien.

La «one step growth curve» se divise en trois étapes. Suite à l'ajout des virus, une première période appelée latence correspond à l'adhésion des virus aux récepteurs bactériens ce qui entraîne une diminution du titre de phages dans le milieu (éclipse), ainsi qu'à la synthèse des enzymes, du matériel génétique et des protéines nécessaires à la formation de nouveaux virus. Une seconde phase correspond aux étapes d'assemblage et de relargage exponentiel des virions dans le milieu avant d'atteindre dans une dernière phase un plateau.

secondes avec de l'acide molybdique. Les résultats peuvent ensuite être confirmés via l'application directe de ribonucléases et de désoxyribonucléases.

4.1 Les différentes méthodes de purification des phages :

La purification est un moyen de s'affranchir au maximum des interactions liées au milieu et autres molécules présentes (Adams and Hancock, 1959; Bonilla *et al.*, 2016), permettant ainsi d'observer les effets de différents paramètres (température, pH, force ionique) sur les bactériophages seuls (Brié *et al.*, 2016), leur persistance dans l'environnement (Jończyk *et al.*, 2011) ou pour réaliser des observations en microscopie (Leigh *et al.*, 2017). Toutefois, les résultats de l'étude menée par Dika *et al.* (Dika *et al.*, 2013) mettent en avant l'impact des différents procédés de purifications sur les propriétés d'agrégation et la charge électrostatique des particules virales des phages MS2.

4.1.1 Purification par gradient de densité au chlorure de césium :

La purification par gradient de densité au chlorure de césium (CsCl) est une technique couramment utilisée pour purifier les virus (Dika *et al.*, 2013; Miyata *et al.*, 2014; Uchiyama *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2007) en fonction de leurs propriétés physiques (Thurber *et al.*, 2009). C'est une technique de centrifugation affinée. En effet, un des paramètres influençant la vitesse de sédimentation d'une particule est la différence de densité entre la particule et le milieu dans lequel elle se trouve. Cette vitesse de sédimentation peut être modulée en faisant varier la densité du milieu grâce à un gradient de concentration. Les particules dont la densité est supérieure à la densité du milieu vont sédimenter. Plus la différence de densité est grande et plus la sédimentation se fera rapidement. En revanche, en l'absence de différence de densité, il n'y aura pas de sédimentation et ce quel que soit l'accélération. Si la particule présente une densité plus faible que celle du milieu, elle s'élèvera jusqu'à atteindre un niveau de densité égale à la sienne ou à défaut elle flottera à la surface. Dans la technique de purification par gradient de densité au chlorure de césium, la suspension phagique est concentrée par ultracentrifugation isopycnique. La bande correspondant aux particules recherchées est retirée à l'aide d'une seringue et remise en suspension dans du SM buffer. La procédure décrite dans le journal *Nature Protocols* (Thurber *et al.*, 2009) est spécialement conçue pour la concentration des particules de phage. Ces particules virales sont situées à l'interface des densités de CsCl 1,5 et 1,35 g.ml⁻¹ après ultracentrifugation.

4.1.2 Purification par précipitation au polyéthylène glycol :

Bien que la purification par précipitation au polyéthylène glycol (PEG) soit une méthode facile et peu coûteuse pour concentrer les phages, son efficacité est partielle. En pratique elle est donc utilisée le plus souvent en amont d'une purification par gradient de Cscl, si le volume de l'échantillon est trop élevé ou si l'échantillon nécessite d'être concentré une première fois (Thurber *et al.*, 2009). Elle consiste à ajouter à la suspension virale du PEG à une concentration finale de 10 % et du NaCl à une concentration

finale de 500 mM. La suspension est ensuite centrifugée et les particules virales récupérées dans le culot de PEG sont remises en suspension dans du NaNO_3 1mM (Yamamoto *et al.*, 1970).

4.1.3 Purification par chromatographie par échange d'ions :

La chromatographie par échange d'anions engendre la liaison des phages à une phase stationnaire. Cela se fait à l'aide d'un système FPLC (Fast protein liquid chromatography) combiné à des monolithes de milieux d'interaction convectifs (Adriaenssens *et al.*, 2015; Vandenheuvel *et al.*, 2018). Par la suite, la colonne est lavée pour éliminer les impuretés du disque CIM® (Convective Interactive Media). En utilisant une solution tampon avec une force ionique élevée, les phages sont expulsés de la colonne et collectés. De cette façon les phages peuvent être purifiés et concentrés efficacement.

4.2 Facteurs influençant la préservation des bactériophages :

Certains bactériophages peuvent être résistants à des facteurs physiques et chimiques, tels que les basses et hautes températures, le pH, la salinité et les ions (Jończyk *et al.*, 2011). Ainsi, ils peuvent s'installer et persister dans des environnements extrêmes (Luhtanen *et al.*, 2014). Toutefois, selon le phage utilisé, des conditions inadaptées peuvent inactiver le virus en endommageant ses éléments structuraux (tête, queue, enveloppe) et génétique (ADN/ ARN) (Ackermann *et al.*, 2004). La variation d'un facteur, peut à lui seul modifier la sensibilité des phages aux autres facteurs (Müller-Merbach *et al.*, 2005). Dans le cas des usages en thérapie, le maintien de leur activité est toutefois importante pour garantir la stabilité des préparations de phages (Fister *et al.*, 2016).

L'intérêt croissant des industries pharmaceutiques et agricoles pour les phages nécessitera donc de nouvelles données sur la survie des bactériophages et les méthodes de leur préservation.

4.3 Les nouvelles technologies pour des investigations plus poussées

Microbiologie et bactériologie ont été les premières disciplines regroupant des protocoles destinés à l'étude des virus. Elles permettent d'appréhender différents mécanismes tel que la régulation de l'expression génique, le transfert de gènes, la synthèse de macromolécules, l'organisation subcellulaire, la communication cellulaire, et les aspects moléculaires de la pathogénicité et de la virulence. Aujourd'hui, la compréhension des procédés biologiques n'est plus limitée à l'analyse biochimique (Orlova, 2012).

4.3.1 Cristallographie et Résonance Magnétique Nucléaire :

Les méthodes de cristallographie aux rayons X et la spectroscopie RMN fournissent des informations détaillées sur la dynamique et la structure moléculaire. Cependant, la cristallographie aux rayons X nécessite d'obtenir en amont des cristaux à partir d'une protéine hautement purifiée. Il est extrêmement compliqué de cristalliser les virus entiers. En effet, ils sont beaucoup plus gros que de simples protéines et peuvent comprendre des milliers de composants d'une part et les conditions

optimales de purification ne peuvent être fixées à l'avance, d'autre part. Seules quelques études cristallographiques de virus icosaédriques ont permis d'obtenir leur structure atomique. A l'heure actuelle, les analyses aux rayons X fournissent plus d'informations quant à la structure de bon nombre de petites protéines constitutives des virus de grandes tailles, tels les bactériophages. Nombreuses sont celles qui concernent la structure du moteur d'encapsidation chez les virions des phages caudés (Roy *et al.*, 2011; Roy and Cingolani, 2012; Simons *et al.*, 2000; Smits *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2013, 2010) etc.

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une autre méthode très puissante d'analyse structurale (Orlova, 2012). Combinée aux méthodes de biologie moléculaire et aux procédés biochimiques disponibles pour la préparation et le marquage isotopique de protéines recombinantes, elle a comme principale avantage d'étudier la structure et la dynamique des molécules biologiques en solution. De manière simplifiée, en RMN, un fort champ magnétique à haute fréquence stimule les noyaux atomiques des isotopes ^1H , ^2D , ^{13}C ou ^{15}N d'un échantillon. S'en suit une mesure de la fréquence du champ magnétique des noyaux atomiques au cours de cette période d'oscillation avant qu'ils ne reviennent à leurs états initiaux. Cela permet d'avoir des informations précises sur : la nature et le nombre d'atomes voisins des noyaux étudiés, la liaison chimique, la conformation moléculaire, les distances interatomiques, la mobilité moléculaire, etc. Des études de repliement des protéines peuvent être effectuées par simple suivi des spectres RMN lors du repliement ou de la dénaturation d'une protéine en temps réel.

36

En comparaison à la cristallographie, elle ne nécessite pas l'obtention de monocristaux et permet d'étudier des protéines, des acides nucléiques à des concentrations millimolaires. Cependant, la RMN ne peut pas traiter des macromolécules de l'ordre du méga-Dalton (max ~50 kDa). A titre d'exemple, la RMN a récemment permis de confirmer les modèles préexistants concernant l'organisation de la structure en « rosette » de la capsid du phage filamenteux M13 (Morag *et al.*, 2015).

4.3.2 Microscopie électronique (ME):

La microscopie optique est un outil d'une grande importance pour étudier la biologie des micro-organismes. Cependant, elle n'est pas en mesure de fournir une résolution suffisante pour voir les virus. C'est le développement en 1944 et l'utilisation des synchrotrons qui a grandement amélioré l'observation des structures virales (Wilson, 1996). La microscopie électronique (ME) est ainsi devenue un outil majeur pour la biologie structurale tant à l'échelle moléculaire qu'à l'échelle cellulaire. Les bactériophages n'ont pas de symétrie icosaédrique exacte, car pour la plupart (les *Caudovirales*), ils possèdent des appendices facilitant leurs interactions avec les cellules hôtes, ce qui complique fortement les essais de cristallographie. De plus leur taille peut-être un frein pour des études en RMN. De ce fait, la ME est un outil de choix pour l'analyse structurale de ce type d'échantillons.

La coloration négative est la méthode la plus simple pour observer des particules virales isolées. Pour ce faire, une goutte d'une suspension virale est étalée sur un film support de ME qui est immergé dans une solution de sels de métaux lourds, tel que l'acétate d'uranyle. Le contraste négatif permet d'assombrir le fond sans colorer l'objet lui-même et donc de le rendre visible sans le modifier, par simple contraste (Brenner and Horne, 1959). Durant les deux dernières décennies, d'autres méthodes ont été utilisées et ont montré leur efficacité lorsque les échantillons sont préalablement congelés ou vitrifiés (Dubochet *et al.*, 1988). Ce refroidissement rapide piège les molécules biologiques dans leur forme native hydratée et prévient la formation de cristaux de glace qui pourraient alors endommager l'échantillon biologique. Les images de ME sont ensuite collectées puis compilées afin de déterminer la structure 3D de la particule (G.J.Jensen, 2010).

La microscopie électronique dès ses débuts, fût l'outil le plus utilisé pour l'analyse morphologique des phages et pour initier leur classification. Le développement des méthodes de cryogénisation a permis de révéler des détails plus fins de la structure 3D des molécules. Les images obtenues permettent non seulement d'obtenir des informations sur la structure quaternaire des complexes macromoléculaires, mais également sur la position de leurs éléments structuraux secondaires comme les hélices et les feuilles bêta (Nogales and Scheres, 2015).

5. Coévolution des phages et des bactéries

Etudier la diversité des réponses mises en place par chacune des deux entités a permis de retracer une véritable coévolution des mécanismes de résistances du virus et de son hôte souvent décrite comme « une course à l’armement » dans la littérature scientifique. Pour illustrer ce processus dynamique, Leigh Van Valen formula en 1973 sa théorie dite de la « Reine Rouge » basée sur le fait que les interactions entre organismes conduisent à des courses évolutives permanentes. La coévolution maintient la diversité phénotypique et génétique, accroît le taux d’évolution et de divergence des bactéries et des phages et façonne la structure des communautés bactériennes en sélectionnant les caractères évolutifs pertinents (Koskella and Brockhurst, 2014; Stern and Sorek, 2011). Le regain d’intérêt pour l’utilisation des phages dans les biotechnologies nécessite que ces interactions complexes phages-hôtes soient étudiées dans le but de prédire leurs comportements respectifs et ainsi d’optimiser leur utilisation.

La résistance innée, également appelée résistance naturelle, est caractéristique d’une espèce ou d’un genre bactérien. Elle repose sur le patrimoine génétique et se transmet à la descendance. Par exemple, *Pseudomonas aeruginosa* n’est jamais sensible à l’ampicilline.

Les résistances acquises, sont le résultat de mutations ponctuelles et subites du patrimoine génétique de la bactérie, ou de l’acquisition par la bactérie, d’un “plasmide”, ou de matériel génétique porteur de gènes de résistance provenant d’une autre bactérie. Une résistance acquise peut également se transmettre à la descendance. L’infection par les phages est également responsable de ce type de transfert de gènes lors de leur insertion dans le génome bactérien.

38

5.1 Systèmes de résistance innée :

5.1.1 Prévenir l’adsorption des phages :

Dans les environnements naturels, les bactériophages sont confrontés à une vaste diversité d’organismes, mais leur spectre d’hôte se limite généralement à une espèce bactérienne. Pour injecter leur ADN dans leur cible, les phages se lient à des récepteurs de la surface cellulaire de leurs hôtes, de types protéiques, polysaccharidiques ou lipopolysaccharidiques. Pour prévenir ces attachements, les bactéries sont susceptibles de modifier/masquer la structure des récepteurs par des systèmes de mutations (**Figure 16a.1,2**), de suppression via des barrières physiques (**Figure 16a.3**) ou via la production d’inhibiteurs compétitifs (Drulis-Kawa *et al.*, 2015) (**Tableau 6**). Les récepteurs de la surface cellulaire sont essentiels à l’attachement des phages. La mutation des récepteurs est une cause fréquente de résistance qui limite l’effet antibactérien recherché.

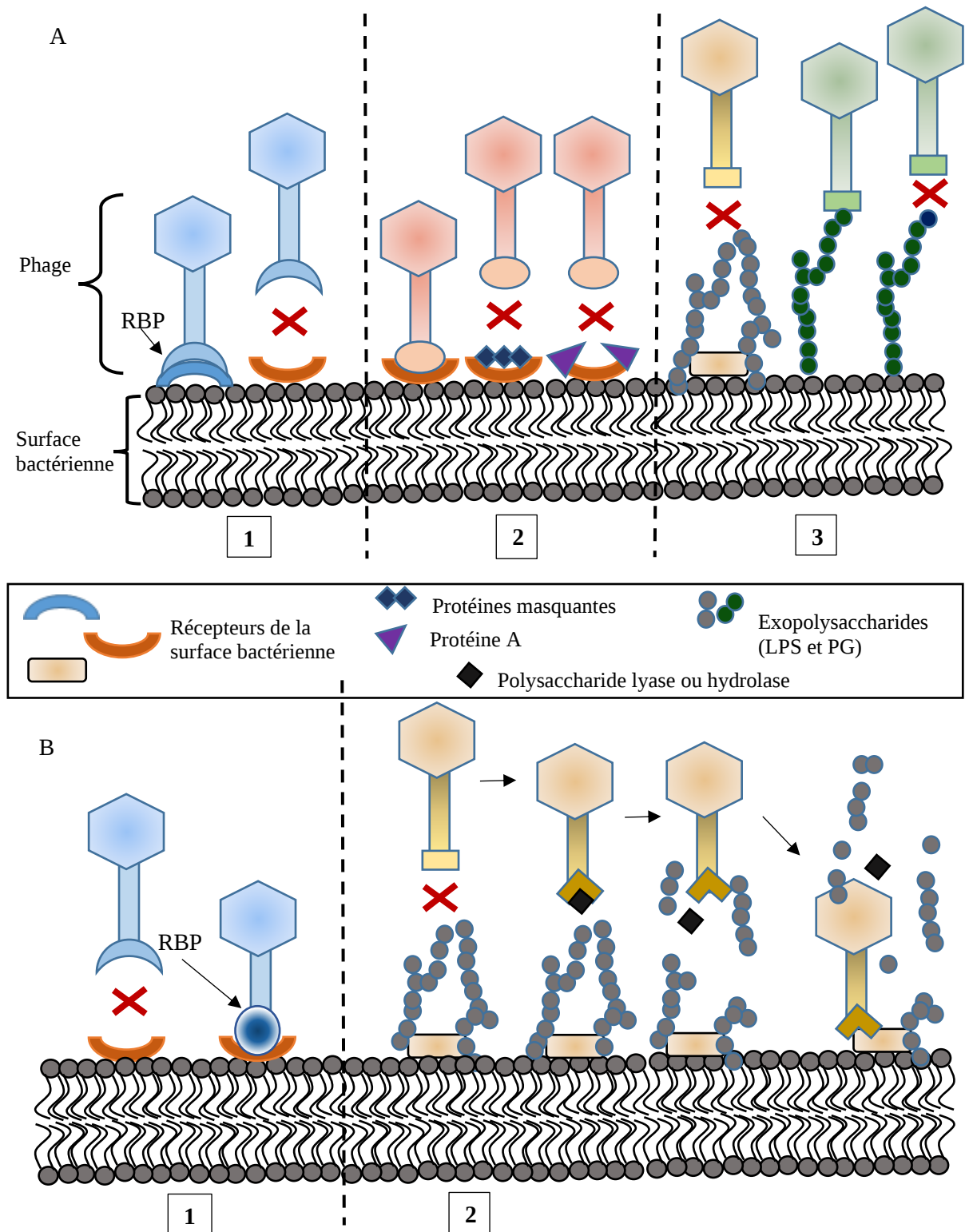


Figure 16A : Stratégies utilisées par les bactéries pour limiter l'adsorption des phages

1. L'adsorption des phages en surface se fait grâce aux récepteurs. Les bactéries sont capables de modifier ces récepteurs qui ne sont dès lors plus reconnus par les phages. 2. Les bactéries peuvent également produire des protéines venant masquer les récepteurs et rentrant en compétition avec l'adsorption des phages. 3. La présence d'exopolysaccharides peut, d'une part, empêcher l'accès des phages aux récepteurs par encombrement stérique, et d'autre part, dans le cas où les phages sont capables d'utiliser les EPS comme récepteurs, inhiber la reconnaissance phage-EPS par une simple modification de la chaîne. 16B. Contournement des mécanismes d'exclusion par les phages. 1. La modification de la RBP (« Receptor binding protein ») du phage lui permet de reconnaître le nouveau récepteur et ainsi de se lier à son hôte. 2. Dans le cas des EPS empêchant la fixation du phage sur son récepteur, la production d'enzymes de types lyases ou hydrolases par le phage lui-même, dégrade les exopolysaccharides et libère l'accès au récepteur.

Cependant, le développement d'une résistance aux phages peut devenir bénéfique. A titre d'exemple, des bactéries mutantes de *Erwinia carotovora* résistantes aux Φ AT1 ont subi des mutations des flagelles, qui lors d'un test de pourriture des tubercules de pomme de terre met en avant une réduction de leur motilité et pouvoir pathogène (Evans *et al.*, 2010).

Des bactéries devenues résistantes à ces phages, présentent des mutations des pili de type IV entraînant une réduction de leur survie dans l'environnement et de leur pathogénicité. Le même constat a été réalisé au cours d'essais visant à évaluer l'efficacité d'un traitement par les phages des infections à *E. coli* chez des souris (Smith and Huggins, 1982). Par conséquent, l'utilisation de certains phages peut favoriser l'apparition de bactéries résistantes qui seront dites atténuées. Dans le cas des mutations modifiant le récepteur (**Figure 16a.1**), les phages peuvent à leur tour modifier la protéine RBP « Receptor binding protein » et ainsi rétablir l'infection de l'hôte (**Figure 16b.1**).

La présence des polymères extracellulaires favorise la survie bactérienne dans les différentes niches écologiques en protégeant la bactérie des conditions environnementales qui ne lui sont pas favorables. Dans certains cas, cette matrice extracellulaire joue le rôle de barrière physique entre les phages et leurs récepteurs (**Figure 16a.3**). De ce fait certains phages ont évolué pour reconnaître certains de ces polymères (**Figure 16a.3**) et faciliter leur adsorption en surface, d'autre, pour les dégrader, via deux types d'enzymes spécialisées dans la dégradation des polysaccharides (Stummeyer *et al.*, 2006; Sutherland *et al.*, 2004). Les hydrolases (EC 3.2.1.-) catalysent l'hydrolyse de liaisons glycosidiques et les lyases (EC 4.2.2.-) clivent la liaison entre le monosaccharide et le groupement C4 de l'acide uronique tout en introduisant une double liaison entre le C4 et C5 (**Figure 16b.2**). Ces enzymes virales peuvent être associées à la structure même du phage ou sous forme soluble, issue de la lyse des cellules bactériennes infectées (Drulis-Kawa *et al.*, 2015).

40

L'expression des récepteurs de surface peut également être modulée par les phages eux même. Chez *P. aeruginosa* la disponibilité des pili de type IV peut être modulée après la conversion lysogénique de l'hôte. Le Phage D3112 code pour une protéine Tip qui se lie aux ATPase des pili et empêche leur localisation. L'assemblage des pili étant impossible, ils sont alors absents de la surface bactérienne, protégeant ainsi cette dernière de toutes nouvelles infections par des phages utilisant eux aussi les pili de type IV comme récepteurs (Chung *et al.*, 2014).

Tableau 6 : Tableau de synthèse des mécanismes, faisant intervenir différentes molécules, prévenant l'adsorption des phages à la surface de leurs hôtes bactériens.

Molécules impliquées	Ex : Bactéries/Phages	Mécanismes	Références
Masquage des récepteurs			
Protéine A	<i>S. aureus</i> /phages 52, 80	La protéine A se lie au fragment Fc de l'Ig G (récepteur)	(Nordström and Forsgren, 1974)
Lipoprotéine Llp	<i>E. coli</i> / T5	Le phage T5 produit la lipoprotéine Llp qui bloque son propre récepteur FhuA et empêche une super infection de l'hôte	(Pedruzzi <i>et al.</i> , 1998)
TraT (associée à la membrane externe)	<i>E. coli</i> F+/coliphages	La protéine TraT codée par le plasmide F masque ou modifie la conformation de la protéine OmpA (récepteur aux coliphages)	(Riede and Eschbach, 1986)
Production de polymères extracellulaires			
Alginates	<i>Pseudomonas spp</i> <i>Azotobacter spp</i>	Chez <i>Pseudomonas</i> , les alginates sont responsables de la viscosité de certaines souches, limitant l'accès des phages aux récepteurs	(Hanlon <i>et al.</i> , 2001)(Hammad, 1998)
Acide Hyaluronique	<i>Streptococcus spp</i>	Constituant de la capsule de <i>Streptococcus</i> sp composé d'une alternance de résidus N-acetylglucosamine et d'acide glucuronique, limitant l'accès des phages aux récepteurs	(Baker <i>et al.</i> , 2002)
Lipopolysaccharide (LPS) (Antigène O)	<i>E. coli</i> /coliphages <i>Pseudomonas spp</i>	Présents à la surface des bactéries, ils peuvent être utilisés par les phages comme récepteurs. Une mutation modifiant la structure de ces antigènes vient empêcher l'adsorption des phages en surfaces. Ils peuvent également masquer d'autres récepteurs	(Chaturongakul S. and Ounjai P., 2014)
Polysaccharide de la capsule (Antigène K)	<i>Salmonella spp</i> / P22		
Production d'inhibiteurs compétitifs			
Microcin J25 Molécule anti bactérienne	<i>E. coli</i> / T1, T5, ϕ 80	La protéine J25 utilise FhuA (transporteur de fer) comme récepteur et entre donc en compétition avec les phages T1, T5, ϕ 80 qui utilisent également ce récepteur	(Destoumieux-Garzón <i>et al.</i> , 2005)

5.1.2 Bloquer l'entrée de l'ADN phagique :

Une fois attaché à son récepteur cellulaire spécifique de la surface bactérienne, le phage est capable d'injecter son ADN dans son hôte et d'utiliser sa machinerie pour se répliquer. Le système SIE pour « superinfection exclusion system » des bactéries se compose de protéines associées à la membrane codées par les phages eux-mêmes. Plus simplement, il permet à une bactérie lysogène d'éviter toute nouvelle infection par des phages relativement proches.

Chez le phage T4, deux systèmes SIE codant pour les protéines Imm et Sp inhibent rapidement l'injection d'ADN dans les cellules et prévient des infections futures (Lu and Henning, 1994). Les deux protéines agissent séparément. La protéine Imm associée à la membrane et à une seconde protéine, empêche le transfert d'ADN en changeant la conformation du site d'injection. La protéine membranaire Sp inactive le lysozyme du phage T4. Codé par la protéine gp5 à l'extrémité des fibres caudales du phage T4, le lysozyme dégrade le peptidoglycane créant ainsi des pores dans la paroi bactérienne et facilitant l'entrée du génome viral. D'autres systèmes, tel que Sim et Sie en association avec les prophages sont retrouvés chez les Entérobactéries.

Chez les espèces à Gram positif quelques exemples de systèmes SIE ont été caractérisés chez *Lactococcus lactis*, en réponse aux attaques des phages lors de son utilisation intensive en agroalimentaire dans le processus de fermentation. Le système Sie₂₀₀₉ a été identifié chez le phage tempéré Tuc2009 puis a été retrouvé chez d'autres prophages dans le génome de plusieurs souches de *L. lactis* (McGrath *et al*, 2002). Chez *S. thermophilus*, utilisée également en agroalimentaire, la lipoprotéine de phage LT_{TP-J34} est capable, en se liant à la membrane, d'interagir avec les protéines de ruban des autres phages et de bloquer l'entrée de leur ADN. Chez les *Siphoviridae* les protéines ruban facilitent le passage du génome viral en formant un tunnel dans la membrane bactérienne. Plusieurs systèmes SIE ont ainsi été reconnus sans toutefois être correctement caractérisés.

42

5.1.3 Restriction/ modification de l'ADN du phage :

Une fois adsorbé à la surface bactérienne, le phage est capable d'injecter son ADN (ou ARN) dans la bactérie et d'enclencher son cycle d'infection (**Figure 17**). Plusieurs mécanismes de défenses peuvent alors être actionnés pour contrecarrer la répllication du génome (**Figure 17.1**). Ces systèmes de restriction-modification particulièrement étudiés lors des interactions entre les phages T4 et la bactérie *E. coli* permettent de cliver cet ADN (ARN) étranger et font intervenir des endonucléases (**Figure 17.2**). L'hétérogénéité de ces protéines reflète la diversité de leurs activités et permet de les classer en 4 groupes selon la composition de leurs sous-unités, leur activité, et les sites de restrictions reconnus (Roberts and Marinus, 2003; Tock and Dryden, 2005). L'efficacité d'un tel mécanisme est directement lié au nombre de sites de restriction présents dans le génome viral. Lorsque l'ADN non méthylé d'un phage est injecté chez une bactérie présentant un système de restriction-modification, il est alors reconnu par l'enzyme de restriction puis rapidement dégradé. Dans une moindre mesure, il est également possible qu'il soit

méthylé par une méthylase bactérienne, cette dernière est tout fois moins active que les endonucléases. Protégé de la restriction par la méthylation, l'ADN du phage va pouvoir initier son cycle lytique.

Face aux mécanismes de défense mis en place par les bactéries, certains phages déploient des stratégies de contournement des systèmes de restrictions-modifications bactériens (**Figure 17.3, 4, 6, 8,10**). Ainsi, des mutations de leur génome ont engendré la suppression des sites de reconnaissance des endonucléases de restriction bactérienne (**Figure 17.3**) (Tock and Dryden, 2005). Le phage K infectant *Staphylococcus* n'a donc pas de sites de restriction dans son génome d'ADN double brin, reconnus par l'endonucléase Sau3A (Krüger and Bickle, 1983). Chez le phage T4 l'incorporation d'hydroxyméthylcytosines (HMC) dans le génome viral en remplacement des cytosines (**Figure 17.4**), permet par simple substitutions des résidus de l'ADN d'échapper aux nucléases clivant spécifiquement les séquences contenant des cytosines (Bickle and Kruger, 1993).

La coévolution des mécanismes de défense a permis aux bactéries d'acquérir des MDSs «Modification-Dependent Systems» capables de cliver exclusivement l'ADN contenant des bases HMC (**Figure 17.5**) (Bickle and Kruger, 1993). Cela a entraîné, chez les phages T4, une glycosylation des bases HMC pour échapper aux MDSs (**Figure 17.6**). A leur tour certaines souches d'*E. coli* parviennent à mettre en place des systèmes de restriction des bases modifiées appelés Gmr « glucose-modified restriction » (**Figure 17.7**). Ce système composé de deux sous unités (GmrS et GmrD) clive spécifiquement les motifs Glu-HMC de l'ADN du phage et donc inhibe son infection (Bair and Black, 2007). Certains analogues aux phages T4 codent pour des protéines internes I (IPI* « Internal protein I»). Durant l'infection les protéines matures IPI* sont injectées dans l'hôte en même temps que le génome viral. La structure de ces protéines leur permet d'interagir avec le complexe GmrS-GmrD et d'annuler son activité restrictive (**Figure 17.8**)(Rifat *et al.*, 2008). Certaines souches bactériennes ont trouvé le moyen de contourner l'action des IPI* en utilisant un polypeptide fusionné comme complexe GmrS-GmrD (**Figure 17.9**)(Rifat *et al.*, 2008).

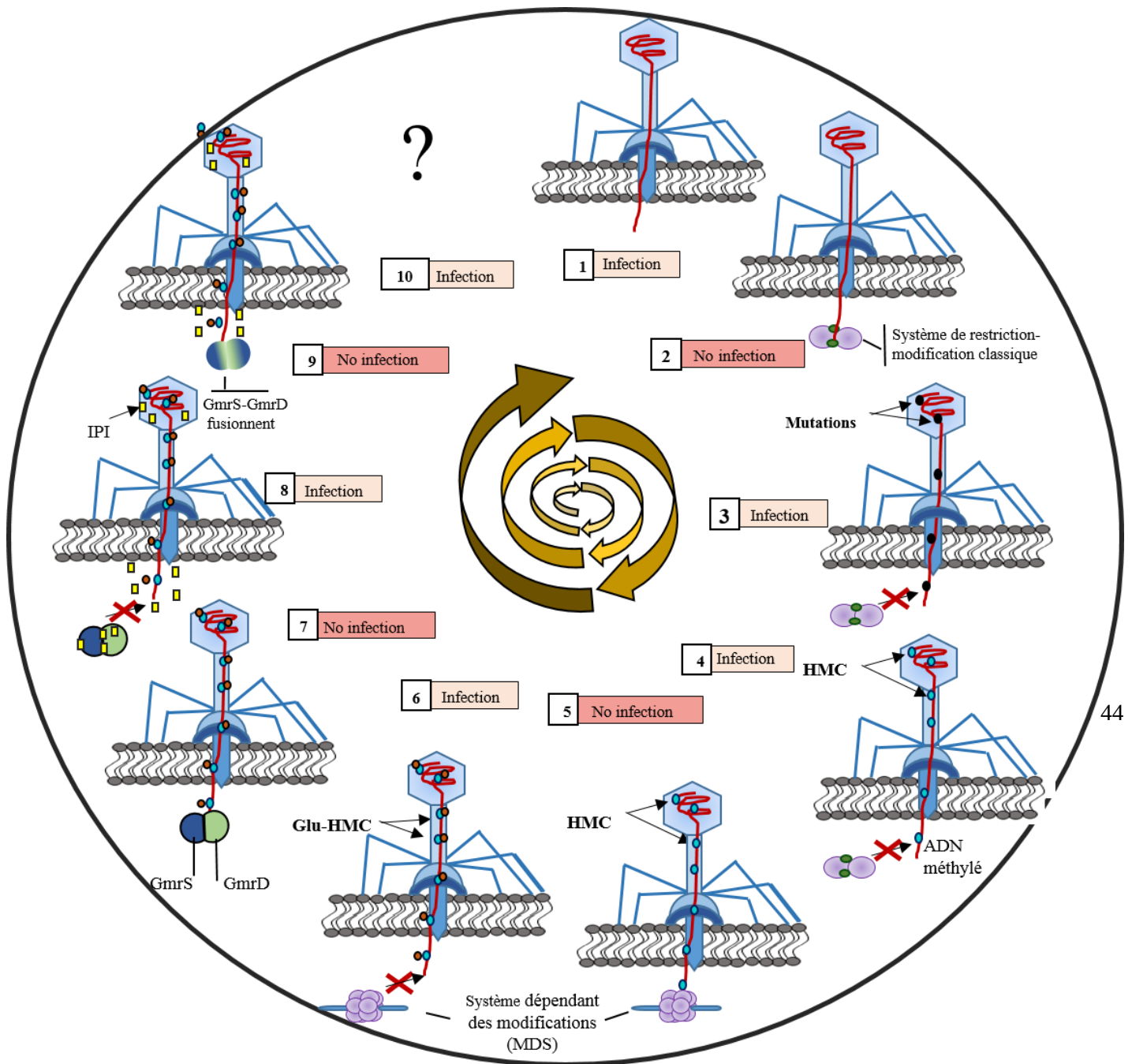


Figure 18 : Schéma de la co-évolution des mécanismes de résistance phages/bactéries impliquant les systèmes de modification/restriction du génome viral.

1. Infection de la bactérie : fixation du phage aux récepteurs de la surface cellulaire puis injection du génome dans le cytoplasme. 2. Système de restriction-modification retrouvé chez certaines bactéries permettant de dégrader l'ADN viral venant d'être injecté. 3-4. La modification du génome de certains phages par des mutations ou par méthylation des résidus cytosines leur permet de ne plus être détectés par le système de restriction bactérien. 5. Certaines bactéries disposent d'un système MDS capable de reconnaître et cliver spécifiquement les bases méthylées. 6. Chez le phage T4, la glycosylation des cytosines méthylées, permet à l'ADN nouvellement injecté d'échapper au système MDS de la bactérie. 7. Certaines souches d'*E. coli* ont mis en place des systèmes de restriction des bases modifiées appelés Gmr « glucose-modified restriction », capables de reconnaître les résidus Glu-HMC et de cliver l'ADN du phage. 8. La sécrétion par certains phages de protéines interne I inhibe l'activité nucléase des systèmes Gmr et permet de restaurer l'infection. 9. La fusion des deux sous unités du système Gmr ne permet plus aux protéines interne I d'exercer leur action inhibitrice, l'ADN du phage est alors clivé et le cycle infectieux stoppé. 10. La suite des recherches permettra probablement de mettre en évidence d'autres mécanismes de co-évolution entre les phages et les bactéries.

5.1.4 Interruption du cycle infectieux :

Egalement appelée Abi pour « Abortive infection systems ». Sous l'activation de ces mécanismes, l'infection par le phage provoque la mort de la cellule infectée, protégeant ainsi la population bactérienne adjacente. Dans ce cas, ce sont chacune des étapes cruciales de la multiplication des phages qui peuvent être ciblées : réplication, transcription et traduction.

Le système RexAB du prophage λ étudié chez *E. coli*, est un système à deux composantes RexA et RexB (Parma *et al.*, 1992). L'injection du génome viral dans la bactérie occasionne la formation d'un complexe ADN/protéines utile à la réplication du génome, et nécessaire à l'activation de RexA. RexA est un senseur intracellulaire capable d'activer à son tour la protéine RexB ancrée à la membrane. Deux protéines Rex A sont nécessaires pour l'activation d'une protéine RexB. Cette dernière agit comme un port laissant passer les cations monovalents au travers de la membrane interne, s'en suit une chute du potentiel membranaire et de la synthèse d'ATP (Snyder, 1995). La production des macromolécules est alors diminuée et la multiplication cellulaire avortée. Parallèlement, le cycle d'infection par le phage est également stoppé par manque d'ATP. Chez *E. coli*, ce système protège une cellule infectée (lysogène) d'une éventuelle attaque par d'autres coliphages. La régulation de cette activité est principalement sous la dépendance du ratio protéique RexA/RexB.

D'autres systèmes plus complexes décrits chez *E. coli* font intervenir diverses catégories de protéines. Les gènes *lit* (*E. coli* K12) et *prcC* (*E. coli* CT196) codent respectivement pour une métallo-protéinase et une nucléase (Snyder, 1995). La métallo-protéinase activée par un peptide de la protéine majeur de la capsid du phage T4 en fin de cycle, est capable de cliver le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) impliqué dans la synthèse des protéines (Bingham *et al.*, 2000). Le gène *prcC*, quant à lui, fait partie d'une cassette contenant trois autres gènes *prcA*, *prcB*, *prcD* impliqués dans les mécanismes de défense de type restriction-modification détaillés auparavant. La nucléase activée, clive les ARN de transfert (Lys) et provoque également l'arrêt de la synthèse protéique. Toutes deux conduisent, indirectement à la mort de l'hôte et donc à l'interruption du cycle infectieux.

45

Les systèmes Abi bien que souvent décrits chez *E. coli*, existent également chez les espèces à Gram positif. Jusqu'à présent, vingt-trois mécanismes Abi (AbiA- AbiZ) ont ainsi été rapportés chez *Lactococcus lactis* (Chopin *et al.*, 2005) : les systèmes AbiA, AbiF, AbiK, AbiP, AbiT perturbent la réplication de l'ADN du phage, alors que AbiB, AbiG et AbiU affectent la transcription de l'ARN. La présence de AbiC limite la production de la protéine majeur de la capsid et celle de AbiZ provoque une lyse prématurée de la cellule infectée, empêchant ainsi l'assemblage complet des virions et leur relargage.

Les systèmes toxine-antitoxine «TA systems» très répandus chez les bactéries sont également appelés systèmes de mort programmée ou systèmes « post-segregational killing » (ou PSK) et ont été identifiés pour la première fois, comme étant responsables du maintien des plasmides au cours de la ségrégation (Jensen and Gerdes, 1995). Dans un même opéron du plasmide sont codés un poison et un antidote à ce poison. L'antidote est relativement instable par rapport au poison car rapidement dégradé par l'activité d'une protéase ATP-dépendante. Il doit donc être maintenu dans une concentration suffisante pour contrecarrer l'effet du poison, ce qui requiert la présence du plasmide. En effet, si, lors de la division, une cellule fille ne reçoit pas de copie du plasmide, l'antidote encore présent dans le cytoplasme est dégradé sans qu'il ne puisse plus être synthétisé de novo. Le poison peut donc agir pour tuer la cellule, d'où l'appellation de « post-segregational killing ». Plus récemment Fineran *et al.*, (Fineran *et al.*, 2009), ont montré que ces mécanismes interviennent dans les réponses antiphages et présentent un phénotype Abi. Ils engendrent des interactions pouvant être de type protéine-protéine (Hazan and Engelberg-Kulka, 2004), ARN-ARN (Pecota and Wood, 1996) ou bien protéine-ARN (Blower *et al.*, 2009), et dans tous les cas, correspondent à la production d'une molécule toxique par la cellule, neutralisée par l'antitoxine. L'expression de ces molécules est finement régulée et varie d'un système à un autre. Néanmoins, lorsque cet équilibre toxine/antitoxine vient à être rompu, le relargage de la toxine abouti à la mort cellulaire et de ce fait à l'interruption du cycle du bactériophage.

5.1.5 Interférer avec l'assemblage viral:

Les îlots chromosomiques inducibles par des phages (PICIs pour «Phage-inducible chromosomal islands») sont une famille d'éléments génétiques très mobiles qui contribuent substantiellement au transfert génétique horizontal, à l'adaptation de l'hôte et à la virulence (Novick *et al.*, 2010). Initialement identifiés dans *Staphylococcus aureus* (SaPIs pour «*Staphylococcus aureus* pathogenicity islands»), ces éléments sont très représentés chez les espèces à Gram positif (Tormo *et al.*, 2008). Ils utilisent une variété de stratégies pour manipuler le cycle de vie des phages et promouvoir leur propre propagation. Dans des conditions normales, les SaPIs sont stables dans le chromosome de l'hôte. Suite à une infection, l'îlot est excisé, répliqué et empaqueté. Dans ces conditions, ils interfèrent sur le développement intracellulaire des phages (Novick and Subedi, 2007). Les capsides produites sont ainsi beaucoup plus petites et ne permettent pas l'encapsidation d'un génome viral fonctionnel. Elles sont donc détournées pour produire une génération de particules virales matures renfermant l'ADN des SaPIs à la place de l'ADN du phage (Novick and Subedi, 2007).

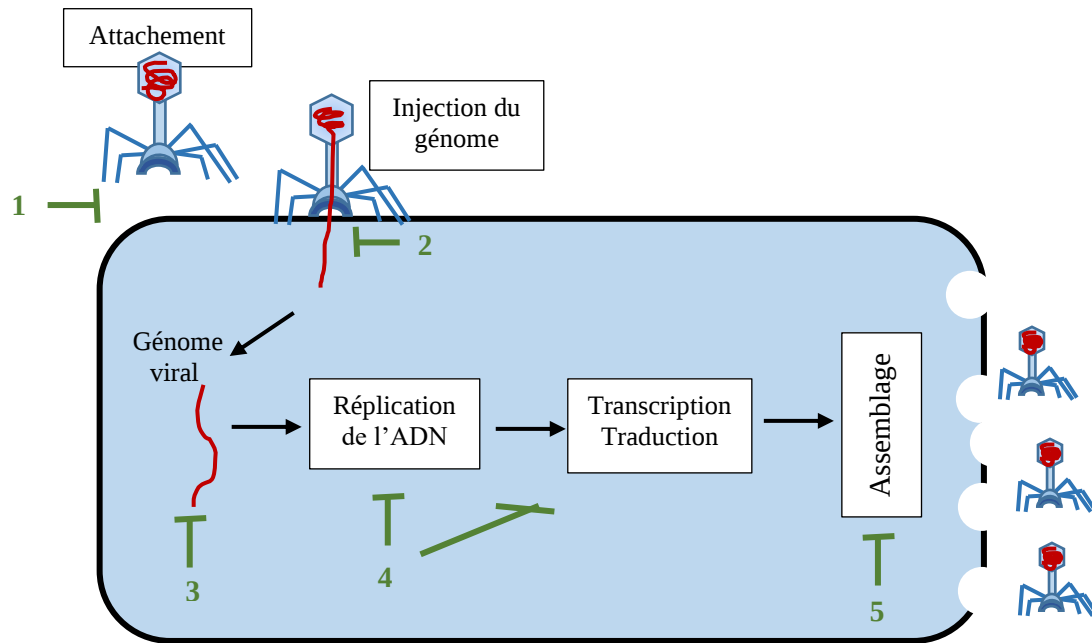


Figure 19 Synthèse des mécanismes de résistance innés retrouvés chez les bactéries pour lutter contre les bactériophages tout au long du cycle infectieux

1. Mécanismes bloquant l'adsorption des phages. **2.** Systèmes limitant l'injection du génome viral. **3.** Systèmes de restriction- modification. **4.** Systèmes Abi. **5.** Stratégies d'interférences avec l'assemblage des particules virales.

5.1.6 Le système BREX (Bactériophage Exclusion) :

47

Le BREX constitue un système de résistance aux phages (lytiques et tempérés), qui est distinct des mécanismes de défense virale précédemment caractérisés (**Figure 19**), d'un point de vue génétique et phénotypique (Barrangou and Oost, 2014). Ce système de défense permet l'absorption du phage et l'intégration de l'ADN dans la cellule hôte, mais empêche la réplication virale. Il s'appuie sur l'utilisation de la méthylation, confirmant ainsi le rôle de l'épigénétique dans la résistance aux virus bactériens. L'analyse de 1 500 génomes procaryotes séquencés, réalisée par Goldfarb *et al.*, (Goldfarb *et al.*, 2015), a permis de mettre en évidence l'existence de ce système chez seulement 10 % des génomes microbiens, bien que ce mécanisme soit phylogénétiquement répandu. Leurs travaux montrent également que ce système immunitaire inné se décline en six sous-types. Chaque sous-type diffère par la composition, le nombre et l'organisation des gènes au sein de l'opéron. Parmi eux le type BREX I est le plus représenté (55 % de prévalence).

Les études futures devraient déterminer le fondement moléculaire de l'immunité codée par le BREX dans les bactéries et éclairer les processus biochimiques qui entraînent la résistance au phage dépendante de la méthylation du chromosome de l'hôte. Des études supplémentaires devraient évaluer si ce système a un coût énergétique et s'il coexiste avec d'autres systèmes de défense, notamment R-M, Abi et CRISPR.

5.2 Système de résistance acquise :

5.2.1 Le CRISPR-Cas :

En écologie, les virus sont des facteurs clés de l'évolution. Leur prédation facilite les échanges génétiques et donc, favorise l'adaptation des génomes (Brigulla and Wackernagel, 2010). Naturellement, leurs hôtes ont ainsi mis en place des systèmes de lutte permettant de résister aux infections. Outre les systèmes de résistance innée détaillés auparavant, des systèmes, dits acquis, permettent une reconnaissance et une élimination spécifique des pathogènes (telle la mémoire immunitaire des lymphocytes B et T humains).

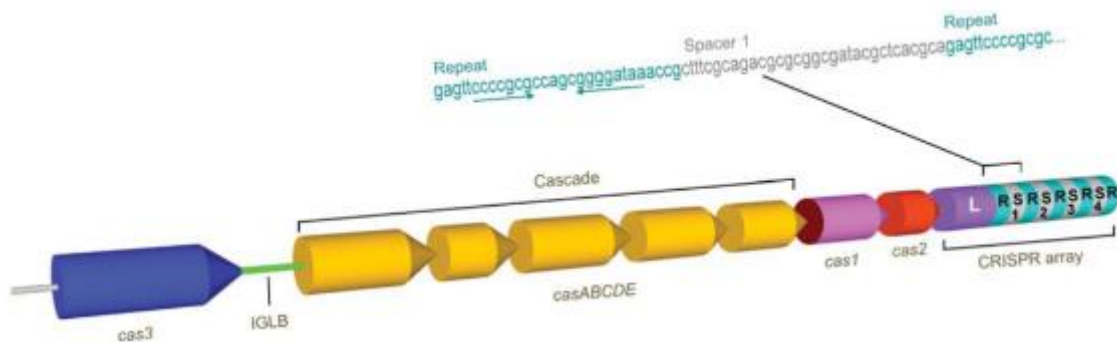


Figure 20 : Représentation schématique du locus CRISPR Cas chez *E. coli* K12

Les gènes *cas* (*cas3*, *casABCDE*, *cas1* and *cas2*) sont généralement à proximité immédiate du locus CRISPR. Le complexe nommé Cascade, pour « *CRISPR-associated complex for antiviral defense* » comprend les protéines CasA, B, C, D, et E (Brouns *et al.*, 2008). Trois éléments constituent le CRISPR : une séquence leader (Leader sequence), des séquences semi palindromiques répétées (Repeat sequences) et des séquences d'espacement (Spacer sequences). Une unité CRISPR correspond à un repeat et un spacer. La région intergénique colorée en vert (IGLB : intergenic region *ygcL-ygcB*) contient les promoteurs requis pour l'expression des gènes *cas*.

48

Les systèmes CRISPR « Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats » ou « courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées », couplés aux protéines Cas (CRISPR associated) (Jansen *et al.*, 2002) peuvent cibler et cliver spécifiquement de l'ADN, de l'ARN et tout autre élément mobile génétique considéré comme étranger à la bactérie (Al-Attar *et al.*, 2011).

Identifié pour la première fois dans le génome d'*E. coli* K12 (Ishino *et al.*, 1987) comme une succession de 29 nucléotides répétés, entrecoupés de séquences uniques de 32 nucléotides (**Figure 20**), les séquences répétées ont par la suite été retrouvées chez de nombreux procaryotes (Goyal *et al.*, 1997; Groenen *et al.*, 1993; Mojica *et al.*, 2000, 1995). Bien que les premières études aient impliqué ces clusters dans des fonctions de ségrégation /partition de l'ADN (Mojica *et al.*, 1995), les travaux suivant ont suggéré, par homologie des séquences, que les spacers provenaient d'éléments extra-chromosomiques et, principalement, de virus (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005) renforçant un peu plus la thèse d'un système à vocation antivirale. En 2002, Jansen *et al.*, (Jansen *et al.*, 2002) après

une succession d'appellation dans la littérature, renomment ces éléments génétiques « CRISPR » et rapportent également qu'environ la moitié des génomes de bactéries et d'archaebactéries répertoriées, possède des loci CRISPR. Ces derniers pouvant totaliser près de 1 % du génome complet des microorganismes. Toutefois, la longueur, la séquence, ainsi que le nombre de répétitions varient d'une espèce à l'autre.

Cinq ans plus tard, Barrangou *et al* (Barrangou *et al.*, 2007) observent une corrélation positive entre le nombre de spacers dans le locus CRISPR1 et la résistance aux phages. Ils valident ainsi l'hypothétique fonction antivirale de ces clusters organisés et provoque une vague de publications sur le système CRISPR Cas.

5.2.2 Composition et fonctionnement d'un locus CRISPR-CAS type :

Une unité CRISPR correspond à une séquence répétée (R) et une séquence d'espacement (S). Une séquence leader suivi d'un enchaînement (R) et (S) est appelé « CRISPR array ».

a- Les séquences répétées (« repeat ») :

Au sein du locus, les séquences répétées contiennent de 28 à 40 paires de base et leur nombre varie énormément d'un organisme procaryotique à un autre, allant de quelques répétitions à plusieurs centaines. Dans la plupart des cas, ces séquences sont identiques et palindromiques.

b- La séquence leader :

Cette séquence est localisée en 5' du CRISPR array. La séquence leader contient des centaines de nucléotides non codants, parmi lesquels l'adénine et thymine sont fortement représentées. Jansen *et al* (Jansen *et al.*, 2002), ont d'abord suggéré qu'elle contenait les éléments nécessaires à la transcription des unités CRISPR, ce qui fût confirmé par Pul *et al.* (Pul *et al.*, 2010), en mettant en évidence l'existence d'un promoteur dans la séquence leader du locus CRISPR II d'*E. coli* K12. Par la suite, les analyses bioinformatiques ont révélé, que l'absence de la séquence leader rend impossible l'expression du locus et l'incorporation de nouveaux spacers, en servant de plateforme pour la fixation des protéines Cas lors de l'intégration de nouveaux spacers (Lillestøl *et al.*, 2006).

c- Les séquences d'espacement (« spacers / proto-spacers »):

Ce sont les séquences les plus variables des unités CRISPR, ajoutées en 5' de la séquence leader (Fineran et Charpentier, 2012). Leur longueur peut varier de 26 à 72 paires de base selon l'organisme. En revanche, au sein d'un même « CRISPR array », les spacers sont généralement de même longueur et de séquences différentes, à l'exception de certaines séquences qui sont issues de duplications au sein de certains « CRISPR arrays » de grande taille (Lillestøl *et al.*, 2006).

La disponibilité dans les bases de données de génomes viraux et bactériens entièrement séquencés a permis, par alignement des séquences, de justifier l'origine virale de certaines de ces séquences d'espacement (Mojica *et al.*, 2005). D'origine extra-chromosomique, ces séquences confèrent à la bactérie une « immunité » contre tout élément porteur de ces séquences (Bolotin *et al.*, 2005). Elles

reflètent d'une part l'environnement dans lequel la bactérie a évolué mais elles retracent également, de manière chronologique, les éléments génétiques mobiles rencontrés, contre lesquels elle a acquis des résistances (Lillestøl *et al.*, 2006). C'est pourquoi on parle d'immunité adaptative (**Figure 22**).

Les étapes de transcription puis maturation des CRISPR arrays libèrent des CRISPR ARN (crARN) qui ciblent leur séquence complémentaire (par couplage de base ARN-ADN). Ces séquences qualifiées de proto-spacer servent de guides aux protéines CRISPR associées (Cas) chargées de cliver la séquence nucléique étrangère correspondante. L'étape de maturation des crARN nécessite dans certains cas l'intervention de « trans-activating crRNA » (TracrRNA) (Deltcheva *et al.*, 2011). Dans ce cas les pre-crRNA sont reconnus par les TracrRNA, l'ensemble est activé par une RNase III endogène aboutissant à la formation d'un duplex d'ARN fonctionnel. Le clivage de l'ADN se produit dans le proto-spacer, proximal au PAM (motif adjacent au Protospacer présent dans les CRISPR types I et II). La présence d'un PAM empêche le système de défense bactérien d'attaquer son propre locus CRISPR. Bien que initialement considéré comme important uniquement pour les interférences, le PAM a également un rôle dans l'acquisition des spacers (Deveau *et al.*, 2008; Mojica *et al.*, 2009).

La complexité des mécanismes permet d'une part d'acquérir de nouveaux spacers à partir d'éléments génétiques rencontrés pour la première fois (adaptation dite naïve) mais également à partir d'éléments génétiques déjà reconnus mais dont les spacers ne sont plus complémentaires à 100 % avec la séquence étrangère d'origine, probablement dû à l'apparition de mutations (adaptation dite « primed ») (Fineran *et al.*, 2014).

50

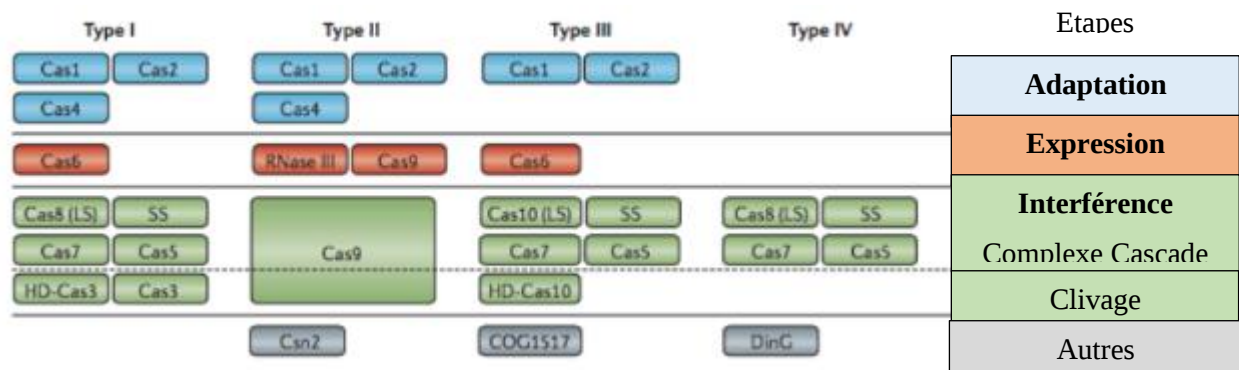
Par ailleurs, la suppression occasionnelle des séquences variables est probablement requise pour limiter la taille du CRISPR, mais il existe peu de connaissances du mécanisme, ni même de la fréquence de ces événements (Shabbir *et al.*, 2016).

d- Les gènes cas :

Quatre gènes, désignés CRISPR-associés (cas), ont d'abord été identifiés uniquement chez les espèces contenant un locus CRISPR (Jansen *et al.*, 2002). Ils sont situés à proximité des CRISPR arrays sous la forme de cluster et orientés de manière à être co-transcrits; l'arrangement le plus commun étant *cas3-cas4-cas1-cas2* (Al-Attar *et al.*, 2011). La protéine Cas3 semble être une hélicase, alors que Cas4 ressemble à la famille des exonucléases RecB et contient des motifs riches en cystéine pouvant correspondre à des sites de liaison à l'ADN. Les nucléases Cas1 et Cas2 sont les seules protéines que l'on retrouve presque systématiquement dans les différents systèmes de CRISPR (Yosef *et al.*, 2012) (Makarova *et al.*, 2006, 2011b). Les travaux de Nuñez *et al.* (Nuñez *et al.*, 2014) ont montré que chez *E. coli* K12, Cas1 et Cas2 s'associent pour former un complexe Cas1-Cas2 fonctionnel nécessaire pour l'acquisition de nouveaux spacers (**Figure 21, Figure 22**).

Depuis les premières études, ce ne sont pas moins de 41 familles supplémentaires de protéines Cas (CRISPR associées) qui ont été identifiées, toujours à proximité des séquences répétées (Haft *et al.*, 2005).

De ce fait, les systèmes CRISPRs sont susceptibles d'être classés sur la base de leur organisation au sein du locus et de leur composition (variation du nombre et du type de motifs de répétitions, présence de gènes différents dans les clusters) d'une part, et selon l'espèce procaryote, d'autre part. L'une des classifications différencie les systèmes CRISPR Cas de type I, II et III, chacun possédant plusieurs sous-types (Makarova *et al.*, 2011; Rath *et al.*, 2015). Plus récemment, un système CRISPR de type IV qui contient plusieurs gènes Cas à l'exception de *cas1* et *cas2* a été proposé (**Figure 21**). Le complexe de types IV serait guidé par des interactions protéines-ADN et non par le crARN guide (Koonin and Krupovic, 2014)



51

I-A à I-F	II-A à II-C	III-A et III-B	IV	Sous types
Bactéries et Archae	Exclusivement bactériens	Bactéries et Archae		Types d'hôtes
ADN	ADN	ADN/ARN	ARN uniquement	Séquences étrangères ciblées
(Jackson <i>et al.</i> , 2014) (Rollins <i>et al.</i> , 2015) (Wiedenheft and Bondy-Denomy, 2017)	(Chylinski <i>et al.</i> , 2014) (Wei <i>et al.</i> , 2015)	(Rouillon <i>et al.</i> , 2013) (Spilman <i>et al.</i> , 2013)	(Rath <i>et al.</i> , 2015)	Références

Figure 21 : Composition protéique des différents types de CRISPR Cas

Les noms des protéines suivent la classification et nomenclature actuelle (Makarova *et al.*, 2011). Les différentes étapes du CRISPR dans lesquelles elles sont impliquées sont indiquées à droite. Certaines sont impliquées dans plusieurs étapes comme par exemple la protéine Cas9 du type II qui intervient dans l'expression des crARN mais également dans le processus d'interférence. De même dans les systèmes de types I et III, Cas6 est une sous unité du complexe cascade qui est impliqué dans le traitement des pré-crARN ainsi que dans la reconnaissance et l'inactivation des MGE (mobile genetics elements). Cas1 et Cas2 sont présentes dans tous les systèmes et indispensables pour l'acquisition de nouveaux spacers, à l'exception du système CRISPR de type IV (Rollins *et al.*, 2015). D'autres protéines sont impliquées mais leurs fonctions restent méconnues. Adaptée de (Koonin and Krupovic, 2014).

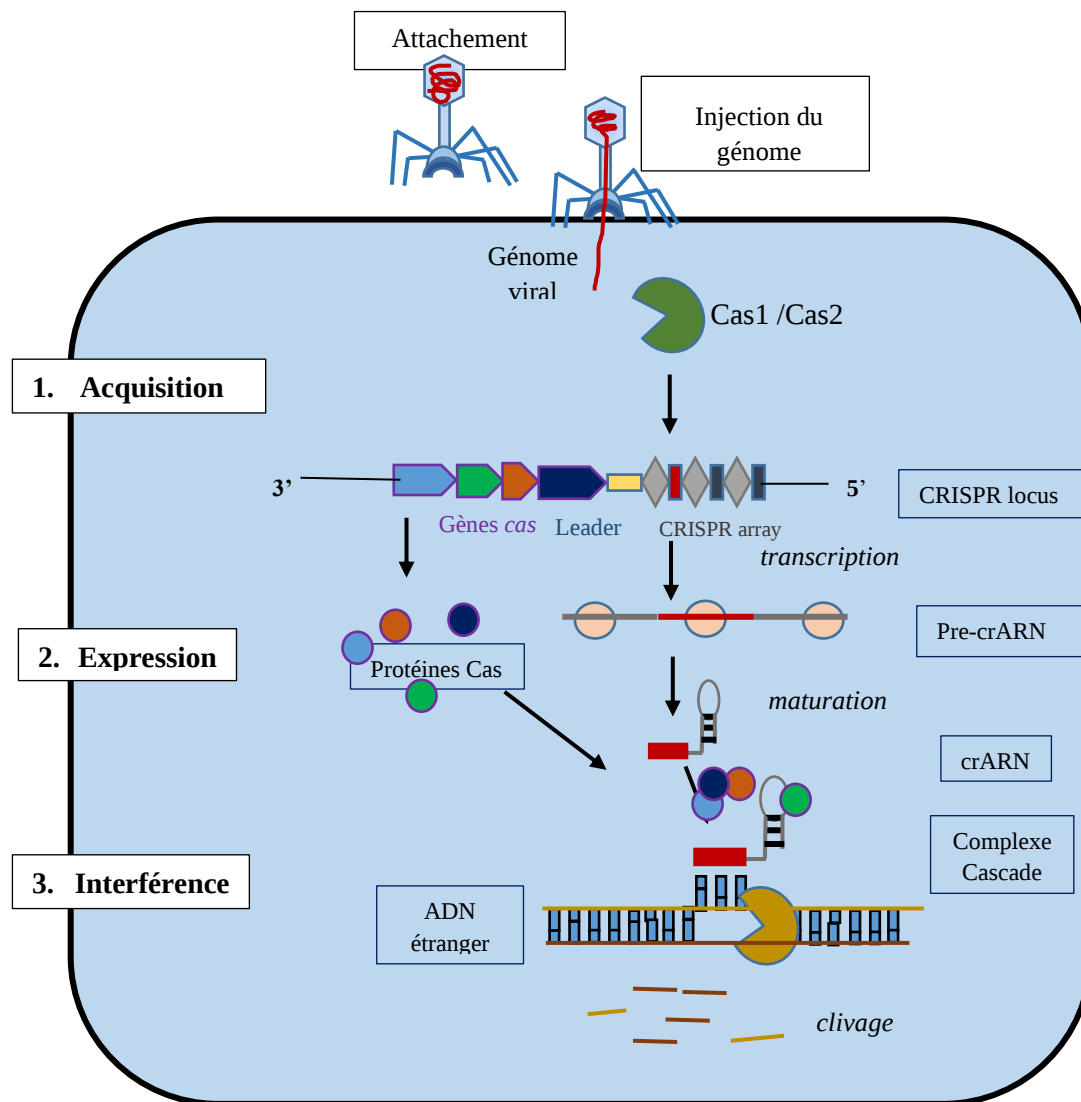


Figure 22 : Représentation des principales étapes de la réponse adaptative du CRISPR Cas chez les bactéries après infection par un phage

1. La première étape passe par l'acquisition de nouveaux spacer en 5' de la séquence leader. 2. Une étape de transcription des CRISPR arrays abouti ensuite à la formation de pré-crARN. Ces derniers subissent une étape de maturation avant de devenir des petits ARN guides associés à d'autres protéines telle que les protéines Cas. 3. Finalement, toute séquence d'ADN/ARN étrangère porteuse de la séquence complémentaire (proto-spacer) à la séquence portée par l'ARN guide sera ciblée puis clivée par le complexe multi protéique Cascade. D'après (Fineran and Charpentier, 2012; Shabbir *et al.*, 2016).

5.2.3 La contre-attaque des phages :

Certains phages codent pour des protéines capables d'inactiver le système CRISPR-cas (Bondy-Denomy *et al.*, 2012). Jusqu'à présent, quatre familles de protéines anti-CRISPR I-E (Pawluk *et al.*, 2014) ainsi que cinq familles capables d'inhiber le système CRISPR de type I-F (Pawluk *et al.*, 2016), ont été recensées. Le système de type I-F possède trois uniques protéines AcrF1, AcrF2 et AcrF3. Les trois protéines interagissent avec les différentes protéines du complexe cascade. AcrF1 et AcrF2 reconnaissent le complexe Cas1-Cas2 alors que la protéine AcrF3 inactive la fonction endoribonucléase de Cas3 (Bondy-Denomy *et al.*, 2015). La présence des trois protéines empêche le complexe Cascade de se lier à l'ADN et donc de cliver la séquence.

5.2.4 Applications biotechnologiques du CRISPR-Cas :

L'édition des génomes :

Le système bactérien de résistance adaptatif CRISPR-Cas révolutionne tous les domaines des sciences de la vie et ouvre de nouvelles frontières à la médecine ciblée. Depuis l'élucidation du mécanisme moléculaire de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* en 2012 et son développement en tant qu'outil d'ingénierie génomique, des modifications génétiques dans plus de 40 espèces (animales et végétales) ont été réalisées (Georges and Ray, 2017; Marchisio and Huang, 2017), plus de 290 brevets ont été déposés dans le monde entier et les premiers essais cliniques utilisant des cellules T modifiées par le CRISPR-Cas ont récemment été lancées en Chine et aux États-Unis (Kick *et al.*, 2017).

Théoriquement, le CRISPR-Cas9 peut être utilisé pour modifier toutes les séquences génomiques, fournissant ainsi un moyen simple et rentable d'édition génétique. Cependant, l'activité du CRISPR-Cas9 engendre parfois des coupures sur des sites où l'ADN n'est pas parfaitement complémentaire avec l'ARNguide. Pour des applications cliniques, nécessitant une précision de 100 %, l'optimisation du CRIPR-Cas9 fait déjà l'objet d'études (Zhang *et al.*, 2016). Parmi les améliorations du procédé, le système inductible mis au point par Polstein et Gersbach (Polstein and Gersbach, 2015) permet de contrôler la transcription et l'expression des gènes endogènes, par émission de lumière bleue. Ce système LACE (light activated CRISPR-Cas9 effector) permet ainsi une gestion dynamique du procédé.

Chapitre 2 : *P. AERUGINOSA* DANS LES RESEAUX D'EAU

1. Généralités sur la bactérie :

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, plus communément appelée « bacille pyocyannique », du grec « puon » (pus) et « kuanos » (bleu foncé), a été isolée pour la première fois en 1882 par le pharmacien des armées, Charles Gessard. Le genre *Pseudomonas* fut créé en 1900, la bactérie *P. aeruginosa* est l'espèce la plus pathogène pour l'homme. Chez les végétaux, *P. syringae* est responsable de lourdes pertes sur les récoltes.

1.1 Génome :

La taille du génome de *P. aeruginosa* est estimée entre 5,2 et 7 millions de paires de bases. Ce génome est constitué, à hauteur de 65 %, par les bases azotées guanine et cytosine. *P. aeruginosa* possède un unique chromosome circulaire ainsi que de nombreux plasmides. Actuellement, 5000 génomes de *P. aeruginosa*, dont les souches PAO1 et PA14, ont leur génome entièrement séquencé (Stover *et al.*, 2000). Une des caractéristiques majeures du génome de cette bactérie est sa grande plasticité qui lui permet de s'adapter rapidement aux modifications de son environnement.

1.2 Morphologie et culture de la bactérie :

Il s'agit d'un bacille à Gram - mesurant 1 à 3 µm de long et 0,5 à 1 µm de large. L'espèce *P. aeruginosa* possède un métabolisme aérobie strict. Dans certains environnements, y compris les poumons, le nitrate et le nitrite sont présents et pourraient servir d'accepteurs d'électrons de remplacement pour la croissance anaérobie de *P. aeruginosa* (Grasemann H *et al.*, 1998; Sun Yoon *et al.*, 2002). Cette bactérie est munie d'un flagelle polaire unique (ciliature monotriche) permettant sa mobilité. Elle peut être entourée d'une pseudo-capsule pouvant intervenir dans la pathogénicité de la bactérie. *P. aeruginosa* peut être facilement cultivée sur milieux nutritifs en aérobie à une température comprise entre 30°C et 37°C. Deux types de milieux sélectifs sont disponibles pour *P. aeruginosa*. Il s'agit du milieu Drigalski et du milieu cétrimide. Ce dernier peut servir à la fois à l'isolement et au dénombrement de *P. aeruginosa*. Le cétrimide est un antiseptique de la famille des ammoniums quaternaires, qui inhibe le développement d'une grande variété de microorganismes, y compris les espèces de *Pseudomonas* autres que *P. aeruginosa*. Le milieu cétrimide peut être additionné d'acide nalidixique, agent antibactérien, bloquant la réplication de l'ADN des microorganismes qui lui sont sensibles. La formule du milieu cétrimide est dérivée de celle du milieu de King A. La présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium dans le milieu cétrimide stimule la production de pyocyanine, par la bactérie.

1.3 Niches écologiques

P. aeruginosa est une bactérie ubiquitaire vivant à l'état saprophyte dans l'environnement (eau, sol, surface des végétaux) avec un fort tropisme pour les milieux humides. Bactérie commensale de

l'homme et des animaux, elle est capable de coloniser le tube digestif, le tractus respiratoire, les zones cutanées humides ou encore le tractus urinaire.

2. Pathogénicité : les réseaux d'eau, sources et vecteurs de contaminations :

Un certain nombre de bactéries pathogènes opportunistes se trouvent naturellement dans les milieux aquatiques, et peuvent persister et se développer dans les réseaux d'eau potable. Ces bactéries comprennent *Aeromonas* spp, certains coliformes (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*), *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp et *Pseudomonas aeruginosa*. Les doses infectieuses de souches cliniquement préoccupantes de ces organismes sont relativement élevées (10^6 - 10^8 UFC) pour les individus en bonne santé, et donc inoffensives pour la plupart (Wingender and Flemming, 2011). Cependant, leurs doses infectieuses sont plus faibles et particulièrement critiques pour une proportion croissante de la population humaine dite sensible. Les populations vulnérables incluent les nourrissons, les personnes très âgées, les personnes hospitalisées, les personnes immunodéprimées et celles souffrant d'autres maladies sous-jacentes et sous traitement médical. Selon l'organisme microbiologique, la voie de transmission entraînant une maladie dites d'origine hydrique peut se faire par ingestion, inhalation d'aérosols ou exposition de la peau (par exemple, via des plaies et les muqueuses), des oreilles et des yeux, avec un fluide contaminé (Exner *et al.*, 2005). En milieu hospitalier *P. aeruginosa* est fréquemment isolée dans les environnements humides proches des malades tels que les éviers, siphons, robinetterie (Blanc *et al.*, 2004; Reuter *et al.*, 2002; Walker *et al.*, 2014; Weinbren *et al.*, 2017). Une transmission interhumaine de la bactérie est également possible par manuportage par le personnel (Bergmans *et al.*, 1998) ou à partir de matériel médical (Garvey *et al.*, 2016) ou d'eaux contaminées (Costa *et al.*, 2015; Lefebvre *et al.*, 2017; Mena and Gerba, 2009). Elle peut ainsi provoquer toute une série d'infections. Elle contamine principalement les parties endommagées du corps, tels que les plaies dues aux brûlures et aux chirurgies, les voies respiratoires des personnes atteintes d'une maladie sous-jacente et les yeux. A partir de ces sites, elle peut envahir le corps, provoquant des lésions destructrices, une septicémie et une méningite. Les folliculites et les otites liées à l'eau sont en revanche associées à des environnements plus chauds et humides tels que les piscines et les spas. De nombreuses souches ont développées des résistantes aux agents antimicrobiens, ce qui accroît significativement les risques liés la présence de ce microorganisme en milieu hospitalier.

55

Parmi les environnements de transmission, les lieux publics tels que les piscines, les établissements de soins et les centres thermaux, susceptibles d'accueillir des personnes dont la santé est altérée, sont soumis à des contrôles bactériologiques réguliers devant répondre à des normes. Dans les industries agro-alimentaires, l'entretien du réseau d'eau ainsi que la mise en place de séquences de nettoyage et désinfection du matériel sont nécessaires pour limiter le développement de biofilms sur les surfaces au contact des aliments.

2.1 Qualité microbiologique de l'EDCH :

Les articles R.1321-1 à R.1321-42, du code de la santé publique, relatifs aux eaux destinées à la consommation humaine (EDCH) à l'exclusion des eaux minérales naturelles, imposent des limites réglementaires qui protègent le consommateur de façon très efficace. Le dernier rapport de l'agence régionale de santé (ARS) de 2015 portant sur la qualité de l'EDCH en France mentionne l'existence de 33 150 points de captage et 16 500 stations de production d'eau potable nécessaire pour alimenter les 25 000 réseaux de distributions. Il s'agit de l'aliment le plus contrôlé pour lequel une soixantaine de paramètres (bactériologiques, physico-chimiques et radiologiques) sont suivis pour évaluer sa qualité. La fréquence des contrôles sanitaires réalisés au niveau des captages, des stations de traitement et au robinet du consommateur ont permis en 2015 d'alimenter 97,6 % de la population française par de l'eau respectant en permanence les limites de qualité fixées par la réglementation pour les paramètres microbiologiques. Sans consignes particulières de la part des instances responsables du suivi de la qualité, l'eau du réseau peut donc être consommée sans risque par la population.

2.2 Cas des établissements thermaux :

L'appellation « eau minérale naturelle (EMN) » s'applique dans le cas d'une eau ayant des propriétés favorables à la santé (teneur en éléments minéraux, oligo-éléments et autres constituants) et respectant des critères précis comme l'origine profonde, la stabilité de leur composition chimique et une pureté originelle, notamment microbiologique (Popoff G., 2010).

56

En France, la parution de la circulaire DGS/VS 4 N° 2000-336 impose des exigences de qualité microbiologique de l'eau thermale et définit de nouvelles modalités de gestion du risque en présence de contaminations (DGS, 2000). L'eau minérale naturelle issue d'une source est amenée au moyen d'un ensemble continu de canalisations et de systèmes hydrauliques, à l'entrée de l'établissement. En raison de leurs usages thérapeutiques et de l'état de santé des curistes exposés, les eaux minérales se doivent d'être exemptes de microorganismes pathogènes de la source d'émergence aux différents points d'usage, on parle de « tolérance zéro » (Popoff G., 2010). Deux types d'analyses microbiologiques sont réalisées: **BMO** pour le dénombrement des organismes revivifiables à $36 \pm 2^\circ\text{C}$ après 44 ± 4 h et à $22 \pm 2^\circ\text{C}$ après 68 ± 4 h dans un échantillon contrôle d'1 mL, le dénombrement des germes anaérobies sporulés sulfito-réducteurs dans un échantillon contrôle de 50 mL et le dénombrement des coliformes totaux à 37°C , et des coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*) à $44,5^\circ\text{C}$, des streptocoques fécaux et de *P. aeruginosa* dans un échantillon contrôle de 250 mL. Les analyses **BM1** concernent le dénombrement de *Legionella pneumophila* dans un échantillon contrôle d'un litre (DGS, 2000).

Pourtant un rapport de la DGS (DGS, 2005) établit que durant la saison thermale de 2001, 67 % des établissements (89 stations thermales et 103 établissements thermaux) ont été contaminés au moins une fois par *P. aeruginosa*. Si peu d'établissements (8 %) ont présenté des contaminations en *Pseudomonas aeruginosa* au niveau des captages, 66 % de ces structures ont rencontré des problèmes

fréquents au niveau des points d'usage. Sur la totalité de ces analyses non-conformes plus de 50 % présentaient une contamination comprise entre 1 et 100 UFC.250 mL⁻¹, 37 % entre 10 et 100 UFC.250 mL⁻¹, 10 % entre 100 et 1000 UFC.250 mL⁻¹ et 2 % étaient supérieures à 1000 UFC.250 mL⁻¹ (DGS, 2005). Une étude réalisée aux thermes d'Aix les Bains (Morin and Graber-duvernay, 2002) a déterminé que les principaux facteurs susceptibles de contribuer à ces contaminations étaient en rapport avec les conditions de conceptions des réseaux et leur mode d'exploitation. En effet, une fréquence d'utilisation réduite de certains appareillages ou robinetteries par le personnel et/ou les curistes, favorise significativement l'implantation de la bactérie. Dans les SPA, la température de l'eau ainsi que le taux de matière en suspension sont propices à sa multiplication (Rotily and Potelon, 1991). Dans certains cas, ce sont les curistes eux même porteurs de la bactérie qui contaminent le réseau de distribution lors de l'utilisation des postes de soin (Morin and Graber-duvernay, 2002). Cet aspect qualifié de rétro-contamination est particulièrement évoqué dans les hôpitaux.

Lors des contrôles, les analyses doivent être réalisées soit par un laboratoire interne de l'établissement thermal, soit un laboratoire indépendant (mais accrédité COFRAC). En cas de non-conformité, l'arrêté du 19 Juin 2000 (DGS, 2000) précise également la démarche à suivre en fondant ses préconisations sur l'application du principe de précaution. Ainsi, en présence de contamination microbiologique de l'eau par un des micro-organismes soumis à des valeurs réglementaires, « l'exploitant devra mettre en œuvre les mesures nécessaires à la suppression de la contamination (nettoyage, rinçage, désinfection, rinçage), assurer l'information du corps médical et transmettre à l'autorité sanitaire le protocole particulier d'entretien, de maintenance et de désinfection des réseaux mis en place ». Selon le poste de soin concerné, celui-ci pourra être fermé dès connaissance des résultats de l'analyse ou resté en fonctionnement sous réserve que la deuxième série d'analyses réalisée dans les 5 jours montre un retour à la conformité.

Il faut savoir que dans certains cas, les conséquences de ces contaminations peuvent conduire à une fermeture administrative totale ou partielle de l'établissement. Au-delà, du déficit budgétaire pour l'établissement, c'est également l'économie locale qui est impactée. Le conseil national des établissements thermaux (CNETh, 2016) estime que 71 % des communes thermales ont moins de 5 000 habitants et, souvent, l'activité thermale représente l'essentiel de leurs ressources.

2.3 Cas des établissements de santé :

Dans les établissements de santé, l'eau du réseau de distribution destinée à la consommation est également soumise à la réglementation fixée par les articles R.1321-1 à R.1321-42 du code de la santé publique. Cependant, des précautions particulières sont apportées selon l'usage qui en est fait. Quatre grandes catégories d'eau se distinguent en fonction des usages opérés, et des traitements complémentaires devant, ou non, être mis en œuvre (**Tableau 7**). Pour chaque catégorie, des valeurs

exprimées en unité formant colonie (UFC) par volume d'eau prélevé ont été établies, selon le paramètre microbiologique recherché. Ces limites de qualité se déclinent en trois niveaux :

- Le niveau cible : niveau vers lequel l'établissement doit tendre dans des conditions normales de fonctionnement.
- Le niveau d'alerte : niveau établi par l'utilisateur, qui détecte précocement une dérive potentielle des conditions de fonctionnement et doit entraîner la vérification des résultats et la mise en œuvre des premières mesures correctives.
- Le niveau exigé : niveau qui doit immédiatement déclencher la mise en œuvre de procédures correctives permettant de revenir rapidement sous le niveau d'alerte et de tendre vers le niveau cible.

Tableau 7 : Paramètres microbiologiques à surveiller dans un établissement de santé, en fonction du type d'eau :
(d'après le Guide « l'eau dans les établissements de santé » Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005)

Typologie de l'eau			Qualité Microbiologique	
			Indicateurs	Niveau cible ou exigé
Q1	Eaux ne subissant aucun traitement dans l'établissement de santé	Q1.a L'eau d'entrée : eau arrivant à l'entrée de l'établissement que ce soit à l'interface avec le réseau public ou à la sortie d'un forage propre à l'établissement	Flore aérobie revivifiable à 22 °C et à 36 °C <i>Qualité microbiologique globale</i>	100 UFC / mL à 22°C
				10 UFC / mL à 36°C
		Q1.b L'eau aux points d'usage : eau étant consommée ou utilisée directement ou indirectement par toute personne au sein de l'établissement. Cette définition concerne l'eau froide de chaque robinet intérieur ou extérieur aux bâtiments au sein de l'établissement. Ces eaux sont destinées à des usages alimentaires et sanitaires. Elles comprennent également les eaux mises à disposition des patients (carafe...)	Flore aérobie revivifiable à 22 °C et à 36 °C	Pas de variations dans un rapport de 10 par rapport à la valeur d'entrée
			<i>P. aeruginosa</i>	< 1 UFC / 100 ml
			Coliformes totaux	< 1 UFC / 100 ml
Q2	Eaux traitées au sein de l'établissement de santé, répondant à des critères définis en fonction des usages alimentaires, sanitaires et de soins	Eaux bactériologiquement maîtrisées	Flore aérobie revivifiable à 22°C <i>P. aeruginosa</i>	≤ 1 UFC / 100 ml < 1 UFC / 100 ml
		Eaux chaudes	<i>Legionella pneumophila</i>	< 1000 UFC / litre Points d'usage (patients à risques) : < 250 UFC / litre
		Eau des piscines de rééducation Eau des bains à remous et douches à jets	Flore aérobie revivifiable à 36°C	< 100 UFC / mL
			<i>P. aeruginosa</i>	≤ 1 UFC / 100 mL
			Coliformes totaux	≤ 1 UFC / 100 mL
			<i>S. aureus</i>	≤ 1 UFC / 100 mL
			<i>L. pneumophila</i>	absence (< 250 UFC / L) (uniquement pour les douches)
		Eaux pour hémodialyse	Flore aérobie revivifiable à 22°C	<100 UFC / mL ou par litre selon le type de dialyse
			Endotoxines	< 0.25 UI /mL

Chapitre 2 : P. AERUGINOSA DANS LES RESEAUX D'EAU

		Eau purifiée	Flore aérobie revivifiable	≤ 100 UFC / mL
		Eau hautement purifiée	Flore aérobie revivifiable	≤ 10 UFC / 100 mL
		Eau des fontaines (boisson)	Mêmes critères de potabilité que l'eau de type Q1.b	
Q3	Eaux stériles	Eau pour préparations injectables	Répondent aux exigences de qualité de la Pharmacopée Européenne pour l'eau purifiée	limite de 0,25 UI / ml d'endotoxines bactériennes
		Eau pour irrigations		moins de 0,5 UI /ml d'endotoxines bactériennes
		Eau potable stérilisée		(eau de type Q1.a autoclavée)
Q4	Eaux techniques	Ces eaux n'entrent pas directement au contact du patient et nécessitent différents niveaux de qualité	Les critères de qualité sont avant tout physico-chimiques - Pas de consensus communs -	

L'arrêté du 11 janvier 2007 rassemble les limites et références de qualité fixées pour EDCH. En fonction de l'origine du prélèvement, un second arrêté du 11 Janvier 2007 mentionne en annexes, la fréquence et le contenu des analyses à effectuer. Les programmes de types D1 et D2 correspondent au programme d'analyses de routine effectué aux robinets normalement utilisés pour la consommation.

Malgré ces aspects réglementaires, une enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, menée entre mai et Juin 2012 (INVS/CCLIN/RAISIN, 2012) met en avant que *P. aeruginosa* représente 8,4 % des microorganismes identifiés comme responsables d'infections nosocomiales. Elle est impliquée dans 6,9 % des infections urinaires, 6,9 % des infections du site opératoire, 18,1 % des pneumonies et 44,1 % des infections de la peau et des tissus mous. Aux Etats-Unis, l'étude menée en 2011 dans 10 états, souligne la présence de *P. aeruginosa* dans 7,1 % des infections nosocomiales (Magill *et al.*, 2014). Ces deux études alertent également sur le fait que la majeure partie de ces infections se retrouvent dans les services de réanimation ou de soins intensifs où l'état de santé des patients favorise l'opportunisme des pathogènes. A cela, s'ajoute l'augmentation d'infections causées par des souches multi-résistantes aux antibactériens (Shawn H, 2015). Récemment, une méta-analyse a été réalisée sur l'ensemble des données publiées concernant les facteurs de risques impliqués dans les infections par des souches *P. aeruginosa* résistantes, à partir d'études épidémiologiques réalisées dans différents services hospitaliers (Raman *et al.*, 2018). Les 54 études sélectionnées ont permis d'établir de fortes corrélations entre l'acquisition par les patients d'une souche multi-résistante et leur admission en unité de soins intensifs ainsi qu'avec l'utilisation de différents antibiotiques. Au-delà des conséquences cliniques, les auteurs mettent également en avant l'impact économique pour les établissements (Nathwani *et al.*, 2014), avec des traitements plus longs, plus chers et des temps de séjours qui augmentent.

3. Le développement des biofilms dans les réseaux d'eau :

3.1 Le biofilm :

3.1.1 Les caractéristiques d'un biofilm :

Les biofilms sont des communautés microbiennes enchâssées dans une matrice de structure tridimensionnelle composée d'exopolysaccharides (Yang *et al.*, 2011a), d'ADN extracellulaire (Montanaro *et al.*, 2011), de protéines (Karatan and Watnick, 2009) et biosurfactants. La formation de biofilm traduit un mode de croissance protecteur qui permet aux micro-organismes de survivre dans des environnements hostiles et de disperser les cellules d'ensemencement pour coloniser de nouvelles niches dans des conditions favorables. Il peut se développer sur les différentes surfaces (biotiques et/ou abiotiques) qui sont présentes au sein des niches écologiques, et spécifiques de l'espèce bactérienne. L'évolution de la structure du biofilm au cours de son développement, engendre l'installation de gradients d'éléments indispensables au métabolisme bactérien, tels que l'oxygène et les nutriments, et conduit à une hétérogénéité métabolique des bactéries entre elles. Deux constructions de gène de la protéine fluorescente verte (GFP) ont ainsi permis de montrer l'existence de modèles de croissance et de synthèse protéique, stratifiés dans les biofilms de *P. aeruginosa* (Werner *et al.*, 2004). La présence de ces gradients est à l'origine du développement de microenvironnements pouvant être colonisés par d'autres espèces adaptées à ces niches écologiques (Yang *et al.*, 2011b).

Le biofilm est décrit comme étant propice aux échanges de matériel génétique qui participent à la résistance des microorganismes (Bridier *et al.*, 2011). Les composants de la matrice extracellulaire ont la capacité de jouer le rôle de barrière « physique » aux différents agents biocides en neutralisant les substances actives de certains antibactériens (Bridier *et al.*, 2011). Cliniquement, les biofilms sont responsables de nombreuses infections persistantes et chroniques en raison de leur résistance inhérente aux agents antimicrobiens et de la sélection des variants phénotypiques (Costerton, 1999). Toutefois, il ne faut pas oublier que les biofilms sont aussi bénéfiques. Ils sont porteurs du potentiel auto-nettoyant du sol, des sédiments et de l'eau en minéralisant la matière organique. Ils servent à l'épuration biologique de l'eau potable dans les biofiltres (Gimbel *et al.*, 2006), au traitement biologique des eaux usées (Butler and Boltz, 2014) et sont les moteurs de l'élimination des déchets biologiques (Bornemann *et al.*, 2015). Ils effectuent les processus de compostage et génèrent suffisamment de chaleur pour inactiver les agents pathogènes provenant des matières premières du compost (Gimbel *et al.*, 2006).

60

Le développement des biofilms est sous l'influence de facteurs environnementaux d'une part mais également dépendant (i) des types de surfaces qui peuvent favoriser leur formation, (ii) de l'activation de gènes, nécessaires à leur formation (Friedman and Kolter, 2004) et requis pour maintenir le biofilm, l'architecture du biofilm ainsi que la synthèse des composés extracellulaires qui sont concentrés dans la matrice du biofilm. L'étude de Pessereau (Pessereau, 2015) a montré une plus forte tendance des matériaux organiques à promouvoir le développement de biofilm comme déjà rapporté

dans la littérature (Eboigbodin *et al.*, 2008). Cet effet a notamment été attribué à l'irrégularité de leur surface, cette rugosité étant susceptible de jouer un rôle déterminant dans l'adhésion bactérienne (Anselme *et al.*, 2010; Pessereau, 2015). Cependant, certaines études suggèrent une influence plus significative de la composition chimique de la surface des matériaux et du relargage de certains additifs, utilisés dans les processus de fabrication des matériaux et pouvant servir de nutriments aux microorganismes (Moritz *et al.*, 2010).

Il est important de noter que selon l'espèce bactérienne et l'environnement, les biofilms sont susceptibles d'être différents d'un point de vue architectural mais également sur les populations bactériennes hébergées. De plus, au laboratoire, il est possible de différencier les biofilms qui se forment à l'interface air-liquide d'une culture sous la forme de pellicules, des biofilms immergés associés à une surface solide en condition statique ou sous l'influence de flux d'écoulement (Busscher and van der Mei, 2006), ou encore, des colonies qui se forment sur les géloses nutritives (Friedman and Kolter, 2004).

3.1.2 Les étapes de formation du biofilm sur une surface inerte :

La formation des biofilms est décrite comme une succession d'événements (**Figure 23**), comprenant les étapes d'adhésion (1 et 2), de développement (3), de maturation (4) et de dispersion (5). Chaque cycle aboutit à la libération d'individus mobiles capables de coloniser de nouvelles surfaces et de donner naissance à de nouveaux biofilms (Stoodley *et al.*, 2001).

61

Dans la littérature, McGuire et Kirtley (McGuire and Kirtley, 1989) suggèrent que la formation d'un film de conditionnement suite à l'adsorption de composés du milieu environnant (tels que des molécules organiques et des ions), favorise les premières étapes d'adhésion des microorganismes (Hwang *et al.*, 2013; Schneider, 1996). Lors du transport, la diffusion et la mobilité des bactéries, ainsi que les mécanismes de mouvements browniens, de convection ou encore de gravitation et sédimentation, conditionnent l'entrer en contact des microorganismes avec la surface (Abdallah *et al.*, 2014; Donlan, 2002). L'adhésion microbienne au support se fait dans un premier temps de manière réversible, via des interactions physico-chimiques de types électrostatiques, hydrophobiques ou encore de van der Waals d'une part, et via des interactions cellulaires et moléculaires d'autre part, entre les protéines de structures présentes à la surface des cellules (par exemple : les flagelles, les pili) et le matériau (Bos *et al.*, 1999).

La transition vers une adhésion irréversible est généralement caractérisée par la formation d'une monocouche de cellules à l'origine de la synthèse des composés de la matrice extracellulaire jouant le rôle de ciment entre les cellules (Stoodley *et al.*, 2002). L'attachement irréversible marque le passage d'un mode de vie planctonique à un mode vie sessile engendrant des changements de morphologie et d'expression génique chez les microorganismes (Donlan, 2002). L'augmentation de la densité cellulaire provoque la concentration de molécules signal, naturellement produites par les bactéries, induisant un

système de communication cellulaire sophistiqué appelé le « quorum-sensing » (Christiaen *et al.*, 2014). Le fonctionnement de ce système est lié à la production de molécules diffusibles. L'accumulation de ces molécules constitue un signal ayant la propriété, après détection par les protéines réceptrices appropriées, d'activer ou d'inhiber l'expression d'un panel de gènes cibles. A titre d'exemple, Pulcini (2001) a observé que les gènes contrôlant la synthèse des polyphosphokinases, impliquées dans diverses voies métaboliques, étaient régulés positivement chez *P. aeruginosa* lors de la formation de biofilm. Hall-Stoodley et Stoodley (Hall-Stoodley and Stoodley, 2002) ont identifié jusqu'à 57 protéines associées au biofilm qui ne sont pas retrouvées dans le profil d'expression des cellules planctoniques. Chez le biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 cultivé in vitro durant six jours, seulement 40 % des protéines exprimées sont identiques au profil d'expression des cellules PAO1 planctoniques. Après 9 et 12 jours, le pourcentage de protéines exprimées identiques augmente à 60 %, ce qui suggère que plusieurs phénotypes sont exprimés au fil du temps.

Les cellules adhérentes, sécrètent alors des substances exopolymériques (EPS) qui stabilisent leur fixation irréversible sur la surface. Cette troisième étape est caractérisée par la croissance et la division de ces cellules, formant des micro-colonies. L'alginate constitue l'un des composants EPS le mieux étudié et joue un rôle important dans l'architecture du biofilm chez la souche mucoïde *P. aeruginosa*.

Durant la quatrième étape, la disponibilité en nutriments au cours de la croissance du biofilm contribue à l'élaboration d'une structure complexe multicouche fournissant de nouvelles niches écologiques à d'autres espèces. En microscopie, la maturité d'un biofilm se distingue par l'apparition de structures dites « en champignons » avec au sommet la possibilité d'avoir le relargage de plusieurs cellules sous la forme planctonique, capables à leur tour de coloniser d'autres surfaces et milieux (**Figure 23**). Tolker-Nielsen *et al.* (Tolker-Nielsen *et al.*, 2000) ont étudié la dynamique de deux espèces de biofilms de *Pseudomonas in situ*, chacune étiquetée avec une protéine fluorescente différente (gfp et dsRed). En suivant au microscope les cellules au fil du temps, ils ont observé que les microcolonies qui au départ étaient distinctes (vertes ou rouges), contenaient après trois jours, des cellules des deux espèces, ce qui suggère que le biofilm contenait à la fois des populations sessiles et motiles. Ils confirment ainsi que la régulation négative des protéines flagellaires, suite à leur adhésion, n'est que transitoire et que des bactéries motiles sont présentes dans les stades les plus avancés du développement du biofilm.

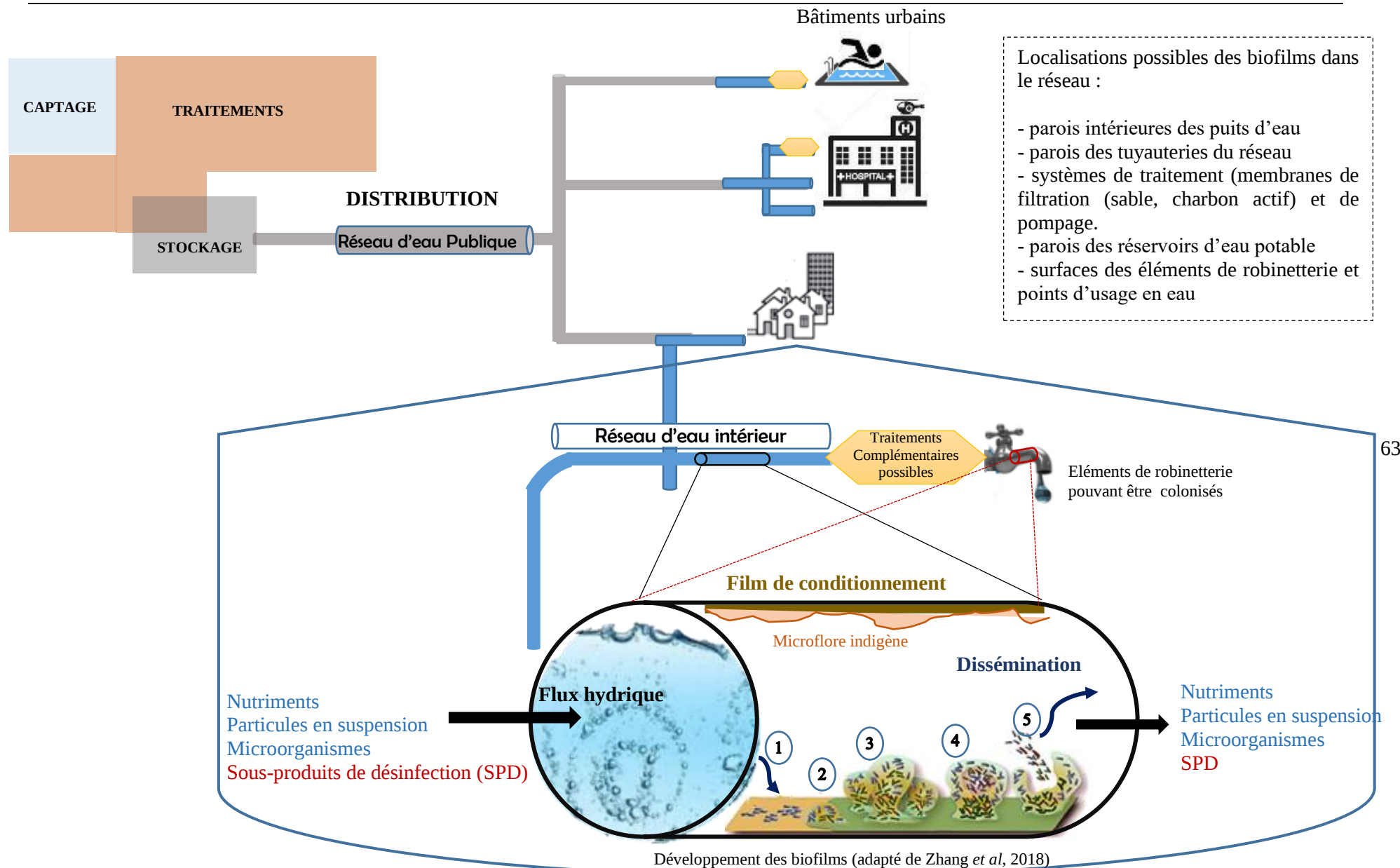


Figure 23 : Développement des biofilms dans les réseaux d'eau : impact sur la qualité de l'eau potable et risques sanitaires associés

3.1.3 La résistance du biofilm :

La définition de « résistance » change selon que l'on considère des cellules planctoniques ou des biofilms. Dans le premier cas, une souche bactérienne est définie comme étant résistante à un biocide si elle n'est pas inactivée par une concentration ou une période d'exposition spécifique qui inactive habituellement la majorité des autres souches (Langsrud *et al*, 2003). A l'inverse, les cellules de biofilm, sont généralement considérées comme résistantes par comparaison avec les cellules planctoniques. La résistance bactérienne aux biocides peut être intrinsèque, génétiquement acquise ou phénotypique (tolérance) (Langsrud *et al* 2003, Russell 2003). Dans le cas des biofilms, elle est principalement induite par une adaptation physiologique au mode de vie (croissance sessile, stress nutritionnel) et peut être perdue ou nettement réduite lorsque les cellules du biofilm reviennent à l'état planctonique (Russell 1999).

Ce mode de croissance améliore la capacité des bactéries à survivre aux traitements par agents antimicrobiens, en raison d'un certain nombre de facteurs. Il s'agit notamment :

- d'une réduction de la pénétration de l'agent dans les biofilms en raison de la présence d'une matrice extracellulaire (Stewart *et al.*, 2001),
- de l'hétérogénéité du biofilm,
- de l'expression de phénotypes, tels que l'expression de pompes à efflux (Høiby *et al.*, 2010),
- de la présence de cellules persistantes ou de cellules viables mais non cultivables (Oliver, 2005)(Li *et al.*, 2014),
- de la présence d'amibes, qui en tant qu'hôtes, internalisent certaines bactéries et les protègent.

La fréquence de mutation des bactéries d'un biofilm en croissance est également significativement augmentée par rapport à celle des bactéries planctoniques ainsi que les événements de transmission horizontale des gènes (Zhang *et al.*, 2018). Ces conditions physiologiques peuvent expliquer pourquoi les bactéries qui produisent des biofilms deviennent facilement résistantes aux antibiotiques en médecine et aux biocides en industries (WHO, 2011). Au travers de leur étude, Zhang *et al* (Zhang *et al.*, 2018) parviennent à mettre en évidence que la présence de bactéries résistantes dans l'eau du robinet provient principalement du biofilm et que les traitements au chlore et aux chloramines (utilisées aux USA) favorisent sa dispersion.

Holden *et al* (1995) ont montré que la concentration en chlore peut influencer sur la formation de biofilm, une diminution du chlore résiduel est corrélée à une augmentation du biofilm. Par conséquent, la présence de résidus de désinfectant libre dans tout le système de distribution d'eau est primordiale afin de réduire la formation de biofilm dans les systèmes de plomberie domestiques. Cependant, ceci n'est pas suffisant pour éliminer complètement les biofilms (LeChevallier *et al*, 1990). Paradoxalement, augmenter la quantité de chlore peut entraîner une augmentation des SPD pouvant affecter la qualité de l'eau, ainsi que la résistance des micro-organismes aux désinfectants sous la forme de biofilms.

3.2 Le biofilm, son origine dans le réseau et son impact sur la qualité de l'eau :

Afin de minimiser les risques de colonisation des réseaux de distribution d'eau potable, une approche multifactorielle a fait consensus (Anaissie *et al.*, 2002; Loveday *et al.*, 2014), elle intègre d'une part la mise en place de périmètres de protection autour du captage, l'application d'étapes successives de traitement permettant de réduire les paramètres à risques puis enfin la gestion et l'entretien des réseaux de distributions, élément important du circuit qui achemine l'eau jusqu'aux consommateurs.

Bien que les usines de potabilisation tendent à éliminer la plupart des contaminations microbiennes de l'eau, elles ne permettent pas une absence totale des microorganismes. Il est donc possible en fin de traitement de détecter une diversité microbiologique cultivable et VBNC (Viables mais non cultivables) dans l'eau potable. Eichler *et al.* (Eichler *et al.*, 2006) ont montré que des populations microbiennes présentes dans l'eau potable produite, étaient également présentes dans l'eau brute du captage, suggérant ainsi que la qualité de la ressource en eau influence la qualité de l'eau potable mais également que certaines espèces sont susceptibles de persister aux différentes étapes de traitement : par sporulation pour les champignons, via leur capsid pour les adénovirus ou encore grâce à leur petite taille. D'autres mécanismes reposent sur des propriétés (physico-chimiques ou métaboliques) propres à chaque microorganisme ainsi que sur des facteurs extrinsèques (tels que la température, le pH et la turbidité) liés à la qualité de l'eau, pouvant influencer l'efficacité des traitements de potabilisation (Huang *et al.*, 1997). De plus, bien que les filières de traitements éliminent un grand nombre de composés organiques, une partie restante devient une source de nutriments favorisant la croissance microbienne dans le réseau de distribution (Gagnon *et al.*, 2000).

Trois catégories permettent de distinguer l'ensemble de ces microorganismes présents dans l'eau potable, il s'agit :

- de la flore indigène,
- de la flore d'altération, susceptible d'altérer les qualités organoleptiques de l'eau, voire dégrader les matériaux utilisés dans le réseau,
- des potentiels pathogènes.

La présence dans les bâtiments publics, privés et industriels, d'installations de plomberie où les bactéries peuvent proliférer et former des biofilms, nécessite parfois des précautions complémentaires de traitement au niveau des réseaux d'eau d'intérieurs et une vigilance sur l'entretien des canalisations. Les endroits favorables à l'implantation des biofilms sont généralement des parties du réseau où il y a stagnation de l'eau (Zlatanović *et al.*, 2017), accumulation d'éléments nutritifs provenant de la matière organique, telles que des sorties et des bras morts peu utilisés, ou en présence de matériaux oxydés ou non métalliques utilisés pour la conception des canalisations (Lehtola *et al.*, 2004). De fait, dans un système de distribution, l'écoulement continu de l'eau au travers de tuyaux d'alimentation de grand diamètre, limite l'accumulation microbienne. Cependant, la distribution de l'eau, en aval, se fait dans

des tuyaux de diamètre de plus en plus petit et les biofilms sont donc susceptibles de se développer beaucoup plus en raison de la plus grande variabilité du débit d'eau auquel ces tuyaux sont exposés. Pour limiter ce problème, la conception d'un réseau repose sur des paramètres de dimensionnement permettant de se placer dans des conditions de flux hydrauliques optimum.

De même, tout travail entrepris sur un réseau d'eau potable est également assimilé à une éventuelle brèche pouvant occasionner l'entrée de microorganismes pathogènes dans le système de distribution et nécessite un protocole particulier de remise en service (Hamsch *et al.*, 2004; Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005).

Lorsqu'un biofilm s'implante à proximité d'un point d'usage en eau, environnement favorable à leur multiplication, la communauté bactérienne devient alors un « potentiel réservoir » dispersant constamment les microorganismes dans le flux d'eau qui passe (Momba *et al.*, 2000). Ils peuvent alors coloniser les usagers et consommateurs (patients et soignants dans les hôpitaux, curistes dans les centres thermaux et baigneurs dans les piscines) ainsi que toutes les surfaces environnementales (tels que les robinetteries, les dispositifs médicaux ou tout autre instrument) en contact avec l'eau. L'élimination du biofilm peut s'avérer compliquée surtout lorsqu'il s'agit de parties du réseau difficilement accessibles.

En conclusion, lutter contre l'implantation des biofilms sur les surfaces en contact avec l'eau (telles que les canalisations mais aussi les robinetteries) revient d'une part, à maîtriser la qualité microbiologique de l'eau depuis son captage jusqu'à sa distribution, au travers des différents traitements qui peuvent être fait et d'autre part, à être vigilant sur la conception et l'entretien des réseaux d'eaux (des canalisations jusqu'aux robinetteries).

66

4. Gestion de la qualité de l'eau potable et de l'eau minérale naturelle :

4.1 Gestion de la qualité des eaux minérales naturelles destinées aux activités thermales :

4.1.1 Les traitements autorisés de l'eau minérale :

L'exploitation d'une source d'eau minérale naturelle est subordonnée à l'autorisation de l'autorité responsable dans le pays où l'eau a été extraite, après constatation que l'eau considérée est conforme aux dispositions de l'annexe I, partie I de la Directive n° 2009/54/CE du 18/06/09 relative à l'exploitation et à la mise dans le commerce des eaux minérales naturelles.

Selon l'arrêté du 27 Février 2007 (Ministère de la santé et des solidarités, 2007), l'eau minérale naturelle exploitée dans un établissement thermal est soumise à la même réglementation que les eaux minérales embouteillées en respectant des limites de qualité physico-chimiques, microbiologiques et organoleptiques. Elles ne peuvent faire l'objet d'aucun traitement ou adjonction susceptible de modifier ses propriétés, autres que ceux relatifs à :

- La séparation des éléments instables, tels que le fer, le manganèse, l'arsenic et les composés du soufre, par filtration ou décantation, éventuellement précédé par une oxygénation,
- L'ajout ou l'élimination (totale ou partielle) du dioxyde de carbone libre par des méthodes exclusivement physiques.

En revanche, selon la nature des soins, et dans un souci de sécurité sanitaire, l'eau minérale peut faire l'objet de traitements de désinfection en amont immédiat du point d'usage par irradiation aux ultraviolets, filtration membranaire ou flash pasteurisation.

La réglementation classe ainsi les soins selon 4 catégories (**Tableau 8**) :

- Type I : contact direct avec les muqueuses respiratoires ou susceptible d'entrer en contact avec les yeux ou les muqueuses respiratoires
- Type II : contact avec les autres muqueuses et l'ingestion d'eau minérale naturelle
- Type III : soins externes individuels (bain ou douche individuels)
- Type IV : soins externes collectifs en piscine thermale ou piscine de déambulation

Tableau 8 : Traitements de l'eau autorisés en amont des points d'usage et fréquence des contrôles, selon les types de soins (Ministère de la santé et des solidarités, 2007)

Types de soins	Traitements autorisés	Fréquence minimum de contrôle aux points d'usage
Type I : Type II :	– Irradiation aux ultraviolets en amont du point d'usage – Filtration membranaire en amont immédiat du point d'usage – Pasteurisation flash, refroidissement immédiatement avant usage	Type I : au moins une analyse BMO et BM1/mois
Type III :	– Irradiation aux ultraviolets en amont immédiat du point d'usage – Filtration en amont du point d'usage	Types II, III, IV : au moins une analyse BMO /mois et une analyse BM1 trimestrielle
Type IV :	– Traitements autorisés pour le traitement des eaux de piscine mentionnées à l'article L. 1332-1 du code de la santé publique	

67

Une partie du réseau des établissements thermaux est également dédiée à l'acheminement et la distribution de l'eau du réseau public, issue de la filière de production d'eau potable et répond donc aux mêmes critères de qualité. Si la nature physico-chimique de l'eau minérale ne le permet pas (gazeuse, sulfureuse), l'eau potable du réseau public de distribution pourra d'ailleurs être utilisée pour les opérations de rinçage du réseau après désinfection jusqu'à disparition de toute trace de la solution désinfectante.

4.1.2 L'entretien du réseau de distribution des eaux minérales naturelles :

Le maintien de la qualité de l'eau repose sur un entretien rigoureux des réseaux, la mise en place de procédures de nettoyage et de désinfections spécifiques ou encore de nettoyage en place (NEP).

La limitation des risques est toutefois en partie dépendante de la conception et de la maintenance des réseaux de distribution. Des réseaux de conception simple permettent d'une part, d'éviter la stagnation d'eau dans les canalisations qui favorise les dépôts et également d'isoler certains tronçons du

réseau pour faciliter les opérations de nettoyage. Ces dépôts sont principalement constitués par la sédimentation de certains minéraux ainsi que par une fraction organique issue de la flore autochtone des eaux, implantée sous la forme de biofilm et pouvant héberger des pathogènes. Dans le cas où le nettoyage ne suffit pas à éliminer totalement le biofilm, des opérations de désinfection peuvent être réalisées en s'assurant que tout risque soit évité aux curistes vis-à-vis de ces traitements (**Tableau 9**).

Les actions préventives sont d'autant plus faciles à réaliser que le réseau a bien été conçu. Elles consistent, à espace de temps régulier variant de 48 heures à une fois par semaine, en un traitement permettant d'éviter l'installation d'un biofilm et doivent être réalisées en dehors des périodes d'accueil des curistes (DGS, 2000). Ce sont en général : (i) soit des purges régulières à une vitesse d'eau de 1 à 3 m/s (avec ou sans air) et des traitements chimiques de désinfection : eau oxygénée 1000 ppm avec ou sans acide péracétique ou eau chlorée à 1 ou 2 ppm, (ii) soit des traitements à l'eau chaude ou à la vapeur d'eau basse pression. Néanmoins, Bédard *et al.* (Bédard et al., 2016) soulignent dans leur étude le coût que représente les traitements thermiques mais également le manque d'efficacité sur des biofilms déjà implantés.

Les actions curatives nécessitent avant tout de connaître la composition des dépôts, puis de mettre en place l'un des protocoles de nettoyage cité auparavant (**Tableau 9**) en tenant compte des paramètres de conception du réseau. Une étape de désinfection sera ensuite opérée et pourra être répétée si besoin, en veillant à ne pas engendrer l'apparition de réactifs résiduels dans l'eau (DGS, 2000).

Tableau 9 : Opérations de nettoyage et de désinfection des réseaux, susceptibles d'être utilisées, en préventif ou curatif (DGS, 2000)

Types	Modalités	Contraintes	P / C ²
Nettoyages			
Air + eau	1 m/s	- robinet de décharge pour éliminer les particules décollées	P et C
Eau seule	2 à 2,5 m/s	- les vibrations peuvent endommager les canalisations	P et C
Obus racleurs	Gamme importante d'obus adaptés	- diamètre des canalisations égal ou supérieur à 100 mm - le diamètre des canalisations doit être le même dans la zone concernée - le réseau doit être adapté pour recevoir l'obus - disposer d'une pression de 2 bars.	C
Chimique	Mélanges ¹ Temps d'action > 20 min	- identifier la nature des dépôts à éliminer - rinçage efficace pour limiter la corrosion des matériaux	P et C
Désinfections			
Thermique	Eau à 80°C Vapeur d'eau basse pression à 115 °C	- nécessite une conception du réseau prévue à cet effet - rinçage du réseau pour ramener la température à celle de l'eau minérale	P et C
Chimiques Oxydant	Chlore	de 10 ppm à 100 voire 150 ppm	P et C
	Chloramines ³	100 à 150 ppm Temps d'action de 12 h	C
	Eau oxygénée	1000 ppm H ₂ O ₂ 2 à 3 h en régulier jusqu'à 24 heures	P et C
	H ₂ O ₂ + acide peracétique	- formation d'acide acétique devant être totalement éliminé par rinçage car il constitue une source de carbone biodégradable	P et C
	Chimiques non oxydant	Solution sodique à pH 12 Temps de contact 30 min	C

¹ Ces derniers sont en général constitués de carbonates de calcium et/ou d'hydroxydes de fer et oxydes de manganèse permettant la dissolution des dépôts.

² Traitements étant habituellement utilisés en préventif P ou curatif C.

³ Ce procédé, très utilisé aux USA, n'est pas en usage en France en raison de la dégradation des caractéristiques organoleptiques de l'eau qu'il est susceptible d'entraîner.

4.2 Gestion de la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine :

La liste de l'ensemble des produits et des procédés autorisés pour le traitement des eaux destinées à la consommation est disponible dans la circulaire DG 5/VS 4 n° 2000-166 du 28 mars 2000.

4.2.1 Les différents procédés de désinfection existants :

- Les traitements chimiques :

Pour maîtriser au mieux la qualité microbiologique, l'eau potable est généralement désinfectée par ajout dans le réseau de désinfectants chimiques tels que le chlore, le dioxyde de chlore, l'ozone ou d'autres oxydants (WHO 2011). Après traitement, le réseau de distribution contient généralement des résidus de désinfectants qui limitent la croissance des bactéries dans l'eau mais qui, dans certains cas, ne suffisent pas à préserver l'ensemble du réseau d'une éventuelle contamination. De plus, la libération de ces résidus chimiques appelés aussi « les sous-produits de désinfection (SPD) » peuvent affecter le goût de l'eau, l'odeur et impacter la santé des consommateurs (Hrudrey, 2008). La génération de SPD liée au chlore dans l'eau du réseau, se produit au contact de la matière organique et inorganique naturellement présente ou importée (xénobiotique).

En France, la circulaire DGS/SD7A n°2003-524/DE/19-03 du 7 novembre 2003 créée dans le contexte du plan Vigipirate préconise de « maintenir une concentration minimale en chlore libre de 0,3 milligramme par litre (mg/l) en sortie des réservoirs et de viser une concentration de 0,1 mg/l en tout point du réseau de distribution ». L'utilisation de produits chlorés en réseau de distribution, exige une eau de bonne qualité (faiblement chargée en matière organique, faiblement turbide, pH correct voisin de la neutralité) pour permettre au pouvoir désinfectant d'agir vis-à-vis des bactéries en suspension dans l'eau.

Dans ce contexte, l'un des challenges actuels consiste à optimiser la désinfection en trouvant un compromis entre les traitements existants pour limiter la présence des agents pathogènes et les risques chroniques associés aux SPD (effets mutagènes, cancers). Dans certains pays du nord de l'Europe, une alternative consiste à mettre en œuvre des procédés de traitement physique performants (par exemple du charbon actif, de la nanofiltration) pour éliminer les précurseurs organiques avant l'application du désinfectant (Li and Mitch, 2018). En plus d'éliminer les précurseurs organiques, ces techniques permettent de réduire la dose de désinfectant à appliquer en réduisant la demande en oxydant. L'enlèvement des précurseurs pourrait également permettre d'obtenir une eau « biostable », ce qui éviterait de devoir conserver des résidus de désinfectants importants dans les systèmes de distribution pour prévenir la croissance de pathogènes opportunistes. Aux Pays Bas, le dernier processus de chloration a été remplacé en 2005 par un système UV innovant validé pour son action anti-microbiologique. Actuellement, la gestion de la qualité de l'eau potable de ce pays ne repose plus sur des procédés donnant lieu à des SPD (Smeets *et al.*, 2009).

- Les traitements physiques :

Lorsque l'installation le permet, l'utilisation de traitements non chimiques tels que la lumière ultraviolette (UV) sous la forme de rayonnements monochromatiques à une longueur d'onde germicide de 254 nm, est efficace pour traiter l'eau potable mais néanmoins ne possède pas d'effet rémanent. L'utilisation des UV nécessite toutefois un équipement spécifique devant répondre aux exigences de la Circulaire DGS/PGE/1 D 52 du 19 janvier 1987, ainsi qu'un entretien régulier et coûteux de l'installation. Dans les pays en développement, en raison de la nécessité d'un approvisionnement fiable en électricité, ces installations ont des applications limitées.

4.2.2 Actions préventives et traitements complémentaires sur les réseaux d'eau intérieurs :

Dans le cas particulier des hôpitaux, différents traitements complémentaires de l'eau pour l'obtention des qualités Q.2. et Q.4. (**Tableau 7**) sont appliqués. Les dispositifs de traitement complémentaire de la qualité de l'eau sont réglementés par l'article R.1321-55 du code de la santé publique. Ils doivent respecter les dispositions de la circulaire DGS/VS4 n°99-360 du 21 juin 1999 relative aux appareils individuels de traitement des eaux destinées à la consommation humaine au robinet. Ils reposent dans un premier temps sur des procédés visant à améliorer les propriétés physico-chimiques de l'eau, tels que l'adoucisseur ou la déminéralisation via des résines échangeuses d'ions. Ces traitements peuvent ensuite être complétés par de la filtration biologique ou physique (micro-, ultra- et nano-filtration), de l'osmose inverse et de la distillation, permettant d'obtenir des eaux d'une grande pureté microbiologique.

71

- Actions préventives pour limiter l'implantation des biofilms :

Pour respecter les règles de conception et de mise en œuvre du bâtiment, les installations d'eau froide mais également d'eau chaude sont soumises à des alimentations en eaux dont la vitesse est susceptible de varier de 0,2 m/s dans les retours de boucles d'eau chaude sanitaire (DTU 60.11 P1-2, 2013) à 2 m/s pour les canalisations en sous-sol, les vides sanitaires etc.. (DTU 60.11 P1-1, 2013) de façon à limiter le développement de dépôts qui faciliteraient l'implantation des biofilms.

D'autre part, il existe une relation directe entre le type de matériel utilisé pour la construction des systèmes de distribution d'eau potable et la qualité des traitements qui seront appliqués. La formation du biofilm peut être favorisée à la surface d'une plomberie, si les matériaux sont capables de fournir les nutriments nécessaires pour la croissance bactérienne par relargage ou par rétention (Momba *et al.*, 2000) ou inversement. Concernant *P. aeruginosa*, Moritz *et al.* (Moritz *et al.*, 2010) ont montré que la souche AdS (isolée d'eau potable) n'a pas la capacité d'intégrer un biofilm d'eau potable de 14 jours, préétabli sur un coupon de cuivre. Cependant, cette même souche arrive à intégrer et à persister pendant plus de 29 jours dans ce même biofilm développé sur un coupon d'éthylène-propylène-diène monomère

(EPDM) ou de polyéthylène réticulé (PE-X c). Cet effet inhibiteur est attribué à la toxicité des ions cuivre en solution.

En France, les matériaux pouvant être utilisés dans les installations fixes de distribution d'eau destinée à la consommation humaine doivent répondre aux exigences de l'arrêté du 29 mai 1997 modifié par les circulaires DGS/VS4 n° 99/217 du 12 avril 1999, DGS/VS4 n° 2000/232 du 27 avril 2000, DGS/SD7A/2002/571 du 25 novembre 2002 et DGS/SD7A/2006/370 du 21 août 2006. De plus, les robinetteries ainsi que tout autre dispositif de protection doivent être homologués avant d'être mis sur le marché et sont parfois certifiés NF, ils permettent avec les améliorations techniques de limiter l'installation de conditions favorables au développement bactérien (ex : clapets anti-retour, siphons autoclavables..). Toutefois, l'ensemble de ces appareillages nécessite un entretien régulier en se référant aux préconisations des fabricants, sous peine d'obtenir un effet inverse et de favoriser l'installation « d'un réservoir » supplémentaire de contaminants.

La conception de nouveaux matériaux aux propriétés antibactériennes a d'ores et déjà fait preuve d'innovation. Les surfaces antibactériennes sont capables de repousser les cellules bactériennes, d'empêcher leur fixation, ou d'inactiver / tuer les cellules qui entrent en contact avec la surface (Hasan *et al.*, 2013). Néanmoins, dans le cas des surfaces recouvertes ou modifiées par des agents chimiques, il est nécessaire d'évaluer minutieusement leur efficacité dans le temps ainsi que leur toxicité. De nouvelles surfaces nanostructurées bio-inspirées interagissant avec la paroi cellulaire des bactéries, parviennent à limiter leur adhésion ou à les éliminer (Tripathy *et al.*, 2017). Ces surfaces bactéricides ont le potentiel d'être incorporées dans des domaines d'applications biomédicaux et industriels, comme alternative ou en synergie avec les produits bactéricides chimiques. Cependant, les techniques de fabrication pour le moment, ne permettent pas la production rentable de nanostructures sur de grandes surfaces, et les essais quant au vieillissement de ces surfaces en contact avec des milieux aqueux sont inexistantes.

72

Face à l'augmentation des résistances bactériennes, au manque d'efficacité des produits de désinfection actuels et à leur impact négatif sur la santé humaine mais également sur l'environnement, les recherches se portent donc sur le développement d'alternatives plus efficaces et plus durables permettant d'une part d'éviter l'implantation des bactéries mais également d'éliminer les biofilms existants sans altérer les matériaux.

Chapitre 3 : LES PHAGES COMME ALTERNATIVE AUX BIOCIDES ET AUX ANTIBIOTIQUES ?

Alors même que la communauté scientifique explore la possibilité d'utiliser les phages comme agent de biocontrôle, en réponse aux bactéries devenant multi-résistantes, nombreuses sont les questions concernant les modalités de leur utilisation, de leur production et mise sur le marché ainsi que les impacts et risques environnementaux pouvant émergés de ces nouvelles alternatives.

1. La phagothérapie : l'utilisation des bactériophages à des fins thérapeutiques :

1.1 En thérapie, seuls ou combinés à d'autres molécules :

L'augmentation rapide du nombre de bactéries multi-résistantes dans le monde (Fernández *et al.*, 2011) a suscité un regain d'intérêt pour la phagothérapie comme alternative possible aux antibiotiques ou comme approche complémentaire dans le traitement de certaines infections bactériennes (Kutateladze and Adamia, 2010). La plus part des études expérimentales *in vivo* sont menées chez la souris et ont permis de tester l'utilisation des phages contre les infections causées par *S. aureus* ou *P. aeruginosa* (Matsuzaki *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2006 ; Capparelli *et al.*, 2007 ; McVay *et al.*, 2007 ; Watanabe *et al.*, 2007 ; Vinodkumar *et al.*, 2008 ; Debarbieux *et al.*, 2010 ; Morello *et al.*, 2011 ; Alemayehu *et al.*, 2012). Ce sont également, tous ses essais qui permettent de valider les méthodes d'administration selon la préparation de phages et le type d'infection: oral, topique, sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineux.

73

Les résultats positifs de l'application de bactériophages ou de cocktails de phages pour le traitement de diverses infections rapportés dans un certain nombre de cas cliniques et d'essais thérapeutiques (Fish *et al.*, 2016; Jennes *et al.*, 2017; Ravat *et al.*, 2015; Rhoads *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2009) permettent de renforcer les résultats issus des expérimentations précliniques, *in vitro* ou *in vivo* chez l'animal (Kutter *et al.*, 2010). Au-delà de simples preuves d'efficacité, les essais chez l'homme sont l'occasion de définir un cadre réglementaire permettant l'usage de la phagothérapie (Parracho *et al.*, 2012). Ainsi, les futures questions concernent plus particulièrement les bonnes pratiques (Pirnay *et al.*, 2015) :

- (i) de production: la pureté, la stabilité et le conditionnement du produit final,
- (ii) d'utilisation des solutions de phage: les conditions d'applications et la dose optimale.

En effet, si pour une application topique, une simple filtration serait suffisante, dans le cas des solutions de phages injectables, l'élimination par purification des composés susceptibles d'être immunogènes est indispensable. Le maintien de l'activité lytique des virus est également nécessaire et nécessite une formulation et un conditionnement qui garantissent la stabilité des particules dans le temps.

Plusieurs solutions sont également explorées afin d'optimiser la phagothérapie, comme :

- **L'utilisation de cocktails de phages** permettant d'élargir le spectre d'hôte d'une solution de phage. En d'autres termes, dans le cas d'une infection inconnue, il est plus probable qu'un traitement composé de 3 ou 4 bactériophages soit un succès par rapport à une monothérapie. Cela permettrait également dans certains cas de limiter l'apparition de résistances bactériennes (Chan *et al.*, 2013).
- **L'application d'enzymes de type dépolymérases**, qui dans le cas d'infections sous la forme de biofilm faciliteraient l'accès des phages aux cellules présentes dans la matrices d'exopolysaccharides (Pires *et al.*, 2016).
- **L'utilisation de phages modifiés génétiquement** comme cela a pu être testé sur des phages de type M13 (Lu and Collins, 2007). Les différentes modifications ont donné (i) les phages ϕ lexA3 qui suppriment la réponse SOS induite chez les bactéries *E. coli* K-12 EMG2 suite au traitement par l'ofloxacine, ainsi que (ii) les phages ϕ SoxR, ϕ CsrA et ϕ ompF exprimant des protéines capables de moduler la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Les essais réalisés sur des cultures planctoniques et sur des biofilms ont montré un bénéfice apporté par les phages modifiés en complément de l'antibiothérapie.
- **La synergie entre les phages et les antibiotiques**. Les études menées sur ce sujet, suggèrent une nette amélioration de l'efficacité des phages lorsque le traitement se fait conjointement à l'antibiothérapie. Un phénomène appelé Phages-Antibiotiques-Synergie (PAS)(Comeau *et al.*, 2007; Torres-Barceló and Hochberg, 2016). Ces études mettent également en évidence, que dans certains cas des concentrations très faibles en antibiotiques sont suffisantes. Si ce phénomène a été validé pour des cellules planctoniques et sur le biofilm, Chaudhry *et al.* (Chaudhry *et al.*, 2017) montrent en revanche, l'importance que peut avoir l'ordre dans lequel les traitements sont opérés. Dans cette étude, ils obtiennent un résultat maximal sur du biofilm de *P. aeruginosa in vitro* lorsque les phages sont ajoutés avant les antibiotiques.
- **L'utilisation de procédés de micro-encapsulation** qui permettraient de protéger les phages du pH trop acide du système digestif et de favoriser leur libération prolongée dans l'organisme sans stimuler les réactions immunitaires (Malik *et al.*, 2017).

1.2 Pour lutter contre les contaminations dans l'environnement médical :

Un premier projet mené par Curtin et Donlan (Curtin *et al.*, 2006) a montré l'efficacité des phages *in vitro* dirigés contre *Staphylococcus epidermis* pour réduire l'implantation des biofilms sur le matériel médical ou pour traiter des biofilms déjà implantés. Ce model *in vitro* a été par la suite réutilisé pour valider un pré-traitement avec les phages réduisant la formation de biofilms par *P. aeruginosa* sur la surface des cathéters (Fu *et al.*, 2010). Dans ce travail, un cocktail de 5 phages a entraîné une réduction de 3 logs du nombre de cellules du biofilm après 48 h, par rapport aux cathéters non traités (Fu *et al.*, 2010). Selon les auteurs, l'utilisation de cocktails de phages pourrait potentiellement être appliquée dans

des dispositifs médicaux à demeure pour empêcher la colonisation bactérienne et la formation de biofilms.

Dans cette optique, une étude plus récente a évalué le potentiel de cocktails de phages (un cocktail de six phages de *P. aeruginosa* et un cocktail de quatre phages de *Proteus mirabilis*) pour prévenir la formation de biofilms mono-espèce ou mixtes de *P. aeruginosa* et de *P. mirabilis* (Lehman and Donlan, 2015) à l'origine d'infections associées au système urinaire. Les cathéters revêtus d'hydrogel et prétraités avec ces cocktails ont montré une réduction significative du nombre de cellules du biofilm en comparaison au contrôle non traité (Lehman and Donlan, 2015). Dans d'autres cas, l'utilisation précoce des phages permettrait d'éviter l'obstruction des sondes urinaires par les microcristaux issus de la précipitation des éléments minéraux et se retrouvant piégés dans le biofilm (Jones *et al.*, 2015).

1.3 L'absence de cadre réglementaire :

Les phages ne bénéficient pour le moment d'aucun statut particulier auprès de législation. « En France, nous n'avons théoriquement pas le droit de les utiliser...mais pourtant rien ne nous l'interdit ! »(Ravat *et al.*, 2015).

Le recours aux phages ne peut être envisagé que dans le cadre d'une Autorisation Temporaire d'Utilisation nominative (ATUn) délivrée par l'ANSM. L'ATUn est une procédure exceptionnelle, dérogatoire, qui permet l'accès à des médicaments n'ayant pas d'autorisation de mise sur le marché en France et pour lesquels aucune alternative thérapeutique n'est disponible, dès lors que le rapport efficacité-sécurité est présumé favorable pour le patient au vu des données (cliniques ou non) disponibles (Patey *et al.*, 2019) Dernièrement, l'ANSM a jugé nécessaire de mettre en place un nouveau Comité Scientifique Spécialisé Temporaire (CSST) qui s'est déroulée le 21 mars 2019, chargé de réaliser un retour d'expérience sur l'utilisation des bactériophages et d'échanger sur les perspectives en termes de développement et d'élargissement de l'accès aux bactériophages en France. Une autre possibilité repose sur la convention d'Helsinki (World medical association, 2013) qui précise qu'en présence d'une situation où toutes les thérapeutiques reconnues ont échoué, le thérapeute est en droit de recourir à l'option thérapeutique qu'il estimera efficace. Néanmoins, s'il est envisageable de se procurer des phages dans les pays de l'ex-union soviétique, leur importation avec un passage au niveau des frontières semble plus compliquée de par l'absence de leur existence légale sur le territoire.

Dans le but de faciliter l'accès et la diffusion des connaissances sur le sujet, un réseau français appelé Phages.fr a été créé et permet de rassembler les communautés scientifiques institutionnelles, médicales et industrielles lors de meeting annuel et de journées thématiques. Dans la même optique, l'association PhagEspoirs promeut d'une part la recherche et l'utilisation des bactériophages dans les domaines du diagnostic et de la thérapie, et d'autre part soutient et accompagne les patients et leur famille qui souhaitent mieux connaître cette alternative et savoir comment y accéder.

2. Le biocontrôle : L'utilisation des phages pour des usages non thérapeutiques ou médicaux :

En 2006, l'utilisation de deux préparations de phages par les industriels (LISTEX™ P100 et LMP-102™), ciblant *L. monocytogenes*, a été approuvée par la FDA américaine (Smith, 2006). Depuis cette date plusieurs projets et brevets ont été déposés. Tous concernent l'application de phages pour lutter contre des bactéries pathogènes en environnements industriels, en agriculture et/ou sur des denrées alimentaires (**Tableau 10**).

Tableau 10 Ensemble des préparations reconnues comme « GRAS » par la FDA pour lutter contre les contaminations de l'environnement alimentaire (adapté de (Ryan *et al.*, 2011))

Pathogènes ciblés	Bactériophages	Fabricants	Textes de référence
<i>L. monocytogenes</i>	LISTEX P100™	Micreos Food Safety Inc. (EBI Food Safety Inc.)	GRN 000218.2007
<i>L. monocytogenes</i>	ListShield™ (LMP-102)	Intralytix, Inc	21 CFR* Part 172.785
<i>Salmonella</i>	SalmoFresh™	Intralytix, Inc	GRAS** Notice No. GRN000468
<i>Salmonella</i>	SALMONELEX™	Micreos Food Safety Inc. (EBI Food Safety Inc.)	GRAS Notice No. GRN000468
<i>E. coli</i> O157:H7	EcoShield™ (ECP-100)	Intralytix, Inc	FCN No. 1018
<i>E. coli</i> O157:H7	Finalyse™	Omnilytics	Eup No. 74234-Eup-2
<i>Xanthomonas campestris</i> <i>Pseudomonas syringae</i> (Tomato et Pepper spot)	AgriPhage™		US EPA reg. N° 67986-1

*Code of Federal Regulations, Food and Drug Administration

**Generally recognised as safe

*** Food contact substance notification

Les phages peuvent être utilisés aux différents stades de la chaîne alimentaire, de la production agricole jusqu'au conditionnement des aliments, bien que cela nécessite de prendre en compte les paramètres importants pour chaque stade afin d'assurer une efficacité optimale. Les applications de phages pour le bio-contrôle alimentaire peuvent donc se faire :

- « Avant récolte », directement au cours de l'élevage des animaux ou pendant la croissance des plantes à l'échelle des graines, parties aériennes et racinaires, fleurs et fruits,
- « Après récolte », par (i) application directe des phages sur la nourriture ; (ii) associés aux emballages dits antimicrobiens ; (iii) ou lors des procédés de bio-désinfection pour les équipements et surfaces.

- Avant récolte :

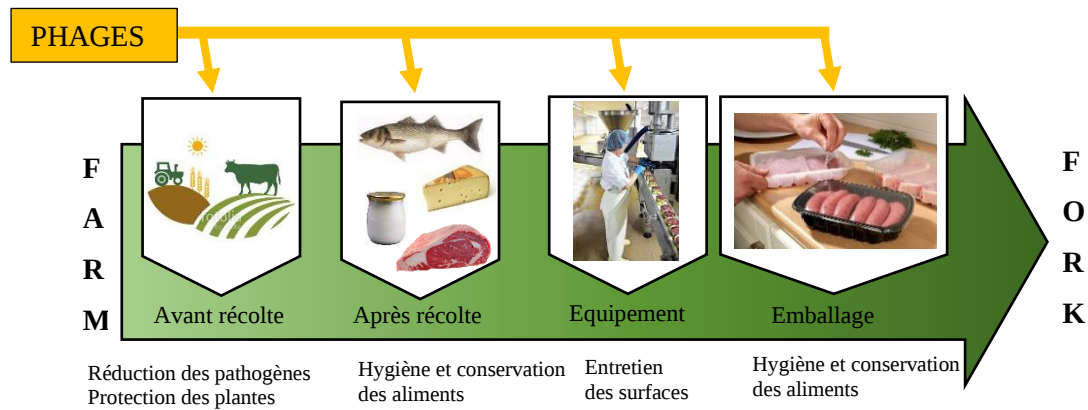


Figure 24 Applications de phages permettant de contrôler les contaminations tout au long de la chaîne alimentaire (adaptée de Mills *et al.*, 2017)

Les principaux agents pathogènes des plantes sont les parasites, oomycètes, nématodes, virus, champignons et bactéries. Parmi ces dernières, il existe plus de 200 espèces phytopathogènes les plus problématiques appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Xylella*, *Pectobacterium* et *Dickeya* (Mansfield *et al.*, 2012).

En agriculture, les phages montrent des résultats prometteurs pour lutter contre ces phytopathogènes (Buttimer *et al.*, 2017; Jones *et al.*, 2012) et suscitent beaucoup d'intérêt en raison de leur aspect durable et de la perte d'efficacité des produits phytosanitaires traditionnels dû au développement des résistances bactériennes (Buttimer *et al.*, 2017). Les recherches concernent de nombreuses cultures telles que les pommes de terre (Carstens *et al.*, 2018; Czajkowski *et al.*, 2015), les tomates (Bae *et al.*, 2012), les champignons (Kim *et al.*, 2011), les carottes, les poireaux (Rombouts *et al.*, 2016) mais également le kiwi (Frampton *et al.*, 2014), les poires et les pommes (Boulé *et al.*, 2011), les oranges (Balogh *et al.*, 2008), la vigne (Balogh *et al.*, 2008) etc.. Toutes ont rapporté une régression des symptômes, une diminution des pertes sur la récolte et parfois un gain de vigueur chez les plants traités. Divers phages ont été testés seuls, en combinaison avec d'autres phages (Boulé *et al.*, 2011) ou avec d'autres molécules (Mills *et al.*, 2017). Ces études ont également permis de mettre en évidence certaines limites et recommandations devant être considérées lors de leur utilisation comme agents de bio-contrôle. Ainsi il peut être judicieux d'appliquer les phages (i) en prophylaxie sur les semences / tubercules avant la mise en terre, sur les parties aériennes des plantes ou directement dans le sol, mais également (i) en curatif bien que les effets positifs soient moins marqués (Bae *et al.*, 2012).

Les protocoles de traitements doivent être adaptés pour prendre en compte la sensibilité des phages aux UV (Born *et al.*, 2015) mais également les éventuelles interactions négatives avec d'autres intrants de la culture (Iriarte *et al.*, 2007). La dessiccation, la température, le pH, les précipitations ainsi que la présence d'autres produits (chimiques ou biologiques) sont d'autres facteurs susceptibles d'impacter leur activité (Iriarte *et al.*, 2007). Pour explorer pleinement le potentiel des bactériophages

comme agents phytosanitaires, des recherches sont nécessaires afin d'acquérir une vision de leur stabilité et efficacité à long terme sous serres et aux champs. Des études sur la dynamique des populations présentes dans le sol (rhizosphère), sur les plantes (phyllosphère) et dans les effluents permettraient d'argumenter les discussions autour des éventuels impacts environnementaux. Selon le pathosystème et le type de phage, il sera nécessaire de déterminer en amont la méthode d'application, le moment de l'application, la fréquence, la dose ainsi que la formulation (Balogh *et al.*, 2003) des virus afin de prolonger leur effet dans des environnements parfois hostiles.

Dans les élevages, l'utilisation des phages est envisagée afin de limiter les apports en antibiotiques et autres composés chimiques susceptibles de se retrouver dans les produits finis. Les applications se font par voie orale, en intra musculaire ou en topique mais nécessitent de prendre en compte leurs limites. Le pH acide du système digestif, ou bien la mise en place d'une réponse immunitaire sont susceptibles d'interférer sur la survie des phages. Tout comme pour la thérapie humaine des méthodes d'encapsulation sont donc envisagées (Hussain *et al.*, 2015). Il est ainsi possible de traiter l'animal vivant et réduire les populations pathogènes avant leur entrée dans la chaîne alimentaire (Raya *et al.*, 2006). En aquaculture, les essais sont réalisés en ajoutant les phages directement dans l'eau des bassins lorsqu'il s'agit d'infections de la peau et des écailles, par imprégnation de la nourriture ou par injections (Nakai and Park, 2002). A titre d'exemple, un traitement par l'alimentation (environ 10^7 PFU. poisson) d'un bassin de 200 m³ (120000 poissons) a permis de réduire chaque jour de 5% le taux de mortalité, durant deux semaines. En aquaculture la thérapie par les phages présente plusieurs avantages (Nakai and Park, 2002) tels que, (i) la possibilité d'isoler des phages lytiques directement des eaux d'élevage où une infection bactérienne spécifique prédomine; ii) l'apparition et la persistance des phages dans les organes internes des poissons (ex. les reins) immédiatement après l'administration par voie orale ou dans l'eau; et iii) la difficulté pour les poissons de produire des anticorps neutralisant les phages, que ce soit dans des conditions expérimentales ou naturelles, à l'inverse des mammifères.

- **Après récolte :**

Les différentes étapes de transformation, production et conservations des aliments favorisent le développement d'agents pathogènes pouvant causer des infections mortelles chez l'homme et également générer de nombreuses complications pour le consommateur (Moye *et al.*, 2018). Parmi les plus dangereuses, les bactéries du genre *Salmonella*, *Campylobacter* et *Listeria* sont sous haute surveillance, ainsi que *E. coli*.

Les applications peuvent se faire par pulvérisation directement sur les aliments (Perera *et al.*, 2015), par le trempage des aliments dans une préparation de phage (Perera *et al.*, 2015) ou par ajout de phages sous forme liquide à un grand volume de nourriture (Endersen *et al.*, 2013), sans modifier les propriétés organoleptiques des aliments (Perera *et al.*, 2015). Ces méthodes imposent toutes fois des

limites pour les aliments solides pour lesquels la microstructure en surface aura une influence sur les vitesses de diffusion du phage, les bactéries peuvent ne pas être facilement accessibles par le phage et le nombre de bactéries sera probablement faible, en supposant que de bonnes normes d'hygiène aient été respectées (Endersen *et al.*, 2013; Hagens and Loessner, 2010).

En industrie, Hibma *et al* (Hibma *et al.*, 1997) ont été les premiers auteurs à s'intéresser à l'utilisation des phages pour limiter le développement bactérien de type *Listeria monocytogenes* sur des surfaces en aciers inoxydables. D'autres études ont ensuite mis en avant l'efficacité de préparations de phage, tel que Listex P100™, pour éliminer les cellules libres et les biofilms de *L. monocytogenes* présents sur les équipements utilisées pour la production alimentaire (Iacumin *et al.*, 2016).

Les essais se portent également sur la conception d'emballages susceptibles de contenir des phages (i) par immobilisation sur une membrane de cellulose (Anany *et al.*, 2011), (ii) par imprégnation d'un papier absorbant avec une solution de phages mis au contact de l'aliment ou (iii) par encapsulation dans des bille d'alginate (Lone *et al.*, 2016).

Ces dernières années, les consommateurs sont de plus en plus réticents à acheter des aliments traités avec des désinfectants chimiques et des antibiotiques. La demande s'est orientée vers le marché d'aliments et de produits biologiques fabriqués localement, tels que sur les marchés des agriculteurs locaux, ou issus d'agriculture raisonnée. Cette tendance semble donc très favorable à une utilisation des phages pour le bio contrôle, qui propose une approche antimicrobienne non chimique, écologique et ciblée pour améliorer la sécurité des aliments. Cependant, le public peut être réticent à acheter des aliments transformés avec des traitements inconnus. Cette technique de « pulvérisation de virus sur leur nourriture » reste pour le moment inconcevable. De plus, les producteurs sont généralement réticents à modifier leurs pratiques, surtout s'il existe une chance que le public réagisse négativement. Ainsi, pour que le bio contrôle par les phages soit plus largement utilisé, il sera essentiel de sensibiliser le public et les entreprises agroalimentaires, à l'innocuité et l'efficacité de cette alternative.

3. L'action des phages sur le biofilm :

3.1 Quel mode d'action ?

Le biofilm est communément défini comme des populations de microorganismes adhérentes à une surface biotique ou abiotique par l'intermédiaire d'une matrice extracellulaire autoproduite (Costerton, 1999). Il est décrit comme étant propice à l'infection par les phages de par la proximité des cellules, susceptible de favoriser le taux de répllication des phages (G.W. Hanlon, 2007), cependant, c'est également cette même structure qui est à l'origine d'une perte de leur efficacité. Plusieurs facteurs biologiques et biochimiques sont en causes.

Deux stratégies peuvent être utilisées pour combattre les biofilms (**Figure 25**): (a) la prévention, en empêchant le développement du biofilm (Fu *et al.*, 2010) et (b) l'éradication, en attaquant les cellules d'un biofilm existant (Azeredo and Sutherland, 2008; Carson *et al.*, 2010; Donlan, 2009).

Dans les deux cas, le cycle de vie exclusivement lytique est le processus fondamental de la thérapie/contrôle biologique par les phages avec un point final entraînant la mort de la cellule hôte et la libération de nouveaux phages lytiques.

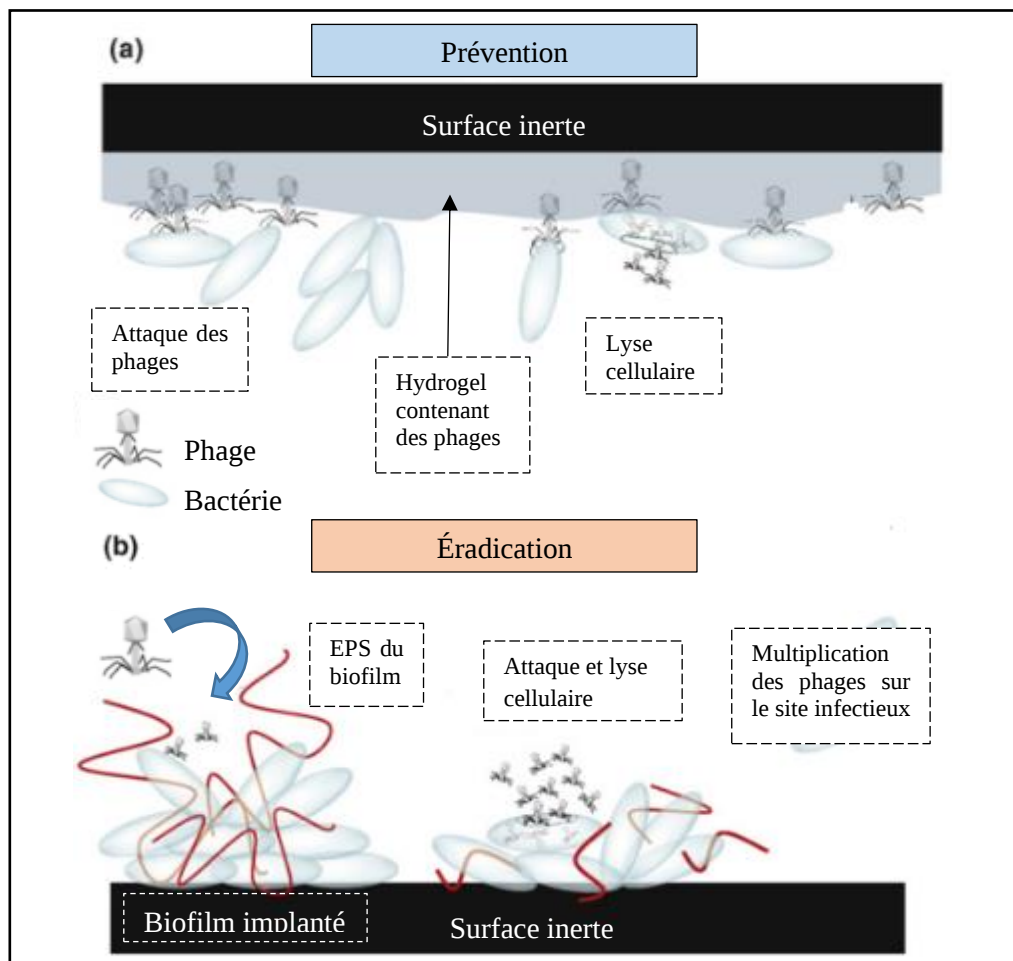


Figure 25 : Stratégies d'utilisation des phages pour lutter contre les biofilms de surfaces inertes

a. Prétraitement de la surface avec un hydrogel neutre contenant des phages. Les cellules sont infectées puis lysées. L'attachement des cellules est limité ainsi que la formation du biofilm. **b.** Application de phages en traitement sur un biofilm existant. Les EPS sont hydrolysés, les cellules se détachent donc de la surface. Les phages peuvent également lysée les cellules du biofilm.

3.2 Facteurs influençant l'efficacité d'infection du biofilm par les phages :

Des facteurs biologiques tels que, la composition du biofilm, la structure, la physiologie des cellules hôtes, mais également des facteurs physico-chimiques, peuvent être limitants et conditionnent la persistance des phages au sein des biofilms. Plusieurs études réalisées sur des biofilms *in vitro* de différentes espèces sont rassemblées dans **Tableau 13** et mettent en évidence l'efficacité des phages en fonction des paramètres testés.

3.2.1 Facteurs biologiques :

- **Biofilms mono espèce/ multi espèces :**

Une grande majorité de ce qui est connu sur les biofilms provient d'études réalisées en laboratoire sur des systèmes simple, mono espèce. Néanmoins dans l'environnement, les biofilms sont beaucoup plus complexes, constitués de plusieurs espèces formant une communauté microbienne (Wingender and Flemming, 2011). Les interactions inter et intra espèces, dans ce cas plus complexe, doivent être prises en compte (Yang *et al.*, 2011b). Des systèmes de compétition et/ou coopération peuvent être mis en place au sein d'un même biofilm composé de différentes communautés bactériennes : certaines souches entrent en compétition pour la nutrition; d'autre telle que, *Pseudomonas aeruginosa* sont capables d'éliminer ou d'inhiber la croissance de *Candida spp* en sécrétant des facteurs de virulence toxiques (Bandara *et al.*, 2010; Hogan, 2002). Dans certains cas, des amibes enkystées peuvent abriter et favoriser la multiplication d'espèces bactériennes pathogènes, suite à leur phagocytose.

La diffusion de molécules signales à l'origine de la communication inter-espèces est susceptible de contrôler : (i) l'expression de gènes impliqués dans diverses voies métaboliques, (ii) la synthèse des facteurs de virulence, des bio-surfactants, des EPS, et (iii) la motilité des bactéries. Wen *et al.* (Wen *et al.*, 2010) rapportent ainsi que l'expression des gènes de virulence chez *Streptococcus mutans* est significativement réduite en présence de *S. oralis* ou *Lactobacillus casei*. L'analyse de Ryan *et al.* (Ryan *et al.*, 2008) met en avant l'effet d'un facteur diffusé par *Stenotrophomonas maltophilia* sur l'architecture et la tolérance à la polymyxine du biofilm chez *Pseudomonas*. La diversité des espèces d'un biofilm induit notamment des co-agrégations intercellulaires multiples facilitant les communications par l'intermédiaire des adhésines mais pouvant masquer les récepteurs reconnus par les phages situés à la surface cellulaire.

- **Structure du biofilm, physiologie et métabolisme des cellules :**

Concernant la structure, la microscopie confocale à fluorescence couplée à l'hybridation *in situ* (FISH) (Moter and Göbel, 2000; Zwirgmaier, 2005) ou encore la microscopie à force atomique ont mis en évidence l'hétérogénéité des biofilms avec une distribution très variée des cellules au sein de la

matrice. L'existence de canaux et de pores remplis d'eau (Sutherland *et al.*, 2004) facilitant le transport des nutriments sont des facteurs susceptibles d'influencer la cinétique de réplication des phages.

Le taux de croissance des cellules, c'est-à-dire la capacité des bactéries à se multiplier dans leur environnement conditionne également l'efficacité d'infection des phages. Sillankorva *et al.* (Sillankorva *et al.*, 2004a) montrent au travers de leur étude que l'infection de cellules récoltées en phase de croissance exponentielle s'avère beaucoup plus efficace pour le planctonique que sur des cellules en phase stationnaire ou de déclin. Le taux de lyse cellulaire est meilleur, ainsi que le nombre de phages relargués. Des périodes de latences plus courtes sont observées. A titre d'exemple, selon l'état physiologique des cellules hôtes d'*E. coli*, de 12 à 200 nouveaux phages peuvent être relargués après infection d'une cellule par un phage T4 (Hadas *et al.*, 1997). En effet, les cellules situées dans les couches internes du biofilm présentent une croissance plus lente et une activité métabolique plus faible (Sternberg *et al.*, 1999) que les cellules se développant en surface. De tels changements s'expliquent principalement par la disponibilité en nutriments et en oxygène dans les différentes couches du biofilm. De Beer *et al.* (De Beer *et al.*, 1994) ont ainsi mesurés des concentrations en oxygène à l'intérieur d'un biofilm d'*E. coli* (épaisseur $\leq 100 \mu\text{m}$) jusqu'à trente fois inférieures aux concentrations mesurées en surface. De plus, des analyses transcriptomiques par « RNA seq » et « microarray » de *P. aeruginosa* révèlent des patterns d'expression géniques très différents entre des cellules planctoniques et des cellules du biofilm (Dötsch *et al.*, 2012), d'une part, et entre les cellules de différents stades de développement d'un même biofilm, d'autre part. Si ces différences sont à l'origine des disparités métaboliques entre les cellules d'un même biofilm, elles permettent de mieux comprendre le développement global du biofilm.

82

L'expression de gènes liés, à la synthèse des exopolymères, au quorum sensing, aux pilis et aux différentes formes de mobilités des bactéries (Wei and Ma, 2013) est impliqué dans l'établissement, la formation et le maintien du biofilm chez *P. aeruginosa* et *E. coli*. Les données de transcriptomiques obtenues par Hentzer *et al.* (Hentzer *et al.*, 2005) révèlent que l'expressions de 17 % des gènes de *P. aeruginosa* diffère entre des cellules du biofilm et des cellules planctoniques en phases exponentielle de croissance, et de seulement 3 % si l'on compare avec des cellules en phase stationnaire. Cette étude suggère premièrement que les cellules du biofilm sont majoritairement en phase stationnaire et deuxièmement que cet état physiologique favorise la résistance du biofilm aux agents antibactériens. En effet, parmi les gènes exprimés différenciellement, 20 % concernent des protéines de membranes ou des protéines impliquées dans le transport. De tels changements dans la composition et la perméabilité des membranes bactériennes modifient leur degré de tolérance aux biocides ainsi que le nombre de récepteurs phagiques exprimés en surface, ce qui peut ou non favoriser l'adsorption et donc la pénétration des phages (Corbin *et al.*, 2001; Hentzer *et al.*, 2005).

L'âge d'un biofilm est également un critère à prendre en compte puisqu'il influence la quantité de cellules mortes limitant la progression de l'infection par les phages. La matrice du biofilm, constituée

de divers exopolymères est, également un potentiel obstacle à la diffusion des phages au travers des différentes couches. A titre d'exemple, l'attaque par le phage E27 d'un biofilm de *P. aeruginosa* conduit à une infection partielle où les particules phagiques ne peuvent diffuser dans les couches les plus profondes (Doolittle *et al.*, 1996).

En résumé, l'état physiologique des cellules bactériennes varie en fonction de l'âge et de la structuration du biofilm et est susceptible d'impacter l'efficacité des phages. Chaque biofilm est différent. Il est donc nécessaire de prendre en compte la nature des micro-organismes installés, les types de polymères sécrétés (Flemming *et al.*, 2007), l'environnement et les conditions biologiques et biochimiques dans lesquelles il s'est développé.

3.2.2 Facteurs biochimiques :

- Expression par les phages d'enzymes dépolymérase :

A la fin des années 90, Hughes *et al* (Hughes *et al.*, 1998a) purifient des enzymes capables de dégrader les polysaccharides bactériens à partir de solutions de bactériophages. On parle de dépolymérase. Plusieurs travaux montrent que le génome de certains bactériophages codent pour diverses dépolymérase (Chan and Abedon, 2015; Pires *et al.*, 2016). Le mode d'action de ces enzymes permet de les classer en deux groupes : les hydrolases et les lyases (Pires *et al.*, 2016) divisés en plusieurs classes (**Tableau 11**). Selon Drulis-Kawa *et al.* (Drulis-Kawa *et al.*, 2015), les dépolymérase peuvent être actives sous deux formes : (i) intégrées à la particule phagique elle-même (protéines de structures) ou (ii) sous la forme de protéines solubles libérées lors de la lyse des cellules hôtes. Elles sont capables de dégrader les polymères associés à la surface cellulaire (polysaccharides de la capsule, antigènes par exemple) pour faciliter l'adsorption des phages, ou les EPS constitutifs de la matrice du biofilm (G. W. Hanlon *et al.*, 2001).

Tableau 11 : Principales classes d'enzymes exprimées chez les phages présentant une activité dépolymérase (Pires *et al.*, 2016)

Classes Enzymatique	Codes EC	Polymères cibles	Genre <i>Pseudomonas</i>
Hydrolases			
Sialidases	3.2.1.18 ou 3.2.1.129	Acide sialique	(Knirel <i>et al.</i> , 1984)(Cornelissen <i>et al.</i> , 2012)
Levanases	3.2.1.65	Levane	
Xylosidases	3.2.1.37	Xylane	
Dextranases	3.2.1.11	Dextrane	
Rhamnosidases	3.2.1.40	Rhamnogalacturonane	
Peptidases	3.4.19.9	Poly-γ-glutamate	
Lyases			
Hyaluronidases	4.2.2.1 ou 4.2.99.1	Hyaluronate	
Alginate lyases	4.2.2.3 ou 4.2.2.11	Alginate	(Alkawash <i>et al.</i> , 2006)(Glonti <i>et al.</i> , 2010)
Pectine lyases	4.2.2.10 ou 4.2.2.2	Galacturonate	(Cornelissen <i>et al.</i> , 2012, 2011)
Autres			
Lipases	3.1.1.3	Triacylgcérols	(Gupta <i>et al.</i> , 2004)

En gris, les activités pouvant avoir une action sur les bactéries du genre *Pseudomonas*.

Par conséquent, les phages possédant une activité dépolymérase peuvent accéder plus facilement aux récepteurs de l'hôte pour réaliser leur cycle infectieux et sont susceptibles d'être plus performant dans le contrôle des biofilms bactériens.

- **Environnement de croissance du biofilm :**

D'autres critères, tel que la composition du milieu de croissance, la force ionique le pH ou bien la température dans lequel les bactéries évoluent, peuvent impacter l'efficacité des phages.

Thompson et Yates (Thompson and Yates, 1999) analysent ainsi le comportement de trois phages (MS2, R17 et ϕ X174) dans un système dynamique « batch ». Ils en concluent que l'inactivation virale dans ces expériences dépend de (i) la présence d'une interface air-eau-solide dynamique (où le solide est une surface hydrophobe), (ii) la force ionique de la solution, (iii) la concentration de composés tensio-actifs dans la solution, et (iv) le type de virus utilisé. Sillankorva *et al* (Sillankorva *et al.*, 2004a) quant à eux, remarquent que l'infection par des phages de cellules de *P. fluorescens* cultivées en milieu glucose basic n'est pas possible, à l'inverse d'une infection réalisée sur des cellules ayant poussées dans du milieu NBM (Nutrient Both Medium). Un gel SDS-PAGE révèle l'absence de deux protéines membranaires chez les cellules cultivées dans le premier milieu (glucose), identifiées comme étant probablement des récepteurs aux phages.

84

- **Le pH du milieu :**

Le pH constitue un facteur de régulation important influençant la fixation, l'infection, la réplication intracellulaire et la multiplication des phages (Silva *et al.*, 2014). En général, les études sur l'activité lytique des bactériophages ont montré que les valeurs de pH inférieur à 5 et de plus de 10 sont moins efficaces, le pH optimal correspondant environ à un pH neutre de 6 à 8 (Jarrell *et al.*, 1997; Jepson and March, 2004; Nakai *et al.*, 1999). Un phage capable d'infecter une bactérie se fixe à un site récepteur sur la surface cellulaire. Ce processus fait intervenir divers acteurs (enzymatiques ou protéiques) pouvant être impactés par le pH. Au cours de leurs études Leverentz *et al.* (Leverentz *et al.*, 2004, 2003, 2001), montrent que le pH peut influencer ce processus de manière indirect. Dans leurs expériences d'élimination de *Listeria monocytogenes* se développant sur des tranches de pomme, ils suggèrent que la présence de certains composés acides pourrait à eux seul prévenir l'attachement et l'infection par les phages.

- **La température du milieu :**

Tout comme le pH, la température peut également interférer avec la fixation des phages, empêchant ainsi l'infection de l'hôte. Dans le cas des phages MS2, les propriétés des domaines

hydrophobiques sont modifiées lorsque la température atteint 72 °C , les charges électrostatiques des capsides deviennent moins négatives et les particules virales ne sont plus infectieuses (Brié *et al.*, 2016).

Une étude antérieure a montré que le « burst size » du phage PR4 d'*Escherichia coli* était d'environ 40 - 30 PFU, à 42 °C, et était inférieur à 3 PFU, à 20 °C (Sands and Auperin, 1977). Lorsque la température chute à 0°C, environ 80 % de l'infectiosité des phages a été perdue (Adams, 1955). Cependant, une étude de *Pseudomonas fluorescens* a indiqué qu'une température élevée (37 °C) inhibe l'infection par les phages à la fois des cellules planctoniques et des cellules de biofilm (Sillankorva *et al.*, 2004b, 2004a). Par conséquent, une température appropriée devrait être considérée pour améliorer l'efficacité du traitement par un phage donné.

- **Le flux hydraulique :**

La force hydrodynamique des flux fait partie des facteurs majeurs impactant la structure et le comportement des biofilms (Stoodley *et al.*, 1999; Tsai, 2005; Vieira *et al.*, 1993). En effet, les biofilms bactériens sont capables de se développer sur la plupart des surfaces humides de l'environnement et sont donc à même de rencontrer différents stress. Trois types d'écoulement sont décrits dans la littérature (**Tableau 12**) : laminaires, turbulents, et critiques. Ils sont caractérisés par le nombre de Reynolds (Re). Le nombre de Reynolds est une unité sans dimension combinant trois caractéristiques du fluide : la vitesse, la densité, la viscosité et la longueur caractéristique du tuyau.

85

Tableau 12 : Caractéristiques des différents régimes d'écoulement d'après (Busscher and van der Mei, 2006)

Régimes d'écoulement	Nombre de Reynolds	Caractéristiques
Laminaires	$Re < 2000$	Écoulement calme et régulier.
Critiques	$2000 < Re < 4000$	Écoulement instable entre le régime laminaire et turbulent.
Turbulents	$Re > 4000$	Écoulement sous forme de remous et tourbillons.

L'épaisseur et la densité d'un biofilm conditionnent les limites de diffusion au travers des différentes couches et par conséquent influencent le métabolisme bactérien. Pereira *et al* (Pereira *et al.*, 2002), ont ainsi confirmé lors de leurs analyses par CLSM, qu'un biofilm bactérien âgé de 24 h au contact de flux turbulents ($v = 0.51 \text{ m.s}^{-1}$; $Re = 5500$) est relativement moins épais ($17 \pm 3 \mu\text{m}$ contre $21 \pm 7 \mu\text{m}$) mais plus dense qu'un biofilm se développant en présence de flux laminaires ($v = 0.21 \text{ m.s}^{-1}$; $Re = 2000$). L'accroissement de la densité cellulaire est accompagné d'une augmentation de la production d'exopolymères par unité de surface, renforçant l'adhésion entre les cellules et participant à une meilleure cohésion de la matrice extracellulaire. Kirisits *et al.* (Kirisits *et al.*, 2007) ont montré que dans des conditions de flux ($Re = 3000$) le système de communication cellulaire relevant du « quorum sensing » n'est pas pleinement opérationnel ce qui peut expliquer les différences structurelles et morphologiques observées.

En résumé, la complexité des interactions entre les phages et les biofilms rend difficile l'interprétation et/ou la comparaison des études sur ce sujet entre elles. Différentes variables doivent être prises en compte : protocoles et systèmes utilisés, virus, nature et environnement physico-chimique du biofilm. La morphologie des virus et leurs propriétés de surface sont également des paramètres intéressants pour discuter des résultats mais nécessitent une caractérisation complète des phages utilisés.

Chapitre 3 : LES PHAGES COMME ALTERNATIVE AUX BIOCIDES ET AUX ANTIBIOTIQUES ?

Tableau 13 : Quelques études rapportant l'utilisation des phages pour éliminer les biofilms implantés sur différentes surfaces inertes

	Type de biofilm traité	Type de surface	Phages testés	Dose infectieuse	Conditions d'application	Facteurs d'influence étudiés	Résultats observés	Références
Agro. ¹	<i>L. monocystogenes</i> (18 heures)	acier inoxydable (coupons)	Phages ATCC 23074-B1	10 ¹⁰ PFU ml ⁻¹	6h / 30°C/ 25rpm	Traitement chimique des phages	Phages traités sont plus efficaces Réduction de 3 logs des cellules viables	(Hibma <i>et al.</i> , 1997)
	<i>L. monocystogene</i> (plusieurs souches) (4 jours)	acier inoxydable (trancheuse industrielle)	LISTEX P100 approuvé par FDA	>10 ⁸ PFU/cm ²	24h /20°C statique	Température Stabilité des phages à 4°C	Inactivation de <i>L. monocystogene</i> sur des surfaces en contact avec les aliments	(Iacumin <i>et al.</i> , 2016) (Smith 2016)
	<i>P.fluorescens</i> (24h à 168h)	acier inoxydable (coupons 1*1cm)	φIBB-PF7A	10 ⁷ PFU ml ⁻¹	2h et 4h Statique/ dynamique	Age du biofilm	Après 4h, réduction de 3 à 5 logs des cellules viables, en dynamique et statique	(Sillankorva <i>et al.</i> , 2008)
	<i>Salmonella spp.</i> biofilm 72h	-Coupons en Acier inoxydables (type 302) et en caoutchouc (2* 2 cm) - MBEC™ (Innovotech Inc.)	BP1370 BP1969	10 ⁸ PFU.ml ⁻¹	2h 30°C et 10°C	Température et type de surfaces	Réduction entre 2 et 3,6 logs UFC/cm ² selon la surface	(Sadekuzzaman <i>et al.</i> , 2018)
	<i>E. coli</i> 0157:H7 (28 souches) 72h 25°C en aérobie	-Coupons en Acier inoxydables (1*4 cm)	BECP2 BECP6 (Seongnam, Corée)	10 ⁸ PFU.ml ⁻¹	30 min à 25°C	Type de surfaces	Réduction de 2 logs à 6 logs UFC/coupon	(Lee and Park, 2015)
Méd. ¹	<i>S. epidermis</i>	Surfaces internes et externes des cathéters	Phages 456	1.10 ¹⁰ à 2,2.10 ¹⁰ PFU.ml ⁻¹	1h/ 37°C	Pré traitement des surfaces : hydrogel/sérum	Réduction du nombre de cellules viables et du nombre de cellules adhérent à la surface	(Curtin <i>et al.</i> , 2006)
	<i>P. aeruginosa</i> (plusieurs souches) (2h)	Surface luminale des cathéters (Silicone)	Phages M4 Cocktail de phages	1,1 à 2,2 10 ¹⁰ PFU ml ⁻¹ pour M4 et 7.10 ⁹ PFU ml ⁻¹ pour le cocktail	2h Débit : 1mL.min ⁻¹	1) Prévention 2) Eradication 3) Les deux	Le pré-traitement réduit la formation du biofilm. Cocktail de phages : spectre d'hôtes plus large, moins de résistance bactérienne	(Fu <i>et al.</i> , 2010)

Chapitre 3 : LES PHAGES COMME ALTERNATIVE AUX BIOCIDES ET AUX ANTIBIOTIQUES ?

	<i>Proteus mirabilis</i> (plusieurs souches) préventif	Surface luminale des cathéters (coupons Silicone)	vB_PmiP_5460 vB_PmiM_5461	10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} PFU.mL ⁻¹	Adsorption des phages durant une nuit à température ambiante	Capacité des phages à s'adsorber au silicone. Efficacité des phages en conditions dynamiques	Efficacité du cocktail de phages adsorbés visible jusqu'à 7 jours après avec 1 log en moins de cellules viables à la surface des cathéters	(Melo <i>et al.</i> , 2016)
Env. ¹	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 39018 curatif : 37°C 72h	Microplaques	Phages lytiques isolés des eaux usées municipale (Columbia, MO)	Phages : 10^1 à 10^7 PFU.mL ⁻¹ Chlore : 21 ou 210mg/L Phages + Chlore	Traitement pendant 70h ou 72h à température ambiante	1) Préventif : Développement du biofilm en présence des phages 2) Curatif : Sur le biofilm de 72h	Phages seuls : 1) Inhibition de 45 à 73% de la croissance du biofilm. 2) Elimination de 52% du biofilm. Action combinée : 1) 92 à 94% d'inhibition 2) 60 à 88 % d'élimination	(Zhang and Hu, 2013)
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 39018 1) 1 dose de $2,3.10^7$ CFU.mL ⁻¹ 2) 1 dose de $2,3.10^7$ CFU.mL ⁻¹ + 85jours	Types de Biofiltres: - GAC - Anthracite	Mix de phages <i>P. aeruginosa</i> isolé des eaux usées	1) Phages : $2,7.10^7$ PFU.mL ⁻¹ 2) Phages : $5,1.10^6$ PFU.mL ⁻¹	1) 45min 2) 1h Débit : 1,6 mL.min ⁻¹	1) Action/ biofilm mono-espèce 2) Action / biofilm multi espèces	1) réduction de 50% (anthracite) à 99,9% (GAC) de <i>P. aeruginosa</i> en sortie du filtre. 2) réduction de 56% (anthracite) à 70% (GAC) de <i>P. aeruginosa</i> en sortie du filtre.	(Zhang <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Membrane de filtration par osmose inverse	P1 à P7 isolés d'une station de trait. d'eaux usées (Kaust, SA)	1) Action des Phages : MOI 10 2) Action combinée : Phages + 0,1M Acide citrique	1) Durée : 10h Variation du pH/température et salinité 2) Durée : 9h	Efficacité des phages sur le biofilm en fonction 1) pH, température, salinité ou 2) combiné à l'acide citrique.	1) pas d'effet des gammes de températures et pH testés, sur l'efficacité des phages. 2) Réduction du biofilm de 1,1log.	(Scarascia <i>et al.</i> , 2018)
Exp. ¹	<i>P. aeruginosa</i> NCIMB 10548	Disques de 12mm de diamètre en poly(méthyl)méthacrylate (PMMA)	Phage F116	Ratios phages/ cellules testés : 100:1 et 1000:1	24h /37°C	Age du biofilm et concentration des phages	- ratio 100 :1 Réduction de 1 log des cellules viables	(G. W. Hanlon <i>et al.</i> 2001)

Chapitre 3 : LES PHAGES COMME ALTERNATIVE AUX BIOCIDES ET AUX ANTIBIOTIQUES ?

(5/ 10/ 15/20 jours)							- ratio 1000 :1 Réduction de 2 logs des cellules viables	
<i>P. fluorescens</i> ATCC 27663 (5jours)	Coupons en Inox de 2cm ²	Phage φS1	9.10 ⁹ PFU ml ⁻¹	0-200 min 4/26/37°C 130rpm	Température de croissance du biofilm et d'infection		Biomasse du biofilm réduite de 85% à la température optimale de 26°C	(Sillankorva <i>et al.</i> , 2004b)
<i>S. epidermis</i> plusieurs souches (24h)	Microplaques 96 puits	Phages K	2.10 ⁸ PFU ml ⁻¹	24h/37°C 130rpm	Différentes souches		Réduction significative de la DO _{570nm} pour plusieurs souches	(Cerca <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1+ ATCC10145 (24h)	Microplaques 96 puits	phiIBB-PAA2 phiIBB-PAP21 phages isolés d'effluents hospitaliers	MOI 1	2/6/24h 37°C 120rpm	Durée du traitement Couples phage/souche		- Diminution du nombre de cellules viable dès 2h de traitement. - Apparition de résistances pour le couple PAO1/ PAP21 après 24h	(Pires <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. aeruginosa</i> PAO1+ isolats cliniques	Microplaques (condition statique 1) Robbins Device Inox (condition dynamique 2)	Cocktail de Phages : DL52/60/68 DL54/62/64 isolés des eaux usées et eaux de crue	1) MOI 1 ou 10 2) émulsion du cocktail MOI 0,1	1) Traitement de 2h/4h/24h/48h à 37°C 2) Traitement de 24h/48h à 37°C	Conditions statiques (1) ou dynamiques (2)		1) Biomasse réduite de 95% après 4h, puis est supérieure à la biomasse du départ après 48h 2) Réduction de 4logs des cellules viables en 48h	(Alves <i>et al.</i> , 2015)
<i>P. aeruginosa</i> (24h /48h/ 72h)	Lame de verre	JHP phages	MOI 0,6	6h/ 24h	Durée du traitement Surface Age du biofilm		Réduction de la biomasse de 2 à 4,5 logs	(Shafique <i>et al.</i> , 2017)
<i>P. aeruginosa</i> Pa10 (24h)	Microplaques 96 puits	MAG1 MAG4	10 ⁶ à 10 ⁹ PFU ml ⁻¹	4h /8h/24h	Action séparée ou en cocktail Durée du traitement Souche clinique		Réduction de la biomasse maximale après 8h de traitement. Apparition de résistance après 24h	(Kwiatek <i>et al.</i> , 2017)

4. L'utilisation des phages et les risques environnementaux associés :

L'augmentation des résistances bactériennes aux agents antimicrobiens favorise le développement de contaminations sous la forme de biofilm dans de divers environnements. Leur capacité à héberger des bactéries potentiellement pathogènes, nécessite de mettre en place des actions préventives mais également curatives, afin d'éviter les risques de disséminations. Face au manque d'efficacité des traitements existants pour éliminer le biofilm, l'utilisation de phages peut constituer une stratégie complémentaire, bien qu'il soit important de prendre en compte les risques inhérents et d'adapter les traitements en conséquence.

4.1 L'impact des phages sur la communauté bactérienne naturelle :

L'une des limites concerne le développement de résistances/sensibilités bactériennes. Les bactériophages lytiques se multiplient et s'assemblent dans l'hôte, l'ADN chromosomique bactérien peut alors être empaqueté par inadvertance dans la capside virale avec l'ADN viral. Cette erreur conduira à une transduction généralisée et peut déplacer l'ADN chromosomique d'un hôte bactérien à un autre au sein d'une communauté bactérienne. Au cours de ce mouvement, les phages peuvent ainsi transférer des gènes codant pour des toxines ou des facteurs de virulence, et modifier de manière critique le phénotype bactérien. Il a été démontré, par exemple, que chez *P. aeruginosa*, les bactériocines, appelées pyocines de type R et F, qui sont synthétisées pour se défendre dans la communauté bactérienne présentent des similarités de séquences élevées et des parallèles structuraux frappants avec la queue des phages, révélant une connexion évolutive entre ces dispositifs moléculaires complexes (Nakayama *et al.*, 2000). Muniesca *et al* (Muniesca *et al.*, 2000), ont mis en évidence la conversion de souches d'*E. Coli* non pathogènes en souches entéro-hémorragiques par transfert de gènes codant pour la toxine Shiga (Stx I et II). Plus tard, Chen and Norvick (Chen and Novick, 2009) confirment le transfert par les phages d'îlots de pathogénicité entre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*, dans le lait cru.

D'autre part, l'utilisation de phages tempérés favorise la transduction spécialisée. En effet, lors du cycle lysogénique réalisé par le phage dans son hôte, le génome viral s'insère sous la forme d'un prophage dans le chromosome bactérien. Stress et environnement propice, sont ensuite susceptibles de provoquer l'excision du prophage ainsi que des portions voisines du génome bactérien, pouvant contenir des gènes de résistance. L'insertion de ce prophage dans un nouvel hôte sera vecteur de nouvelles séquences pouvant être avantageuses pour la bactérie vis-à-vis de ces envahisseurs. Toutefois, ce processus a d'ores et déjà été détourné, par exemple, pour introduire chez l'hôte, par lysogénisation, des gènes conférant une sensibilité aux antimicrobiens (Edgar *et al.*, 2012) ou pour inhiber les caractères de virulence (Chung *et al.*, 2012).

4.2 Une utilisation raisonnée :

Généralement, l'utilisation de phages nouvellement isolés nécessite d'évaluer leur gamme d'hôtes afin de sélectionner les isolats ayant une grande efficacité contre le pathogène d'intérêt (Pirnay *et al.*, 2015). Cependant, ce criblage est le plus souvent effectué en utilisant un panel de souches de référence de laboratoire, plutôt qu'un grand nombre de bactéries provenant de l'environnement local dans lequel les phages seront appliqués. Par conséquent, un moyen de réduire les effets possibles suite à l'application de phages au niveau de la communauté, consiste à effectuer des analyses à grande échelle sur un panel d'isolats biologiquement significatifs (c.-à-d. les souches bactériennes et les espèces avec lesquelles les phages vont interagir une fois appliqués). Dans cette démarche, une étude de Zhang Y. *et al.*, (Zhang *et al.*, 2013) porte sur l'efficacité des phages pour l'élimination du biofilm se développant dans les systèmes de traitement des eaux usées, au niveau des biofiltres. Il a été montré qu'il était possible d'agir significativement sur les bactéries pathogènes cibles, tout en minimisant l'impact sur les organismes également présents dans les filtres, et bénéfiques pour l'amélioration de la qualité des effluents.

4.3 Application et devenir des phages dans l'environnement :

La persistance d'un phage seul dans l'environnement reste globalement floue, bien qu'à l'inverse, il puisse se reproduire indéfiniment en présence de son hôte. Cette réplication continue rend les calculs de dosage difficile. Trouver le bon équilibre entre un nombre suffisant de phages pour être efficace et ne pas introduire des quantités excessives dans l'environnement, fait partie des préoccupations (Meaden and Koskella, 2013). Dans l'étude de Hornstra *et al.*, (Hornstra *et al.*, 2011), une concentration en dioxyde de chlore (ClO_2) de 0,02mg/L était suffisante pour inactiver les phages MS2 résiduels. Aucun outil n'étant actuellement disponible pour éliminer sélectivement et durablement ces virus de l'environnement, l'adaptation du traitement, en fonction de la densité bactérienne, peut être une alternative pour un résultat optimal (Payne et Jansen, 2003).

SYNTHESE ET POSITIONNEMENT DU SUJET :

Les bactériophages sont des virus de bactéries présents dans tous les écosystèmes. Ils agissent en tant que régulateurs des populations bactériennes en ciblant une espèce voire une souche donnée. La diversité importante des bactériophages permet d'envisager l'isolement à partir d'échantillons environnementaux, de phages infectieux pour chaque bactérie pathogène que l'on souhaite éliminer. Si, les bactériophages sont utilisés depuis la guerre froide en thérapie dans les pays de l'Est, dans les pays occidentaux, l'antibiothérapie s'est développée au détriment de la phagothérapie. Néanmoins, face à l'augmentation des résistances bactériennes dans la société, la nécessité de trouver des alternatives bactéricides a permis de mettre en évidence au travers des recherches le potentiel des phages. En médecine, l'intérêt pour les phages ne cesse de progresser. Nombreuses sont les publications traitant de ce sujet et pouvant être déclinées à l'infini selon les phages sélectionner et la souche bactérienne ciblée. Ces travaux ont permis de mettre en place des essais cliniques permettant de définir plus concrètement les bases d'un cadre réglementaire pour cette thérapie. Parallèlement, l'utilisation des bactériophages est envisagée dans l'environnement agroalimentaire et industriel pour limiter le risque de prolifération de bactéries pathogènes tout en limitant le recours aux antibiotiques et aux désinfectants.

Les réseaux d'eau selon leur configuration et leur exploitation sont vulnérables à la contamination par des bactéries pathogènes opportunistes (Momba *et al.*, 2000). Les traitements préventifs ou curatifs ne permettent pas toujours d'éliminer les contaminations installées et la répétition de traitements sélectionne les souches les plus résistantes et engendre des effets délétères sur les matériaux (Bédard *et al.*, 2016). Il n'est pas envisageable à l'heure actuelle d'injecter des bactériophages dans les réseaux d'eau destinée à la consommation humaine ou dans les réseaux d'eau thermale. En effet les dispositions réglementaires actuelles permettant d'assurer la qualité sanitaire de l'eau ne le permettraient pas et par ailleurs la probabilité de rencontre entre un bactériophage présent dans un flux d'eau et sa cible présente dans un biofilm statique serait très faible. En revanche, il pourrait être envisagé de traiter des surfaces, des éléments de robinetterie sanitaire ou des postes de soin que l'on sait contaminés par une espèce donnée, lorsque les traitements chimiques ou thermiques ne sont pas appropriés.

L'application des bactériophages comme agents antibactériens pour lutter contre l'implantation et le développement des biofilms a déjà fait l'objet de divers essais *in vitro* et les résultats mettent en évidence des interactions complexes qui dépendent fortement du système virus/hôte/environnement étudié (Ly-Chatain, 2014). Dans le cas de *P. aeruginosa*, la majorité des études traitant de l'efficacité des phages sur le biofilm, concernent des isolats d'origines cliniques (Alves *et al.*, 2015 ; Issa *et al.*, 2019 ; Kwiatek *et al.*, 2017 ; Lehman *et al.*, 2015 ; Morales *et al.*, 2017 ; Shafique *et al.*, 2017) et très peu de travaux mettent en évidence des phages pouvant infecter des isolats provenant d'environnements plus spécifiques tels que les réseaux d'eau potable et thermal (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012), malgré une grande diversité de phages infectant *P. aeruginosa* (Ceyssens and Lavigne, 2010 ; Pires *et al.*, 2015).

Parmi ces travaux l'étude de Garbe *et al.* (Garbe *et al.*, 2010) caractérisent le phage JG024 capable d'infecter 45 % des 50 isolats de l'environnement testés, néanmoins l'étude ne porte que sur son efficacité en milieu liquide. Zhang et Hu (Zhang and Hu, 2013) se sont quant à eux intéressés au potentiel des phages pour éliminer le biofilm de *P. aeruginosa* responsable des contaminations dans les réseaux d'eau et environnements industriels. Afin de prendre en compte l'existence des traitements existants, les auteurs envisagent l'utilisation des phages en synergie avec le chlore. Toutefois, les essais sont réalisés uniquement sur le biofilm de la souche référence PAO1 cultivée en milieu LB.

D'un point de vue méthodologie, la démarche expérimentale de ces études repose sur des modèles de biofilm *in vitro* développés en plaque 24 ou 96 puits et donc peu représentatifs des surfaces sur lesquelles sont retrouvées les contaminations en environnement humides (Garbe *et al.*, 2010; Zhang and Hu, 2013). Les résultats concernant l'efficacité des traitements par les phages sur le biofilm des souches (cliniques ou environnementales) sont généralement obtenus par dénombrement des cellules cultivables (Garbe *et al.*, 2010), par cristal violet pour estimer la biomasse du biofilm (Issa *et al.*, 2019; Kwiatak *et al.*, 2017; Zhang and Hu, 2013) par densité optique pour la population totale (Zhang and Hu, 2013), par estimation de l'activité métabolique (Kwiatak *et al.*, 2017) et par microscopie pour visualiser la structure (Zhang and Hu, 2013), mais aucune de ces méthodes ne permet à la fois de cibler spécifiquement une espèce bactérienne et de renseigner sur l'état métabolique des cellules du biofilm.

Pour explorer le potentiel des phages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *P. aeruginosa* nous avons fait le choix de travailler sur un panel de souches de *P. aeruginosa* comportant la souche de référence PAO1 et des isolats provenant de différents réseaux d'eau. Le panel de bactériophages se compose, quant à lui, de phages déjà étudiés dans la littérature ainsi que de phages isolés au début de cette étude.

La démarche expérimentale de ce travail de thèse (**Figure 26**), a été scindée en trois grandes phases successives permettant de progresser vers le modèle d'infection complexe que représente un biofilm :

- Une première étape a consisté à obtenir le panel de phage puis à établir leur gamme d'hôtes. Il a été choisi d'utiliser la méthode des spots test sur boîte de pétri, une méthode simple permettant de réaliser un screening de l'infectiosité des phages sur les différents isolats, par visualisation des plages de lyse. Sur la base de ces résultats, et des données déjà publiées, trois phages ont été sélectionnés.

- La seconde étape a permis de caractériser les trois phages au travers d'observations réalisées par microscopie électronique à transmission, et de déterminer précisément leurs paramètres de lyse (phase de latence, adsorption, burst size). L'efficacité de ces phages vis-à-vis de quatre isolats de *P. aeruginosa* sélectionnés auparavant pour leur sensibilité, a été déterminée en milieu liquide. Les cultures planctoniques ont été réalisées dans des conditions expérimentales standardisées, dans un milieu minimum composé d'eau minérale naturelle additionnée de glucose et d'acides aminés pour se

rapprocher des conditions naturelles d'un réseau d'eau. Trois doses infectieuses ont été comparées. Les résultats ont été obtenus en suivant la densité optique des populations bactériennes permettant de mettre en évidence différents pattern d'infectiosité, dépendants en partie des isolats bactériens. Sur la base de ces différents patterns, deux bactériophages ainsi que deux isolats bactériens ont été sélectionnés.

- La dernière étape a donné lieu à des tests d'activité lytique des deux phages sélectionnés, sur des biofilms mono-species de la souche de référence PAO1 et d'un isolat provenant d'un réseau d'eau thermal. Ces essais ont été conduits en milieu minimum permettant au biofilm de se développer durant 24 h à la surface de coupons en INOX, un matériau susceptible d'être retrouvé dans les établissements thermaux mais également très présent en industrie agroalimentaire, Le traitement par les phages a ensuite été appliqué durant 14 h. Afin d'évaluer l'efficacité du traitement pour chaque couple, un suivi des cellules viables et cultivables a été opéré par dénombrement sur milieu nutritif mais également par une méthode sélective d'amplification de l'ADN des cellules métaboliquement actives, la PCR quantitative viable.

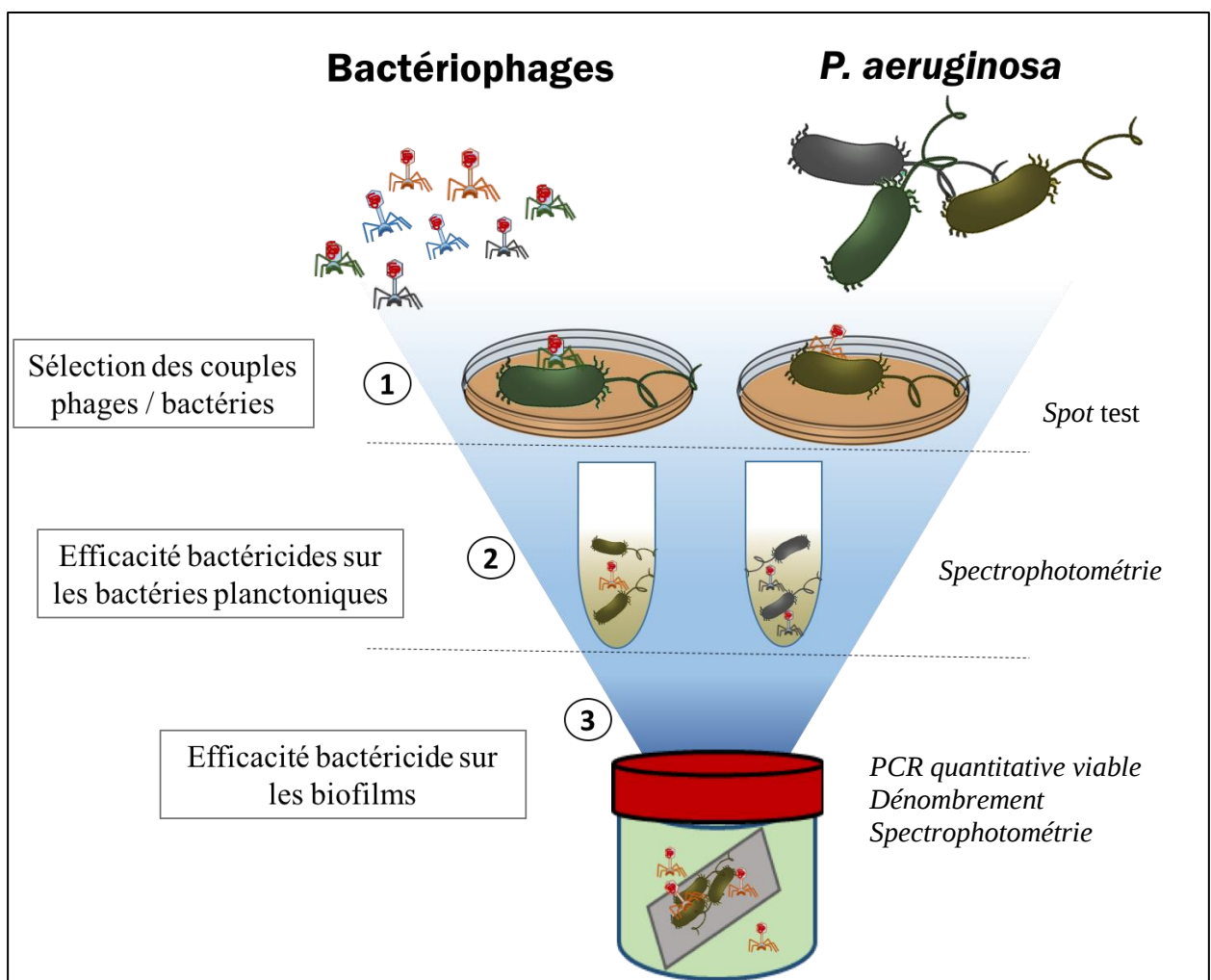


Figure 26 : Démarche de la thèse

SOMMAIRE Partie II

PARTIE II : SELECTION DES COUPLES PHAGES/BACTERIES 96

II.1 Introduction : 96

II.2 Matériel et méthodes : 97

1. Matériel biologique:..... 97
2. Constitution d'un panel de phages : 97
3. Mise au point d'un inoculum standardisé en milieu LB : 100
4. Amplification et suivi du titre des phages : 100
 - 4.1 Principe général de l'amplification / extraction : 100
 - 4.2 Principe général de titration : 100
5. La méthode « spot test » pour sélectionner les phages infectieux : 101

II.3 Résultats : 102

1. Amplification, extraction et suivi dans le temps des suspensions de phages en milieu LB:..... 102
3. Résultats des essais en spot test : 104
 - 3.1 Premier screening : détermination de la gamme d'hôtes de chacun des phages :..... 104
 - 3.2 Deuxième screening : sélection des phages infectieux les plus efficaces : 107

II.4 Discussion : 111

Partie II : Sélection des couples phages/bactéries

II.1 Introduction :

L'objectif dans cette première partie expérimentale, était d'établir au laboratoire une collection de phages susceptibles d'être infectieux vis-à-vis de différentes souches de *P. aeruginosa* issues d'environnements considérés comme étant « à risque ».

Un panel de neuf souches de *P. aeruginosa*, précédemment caractérisées pour leur capacité à former du biofilm sur divers matériaux (Pessereau *et al*, 2015), a été retenu pour cette étude. Ce panel comprend la souche de référence PAO1, des souches d'origine environnementale isolées d'eau potable et d'eau thermique et une souche clinique.

L'utilisation de phages lytiques ayant une spécificité d'action vis-à-vis de *P. aeruginosa* étant un des prérequis pour pérenniser la suite de cette étude, une collaboration avec l'Institut des Sciences Evolutive de Montpellier (ISEM) a permis l'obtention de sept phages lytiques appartenant à la famille des *Caudovirales* et dont certains aspects moléculaires et phylétiques ont déjà fait l'objet de publications. En parallèle, l'isolement de phages a été entrepris à partir d'échantillons d'eau de surface et d'eaux usées.

Dans un premier temps, tous les phages ont donc été testés en termes de virulence sur chacune des souches. La technique des spots test a été utilisée pour réaliser ces essais, sur la base des protocoles fournis par l'Institut des Sciences Evolutives de Montpellier. Ce premier « screening » a permis d'une part de mettre en évidence la sensibilité des souches vis à vis de chacun des virus, mais également de déterminer pour chacun de ces bactériophages, une gamme d'hôtes. Un second « screening » a ensuite été entrepris afin de déterminer parmi les phages infectieux, lesquels étaient les plus efficaces.

Cette première partie a permis de sélectionner des couples « phages/souche de *P. aeruginosa* » pouvant être utilisés pour la suite de l'étude comme modèles pour évaluer l'impact de certains paramètres sur l'interaction virus/bactéries dans différentes conditions (planctonique ou biofilm).

II.2 Matériel et méthodes :

1. Matériel biologique:

Un panel de neuf souches de *P. aeruginosa* a été utilisé dans cette étude (**Tableau 14**). Ce panel inclut la souche de référence PAO1, six souches environnementales isolées de réseaux d'eau potable ou d'eau thermale ainsi que deux souches isogéniques d'origine clinique (ST395P) et d'origine environnementale (ST395E) isolées dans la même unité de soin intensif (USI) de l'hôpital de Besançon. Ces souches, la souche de référence PAO1 et la souche environnementale ST111 ont été fournies par le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Macromoléculaires de Marseille (UMR CNRS 7255). Les souches environnementales D1 et D2 ont été fournies par le Laboratoire d'Hydrologie-Environnement de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de Bordeaux. Les souches E1 et E6 proviennent d'un même établissement thermal et ont été isolées respectivement d'eau potable et d'eau thermale. La souche MLM provient du siphon d'un évier d'une salle de consultation à l'hôpital. Ces prélèvements ont été analysés selon la norme NF EN ISO 16266. Les souches ont été isolées successivement sur milieu sélectif cétrimide et milieu non-sélectif PCA avant d'être conservées sur cryobilles à -80°C .

Le typage des souches a été réalisé lors de la thèse de Coline Pessereau, par la méthode du Multiple Locus VNTR Analysis (MLVA) basée sur l'analyse des 16 VNTRs suivant : ms77, ms127, ms142, ms172, ms211, ms212, ms213, ms214, ms215, ms216, ms217, ms222, ms223, ms61, ms207 et ms209 (CEERAM - La Chapelle sur Erdre, Nantes). Les codes numériques générés pour chacune des souches retenues ont été analysés à l'aide de la banque de données publiques MLVA (Grissa *et al.*, 2008).

97

Tableau 14 : Panel des souches *P. aeruginosa* de l'étude

Noms	Origine	Localisation des prélèvements	Références
MLM	H_1	EDCH - Siphon évier salle de consultations	(Pessereau, 2015)
ST395E	H_3	EDCH - Siphon USI	(Pessereau, 2015)
ST395P	H_3	Souche clinique - patient en USI sous ventilation assistée	(Lucchetti-Miganeh <i>et al.</i> , 2014)
D1	ThI_1	Eau Thermale	
D2	ThI_1	Eau Thermale	
E1	ThI_2	Eau Thermale	(Pessereau, 2015)
E6	ThI_2	EDCH - Réseau de rinçage	
ST111	H_2	EDCH	
PAO1	-	Souche de référence isolée en 1954	(Holloway, 1955)

EDHC : Eau destinée consommation humaine ; H : Hôpital ; Th : thermes

2. Constitution d'un panel de phages :

L'élaboration d'une collection de phages a été entreprise dès le début du sujet. Sept phages nous ont été fournis par l'ISEM (UMR 5554) : parmi eux, les trois genres de la famille des *Caudovirales* y sont représentés : LKD16, LUZ19, LUZ7, PEV2 pour les *Podoviridae* ; 14.1, EL pour les *Myoviridae* et MP22 pour les *Siphoviridae* (Ceyssens *et al.* 2006, 2009, 2010)(Betts *et al.*, 2013). Leurs caractérisations ont confirmés leur génome en ADN double brin. Tous ont été isolés à partir des souches

de *Pseudomonas aeruginosa* référentes PAO1 ou PA14. Pour certains les récepteurs de l'hôte utilisés pour l'infection ont été identifiés. Toutes les informations concernant ces phages sont disponibles à cette adresse : <http://www.ebi.ac.uk/genomes/phage.html> et regroupées dans le **Tableau 15**.

En complément, différents prélèvements ont été réalisés dans le but d'isoler des phages de l'environnement. Certains échantillons sont issus d'eaux usées sur le site du CSTB (Nantes), d'autres de cours d'eaux, rivières ou encore de récupérateurs d'eaux de pluies et de réserves d'eaux (**Figure 27**). Les échantillons ont été préalablement décantés puis centrifugés à 5 000 rpm durant 10 min. Le surnageant a ensuite été filtré, en deux étapes pour les prélèvements les plus troubles, ou directement pour les autres, à l'aide de filtres seringues de 0,20 µm. Les filtrats peuvent ensuite être conservés à -4°C ou être directement utilisés pour ensuite réaliser la méthode de la double couche (Adams, 1959).

Un volume de 1ml provenant de chaque filtrat est mélangé avec 100 µL d'une culture de *P. aeruginosa* en phase exponentielle dans du milieu LB et 5 mL d'agar 0,7 % à 56°C, le mélange est rapidement homogénéisé puis coulé sur boîte de pétrie contenant déjà une couche de milieu non-sélectif PCA gélosé. Après séchage, les boîtes sont placées à 30°C la nuit.

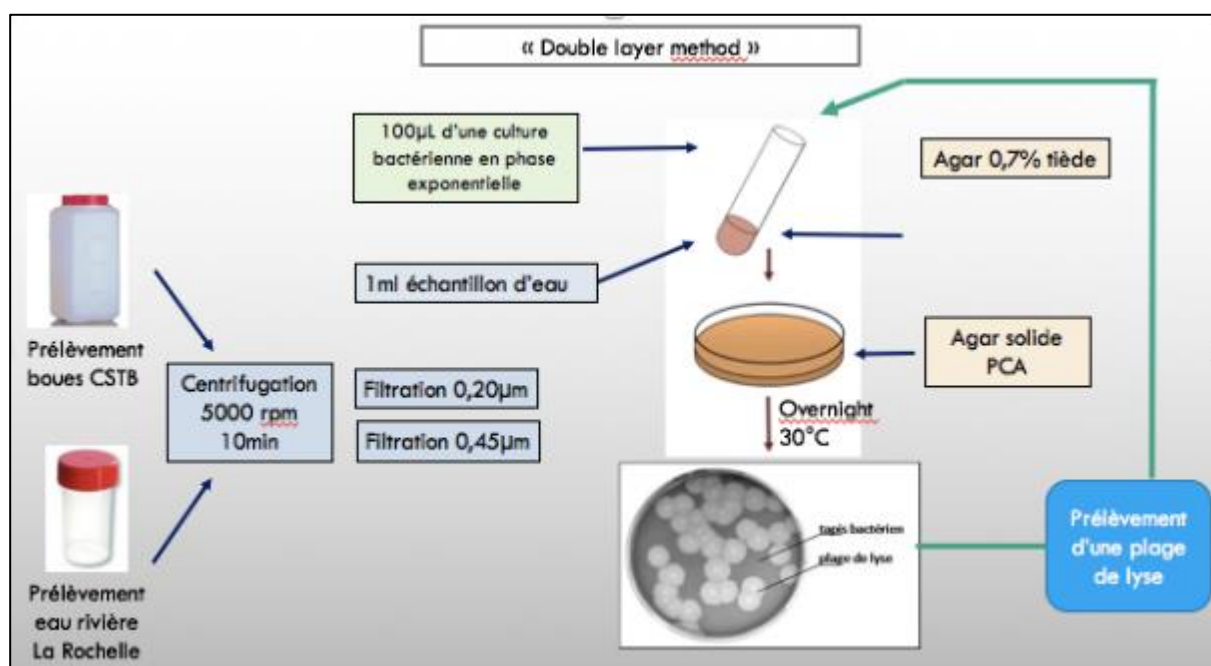


Figure 27 : Procédure de préparation des échantillons et méthode en double couche pour isoler des phages à partir de prélèvements d'eau

Le lendemain, la présence de plages de lyse apparaissant comme des zones plus claires a permis de mettre en évidence la présence de particules virales. A ce stade, il est possible que les plages de lyse sur une même boîte de pétri, ne correspondent pas toutes au même virus. Pour isoler un unique phage, un prélèvement a été fait sur une plage de lyse avant d'être mis à nouveau au contact de 100 µL d'une culture de *P. aeruginosa* et 5 mL d'agar 0,7 % à 56°C, puis coulé sur une nouvelle gélose nutritive. Après apparition des plages de lyse, un nouveau prélèvement a été refait. L'opération a ainsi été réalisée trois fois afin d'isoler et propager un unique virus.

Tableau 15 : Caractéristiques génétiques, moléculaires et morphologiques des phages de l'étude

Caudovirales								
NOM	EL	LKD16	PEV2	LUZ7	LUZ19	14.1	MP22	B1
GENRE	Myoviridae	Podoviridae	Podoviridae	Podoviridae	Podoviridae	Myoviridae	Siphoviridae	
GENOME	ADN double brin							
RECEPTEUR		type IV pili	inconnu	AlgC (LPS)	type IV pili	LPS	type IV pili	
HOTE	PA14			PAO1			PAO1/ PA14	
SEQUENCE	oui			oui			oui	
TAILLE	211215pb	43200pb	72697pb	74901pb	43548pb	66235pb	36409pb	
Topologie	circulaire	linéaire	linéaire	linéaire	linéaire	linéaire	linéaire	
Mise à jour	24-nov-05	(18-Sept-06) 12-Oct-06	20-juin-16	(22-Sep-09) 24-Jan-11	(27-Nov-07) 15-Nov-10	(14 -dec-08) 24 -janv -11	(31 aout 07) 11-sept -07	
Protéines d'intérêts		gp37:putative C-terminus lysozyme motif internal virion protein gp45: putative lysozyme		ORF59:Putative role in phage attachment	gp44: holin gp45:endolysin gp46: RZ protein gp46.1:RZ1 protein		orf13 : host nuclease inhibitor protein	
Fichier fasta disponible								

3. Mise au point d'un inoculum standardisé en milieu LB :

Dans un souci de répétabilité la culture des souches a été standardisée. Toutes les souches du panel ont été conservées sur cryobilles à -80°C . Un milieu sélectif gélosé cétrimide est ensemencé avec une cryobille et incubé 48 h à 30°C . Une colonie développée sur ce milieu a ensuite été utilisée pour ensemencer un milieu non sélectif PCA. A l'issue d'une incubation de 24 h à 30°C , une nouvelle colonie a, à son tour, été utilisée pour ensemencer 30 mL de milieu LB et incubé durant toute une nuit à 30°C sous agitation transversale (120 rpm). La sous-culture ainsi obtenue constituait l'inoculum standardisé et a été utilisée pour ensemencer un milieu LB frais (**Figure 28**).

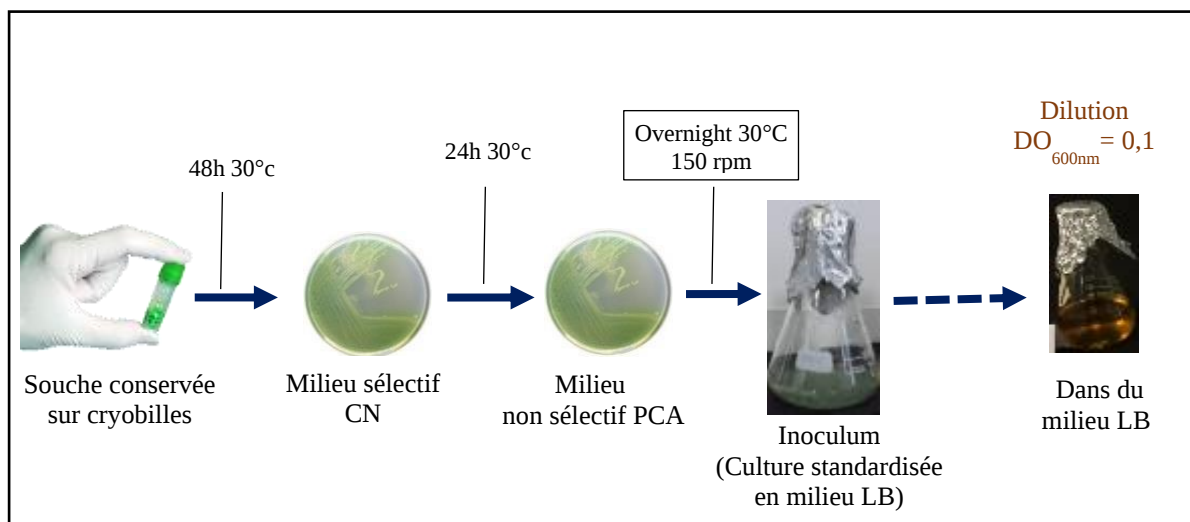


Figure 28 : Préparation de l'inoculum : culture standardisée en milieu LB

100

4. Amplification et suivi du titre des phages :

4.1 Principe général de l'amplification / extraction :

L'amplification des phages a été réalisée en utilisant la souche PAO1. Chez *P. aeruginosa* la souche de référence commune PAO1 est un mutant spontané de la souche PAO isolée en 1954 d'une blessure à Melbourne, Australie.

Sur le même principe que celui décrit par (Betts *et al*, 2013), 30 mL d'une culture standardisée en LB de bactéries *P. aeruginosa* PAO1 en phase exponentielle ont été infectés avec 100 μL de phages. La culture a été placée à 30°C la nuit avec une agitation transversale d'1 minute toutes les 30 minutes. Le lendemain, l'extraction des phages de la culture a été réalisée par ajout de chloroforme (v/v). Ce dernier est utilisé pour lyser les bactéries et ainsi libérer tous les phages dans le milieu. La culture a ensuite été vortexée puis centrifugée à 14 000 rpm pendant 10 min. Le surnageant exempt de chloroforme et de débris bactériens a été filtré à $0,22\ \mu\text{m}$ avant d'être conservé à $+4^{\circ}\text{C}$ pour une titration ultérieure.

4.2 Principe général de titration :

Des dilutions au dixième en plaques 96 puits (Grosseron SAS, France) ont été faites à partir de l'extrait pur. Une ligne de 12 puits permet de réaliser des dilutions au dixième en cascade d'une même

Partie II : Sélection des couples phages/bactéries

solution de phages (**Figure 29**). Un volume de 180 μL de tampon SM (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 99 mM NaCl, 8 mM MgSO_4) est ajouté dans l'ensemble des puits à l'exception de ceux contenant les solutions pures. Un volume de 20 μL du 1^{er} puit est prélevé puis ajouté au 180 μL du second (dilution 10^{-1}). Après homogénéisation, 20 μL sont prélevés dans ce puit puis ajoutés au puit suivant pour une dilution de l'ordre de 10^{-2} , et ainsi de suite.

Sur le principe de la méthode en double couches décrite auparavant (**Figure 27**), 10 μL d'une dilution de phages ont été ajoutés à 100 μL d'une culture de bactéries PAO1 en phase exponentielle ainsi que 5 mL d'agar 0,7 % (à 56 °C), le tout a ensuite été coulé sur une boîte de pétri contenant un milieu PCA gélosé. Pour chaque essai de titration, une boîte témoin servant de contrôle positif pour la croissance bactérienne de la souche PAO1 a été réalisée. A l'issue d'une incubation d'une nuit à 30 °C, l'apparition des plages de lyse sur les boîtes de différentes dilutions a permis d'estimer la concentration en phage de l'extrait initial en PFU. mL^{-1} . Seules les boîtes ayant un nombre de plages de lyse compris entre 30 et 300 sont utilisées pour faire le calcul suivant :

$$\text{Titre initial de l'extrait (en PFU.mL}^{-1}\text{)} = \text{nombre de plages de lyse} * 100 * \text{facteur de dilution}$$

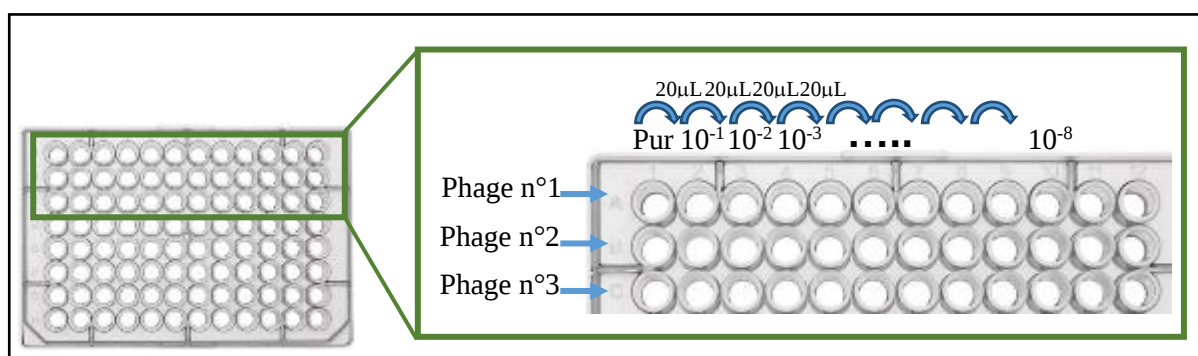


Figure 29 : Préparation en plaque 96 puits des dilutions de chacune des suspensions de phages

5. La méthode « spot test » pour sélectionner les phages infectieux :

La méthode utilisée est une adaptation de la méthode « double layer » décrite par Adams (1959). Pour chaque souche *P. aeruginosa*, un inoculum standardisé a été réalisé en milieu LB, puis utilisé pourensemencer un nouveau milieu LB à une densité optique $\text{D}_{0600\text{nm}} = 0,1$. Les cultures ont été placées en agitation à 120 rpm à 30 °C. Un volume de 100 μL de chaque culture en phase exponentielle a ensuite été ajouté à 5 mL d'agar 0,7 % à 56 °C avant d'être coulé sur des boîtes de pétri contenant déjà une couche de gélose PCA (**Figure 30.A**). Pour chaque souche, deux boîtes sont préparées ; l'une pour tester les phages, l'autre pour contrôler la croissance bactérienne. Sur les boîtes tests, des gouttes de 8 μL des solutions de phages sont déposées en surface de la couche d'agar/bactéries selon un patron prévu à l'avance (**Figure 30.B et C**). Après un temps de séchage, toutes les boîtes sont incubées 15 h à 30 °C.

Les premiers essais ont été réalisés dans le but d'identifier les souches de *P. aeruginosa* sensibles et de déterminer la gamme d'hôtes des bactériophages. Des gouttes de chacun des extraits de phages purs, ont été déposées à la surface des boîtes selon le patron présenté **Figure 30.B**.

La deuxième série d'essais a été réalisée pour évaluer la dose minimale infectieuse (DMI) c'est à dire, la quantité minimale de phages à déposer pour obtenir une plaque de lyse complète (**Figure 30.C**). Pour cela, des dilutions en séries au dixième ont été réalisées dans du SM buffer en plaques stériles 96 puits (**Figure 29**). Dans un premier cas, les dilutions ont été réalisées directement à partir des extraits purs de chaque solution de phages. Dans l'autre cas, les solutions de phages ont toutes été ajustées à une même concentration (10^9 PFU.mL⁻¹) avant d'être diluées en cascade.

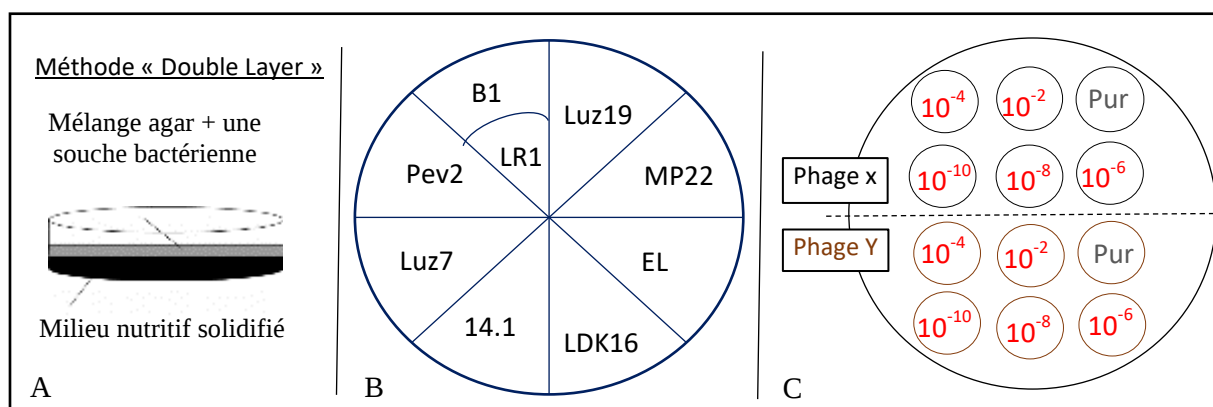


Figure 30 : Patrons utilisés pour les différents essais en « spot test » **A.** Boîte de pétri préparée pour une utilisation en « double layer » ; **B. Première série d'essais** : Patron utilisé pour répartir les gouttes des différents extraits purs de phages. Il est positionné sous la boîte de pétri et permet par transparence d'identifier chaque dépôt pendant l'essai et par la suite, pour la lecture des résultats ; **C. Seconde série d'essais** : Patron permettant de déterminer la dose minimale infectieuse pour chaque phage. Ordre de dépôt des dilutions de phages sur la boîte de pétri recouverte du tapis bactérien *P. aeruginosa*.

102

II.3 Résultats :

1. Amplification, extraction et suivi dans le temps des suspensions de phages en milieu LB :

Les phages B1 issus d'un isolement à partir de boues primaires prélevées sur le site du CSTB ainsi que les phages issus de la collaboration avec l'ISEM de Montpellier, ont été amplifiés avant d'être extrait en milieu LB, utilisé au laboratoire pour la croissance des souches de *P. aeruginosa* (**Figure 31**). Leur titre a été suivi dans le temps afin de vérifier la stabilité des solutions conservées à 4°C (**Figure 32**). Les résultats des titrages sont reportés dans le **Tableau 16** et le **Graphique 2**.

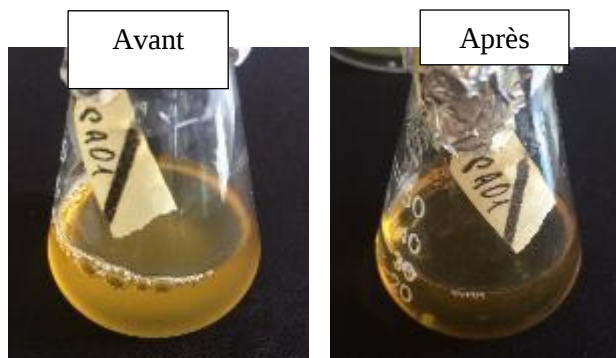


Figure 31 : Amplification des phages Luz7 sur PAO1 en milieu LB

Dans l'erenmeyer à gauche de la figure, la culture bactérienne est en phase exponentielle, les concentrations très élevées en bactéries sont visibles à l'œil nu. A droite, la multiplication des phages durant 12 h à 30 °C a entraîné la lyse des bactéries laissant apparaître un milieu de culture plus limpide.

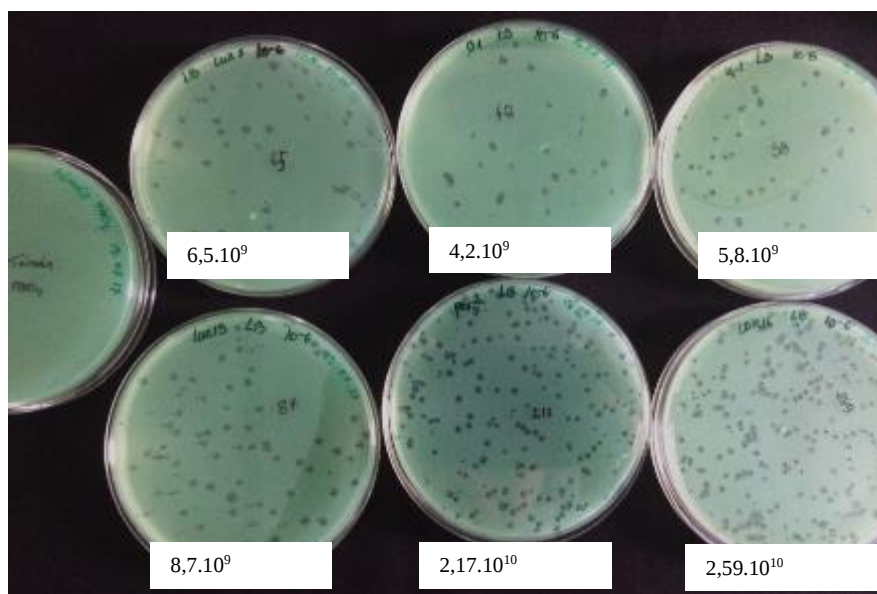
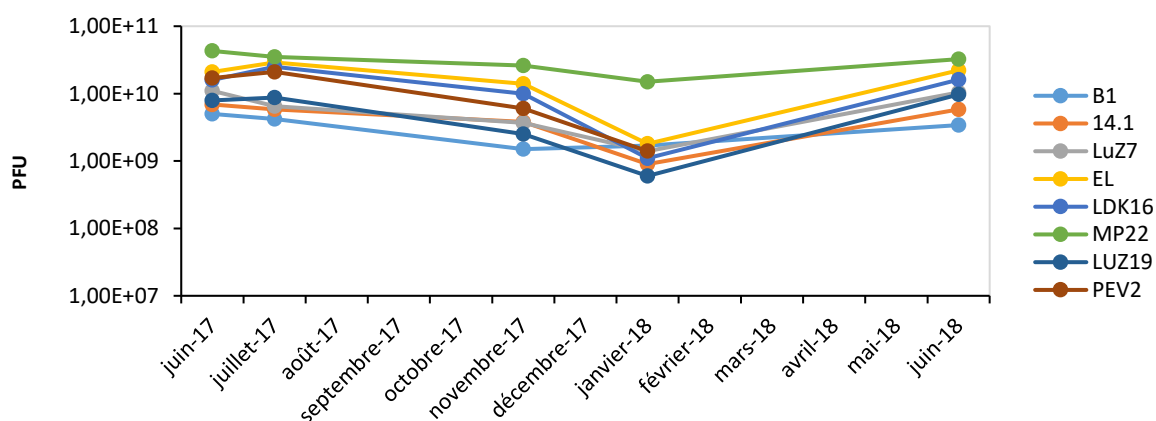


Figure 32 : Numération des bactériophages Luz7, B1, 14.1, Luz19, Pev2 et LDK16 conservés à -4 °C en milieu LB

Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} de chaque solution stock ont été réalisées dans du tampon SM. Un volume de 10 μ L de chaque dilution a été ajouté à 100 μ L d'une culture PAO1 en phase exponentielle de croissance et 5mL d'agar 0.7 %, avant d'être coulés sur des boîtes différentes en double layer et identifiées par la date, le phage, ainsi que le facteur de dilution. Ci-dessus, les résultats pour les dilutions 10^{-6} des différents phages.

Tableau 16 : Suivi du titre (en PFU.mL⁻¹) des suspensions de phages conservées en milieu LB à 4°C

Phages	De Janvier 2017 à Juin 2018								
	01.2017	02.17	03.17	04.17	06.17	07.17	11.17	01.2018	06.18
B1	2,3.10 ⁹	3,6.10 ⁹	2,1.10 ⁹	8.10 ⁹	5.10 ⁹	4,2.10 ⁹	1,5.10 ⁹	1,7.10 ⁹	3,4.10 ⁹
14.1			9,5.10 ⁹	6.10 ⁹	6,9.10 ⁹	5,8.10 ⁹	3,8.10 ⁹	9.10 ⁸	5,8.10 ⁹
LUZ7				1,3.10 ¹⁰	1,1.10 ¹⁰	6,5.10 ⁹	3,7.10 ⁹	1,4.10 ⁹	1,04.10 ¹⁰
EL					2,1.10 ¹⁰	2,9.10 ¹⁰	1,4.10 ¹⁰	1,8.10 ⁹	2,21.10 ¹⁰
LDK16					1,6.10 ¹⁰	2,5.10 ¹⁰	1.10 ¹⁰	1,1.10 ⁹	1,61.10 ¹⁰
MP22					4,3.10 ¹⁰	3,5.10 ¹⁰	2,6.10 ¹⁰	1,5.10 ¹⁰	3,25.10 ¹⁰
LUZ19					7,9.10 ⁹	8,7.10 ⁹	2,5.10 ⁹	6.10 ⁸	9,7.10 ⁹
PEV2					1,7.10 ¹⁰	2,1.10 ¹⁰	6.10 ⁹	1,4.10 ⁹	8,8.10 ⁹



Graphique 1 : Evolution du titre des phages conservés en milieu LB dans le temps à 4°C

3. Résultats des essais en spot test :

3.1 Premier screening : détermination de la gamme d'hôtes de chacun des phages :

Trois essais ont été réalisés dans les mêmes conditions, à des dates différentes. Les résultats obtenus pour un essai sont présentés sur la **Figure 33**. Pour chaque souche de *P. aeruginosa* testée, deux boîtes en double layer ont été nécessaires, l'une pour faire les dépôts et la seconde comme témoin de croissance de la souche bactérienne. L'utilisation d'un patron permet d'une part d'organiser le dépôt des gouttes de chaque extrait et d'autre part de faciliter la lecture des résultats. Dans cet essai, trois souches (MLM, D1, ST395E) ainsi que la souche référence PAO1 sont sensibles à l'ensemble des phages testés. En revanche dans ces conditions expérimentales, seuls les phages LUZ7, Luz19, 14.1, LDK16 et EL parviennent à lyser le tapis bactérien de la souche D2. Aucune plage de lyse n'est visible sur les boîtes pour les souches ST111, ST395P, E1 et E6.

L'ensemble des résultats concernant les 3 essais a été synthétisé dans le **Tableau 17**. Pour chaque couple phages/souche bactérienne un dégradé de couleur a été utilisé pour coder la reproductibilité des résultats obtenus. Ainsi la couleur la plus sombre indique que sur les trois essais réalisés, trois résultats positifs d'infection de la souche par les phages ont été obtenus. Dans les cas où seuls 2/3 essais ont abouti à un résultat positif, une nuance de couleur intermédiaire est appliquée, la nuance la plus claire étant utilisée lorsqu'un seul essai sur les 3 s'est révélé positif. L'absence de couleur permet de mettre en évidence les phages n'étant pas capables d'infecter certaines souches dans ces conditions ou, autrement dit, les souches de *P. aeruginosa* de la collection qui n'ont pas été sensibles à certains phages. Dans la dernière colonne du tableau figure le nombre total de spots positifs cumulés sur les 3 essais, par phage et dans la dernière ligne, par souche.

Tableau 17 : Synthèse des résultats obtenus pour les 3 essais réalisés en spot tests à partir des extraits purs de phages.

Famille	Récepteur bactérien	Nom phages	Souches de <i>P. aeruginosa</i>									Total spots positifs/ phage
			ST111	MLM	E1	E6	D1	D2	ST395E	ST395P	PAO1	
M	?	EL										12
P	pili type IV	LDK16										11
P	unknown	PEV2										13
P	AlgC (LPS)	LUZ7										16
P	pili type IV	LuZ19										11
M	LPS	14.1										16
S	pili type IV	MP22										9
?	?	B1										13
?	?	LR1										4
Total spots positifs / souche			1	21	1	1	23	12	21	0	25	
Légende :												
M : Myoviridae ; P : Podoviridae ; S : Siphoviridae Pas de réponse 1 essai /3 de positif 2 essais/ 3 de positifs 3 essais/ 3 de positifs												

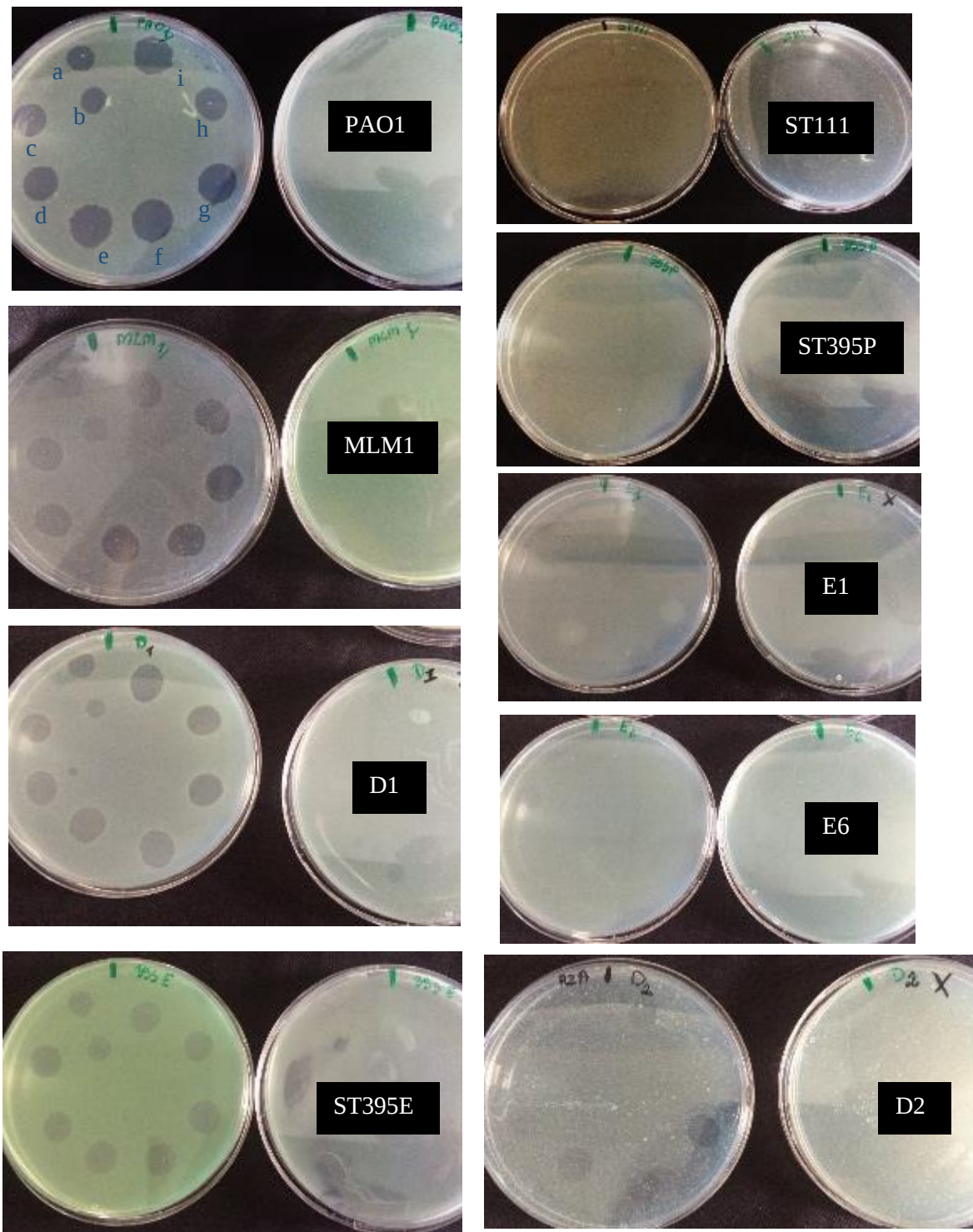


Figure 33 : Résultats d'un essai en spot test

Chaque photographie correspond au résultat obtenu pour une des neuf souches de *P.aeruginosa* (à gauche de chaque photo : la boîte test avec les dépôts en gouttes des différents extraits de phages et à droite : la boîte sans dépôt de phages servant de contrôle de la croissance bactérienne). De haut en bas : la colonne de gauche : les souches PAO1, MLM, D1, ST395E, la colonne de droite : les souches ST111, ST395P, E1, E6, D2. Intitulés des dépôts : a. B1, b. LR1, c. Pev2, d. Luz7, e. 14.1, f. LDK16, g. EL, h. MP22, i. Luz19. L'apparition de zones plus claires à l'emplacement de certains dépôts correspond dans ces cas-là, à la lyse des bactéries par les phages. Des résultats différents sont obtenus selon la souche testée.

3.2 Deuxième screening : sélection des phages infectieux les plus efficaces :

Si le premier screening avait pour but de déterminer la gamme d'hôtes de chacun des phages de la collection, le second screening, réalisé sous la forme de deux essais, avait pour objectif d'identifier les phages infectieux les plus efficaces vis-à-vis des souches *P. aeruginosa*.

Les extraits de virus ont donc été dilués en milieu LB afin de déposer, pour chaque phage, des gouttes de différents titres à la surface des tapis bactérien. Lorsque la lecture des résultats le permettait, pour chaque couples phage/souche, le titre minimum (en PFU.mL⁻¹) nécessaire pour obtenir un spot de lyse complet a été déterminé. Tous les phages ont donc été testés sur l'ensemble des souches. Les résultats de ces deux essais sont synthétisés dans les **Figure 34** et **Figure 35**. Un code a été utilisé pour retranscrire l'efficacité de la lyse obtenue pour chaque spot selon la dilution du phage et la souche. Pour chaque souche, 5 boîtes de pétri permettent de lire les résultats pour les 8 phages testés, les dépôts de deux phages différents pouvant être fait sur une même boîte.

1^{er} essai :

Des dilutions au dixième à partir des extraits purs de phages ont été réalisées. Puis, pour chacun des phages, des gouttes correspondant à l'extrait pur ainsi qu'aux dilutions 10⁻² 10⁻⁴ 10⁻⁶ 10⁻⁸ et 10⁻¹⁰ ont été déposées à la surface de la double couche. Les résultats sont présentés **Figure 34**.

2^{ème} essai :

Les extraits purs ont tous été préparés à 10⁹ PFU.mL⁻¹ avant d'être dilués au dixième de 10⁻¹ à 10⁻⁵. Les gouttes correspondantes sont ensuite déposées sur les boîtes. Les résultats sont présentés **Figure 35**.

Sur les **Figure 34** et **Figure 35**, les plages de lyse sont classées selon leur degré de clarté. La présence d'un spot entièrement lysé à l'emplacement d'une goutte est symbolisé par +++ . Un ombrage (++) met en valeur les titres minimums en phages nécessaires et suffisants pour une lyse complète des spots. Le titre de l'extrait pur ainsi que la dilution ont été utilisés pour calculer ce titre minimum comme présentés ci-dessous :

Titre minimum de lyse des phages LUZ7 sur la souche PAO1	
1 ^{er} essai (figure 34)	2 nd essai (figure 35)
Titre de l'extrait pur (en PFU.mL ⁻¹) * facteur dilution	
Soit 1.10 ¹⁰ * 10 ⁻⁴ = 1.10 ⁶ PFU.mL ⁻¹	Soit 1.10 ⁹ * 10 ⁻⁴ = 1.10 ⁵ PFU.mL ⁻¹

Les titres minimums ont été calculés pour chaque phage et souche. Les valeurs ont été rassemblées dans le tableau a (Annexe 1) pour le 1^{er} essai et dans le tableau b (Annexe 1), pour le second essai.

Les souches ST111, E1, E6, ST395P et D2 déjà identifiées dans des expérimentations préliminaires comme étant peu ou pas sensibles à certains phages, ont également été testées dans ces essais. L'absence de spots de lyse sur l'ensemble des boîtes correspondantes confirme les résultats

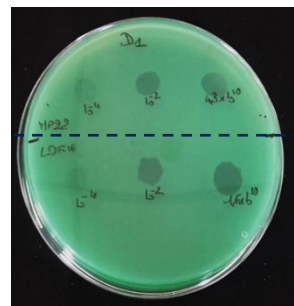
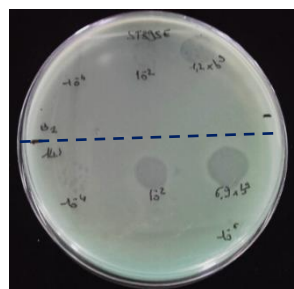
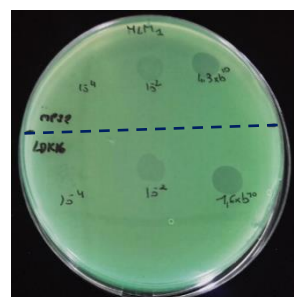
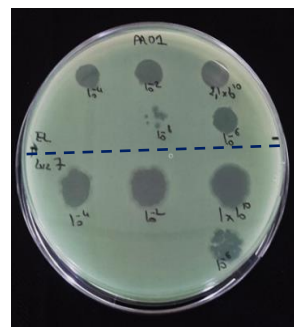
obtenus en amont et présentés dans le **Tableau 17**. Pour ces souches, aucunes des dilutions de phages n'aboutit à la formation de spots de lyse permettant d'évaluer l'efficacité d'infection des différents bactériophages.

Depuis son séquençage complet en 2000, la souche PAO1 est devenue la souche de référence pour la génétique de *Pseudomonas* et les analyses fonctionnelles (physiologiques et métaboliques) de cette protéobactérie. L'annotation du génome est continuellement mise à jour permettant la découverte et la compréhension de certains comportements des bactéries en réponse à leur environnement. Dans la littérature, PAO1 est très souvent utilisée pour isoler de nouveaux phages de l'environnement. Dans ce projet elle nous a également permis d'isoler de nouveaux phages à partir d'un échantillon d'eaux usées et d'un cours d'eau de la Rochelle. Sa sensibilité à tous les phages du panel, nous a permis de l'utiliser pour amplifier chacun d'eux. Elle sera le témoin positif d'infection lors des différentes expérimentations.

L'analyse des **Figure 34** et **Figure 35** permet de souligner des comportements différents des souches. En effet, bien que les deux essais aient été réalisés à des temps et selon des protocoles différents, les résultats obtenus confirment la sensibilité de la souche PAO1, à l'ensemble des phages. Des titres viraux de l'ordre de 10^4 à 10^6 PFU.mL⁻¹ pour le 1^{er} essai (**Figure 34**) et 10^5 PFU.mL⁻¹ pour le 2nd essai (**Figure 35**) sont suffisants pour obtenir un spot de lyse totale du tapis bactérien. De la même manière, il est possible de constater que la souche D1 est également sensible à l'ensemble des phages et ce, pour des titres minimums infectieux allant de 10^6 à 10^8 PFU.mL⁻¹. Finalement, la collecte des résultats permet de différencier les souches MLM et ST395E des souches PAO1 et D1. En effet, lorsque ces 2 souches sont sensibles à un phage, le titre minimum nécessaire pour lyser le tapis bactérien s'élève de 10^7 à 10^{10} PFU.mL⁻¹, soit entre 2 et 5 log de plus que pour les souches D1 et PAO1 (Annexe 1).

Partie II : Sélection des couples phages/bactéries

	Noms des phages	Titre initial (PFU.mL ⁻¹)	Dilutions				
			Pur	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁸
PAO1	EL	2.10 ¹⁰	+++	+++	+++	+++	+-
	LUZ7	1.10 ¹⁰	+++	+++	+++	++-	
	LuZ19	8.10 ⁹	+++	+++	+++	++-	-
	Pev 2	1,7.10 ¹⁰	+++	+++	+++	++-	-
	B1	1,2.10 ¹⁰	+++	+++	+++	++-	-
	14.1	6,9.10 ⁹	+++	+++	+++	++-	-
	MP22	4,3.10 ¹⁰	+++	+++	+++	++-	-
	LDK16	1,6.10 ¹⁰	+++	+++	+++	++-	-
MLM	EL	2.10 ¹⁰	+++	+++	++-		
	LUZ7	1.10 ¹⁰	+++	+++	++-		
	LuZ19	8.10 ⁹	+++	+++			
	Pev 2	1,7.10 ¹⁰	+++	+++	++-	+-	
	B1	1,2.10 ¹⁰	+++				
	14.1	6,9.10 ⁹	+++				
	MP22	4,3.10 ¹⁰	+++	++-	+-		
	LDK16	1,6.10 ¹⁰	+++	++-	+-		
ST395E	EL	2.10 ¹⁰	+++	+++	++-	+-	
	LUZ7	1.10 ¹⁰	+++	+++	++-	+-	
	LuZ19	8.10 ⁹	+++	++-	++-		
	Pev 2	1,7.10 ¹⁰	+++	++-	++-		
	B1	1,2.10 ¹⁰	+++	++-	-		
	14.1	6,9.10 ⁹	+++	+++	++-	-	
	MP22	4,3.10 ¹⁰	+++	+++	++-		
	LDK16	1,6.10 ¹⁰	+++	+++	++-		
D1	EL	2.10 ¹⁰	+++	+++	+++		
	LUZ7	1.10 ¹⁰	+++	+++	++-		
	LuZ19	8.10 ⁹	+++	+++	+++		
	Pev 2	1,7.10 ¹⁰	+++	+++	+++		
	B1	1,2.10 ¹⁰	+++	+++	++-		
	14.1	6,9.10 ⁹	+++	+++	++-		
	MP22	4,3.10 ¹⁰	+++	+++	++-		
	LDK16	1,6.10 ¹⁰	+++	+++	++-		



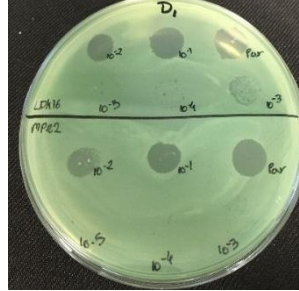
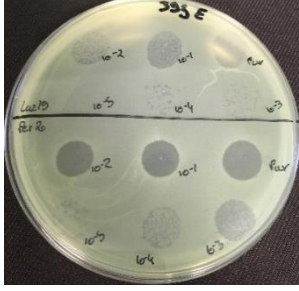
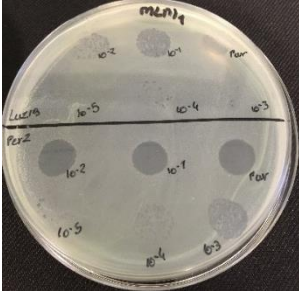
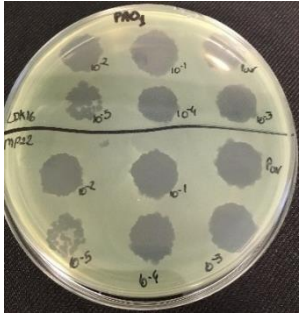
109

Légende :	
+++	Lyse totale
+++	Titre minimum pour une lyse totale
++-	Lyse partielle
+-	>ou= à 6 plages de lyse
-	1 ou 2 plages de lyse
	Absence de lyse

Figure 34 Résultats par souche *P. aeruginosa* de l'essai en spot test à partir des extraits purs et des dilutions de 10⁻² à 10⁻¹⁰

Pour chaque phage, le titre initial de l'extrait (en PFU.mL⁻¹) est indiqué ainsi que le résultat du test réalisé avec l'extrait pur et pour les dilutions 10⁻² 10⁻⁴ 10⁻⁶ 10⁻⁸. Aucune souche n'est sensible aux phages pour les dilutions 10⁻¹⁰. Pour chaque souche, une photo des résultats obtenus pour les dilutions de 2 phages est ajoutée à droite du tableau. Pour les souches D2, E1, E6, ST111 et ST395P, les résultats ne permettent pas d'identifier des phages infectieux dans ces conditions.

	Noms des phages	Titre initial 10 ⁹ PFU.m ⁻¹	Dilutions				
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
PAO1	EL	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
	LUZ7	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
	LuZ19	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
	Pev 2	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
	B1	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
	14.1	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
	MP22	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
	LDK16	+++	+++	+++	+++	+++	+ -
MLM	EL	++-	++-	++-	-	-	
	LUZ7	+++	+++	+++	++-	-	
	LuZ19	++-	++-	+-	-	-	
	Pev 2	+++	+++	+++	++-	++-	+ -
	B1	+-	-				
	14.1	+++	++-	+-			
	MP22	++-	++-	+-			
	LDK16	++-	++-	+-	-		
ST395E	EL	++-	++-	++-	+-	-	
	LUZ7	+++	+++	+++	++-	+-	-
	LuZ19	++-	++-	++-	+-	+-	-
	Pev 2	+++	+++	+++	++-	++-	+ -
	B1	++-	++-	+-	-	-	
	14.1	+++	++-	++-	+-	-	
	MP22	++-	++-	+-	-		
	LDK16	++-	++-	+-	-		
D1	EL	+++	+++	++-			
	LUZ7	+++	+++	+++	++-	+-	-
	LuZ19	+++	+++	+++	++-	++-	+ -
	Pev 2	+++	+++	+++	++-	++-	+ -
	B1	+++	+++	+++	++-	-	
	14.1	+++	+++	+++	++-	-	-
	MP22	+++	+++	+-	-		
	LDK16	+++	+++	+++	++-	+-	-



Légende :	
+++	Lyse totale
+++	Titre minimum pour une lyse totale
++-	Lyse partielle
+-	>ou= à 6 plages de lyse
-	1 ou 2 plages de lyse
	Absence de lyse

Figure 35 : Résultats par souche *P. aeruginosa* de l’essai en spot test à partir des solutions de phages de titre 10⁹ PFU.mL⁻¹ et des dilutions de 10⁻¹ à 10⁻⁵

Pour chaque souche, une photo des résultats obtenus pour les dilutions de 2 phages est ajoutée à droite du tableau. Pour les souches D2, E1, E6, ST111 et ST395P, les résultats ne permettent pas d’identifier des phages infectieux dans ces conditions.

II.4 Discussion :

La première étape de cette étude a permis d'intégrer au sein du laboratoire de microbiologie de la plateforme AQUASIM (CSTB, Nantes) une collection de phages. Parmi les étapes indispensables, l'isolement puis la multiplication des virus à partir d'échantillons environnementaux ont permis d'obtenir un nouveau phage potentiellement inconnu dans la littérature, en complément de ceux déjà caractérisés et référencés sur l'ICTV. Il est à noter toutefois, que l'utilisation de l'unique souche PAO1 pour l'isolement de nouveaux phages peut toutefois être vue comme limitante malgré son profil de sensibilité connu et faisant d'elle la souche idéale pour l'isolement de nouveaux phages spécifique de *P. aeruginosa*. Un panel diversifié de phages principalement caudés appartenant aux familles des *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* a ainsi été établi. Des choix méthodologiques et la mise en place de protocoles spécifiques ont permis de cultiver et de maintenir des solutions stocks, de chacun de ces phages, avec des titres stables dans le temps. Les variations ponctuelles observées peuvent être expliquées par les mécanismes d'agrégation des phages entre eux, déjà identifiés dans la littérature (Kutter E. *et al.*, 2005) et sont observés chez les phages caudés (Serwer *et al.*, 2007). Ils peuvent être liés au changement des paramètres environnant tels que le pH, la composition en ions et la force ionique (Alves *et al.*, 2015). Dans notre cas, l'absence d'une homogénéisation suffisante pour les remettre en suspension avant de prélever peut expliquer cette variation.

L'évaluation des phages comme potentiels agents biocides dans l'élimination des biofilms de surfaces a nécessité, dans un premier temps, d'analyser le comportement des phages collectés sur un panel de souches de *P. aeruginosa* représentatifs des contaminations pouvant être retrouvées dans ces environnements dits « à risques ». Une démarche similaire a été utilisée dans l'étude de Alves *et al.*, (Alves *et al.*, 2015) leur permettant d'isoler puis de déterminer la gamme d'hôtes de six nouveaux bactériophages avant de tester leur potentiel antibactérien sur des biofilms modèles de souches cliniques de *P. aeruginosa*, en condition statique et dynamique. La gamme d'hôtes d'un phage est affectée par un certain nombre de facteurs. Le phage doit avant tout être capable de s'adsorber à la surface cellulaire pour pouvoir initier l'infection et l'absence ou le masquage d'un récepteur compatible empêchera cette interaction initiale (Drulis-Kawa *et al.*, 2015). Dans le cas où l'adsorption à la surface est réussie, l'entrée de l'ADN du phage dans la cellule bactérienne peut ensuite être bloquée par des systèmes d'exclusion (Lu and Henning, 1994). Les systèmes de modification/ restriction (Roberts and Marinus, 2003; Tock and Dryden, 2005) et CRISPR bloquent, quant à eux, l'infection, en dégradant l'ADN du phage peu de temps après son entrée dans le cytoplasme cellulaire (Fineran and Charpentier, 2012; Shabbir *et al.*, 2016). Tous ces facteurs régissent et limitent naturellement le nombre d'hôtes des phages.

La méthode en spot test, adaptée de la méthode en double couche (Adams and Hancock, 1959) a été retenue pour cette première partie. Elle permet d'une part d'identifier pour chaque phage quelles sont les souches sensibles et d'autre part d'estimer leur efficacité vis-à-vis de ces souches. Une première série d'essais a mis en évidence les phages LUZ7 et 14.1 capables d'infecter jusqu'à 6 souches de la

collection ainsi que les phages B1 et Pev2 infectieux pour 5 des 9 souches testées. Il est intéressant de noter que pour les phages LUZ7 et 14.1, les récepteurs utilisés pour adhérer à la surface bactérienne lors de l'infection, sont les lipopolysaccharides (LPS), l'un des composants majeur de la paroi des bactéries Gram -. En effet, dans leur étude B. Silva *et al*, (Bertozzi Silva *et al.*, 2016) mettent également en avant le fait qu'une majorité des phages adhèrent préférentiellement à la surface des bactéries Gram - par l'intermédiaire de ces sucres. En ce qui concerne les phages Pev2, aucun potentiel récepteur bactérien n'a été identifié, de même pour les phages B1 nouvellement isolés.

Parmi les souches les plus sensibles de la collection, MLM, D1, ST395E et la souche de référence PAO1 se distinguent des autres souches qui ne sont peu voire pas sensibles aux différents phages de l'étude dans ces conditions. Les souches MLM et ST395E proviennent toutes les deux de prélèvements d'eau potable au niveau d'éviers d'une salle de consultation et d'une unité de soins intensifs et la souche D1 d'un prélèvement d'eau thermale. Bien que les souches ST395E et ST395P soient isogéniques, il est intéressant de noter que la souche ST395P ne soit sensible à aucun des phages testés. ST395P, issue d'un patient en unité de soins intensifs, de par son origine et les différents stress rencontrés, exprime probablement un phénotype différent responsable de sa résistance. Le phénotype est classiquement décrit comme étant la résultante de l'expression du génotype (un ou plusieurs gènes) à laquelle il faut ajouter les effets d'un environnement souvent complexe (Corre, 2015).

Toutefois cette méthode ne reflète que l'aspect bactéricide d'un phage vis-à-vis d'une souche et pour un temps donné mais elle ne permet pas d'évaluer l'efficacité de lyse. Plusieurs auteurs ont d'ailleurs souligné dans la littérature l'existence d'une possible « lysis from without » (Abedon, 2011) pour laquelle l'apparition d'une plage de lyse serait le résultat de procédés distincts de l'action lytiques des phages (Mirzaei and Nilsson, 2015; Xie *et al.*, 2018). En effet l'observation des zones claires peut faire suite à un mécanisme de résistance bactérien nommé « Abortive infection ou Abi » en réaction à l'adsorption des phages aux récepteurs de l'hôte, ou simplement à la présence de résidus de bactériocines, responsables de la lyse des bactéries sans que de nouveaux phages ne soient produits. La distinction entre les deux mécanismes peut être faite en réalisant le suivi dans le temps du titre des phages en présence de leur hôte bactérien. Il est ainsi possible d'estimer les différents paramètres de lyse des phages.

Dans le but de préciser les premiers résultats, une seconde série d'essais a donc été menée afin de mettre en évidence les phages les plus actifs en fonction des titres infectieux. Deux expérimentations ont été réalisées sur le même principe. Bien que les résultats diffèrent sur certaines valeurs, la comparaison des deux tableaux de synthèse en annexe 1, retranscrits sous la forme d'un seul et même diagramme de couleur (**Tableau 18**) permet de confirmer les premiers résultats. Un gradient de couleur rouge a été utilisé pour symboliser les différents degrés d'efficacité de lyse des phages et la sensibilité des souches. Ce **Tableau 18** confirme la sensibilité des 4 souches citées auparavant : MLM, D1, ST395E, PAO1 parmi lesquelles, 2 souches ressortent particulièrement avec des profils relativement proches. En effet la souche D1 a un comportement se rapprochant de celui de la souche de référence

PAO1, connue comme étant la souche la plus sensible de la collection. Si le premier essai souligne l'efficacité des phages LUZ7, 14.1 et B1, la seconde expérimentation met en évidence les phages LUZ7, Pev2 et 14.1.

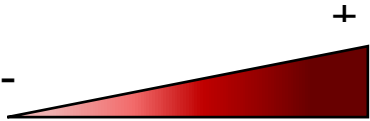
Sur la base de ces résultats, les quatre souches *P. aeruginosa* MLM, D1, ST395E et PAO1 ont été retenues et seront cultivées en milieu liquide, dans des conditions favorables à leur croissance afin de tester l'infectiosité de trois phages. Dans la littérature, l'étude de Sillankorva *et al.* (Sillankorva *et al.*, 2004a) a mis en évidence l'impact du milieu de croissance des bactéries sur l'activité des phages, or si le milieu LB permet de cultiver simplement les bactéries, il n'est cependant pas du tout représentatif des conditions naturelles hydriques d'un environnement considéré comme étant « à risque ». Sur ce constat, nous avons choisi de réaliser la suite des expérimentations en milieu minimum (partie III).

Les résultats précédant ont également permis de retenir les phages LUZ7 (*Podoviridae*) et 14.1 (*Myoviridae*). Les phages Pev2 et LuZ19 appartenant également à la famille des *Podoviridae*, déjà représentée par le phage LUZ7, et les récepteurs cibles de l'hôte utilisés pour l'adsorption en surface des bactéries n'étant pas connus pour Pev2, il a donc été envisagé d'évaluer, en troisième point, l'action des phages B1 nouvellement isolés à partir des eaux usées.

Tableau 18 : Mise en évidence des couples phages / souches de *P. aeruginosa* pouvant être utilisés par la suite comme modèles d'infectiosité

			Noms des souches <i>P. aeruginosa</i>									
			1 ^{er} essai en spot test avec dilution					2 nd essai en spot test avec dilution				
			PAO1	MLM	D1	ST395E	ST111/E1/E6/D2/ ST395P	PAO1	MLM	D1	ST395E	ST111/E1/E6/D2/ ST395P
Panel de phages	Myoviridae	EL										
	Podoviridae	LUZ7										
	Podoviridae	LuZ19										
	Podoviridae	Pev 2										
	unknown	B1										
	Myoviridae	14.1										
	Siphoviridae	MP22										
	Podoviridae	LDK16										

Légende : Titres viraux en PFU.mL-1						
	[10 ⁴ ; 10 ⁶]		[10 ⁶ ; 10 ⁸]		[10 ⁸ ; 10 ¹⁰]	>10 ¹⁰



Gradient d'efficacité de lyse des phages sur la souche.
Gradient de sensibilité de la souche vis-à-vis des phages.

SOMMAIRE Partie III

PARTIE III : EVALUATION DU POTENTIEL INFECTIEUX DES PHAGES SUR DES CULTURES DE *P. AERUGINOSA* EN MILIEU MINIMUM PLANCTONIQUE..... 116

III.1 Introduction : 116

III.2 Matériel et méthodes :..... 118

1. Mise au point d'un milieu minimum : 118
2. Culture des souches et amplification des phages en milieu minimum :..... 119
3. Caractérisation des phages 14.1, LUZ7 et B1:..... 120
 - 3.1 Cinétique de multiplication des phages : « One Step Growth Curve »..... 120
 - 3.2 Microscopie électronique à transmission : 120
4. Préparation des solutions de phages et modalités d'infection par les phages : 121
5. Efficacité des phages sur *P. aeruginosa* en milieu liquide : plan expérimental :..... 122

III.3 Résultats : 125

1. Milieu de culture et amplification des phages : 125
 - 1.1 Validation de la croissance des souches en milieu minimum :..... 125
 - 1.2 Amplification, extraction et titre des phages en milieu minéral minimum :..... 125
2. Paramètres de lyse des phages 14.1, LUZ7 et B1 :..... 126
3. Morphologie des phages 129
4. Efficacité des phages sur les souches cultivées en milieu minimum planctonique :..... 132
 - 3.1 Efficacité des phages sur la souche PAO1 : 132
 - 3.2 Efficacité des phages sur la souche MLM :..... 135
 - 3.3 Efficacité des phages sur la souche ST395E : 140
 - 3.4 Efficacité des phages sur la souche D1 : 143

III.4 Conclusion 146

Partie III : Evaluation du potentiel infectieux des phages sur des cultures de *P. aeruginosa* en milieu minimum planctonique

III.1 Introduction :

Un premier screening permettant d'évaluer la virulence des différents phages du panel vis-à-vis des souches de *P. aeruginosa* a été réalisé dans la partie expérimentale précédente (cf partie II) permettant de dresser la gamme d'hôtes de chacun des phages. Parmi les phages infectieux, il a ensuite été entrepris de sélectionner les plus efficaces. Les résultats ont été synthétisés sous forme de tableaux permettant d'identifier les souches bactériennes les plus sensibles ainsi que les phages les plus virulents. Trois types de phages et quatre souches bactériennes (y compris la souche PAO1) ont donc été sélectionnés en prenant en compte :

- les résultats des essais en spot test (cf partie II)
- l'origine des souches bactériennes (hospitalière ou thermale)
- les genres auxquels appartiennent les phages (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*)

Dans cette partie, les trois phages sélectionnés ont été, dans un premier temps, caractérisés. Pour chacun d'eux une cinétique de multiplication a été réalisée en présence de la souche hôte PAO1 permettant de déterminer les paramètres de lyse tel que le temps de latence et le nombre de virions produit par cycle d'infections. La microscopie électronique à transmission a également été entreprise pour valider leur aspect morphologique et confirmer leur classification.

116

La suite des essais a eu, pour objectif principal, de rendre compte de l'efficacité bactéricide de ces phages sur les souches *P. aeruginosa* cultivées en condition liquide. Dans la littérature, plusieurs auteurs se sont ainsi déjà intéressés à tester l'infectiosité de phages dans des milieux artificiels plus représentatifs de l'environnement réel dans lequel les bactéries se sont multipliées. Scarascia *et al.* (Scarascia *et al.*, 2018) mettent au point un milieu artificiel d'eau de mer leur permettant d'évaluer l'efficacité de sept phages sur le biofilm de *P. aeruginosa* qui se développe dans les membranes de filtration lors du processus d'osmose inverse. Garbe *et al.* (Garbe *et al.*, 2010) imitent, quant à eux, l'environnement de la fibrose kystique-pulmonaire grâce à un milieu artificiel dont la composition se rapproche de celle des expectorations des patients malades. Dans notre étude un milieu minimum proche des conditions naturelles retrouvées dans un réseau d'eau, favorable au développement du pathogène, a été mis au point et utilisé pour la culture des souches *P. aeruginosa* d'une part, mais également pour amplifier et conserver les phages. Le protocole de préparation des cultures a été standardisé permettant de se placer dans des conditions de répétabilité pour chaque essai. Le titre des phages a été suivi dans le temps pour s'assurer de leur stabilité dans le milieu minéral minimum.

En milieu liquide, la capacité des phages à lyser spécifiquement une souche de bactérie est évaluée en suivant la densité optique du milieu à 600 nm qui est proportionnelle à la concentration en bactéries. L'action des phages B1, 14.1 et LUZ7 a ainsi été suivie pendant 24 h sur les cultures

planctoniques des souches MLM, ST395E, PAO1 et D1. Il a été choisi de tester en parallèle un paramètre supplémentaire en faisant varier la dose virale ou MOI (Multiplicity Of Infection). Sur la base d'études réalisées en amont par d'autres auteurs sur *P. aeruginosa* (Alves *et al.*, 2015; Kwiatek *et al.*, 2017; Scarascia *et al.*, 2018; Shafique *et al.*, 2017) trois MOI (le nombre de phages ajoutés par rapport au nombre de bactéries présentes dans la solution) ont été testés (0,1 ; 1 ; 10).

Les résultats ont mis en évidence une action des phages qui dépend de la souche. Trois profils d'interactions des phages sur les cultures planctoniques ont ainsi été obtenus et suggèrent l'existence de mécanismes complexes intervenant chez les phages ou chez les bactéries au cours de leur rencontre. Selon le couple phage/bactérie, ces mécanismes sont susceptibles d'être en faveur de l'action lytique des virus ou à l'inverse de la persistance des bactéries.

III.2 Matériel et méthodes :

1. Mise au point d'un milieu minimum :

Toutes les souches de *P. aeruginosa* ont été cultivées dans un milieu minimum artificiel représentatif d'une eau favorable au développement du biofilm sur des surfaces retrouvées dans les environnements à risque. L'étude de Pessereau (Pessereau, 2015) a permis de mettre en évidence une variation de l'indice de formation globale de biofilm des souches en fonction de la minéralisation de l'eau. Les niveaux de formation du biofilm sont significativement plus élevés en condition de minéralisation faible ($p > 0.0001$). Il a donc été choisi d'utiliser une eau minérale naturelle embouteillée de faible minéralisation pasteurisée pendant 2 h à 60 °C, à laquelle est ajouté du glucose à 0,2 % pour la source de carbone, supplémentée en acides casamines 0,005 % pour les apports en acides aminés. L'eau minérale naturelle embouteillée est caractérisée par un contenu minéral dit faible, moyen ou fort basé sur la valeur de son résidu sec à 180 °C (**Tableau 19**).

En supplément des informations mentionnées sur l'étiquetage, les paramètres physicochimiques et microbiologiques complémentaires tels que la conductivité, la concentration en fer total et le dénombrement de la flore autochtone cultivable ont été mesuré lors des travaux de thèse précédant (Pessereau, 2015). La valeur de la conductivité des eaux minérales naturelles correspond à la moyenne de trois mesures effectuées à 22 °C. Les mesures de concentration en fer total peuvent être effectuées par spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) suivant la norme NF EN ISO 17294-2 (T90-164). L'analyse quantitative de la flore autochtone cultivable de l'eau minérale naturelle a été réalisée par la technique des UFC sur milieu R2A, suivie d'une incubation d'une semaine à 22 °C et d'un dénombrement.

118

Tableau 19 : Paramètres physicochimiques et microbiologiques d'une eau minérale naturelle embouteillée, faiblement minéralisée (D'après la thèse de C. Pessereau 2015)

Paramètres	Minéralisation faible	
	mg/L	mM
Ca ²⁺	11,5	0,29
Mg ²⁺	8,0	0,33
Na ⁺	11,6	0,50
K ⁺	6,2	0,16
SO ₄ ²⁻	8,1	0,03
NO ₃ ⁻	6,3	0,10
Cl ⁻	3,5	0,10
HCO ₃ ⁻	71,0	1,16
pH	7,0	
Résidu à sec à 180°C (mg/L)	130,0	
Conductivité à 22°C (µS/cm)	153,4±10	
Concentration en fer totale (µg/L)	<12	
Flore bactérienne cultivable -analyse quantitative (10 ⁴ UFC/mL)	5,42±1,09	

2. Culture des souches et amplification des phages en milieu minimum :

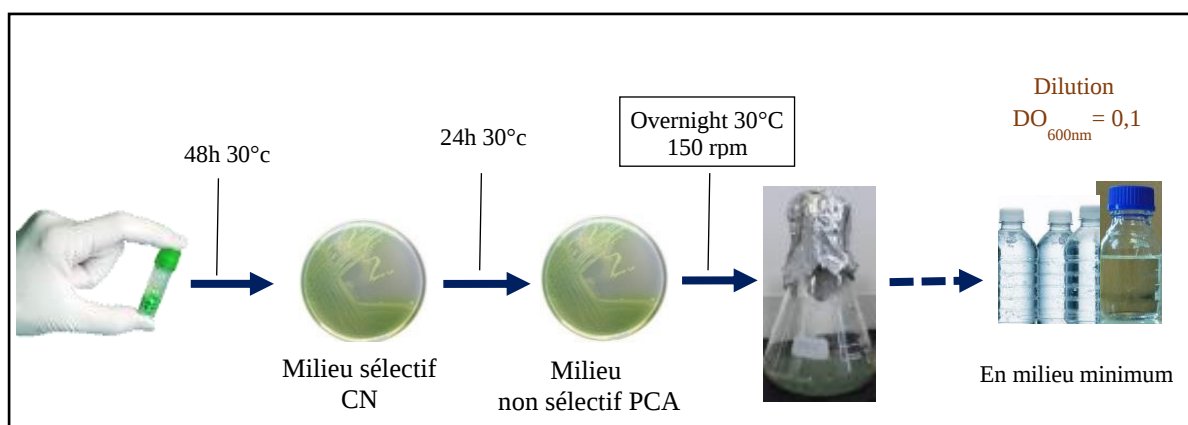
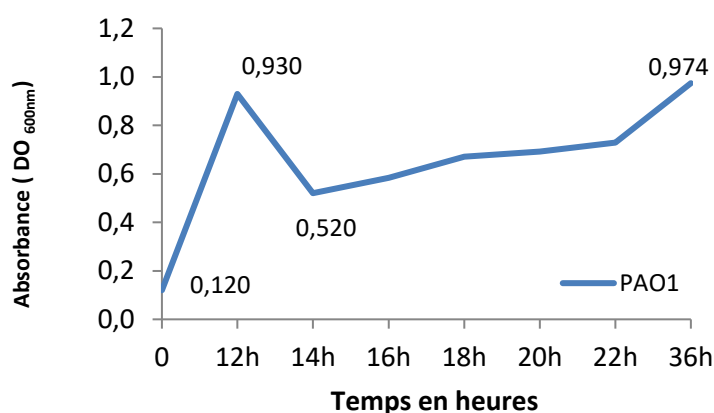


Figure 36 : Préparation de l'inoculum : culture standardisée en milieu minimum

Les 4 souches MLM, ST395E, D1 et PAO1 dont les caractéristiques sont détaillées dans le tableau 2 (cf partie II.) ont été cultivées en conditions aérobies en suivant le protocole standardisé détaillé dans la partie II. Les sous-cultures ont été préparées et utilisées pour ensemercer des milieux de culture minimum frais préparés dans l'eau minérale naturelle embouteillée de faible minéralité (**Figure 36**). Pour chaque souche, le milieu minimum ensemercé ($DO_{600nm} = 0,1$) a été placé à 30 °C en agitation 120 rpm pendant 15 h à l'obscurité dans un erlenmeyer.



Graphique 2: Croissance de la souche PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa* en milieu minimum liquide

Courbe de croissance de PAO1 réalisée en milieu minimum par mesure de la densité optique à $t = 0$ h, $t = 12$ h puis toutes les 2 h ($n=3$).nb: à $t = 12$ h la culture est diluée au demi par ajout de milieu minimum pour respecter les mêmes conditions expérimentales que lorsqu'il y a ajout des phages.

Des expérimentations préliminaires ont permis de définir les conditions permettant d'obtenir en 12 h une croissance de la souche PAO1 similaire à celle réalisée en milieu LB (Floyd *et al.*, 2016) (verrerie placée à 30°C, milieu minimum à température ambiante). Après 12 h de croissance, la densité optique de la culture bactérienne en milieu LB est généralement proche de 1,0 et comprise entre 0,850 et 0,950 pour une culture en milieu minimum (**Graphique 2**).

3. Caractérisation des phages 14.1, LUZ7 et B1:

3.1 Cinétique de multiplication des phages : « One Step Growth Curve »

Pour caractériser le cycle des phages ainsi que leur « burst size » qui correspond au nombre de virions relargués par cellules infectées, il est possible de suivre la cinétique de multiplication des virus au contact d'une population bactérienne. Les expériences ont été menées comme décrit précédemment (Gallet *et al.*, 2009) avec quelques modifications. Une culture en phase exponentielle (10^8 - 10^9 UFC/mL) de bactéries hôtes (PAO1) a été infectée avec une suspension de phages à un ratio de 0,1 ; 1 ou 10 et incubée à 30 °C pendant 10 min avec une agitation à 120 rpm. Après incubation, le mélange a ensuite été centrifugé à 10 000 rpm pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant a été titré par la méthode en double couche et utilisé pour estimer le pourcentage de phages adsorbés à la surface des cellules en 10 min.

Le culot, contenant les cellules infectées, a été remis en suspension dans un volume de 10 mL de milieu LB, incubés à 30 °C sous agitation 120 rpm. Des dilutions en série de prélèvements réalisés toutes les 5 minutes, de cette suspension, ont été effectuées pour obtenir le titre viral. Il a été choisi, pour se faire, d'utiliser la méthode en spot test (décrite dans la partie I). Comme décrit dans l'étude de Lee and Park (Lee et Park, 2015) un graphique a été tracé, représentatif de l'évolution du titre viral de la culture en fonction du temps. La période de latence a été déterminée à partir de la courbe et le nombre de phages libérés par cellules, calculé en divisant le titre maximal de virions par le titre initial ($t = 0$).

120

3.2 Microscopie électronique à transmission :

- Purification des extraits :

Pour réaliser des observations par microscopie électronique à transmission (MET), les phages B1, LUZ7 et 14.1 ont été séparément, concentré et débarrassé des débris cellulaires et autres macromolécules issues de l'hôte, par une méthode rapide de centrifugation adaptée du protocole décrit par (Bonilla *et al.*, 2016). Un volume de 500 μ L d'une solution stock de phages préalablement vortexés, a été placé dans la partie supérieure d'un Amicon® (Amicon® Ultra-0,5 centrifugal filter units, Ultracel 100 kDa membrane, Millipore) avant d'être centrifugés durant 5 min à 14 000 rpm. Une taille de pore de membrane de 100 kDa équivaut au diamètre d'une particule sphérique d'environ 3 nm et est donc suffisante pour la capture de tous les bactériophages connus (Erickson, 2009). Le filtrat a été éliminé. Les phages adsorbés sur le filtre ont été décrochés en centrifugeant cette fois le centricon à l'envers dans un nouvel eppendorf. L'opération a été réalisée deux fois afin de concentrer et purifier l'équivalent de 1 mL de la solution stock. Les phages ont ensuite été conservés à 4 °C.

- Coloration négative :

En microscopie électronique à transmission (MET), un échantillon suffisamment mince est placé sous un faisceau d'électrons. Pour les échantillons biologiques l'ajout d'un contrastant se fixant tout autour des particules permet d'obtenir une image des particules (**Figure 37**). Une goutte d'environ 10 µl de l'extrait concentré de phages a été déposée sur un bout de Parafilm ou toute autre surface hydrophobe. A l'aide d'une pince fine, une grille revêtue d'un film formvar-carbone (200 mesh Copper, EMResolutions) a été déposée sur la goutte de l'échantillon durant 1 minute. La grille a ensuite été égouttée sur un papier filtre par capillarité sur les bords. Après quelques secondes de séchage, la grille a été contrastée en la déposant au contact d'une goutte d'UranylLess (EM Stain, Delta Microscopies) durant 45 secondes à 1 minute. Elle a été une nouvelle fois égouttée puis séchée avant d'être observée au microscope.

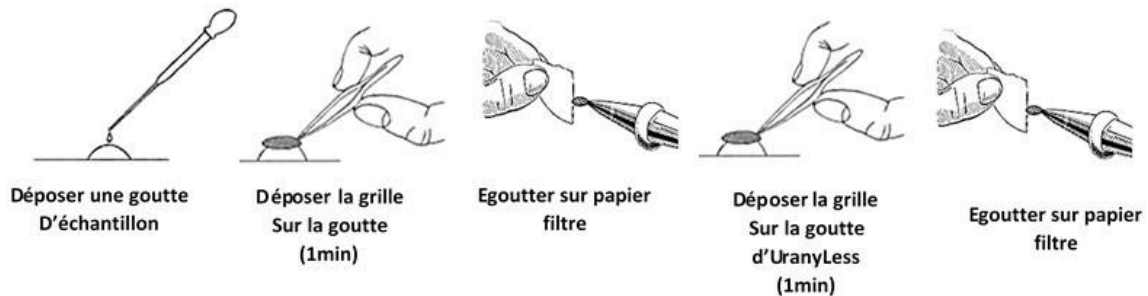


Figure 37 : Etapes du protocole de coloration négative des grilles (d'après les recommandations du fournisseur Delta microscopies)

Trois conditions d'infection sont testées : l'efficacité de trois MOI (Multiplicity of Infection) correspondant à la quantité de phages ajoutés par rapport à la quantité de bactéries présentes dans la culture, sont évaluées.

$$\text{MOI} = \text{Quantité de phages (PFU.mL}^{-1}\text{)} / \text{Quantité de bactéries (UFC.mL}^{-1}\text{)}$$

Les solutions de phages ont été respectivement préparées à partir de dilution des solutions stock dont le titre initial est d'environ 10^9 PFU.mL⁻¹. Selon la MOI souhaitée, les volumes en milieu minimum ajoutés sont plus ou moins importants. Les concentrations en phages et bactéries, utilisées sont synthétisées dans le **Tableau 21**.

Tableau 21 : Préparation des solutions de phages B1, 14.1 et LUZ7

	B1			14.1			LUZ7		
Concentration bactérienne de la culture standardisée	10 ⁸ CFU/mL								
Concentration par tubes	2.10 ⁸ CFU			2.10 ⁸ CFU			2.10 ⁸ CFU		
Concentration en phages en PFU.mL ⁻¹	2.10 ⁷	2.10 ⁸	2.10 ⁹	2.10 ⁷	2.10 ⁸	2.10 ⁹	2.10 ⁷	2.10 ⁸	2.10 ⁹
MOI ciblée	0,1	1	10	0,1	1	10	0,1	1	10

5. Efficacité des phages sur *P. aeruginosa* en milieu liquide : plan expérimental :

122

La pré-culture de bactéries a été placée à 30 °C sous agitation afin d'obtenir une culture en phase exponentielle. Après 12 h, la culture dite standardisée (t = 0 h) a été répartie à hauteur de 2 mL dans des tubes bouchonnés en verre. Au total, 9 tubes par phages ont été préparés (soit 9 tubes*3), ainsi que 3 tubes témoins dans lesquels il n'y a pas d'ajout de phages. Sur les 9 tubes, 3 sont dédiés à évaluer l'efficacité des phages dans des proportions 1/10 (1 phage/10 bactéries), 3 pour évaluer leur efficacité dans des proportions égales et les 3 derniers pour évaluer des proportions 10/1.

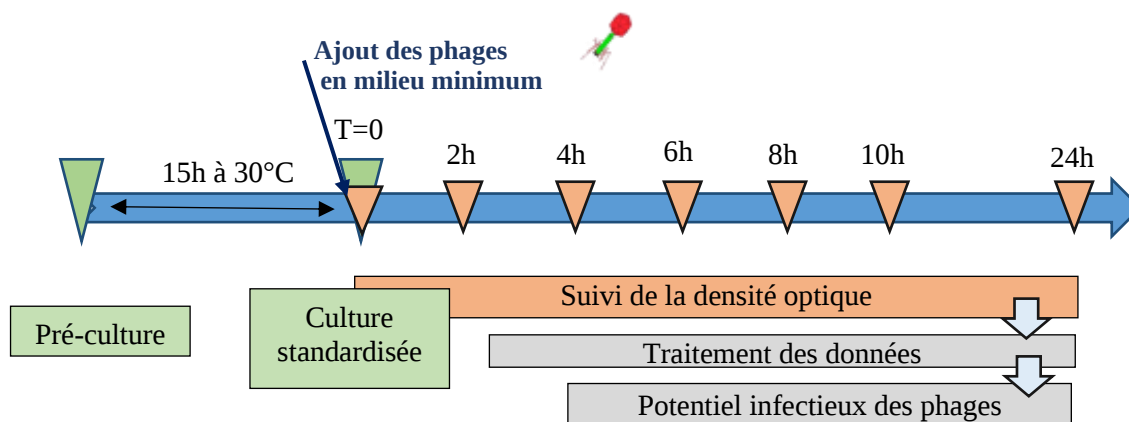


Figure 38 : Diagramme dans le temps des actions à mener depuis la réalisation d'une pré-culture en milieu minimum pour une souche de *P. aeruginosa*, jusqu' à l'obtention des données traitées sous la forme de graphiques $DO_{600nm} = f(\text{temps})$

Tous les tubes sont complétés par 2 ml de différentes solutions de phages préparées en amont (**Tableau 21**). Les tubes témoins sont complétés avec 2 mL de milieu minimum sans phages. Pour chaque condition testée (MOI / type de phage) trois réplicats sont ainsi réalisés. Au total 30 tubes de 4 ml sont placés à 30 °C sur table agitante 60 rpm et sont suivis dans le temps (de 0 à 24 h après l'ajout des phages) par mesure de la densité optique (DO_{600nm}) toutes les 2 h, pendant 10 h puis une mesure est faite après 14 h (**Figure 38**). L'évolution de la densité optique est un indicateur de la population bactérienne présente dans chaque tube.

Parmi les méthodes d'estimation de la biomasse bactérienne, la spectrophotométrie permet par mesure de la densité optique du milieu (ou absorbance) de suivre dans le temps l'évolution d'une population bactérienne. En effet la loi de Beer-Lambert implique une relation de proportionnalité entre l'absorbance (A) et la concentration (C) du milieu. Ainsi une absorbance qui augmente traduit une concentration bactérienne croissante. Un contrôle négatif contenant uniquement du milieu minimum est utilisé pour faire le zéro avant lecture des autres tubes, indispensable pour s'affranchir des propriétés absorbantes des composants du milieu.

Les données collectées sont synthétisées sous la forme de graphiques où chaque point correspond à la moyenne des valeurs de DO_{600nm} des trois tubes réplicats. Un seul graphique est réalisé par type de phage et réunit les données des tubes témoins (n=3), des tubes de MOI 0.1 (n=3), de MOI 1(n=3) et de MOI 10 (n=3). Les écarts-types ont été calculés pour chaque points des différents graphiques

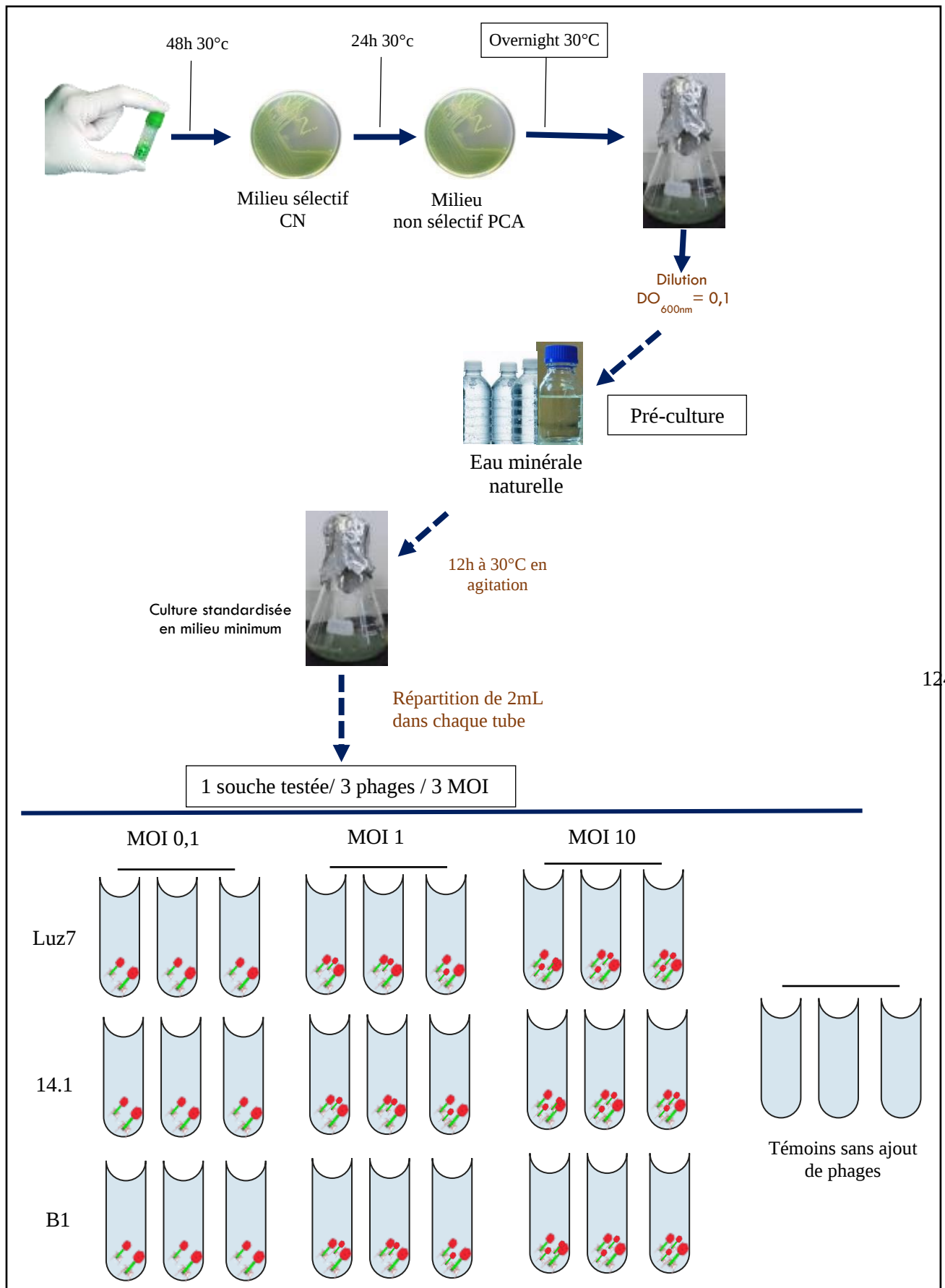


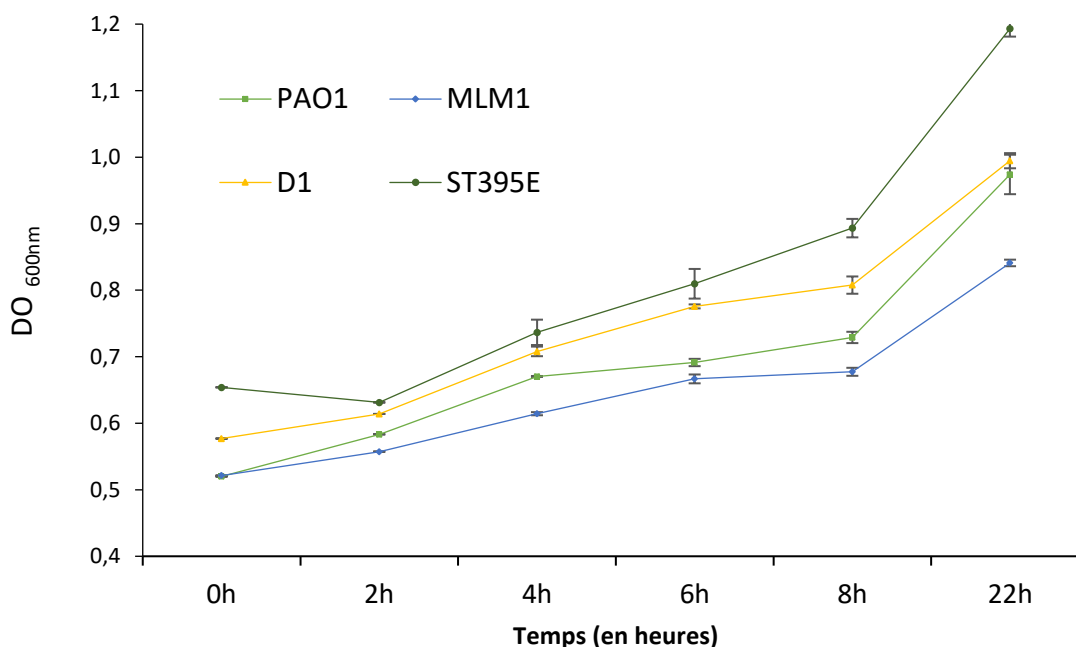
Figure 39 : Etapes du protocole permettant de tester la virulence des phages Luz7, 14.1 et B1 sur les souches de *P. aeruginosa* en milieu liquide

III.3 Résultats :

1. Milieu de culture et amplification des phages :

1.1 Validation de la croissance des souches en milieu minimum :

La croissance des souches MLM, ST395, D1 et PAO1 a été vérifiée et suivie dans le temps dans le milieu minéral minimum. Pour chaque souche, la population bactérienne de 3 tubes a été suivie par lecture de la DO_{600nm} permettant de tracer les courbes correspondantes (**Graphique 3**). La comparaison de la croissance des souches dans ce milieu a montré des valeurs de DO_{600nm} à 22 h généralement moins élevées que pour des croissances réalisées en milieu LB plus riche (tableau a, Annexe 2). En revanche, bien que les essais, pour chaque souche, aient été réalisés à des temps différents, le graphique ci-dessous permet de visualiser un comportement similaire des souches.



125

Graphique 3 : Croissance de la souche référence PAO1 et des souches MLM1, D1 et ST395 en milieu minéral minimum

1.2 Amplification, extraction et titre des phages en milieu minéral minimum :

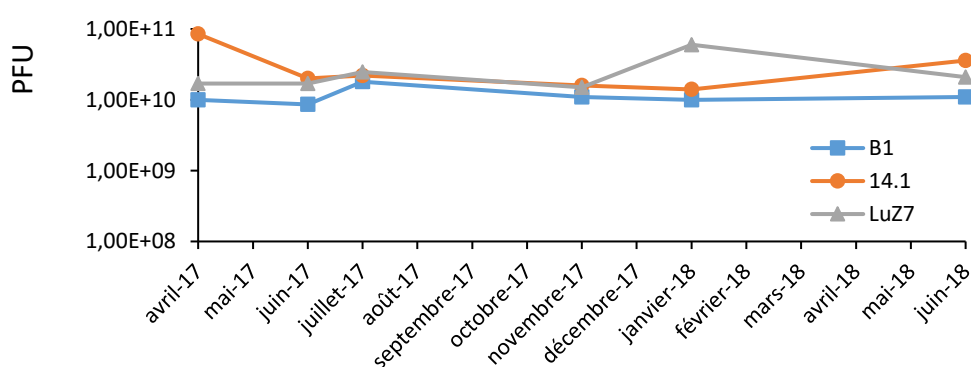
Pour respecter les conditions utilisées lors de la croissance des souches *P. aeruginosa*, les phages 14.1, LUZ7 et B1 ont été multipliés puis extraits dans le milieu minéral minimum (**Figure 40**). Tout comme pour les phages extraits en milieu LB (cf partie II), leur conservation à +4 °C a été suivie dans le temps par titrage. La souche PAO1 a donc été utilisée pour réaliser les tapis bactériens sur lesquels sont ajoutés les extraits de phages. La lecture du nombre de plages de lyses par boîte permet d'obtenir le titre viral en PFU.mL⁻¹ (Annexe 2). Toutefois, il est nécessaire de prendre en compte la dilution pour pouvoir estimer le titre de l'extrait pur.

Les résultats pour chacun des trois phages sont présentés dans le tableau b en Annexe 2. La lecture des données permet de mettre en évidence le maintien dans le temps du titre des phages conservés en milieu minéral minimum (**Graphique 4**).



Figure 40 : Amplifications des phages 14.1 en milieu minéral minimum

Dans l'erenmeyer à gauche de la figure, la culture bactérienne est en phase exponentielle, les concentrations très élevées en bactéries sont visibles à l'œil nu. A droite, la multiplication des phages durant les 12h à 30°C a entraîné la lyse des bactéries laissant apparaître un milieu de culture plus limpide.



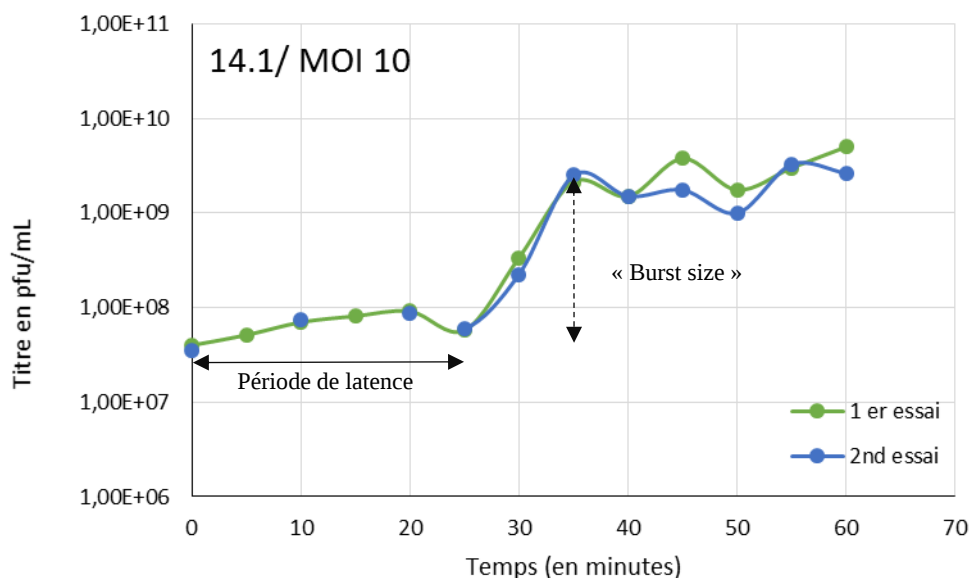
Graphique 4 : Evolution du titre des phages conservés en milieu minimum en fonction du temps

2. Paramètres de lyse des phages 14.1, LUZ7 et B1 :

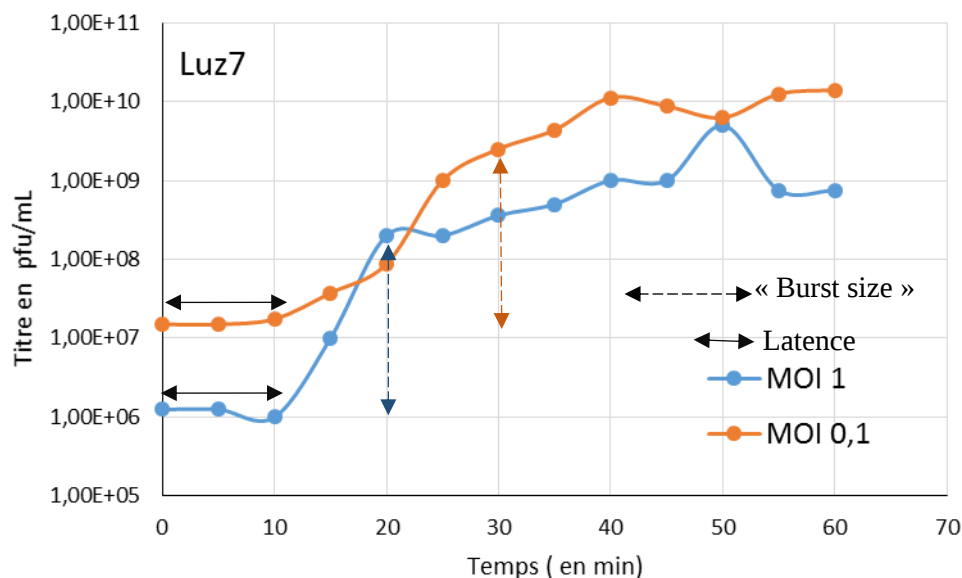
Il est possible de suivre la multiplication des phages dans le temps en suivant leur concentration dans d'une culture. Une courbe est ainsi obtenue, elle commence par une période de latence ou d'éclipse. Pendant cette phase de l'infection, l'adsorption, l'injection et la synthèse de nouveaux ADN viraux et de nouvelles protéines ont lieu. La phase suivante est appelée maturation ou stade de libération (semblable à la phase logarithmique chez les bactéries) et correspond à la phase de libération des particules de phages nouvellement synthétisées. Le cycle peut alors recommencer avec l'infection de nouvelles cellules. L'expérience décrite par Ellis et Delbrück (Ellis and Delbrück, 1939) a permis de mettre en évidence cette réplication cyclique des phages et d'en isoler la première étape.

L'expérience a été réalisée avec les phages 14.1 et les phages LUZ7 dans un premier temps en présence de la souche hôte de référence de *P. aeruginosa* PAO1. En ce qui concerne les phages 14.1, deux essais ont été réalisés indépendamment (**Graphique 5**). 10^8 bactéries ont été mises au contact de 100 μL d'une solution de phages à 10^{10} PFU. mL^{-1} soit 10^9 phages, ce qui équivaut à une MOI de 10. Après 10 min d'incubation, le tube a été centrifugé permettant de recueillir le surnageant qui a été titré à 2.10^8 PFU /100 μL de calculer le pourcentage de phages fixés à la surface des cellules :

$$((1.10^9 - 2.10^8) / 1.10^9) * 100 = 80 \%$$



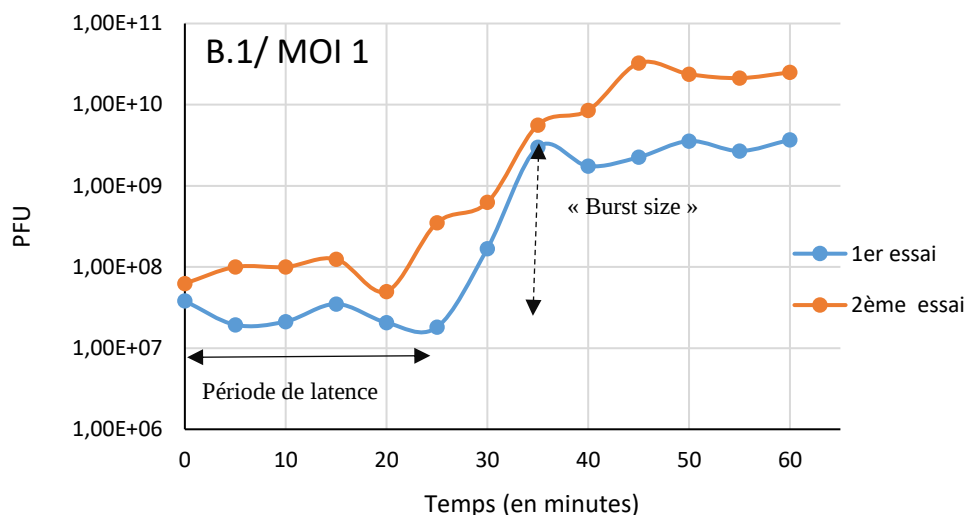
Graphique 5 : « One step growth curve » pour les phages 14.1 en présence de la souche PAO1



Graphique 6 : « One step growth curve » pour les phages Luz7 en présence de la souche PAO1

Le culot contenant les phages et bactéries en interaction, a ensuite été remis en suspension dans 10 mL de milieu LB à 30 °C et en agitation à 120 rpm avec des prélèvements toutes les 10 min. Le tracé du titre des phages (en PFU.mL⁻¹) en fonction du temps a permis d'estimer la période de latence de 20 à 25 min et le nombre de virions libérés par cellule infectée à 70 PFU (**Tableau 22**). Les phages 14.1 sont décrits dans la littérature comme appartenant à la famille des *Myoviridae* type PB1. Le phage PB1 de *P. aeruginosa* a été décrit pour la première fois il y a près d'un demi-siècle (Holloway *et al.*, 1960). Pas moins de 42 phages ont été rapportés comme étant de type PB1, principalement sur la base d'études génomiques et morphologiques. Récemment, le phage SL1 (Latz *et al.*, 2017) a été isolé des eaux usées d'un hôpital. L'analyse de son génome a révélé qu'il appartient à la même famille que 14.1 avec 96 % d'homologie de séquence. Son cycle de réplication a été caractérisé par une période de latence de 45 min ainsi qu'un nombre de virions libérés par cellule d'environ 100 PFU (Latz *et al.*, 2017). Cependant, contrairement à notre étude, la courbe de multiplication de SL1 a été réalisée à 37 °C en présence d'une souche de *P. aeruginosa* clinique multi-résistante (MDR-PA1) et non de la souche PAO1, ce qui pourrait expliquer que le temps de latence soit 20 à 25 min plus long. En effet, durant cette phase les phages doivent parvenir à injecter leur génome viral en franchissant la paroi bactérienne, hors si PAO1 est une souche sensible, d'autres souches devenues résistantes à certains antibiotiques sont susceptibles d'avoir évoluées par modification des protéines de surfaces, par exemple, ce qui pourrait interférer sur les interactions phages/ bactéries et retarder la lyse de l'hôte bactérien.

Dans le cas des phages LUZ7, les deux essais réalisés à des temps différents ont mis en évidence 128 l'influence de la MOI sur la multiplication des phages (**Graphique 6**). Si le temps de latence reste le même, on remarque que la phase logarithmique est plus longue de 10 min dans le cas de la MOI 0,1 ce qui rallonge la durée totale du cycle de réplication. Néanmoins, ces deux expériences ont permis de déterminer et confirmer le nombre de virions libérés par cellules entre 160 et 167 (**Tableau 22**). Dans la littérature, l'étude de Ceyssens *et al.*, 2010 (Ceyssens *et al.*, 2010) vise à caractériser trois phages de *Pseudomonas* génétiquement proches, dont LUZ7, appartenant à la famille des *Podoviridae*. Ces auteurs supposent que les analogies de séquence entre ces trois phages sont probablement responsables de comportements identiques d'infection et analysent les phages Pev2. Ils montrent au travers de leurs essais de multiplication que pour Pev2, le cycle de réplication réalisé à 37 °C en TBS débute par une phase de latence de 20 min suivie d'une lyse de l'hôte dans les 25-30 min libérant entre 100 et 150 virions par cellules hôtes. Dans nos essais, la phase de latence réduite à 10 min peut s'expliquer par des différences de conditions expérimentales (30 °C vs 37 °C) mais également du protocole dont les détails ne figurent pas dans l'article.



Graphique 7 : « One step growth curve » pour les phages B1 en présence de la souche PAO1

L'ajout de phages B1 dans des proportions équivalentes au nombre de bactéries (MOI 1) a permis d'estimer au cours de deux essais la phase de latence entre 20 min et 25 min et le nombre de virions relargués entre 79 et 90 par cycle (**Graphique 7** et **Tableau 22**).

Tableau 22 : Paramètres de lyse des phages 14.1, LUZ7 et B1.

129

		Pourcentage d'adsorption	Temps de latence	Nombre de virions par cellules infectées
14.1	MOI 10	80 %	20/25 minutes	~70 PFU
LUZ7	MOI 0,1	94 %	10 minutes	~167 PFU
	MOI 1	97,5 %	10 minutes	~160 PFU
B1	MOI 1	nd	20 minutes	~79/ 90 PFU

3. Morphologie des phages

Les phages ont été amplifiés pour l'observation au MET d'une part et pour les différents tests de l'étude, selon les protocoles publiés antérieurement avec quelques modifications (Bonilla *et al.*, 2016). Les phages purifiés ont été placés sur des grilles en cuivre de 300 mesh, négativement colorée avec de l'Uranyle et observées au microscope électronique à transmission sur la plateforme SC3M du CHU de Nantes.

Les observations en MET ont montré des particules possédant une tête et une queue mesurant environ 100 nm de long, suggérant que le phage 14.1 est un membre de la famille des *Myoviridae* (**Figure 41**), ce qui est en adéquation avec la littérature. La famille PB1, à laquelle appartient 14.1, rassemble des phages dotés d'une tête icosaédrique d'environ 70 nm ainsi que d'une queue non striée d'environ 50 nm (Ceyssens *et al.*, 2009).

Des images prises sur une même grille ont également permis d'observer des phages sans queue (**Figure 41**). La présence de structures similaires dans le milieu environnant, suggère que lors de la remise en suspension des phages en solution en vortexant avant de les déposer sur la grille, certains phages auraient pu être endommagés en perdant leur appendice pour laisser une excroissance (flèche rouge). Une étude de 2012 (Williamson *et al.*, 2012) met en évidence que cette altération des particules serait une source de biais lors de la caractérisation par MET. Elle souligne également que si les *Podoviridae* sont très peu touchés, 15 à 40 % des *Myoviridae* peuvent être altérés lors de l'extraction et entre 32 et 76 % pour les *Siphoviridae*.

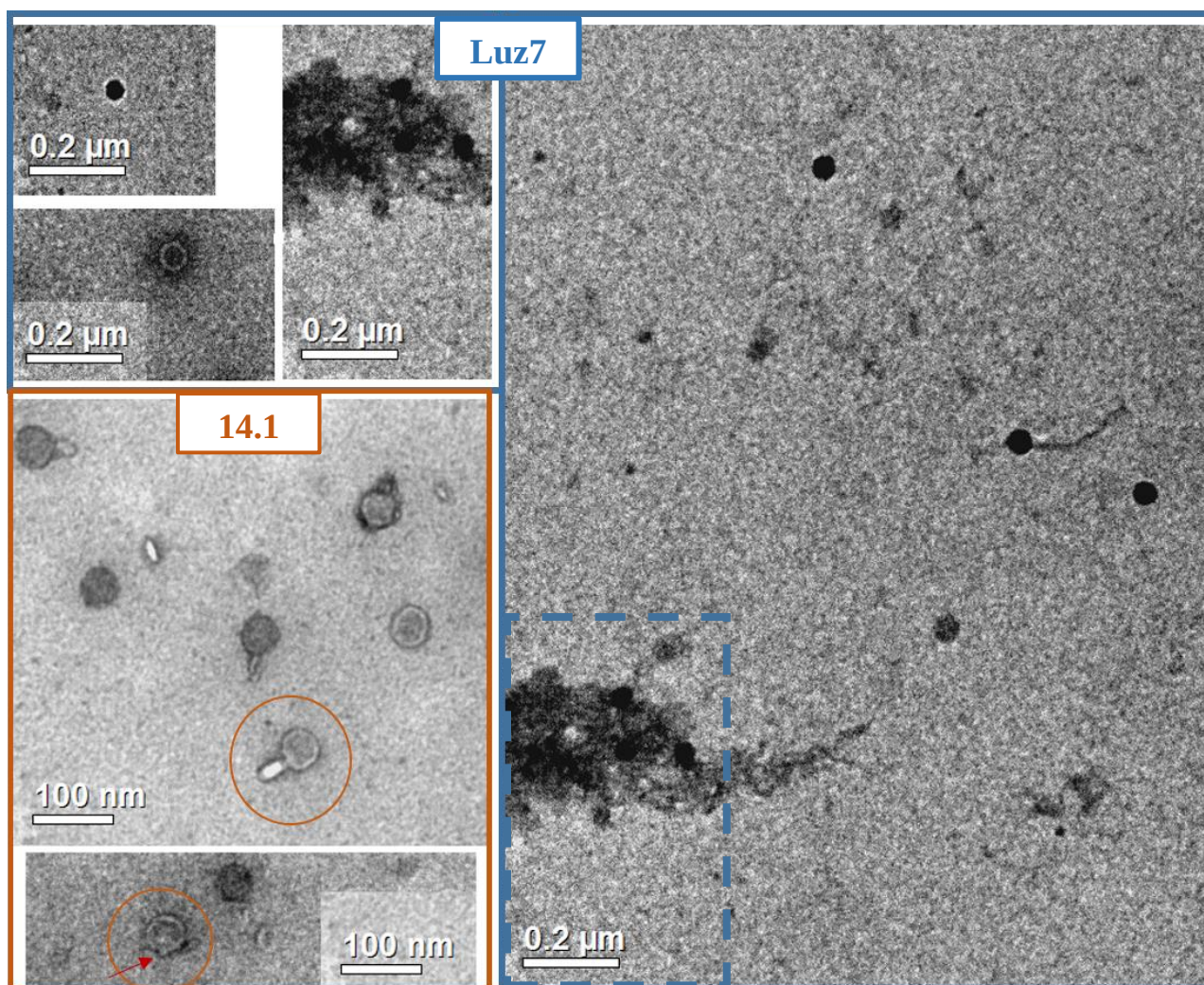


Figure 41 : Observation par MET des phages Luz7 (cadres bleu) et 14.1 (cadre orange) après coloration négative

Dans le cas des phages LUZ7, les observations faites sur les extraits purifiés montrent des structures de formes hexagonales sans queue, mesurant approximativement entre 50 et 60 nm et suggèrent une appartenance à la famille des *Podoviridae* (**Figure 41**). Dans la littérature le phage LUZ7, assimilé à la famille des virus N4 (Ceyssens *et al.*, 2010), est également décrit comme étant un *Podoviridae* avec une tête icosaédrique de 70 nm. Les observations faites par Ceyssens *et al.*, ne permettent cependant pas, d'observer la queue qui dans cette famille est considérée comme étant inférieure à 30 nm. Les différences de coloration des particules sur nos

images sont très certainement liées à la méthode de coloration. Des observations similaires avaient déjà été faites par E. Bradley en 1965 (Bradeley, 1965) dans une revue dédiée à l'étude par microscopie de la morphologie des phages. Ackermann et Tiekotter (Ackermann and Tiekotter, 2012) parlent de coloration positive. En effet dans certains cas, les ions uranyl présentent une forte affinité avec l'ADN double brin, ce qui entraîne une coloration noire à l'intérieur de la capsid. Cet artéfact est à l'origine dans la plus part des cas d'une sous-estimation de la taille de la particule virale d'environ 10 à 15 %, et ne permet pas d'observer les structures secondaires telles que la queue ou les capsomères (Ackermann and Tiekotter, 2012). De plus, il est possible que la préparation des échantillons ou encore la résolution du microscope ne nous ait pas permis d'observer les fibres caudales, caractéristiques de la famille des *Caudovirales* auxquels ils appartiennent. En effet, la présence de résidus bactériens tels que des fragments de membranes issus de la lyse, rend difficile l'observation des particules virales. Pour limiter ce genre de contaminations, certains auteurs utilisent des techniques de précipitation au PEG (Bourdin *et al.*, 2014; Lehman *et al.*, 2019), d'ultracentrifugation (Bourdin *et al.*, 2014) ou de purification par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (Vandenheuvel *et al.*, 2018).

Il a ensuite été entrepris d'analyser la solution de phages B1. Les images obtenues (**Figure 42**) mettent en évidence des particules de forme homogène et icosaédrique d'environ 60 nm. L'absence d'appendice caudale visible, lors des observations, est en faveur d'une particule virale appartenant probablement aux *Podoviridae*. A noter que les particules présentent également une coloration positive.

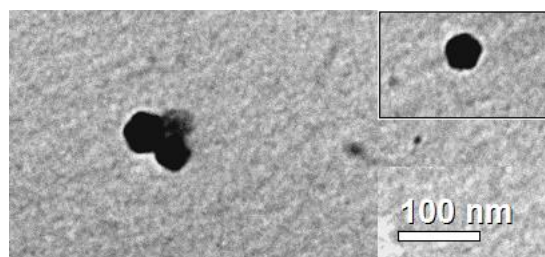


Figure 42 : Observation par MET des phages B1 après coloration à l'Uranyless

4. Efficacité des phages sur les souches cultivées en milieu minimum planctonique :

3.1 Efficacité des phages sur la souche PAO1 :

Le potentiel infectieux des phages B1, 14.1 et LUZ7 a été évalué dans un premier temps sur la souche *P. aeruginosa* de référence PAO1. Après mise en culture de la souche en suivant le protocole détaillé en amont (**Figure 39**) la culture standardisée a été répartie dans les tubes en verres et les solutions contenant les différents phages ont été ajoutées. Une première mesure de la densité optique a été alors opérée sur chacun des tubes avant l'infection ($t = 0h$). Par la suite, des mesures de densité optique ont été réalisées durant 24 h, toutes les 2 h sur l'ensemble des tubes, seule la dernière mesure des DO_{600nm} est faite 14 h après la précédente.

En ce qui concerne les trois tubes témoins dans lesquels aucun phage n'a été ajouté, la moyenne des trois réplicats permet de tracer une courbe qui débute à une valeur de 0,53 de densité optique pour atteindre 0,97 après 24 h. Dans des conditions de température, d'agitation et de nutrition qui lui sont favorables, *P. aeruginosa* est donc capable de se multiplier et ainsi de doubler sa population dans chacun des tubes. L'addition de milieu minimum à $t = 0 h$ (**Figure 38**) permet de renouveler les apports en carbone et acide aminés essentiels à la multiplication des bactéries (LaBauve and Wargo, 2012).

Les écarts types très proches de zéro (entre 0 et 0,04) indiquent, que dans les conditions de cette étude le comportement des bactéries en milieu minimum liquide de la souche PAO1 est reproductible. Les données concernant les tubes témoins ont ainsi pu être utilisées pour tracer une courbe de référence.

Pour PAO1, trois graphiques ont été construits (**Figure 43**) et mettent en avant une seule et même 132 tendance quel que soit le phage ajouté, soit une diminution en 24 h, de la densité optique passant de 0,52 à 0,01. Les trois graphiques mettent en exergue l'impact des différentes MOI sur la population bactérienne des tubes qui se traduit par une densité optique plus faible pour les tubes de MOI 10 que pour les MOI 0,1 et 1, et ce pour un même temps d'action des phages. A titre d'exemple, 4 h après l'ajout des phages 14.1, les tubes de MOI 10 présentent une DO moyennant 0,28, ceux de MOI 1 une DO de 0,4 et ceux de MOI 0,1 une DO de 0,44. Une progression similaire est obtenue les heures suivantes jusqu'à atteindre un seuil minimum. Pour les phages 14.1, l'écart entre les valeurs de DO, obtenues pour les 3 MOI, se réduit après 8 h d'action des phages ($\Delta DO < 0,06$) avant d'atteindre des valeurs minimales de l'ordre de 0,01 (Tableau a, Annexe 3).

Action des phages sur la souche PAO1

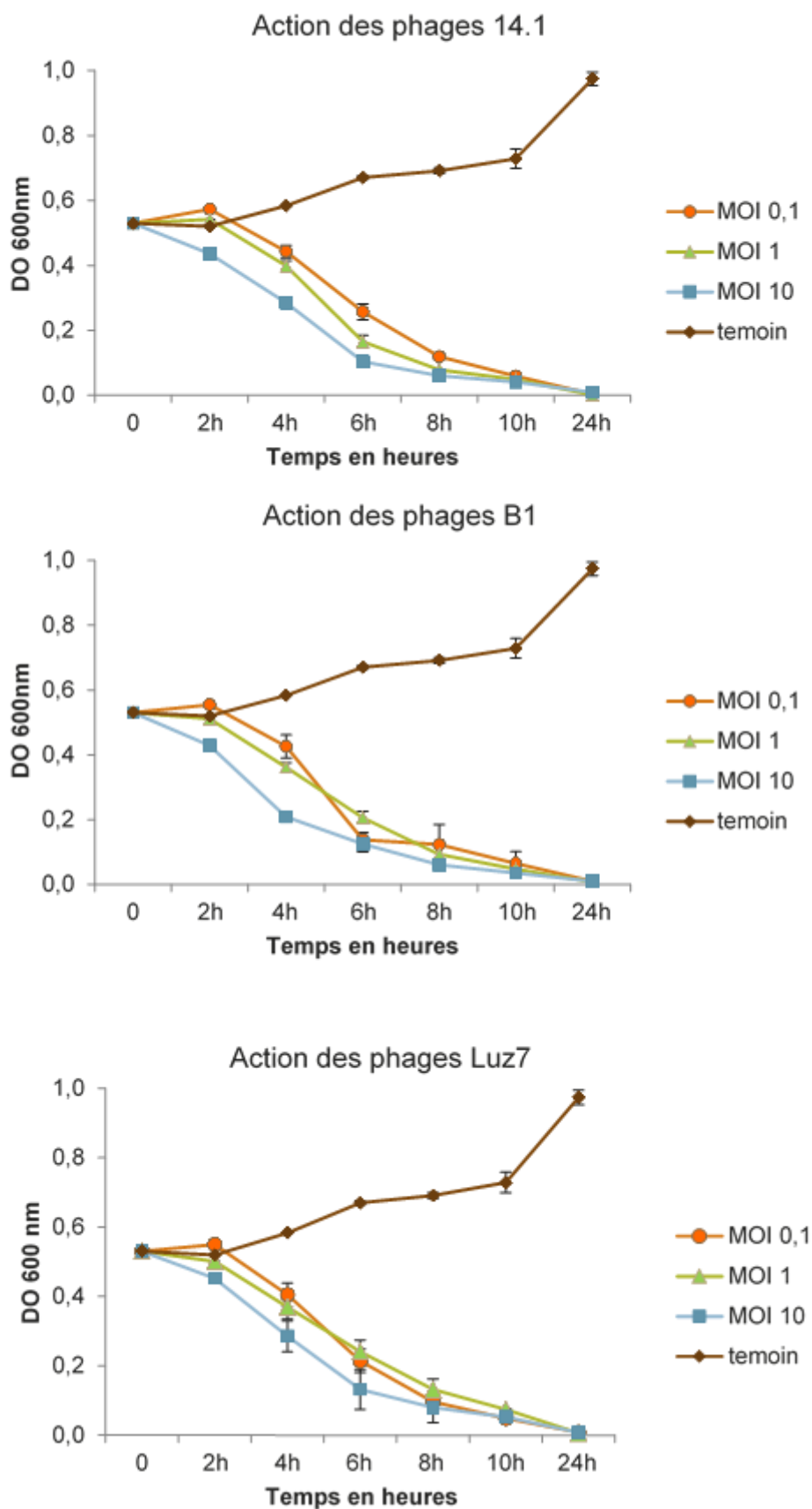


Figure 43 : Efficacité des phages B1, 14.1 et Luz7 sur la souche PAO1 de référence cultivée en milieu liquide minimum

Les premières valeurs obtenues pour chacun des phages ajoutés dans les proportions 1/10 et 1/1, à $t = 0$ et $t = 2$ h sont très proches des valeurs obtenues pour les tubes témoins. Durant cette période, bien que les phages soient présents dans le milieu de culture, la croissance des bactéries n'est pas perturbée. Ces données valident l'existence d'une phase dite de latence ≤ 2 h. Dans la littérature cette phase est décrite comme étant le laps de temps nécessaire aux phages pour d'une part se fixer à la surface cellulaire de leurs hôtes et d'autre part, pour pénétrer à l'intérieur de la cellule.

Malgré des intervalles de prélèvement trop espacés pour permettre une visualisation détaillée à l'échelle d'une heure, des concentrations plus élevées MOI 10 semblent en revanche réduire cette phase. En effet, une quantité plus importante de phages dans le milieu augmente les probabilités de rencontre entre un virus et son hôte ainsi que le nombre de bactéries infectées. La lyse des bactéries infectées est alors plus précoce.

Les données recueillies pour chacun des phages testés montrent qu'après un temps d'action de 4 h, la valeur la plus faible de densité optique est obtenue pour les phages B1 à une MOI de 10 ($DO_{600nm} = 0,20$). Ceci traduit une virulence plus forte des phages B1 en comparaison aux phages LUZ7 et 14.1, sur les premières heures de mise en contact des virus avec les bactéries hôtes.

Plusieurs paramètres du cycle de multiplication des phages peuvent être à l'origine de cette différence de virulence. La compatibilité des récepteurs entre le virus et sa cible, les conditions d'injection du génome viral, le rendement d'utilisation de la machinerie cellulaire de l'hôte pour copier le génome viral, la lyse bactérienne et le nombre de virions issus de la lyse d'une bactérie (« burst size ») sont autant d'éléments susceptibles d'influencer l'action des phages sur leur cible.

134

Concernant la densité optique suivie entre 4 et 24 h après l'infection, les différences de densité optique ont été calculés comme ci dessous et reportés dans le tableau a en Annexe 3:

$$\text{A } t = 4 \text{ h, } \Delta DO = DO_{\text{max}} - DO_{\text{min}} \text{ soit } 0,443 - 0,285 = 0,158$$

Bien qu'il existe une gradation très marquée de la DO_{600nm} en fonction de la MOI testée entre 2 h et 10 h d'action des phages, ce tableau met en évidence une diminution progressive des ΔDO_{600nm} . Après 24 h d'action des différents phages, les valeurs de densité optique sont toutes proches de zéro, à l'exception, des tubes témoins dans lesquelles la population bactérienne est à son maximum ($t = 24$ h, $DO_{600nm} \text{ témoin} = 0,974$). Il est possible visuellement de différencier les tubes ayant subi un traitement par les phages des tubes témoins (**Figure 44**).

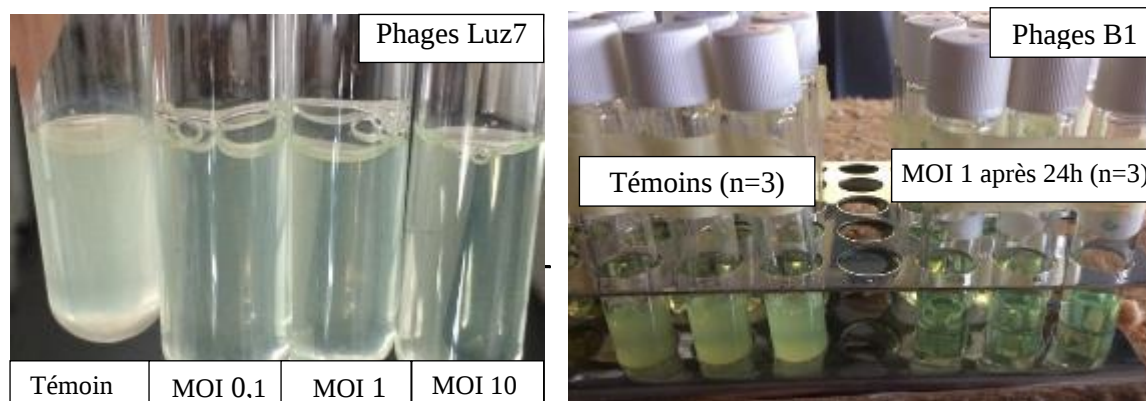


Figure 44 : Comparaison des cultures de *P. aeruginosa* PAO1 avec et sans ajout de phages

A. Comparaison du tube témoin (à gauche) avec les tubes ayant été infectés durant 4h par les phages Luz7 de concentrations croissantes. **B.** A gauche, les tubes témoins sans phages, à droite, les tubes après action des phages B1 pendant 24 h. Les cultures sont troubles pour les témoins et limpides pour les tubes test de MOI 1 après 24 h, seuls les pigments bactériens qui donnent une couleur verdâtre persistent dans le milieu ainsi que des débris cellulaires dans le fond des tubes.

En conclusion, les trois graphiques réalisés pour la souche PAO1 mettent en évidence un profil d'efficacité relativement similaire pour chacun des phages. En effet en 24 h, la densité optique des tubes contaminés diminue jusqu'à atteindre des valeurs proches de zéro, la présence des débris cellulaires étant responsable d'une absorption résiduelle.

135

3.2 Efficacité des phages sur la souche MLM :

La souche MLM provient d'une campagne de prélèvement réalisée par le CSTB (Nantes, France) au cours de laquelle un échantillon d'eau potable prélevé d'un évier d'une salle de consultation à l'hôpital s'est révélé positif pour la présence de *P. aeruginosa*. Le typage MLVA de la souche a révélé une certaine correspondance avec des souches isolées de patients atteints de mucoviscidose et ne diffère que de deux VNTR (ms77 et ms61) avec ces dernières (Vu-Thien *et al*, 2007). La réalisation de la culture standardisée a été réalisée selon le protocole détaillé auparavant (**Figure 39**), les phages ont été ajoutés dans les mêmes conditions et le suivi de la population bactérienne a été opéré de la même manière que pour la souche PAO1.

Une courbe de croissance de référence est obtenue à partir de tubes témoins pour lesquels seul du milieu minimum frais a été ajouté ($t = 0$ h). En l'absence de phages, la densité optique a été doublée, passant de 0,4 à 0,84. Des écarts-types très faibles ont indiqués un comportement reproductible de la souche dans les conditions de culture de l'étude. Pour chacun des trois graphiques présentés (**Figure 45**), cette courbe a donc été le point de comparaison qui sera utilisé pour discuter de l'impact des différents phages sur la souche MLM en milieu liquide.

L'ajout des phages B1 à $t = 0$ h ne semble pas modifier la croissance bactérienne des tubes et ce, pour chacune des MOI testées. Ce n'est qu'après 6 h d'action, que la croissance des bactéries infectées ralentie, puis

se stabilise entre 8 h et 10 h après ajout des phages (Tableau b, Annexe 3). Dès lors, les densités optiques les plus faibles sont obtenues pour une concentration en phages plus élevée que la concentration en bactéries des tubes (MOI 10). Alors que la courbe de croissance témoin est à son maximum 24 h après l'ajout des phages, la densité optique des tubes de MOI 10 chute, passant de 0,60 à 0,48. Pour des concentrations plus faibles en phages (MOI 1 et MOI 0,1), la densité optique à l'inverse se stabilise de 0,64 à 0,59, voire augmente de 0,63 à 0,66.

Concernant l'action des phages 14.1, des profils similaires à ceux décrits pour les phages B1 sont obtenus entre 0 et 6 h après inoculation des cultures bactériennes. De la même manière, après 6 h d'action des phages, les densités optiques mesurées sont inversement proportionnelles aux différentes MOI, avec les valeurs les plus faibles pour les tubes de MOI 10 (Tableau b, Annexe 3). Bien que la croissance se stabilise entre 8 et 10 h, toutes les valeurs augmentent à nouveau durant les 14 h qui suivent, tout en restant inférieures à celles de la courbe témoin (DO_{600nm} Témoin 24 h > DO_{600nm} 24 h).

Action des phages sur la souche MLM

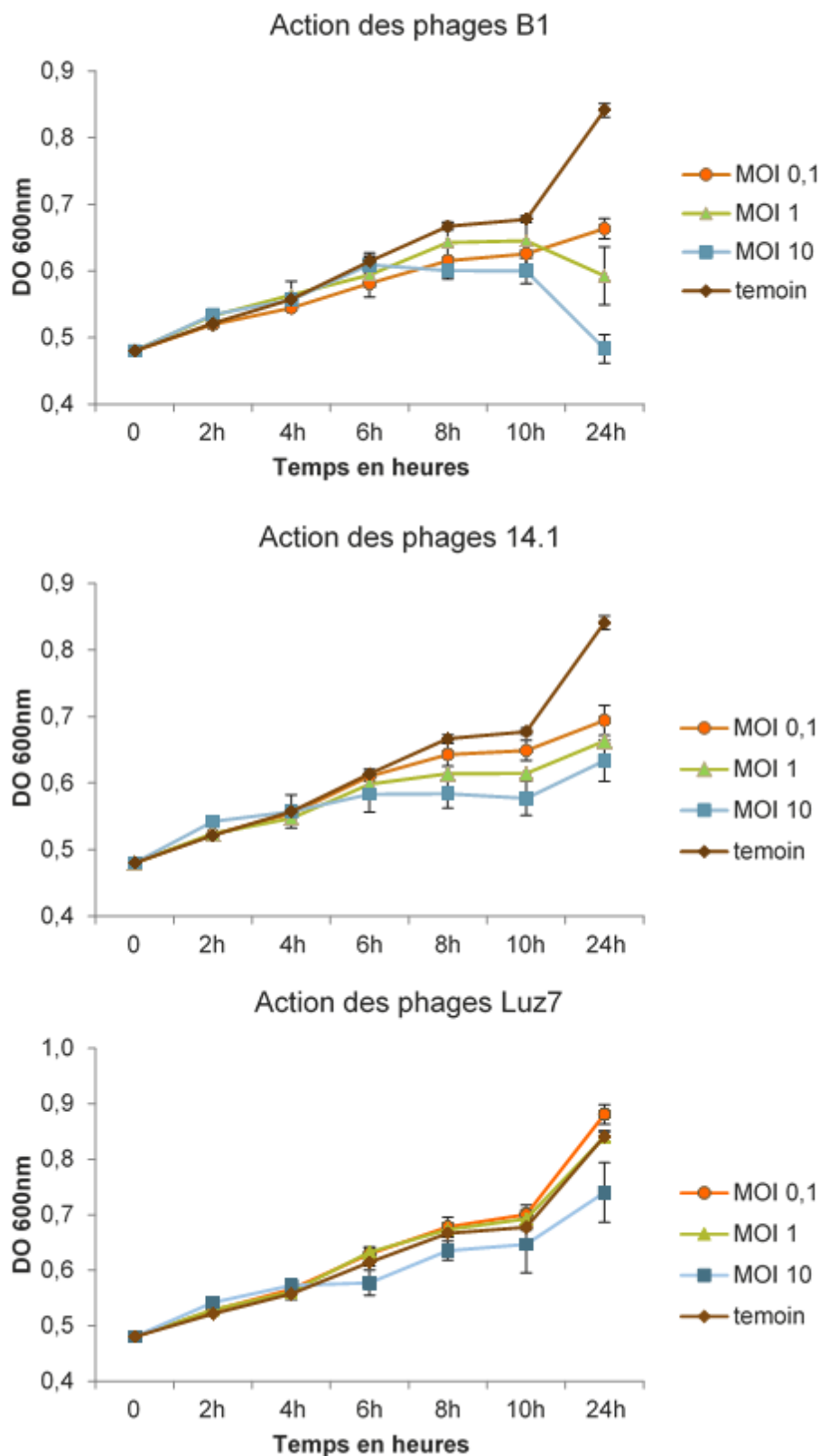


Figure 45 : Efficacité des phages B1, 14.1 et Luz7 sur la MLM cultivée en milieu liquide minimum

D'une manière générale, l'ajout des phages LUZ7 ne modifie pas la croissance bactérienne et ce, même après un temps d'action de 24 h. Seuls les tubes de MOI 10 présentent un léger ralentissement de la croissance qui se traduit comme tel :

$$\text{A } t = 6 \text{ h; } 8 \text{ h; } 10 \text{ h : DO}_{600\text{nm}} \text{ MOI } 10 \text{ (n=3)} = \text{DO}_{600\text{nm}} \text{ témoin (n= 3)} - 0,030$$

$$\text{A } t = 24 \text{ h : DO}_{600\text{nm}} \text{ MOI } 10 \text{ (n= 3)} = \text{DO}_{600\text{nm}} \text{ témoin (n= 3)} - 0,100$$

Pour les trois phages testés sur la souche MLM, les graphiques mettent en avant un temps de latence supérieur à ce qui a été observé avec la souche de référence PAO1 (≤ 2 h). En effet, il faut attendre 6 h pour visualiser l'impact des différents phages sur la croissance de la souche. Durant cette première phase, les bactéries continuent de se multiplier et les phages doivent : i) se fixer aux récepteurs de l'hôte, ii) injecter leur génome, iii) se multiplier, avant de provoquer la lyse bactérienne. Dans les conditions de l'étude, il est possible d'assimiler cette phase à la période dite « elipse period » (Weinbauer, 2004) qui correspond à toutes les étapes du cycle d'infection d'un phage en amont de la lyse cellulaire, tout en prenant en compte les différents paramètres susceptibles d'influencer sa durée.

Contrairement à la souche PAO1, des profils différents sont obtenus selon le type de phages ajoutés. Seuls les graphiques concernant les phages B1 et 14.1 montrent tous deux, un état stationnaire des $\text{DO}_{600\text{nm}}$, entre 8 h et 10 h d'action, quelques soient les MOI testées. Il est possible que des mécanismes de résistance bactériens limitent l'action des virus sur les bactéries. Dans la littérature, quatre mécanismes de défense innée sont distingués en fonction de leur point d'action dans le cycle de vie des phages (Shabbir *et al.*, 2016): l'inhibition de l'adsorption, le blocage de l'injection d'ADN, la restriction-modification et l'infection abortive (cf Partie I, Chapitre 1.5). Au travers de tels mécanismes, un équilibre entre croissance et lyse peut alors être atteint.

Au-delà des 10 h après l'ajout des phages, trois cas de figures se dessinent :

- En présence des phages B1 (MOI 10), cet équilibre est rompu et le taux de lyse des bactéries devient supérieur au taux de croissance. La population bactérienne infectée est alors diminuée de 43 % par rapport aux tubes témoins. En effet, les phages sont également capables d'évoluer et de s'adapter. En modifiant leur génome par mutations (Tock and Dryden, 2005) ou méthylations (Bickle and Kruger, 1993), certains virus parviennent à contourner les résistances bactériennes et à maintenir leur capacité d'infection. En revanche, toujours en présence des phages B1, cet équilibre est maintenu pour des MOI plus faibles (MOI 0,1) et (MOI 1).

- Les mesures réalisées à 24 h pour les cultures infectées par 14.1 sont supérieures à celles réalisées 14 h auparavant, quelques soient les MOI testées. L'équilibre est rompu en faveur de la croissance bactérienne. Toutefois, la population reste inférieure à celle des tubes témoins.
- L'ajout des phages LUZ7 ne modifie en rien la croissance des cellules MLM et ce, durant tout l'essai. Les valeurs de densité optique sont très fortement similaires à celles obtenue pour la souche cultivée en l'absence de phages.

La construction des différents graphiques permet d'analyser le profil de virulence des phages LUZ7, B1 et 14.1 sur la souche MLM d'origine hospitalière. Dans les conditions de cultures fixées lors de cette étude, seuls les phages B1 dans des concentrations 10 fois supérieures aux bactéries sont susceptibles d'agir sur la population bactérienne totale. En revanche, il faut attendre 10 h après l'ajout des phages pour obtenir une baisse de la population de 43 % seulement, en comparaison à la souche PAO1 pour laquelle la population totale avait été divisée par 7 pour un même temps d'action. Les phages LUZ7 et 14.1 quant à eux, ne parviennent pas à agir significativement sur la population totale.

3.3 Efficacité des phages sur la souche ST395E :

Tout comme la souche MLM, la souche ST395E est issue également d'un prélèvement d'eau potable d'un évier d'une unité de soin intensif dans un hôpital. Le typage MLVA de la souche a révélé des correspondances avec les mêmes souches que pour MLM, provenant de patients atteints de mucoviscidose. La souche ST395E ne diffère que de deux VNTR (ms77 et ms61) avec ces dernières (Vu-Thien *et al*, 2007). Cette souche fait partie de la sélection qui a été réalisée auparavant sur boîte de pétri par la méthode en double couche. De la même manière que pour les souches PAO1 et MLM, une culture standardisée a été réalisée en milieu minéral minimum tout en respectant le protocole détaillé auparavant (**Figure 39**). Cette dernière a été répartie dans des tubes en verre, complétés par les différentes solutions de phages (**Tableau 21**). Les tubes témoins ont été complétés par du milieu minéral minimum sans phages.

La croissance de la souche en milieu minéral minimum est utilisée comme référence pour l'analyse des tubes témoins. En l'absence de phages, la densité optique moyenne de la souche ST395E progresse de 0,63 à 1,19, doublant ainsi la population bactérienne en 24 h. Toutefois, il faut attendre 6 h avant d'observer une première augmentation significative de la densité optique (**Figure 46**).

L'ajout des phages B1 affecte la croissance bactérienne après 6 h d'action, pour la MOI 10 et après 8 h pour la MOI 0,1 et MOI 1 (**Figure 46**). Sur l'intervalle de temps 6 h-24 h, bien que les différences de DO_{600nm} entre les trois MOI soient inférieures 0,2, il existe tout de même une gradation en fonction de la MOI testée.

Ainsi, pour $t = 8$ h, $t = 10$ h et $t = 24$ h : $DO_{600nm} [MOI 10] < DO_{600nm} [MOI 1] < DO_{600nm} [MOI 0,1]$

140

Après 24h d'action, en comparaison avec le témoin, la densité optique des tubes est divisée par 3,5 [MOI 10], par 3 [MOI 1] et par 2,7 [MOI 0,1], soient des concentrations relativement similaires.

A l'inverse, l'ajout des phages LUZ7 ne modifie pas la croissance bactérienne qui reste identique à celle des tubes témoins durant les 10 premières heures. Un ralentissement de la croissance est visible par la suite, toutefois les DO_{600nm} restent supérieures à 1 quelques soient les MOI testées.

En présence des phages 14.1, il faut attendre entre 4 et 6 h après leur ajout pour observer dans un premier temps, un ralentissement de la croissance, puis un maintien des DO_{600nm} entre 6 et 10 h. Durant ces 4 h, les valeurs de DO_{600nm} sont stationnaires (Tableau c, Annexe 3) pour les trois MOI, avant d'augmenter de nouveau. De la même manière que pour les phages B1, il existe une gradation des DO_{600nm} selon la MOI testée. Après 24 h d'action, la DO_{600nm} moyenne la plus faible est obtenue pour la MOI 10. En comparaison aux tubes témoins, les valeurs sont divisées par 1,6.

Action des phages sur la souche ST395E

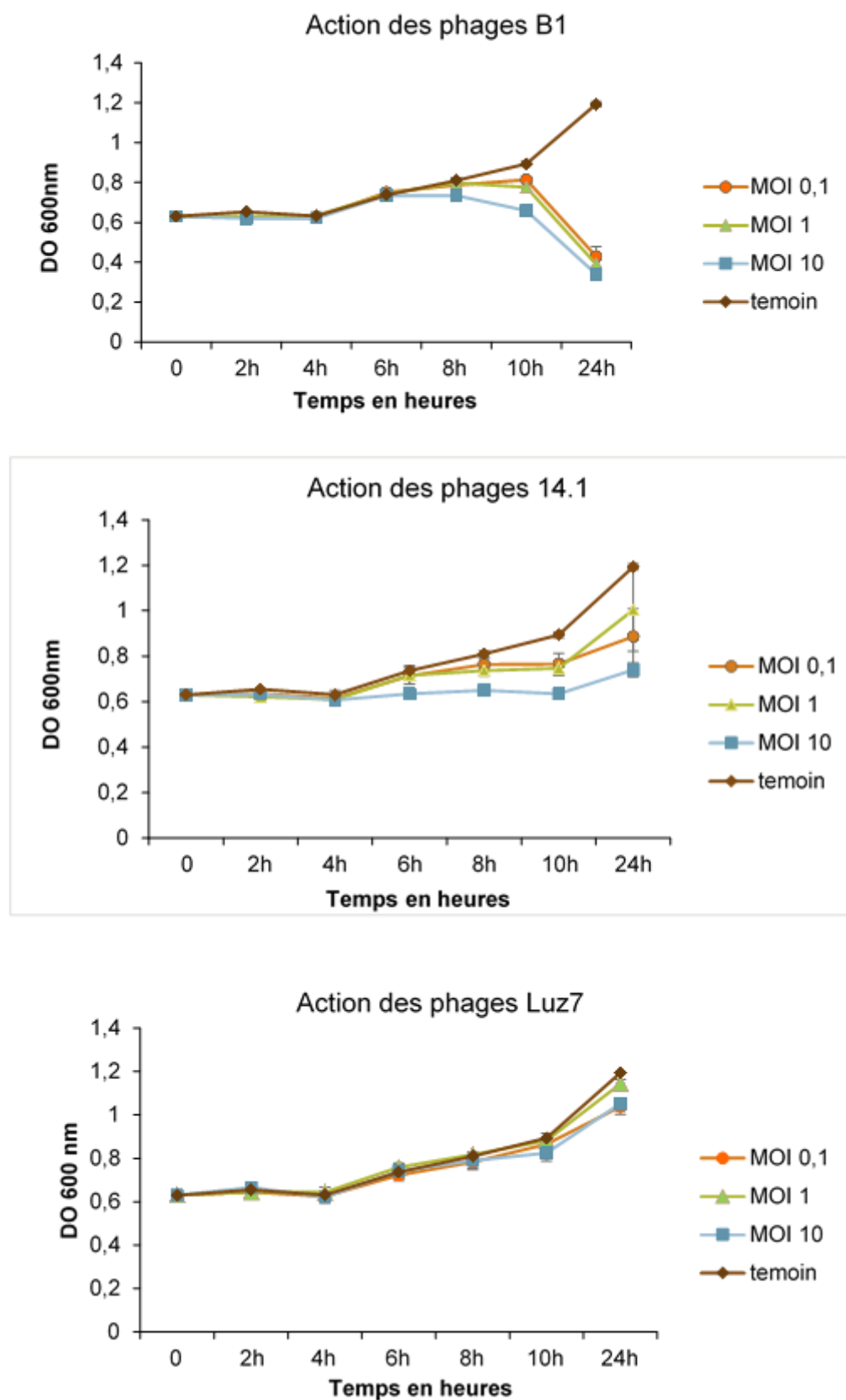


Figure 46 : Efficacité des phages B1 14.1 et Luz7 sur la souche ST395E cultivée en milieu liquide minimum

La souche ST395E d'origine hospitalière se comporte différemment des souches MLM et PAO1. Après l'ajout de milieu minéral minimum supplémentaire dans les tubes témoins, il faut attendre 4 h avant que la souche reprenne sa croissance. La modification du milieu par ajout de nouveaux composés peut probablement expliquer cette période d'adaptation, qui selon la souche bactérienne peut être plus ou moins longue.

Dans les conditions de cultures de cette étude, il a été mis en évidence une efficacité des phages B1 sur la souche ST395E. Toutefois, il s'agit d'une action tardive n'intervenant que 6 h après leur ajout dans le milieu. Au total, 24 h sont nécessaires pour que leur présence permette une réduction de la population allant de 64,1 % à 71,5 % selon la MOI.

Dans des concentrations 10 fois supérieures aux bactéries, les phages 14.1 neutralisent jusqu'à 38 % de la population bactérienne et les phages LUZ7 seulement 13,1 %.

3.4 Efficacité des phages sur la souche D1 :

La souche environnementale D1 a été fournie par le Laboratoire d'Hydrologie-Environnement de l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de Bordeaux. Isolée à partir d'un prélèvement d'eau thermale, elle ne présente aucune correspondance avec les souches répertoriées dans la base de données (dernière consultation en 2015). Les expérimentations en « spots test », réalisées en « double layer » sur boîtes de Pétri et détaillées dans la partie précédente, ont révélées une sensibilité de la souche à plusieurs phages, dont B1, LUZ7 et 14.1. La souche D1 a donc été sélectionnée pour évaluer le potentiel de ces trois phages en milieu liquide minimum.

Dans les mêmes conditions que pour les souches PAO1, MLM et ST395E, une culture standardisée est réalisée en milieu minimum (**Figure 36**), puis est répartie dans des tubes en verre (**Figure 39**). Bien que certains tubes ne soient supplémentés que de milieu minimum (témoins), les autres sont complétés par les différentes solutions de phages préparées en amont (**Tableau 21**). Les tubes sont placés à 30 °C en agitation et la densité optique est suivie dans le temps, de telle sorte qu'il est possible de construire trois graphiques $DO_{600nm} = f(tps)$ selon le type de phages ajouté.

En l'absence de phages, la densité optique des tubes témoins augmente régulièrement de 0,61 à 0,99 en 24 h. Une évolution similaire de la population bactérienne avec de faibles écarts-types calculés pour chaque point (**Figure 47**) a permis de tracer une courbe de référence.

En présence des trois phages différents 14.1, B1 et LUZ7, les populations bactériennes des tubes décroissent jusqu'à atteindre des valeurs de densité optique de l'ordre de 0,11 à 0,15 après 24 h d'action, soit 9 fois inférieures aux valeurs obtenues pour les témoins. L'impact de la MOI est également visible dès les deux premières heures après l'ajout de chaque type de phages (**Figure 47**). D'une manière générale, les différences de DO entre la courbe témoin et les courbes obtenues à partir de différentes MOI, augmentent entre 2 et 6 h après l'ajout des phages avant de réduire jusqu'à être proches de zéro après 10 h (Tableau d, Annexe 3). Bien qu'il existe une gradation des DO_{600nm} proportionnelle aux MOI durant ces dix premières heures d'actions des phages, les valeurs atteignent toutes un minimum à $t = 10$ h.

En termes d'efficacité, la comparaison des graphiques à $t = 6$ h met en avant une action plus rapide des phages 14.1 et LUZ7 pour les MOI 10 avec des DO_{600nm} de 0,14 et 0,17 plus faible que pour les phages B1 (0,24). En effet, la population bactérienne est divisée par 2,6, entre 4 h et 6 h après l'ajout des phages 14.1 et LUZ7 et seulement par 1,8 en présence des phages B1.

Action des phages sur la souche D1

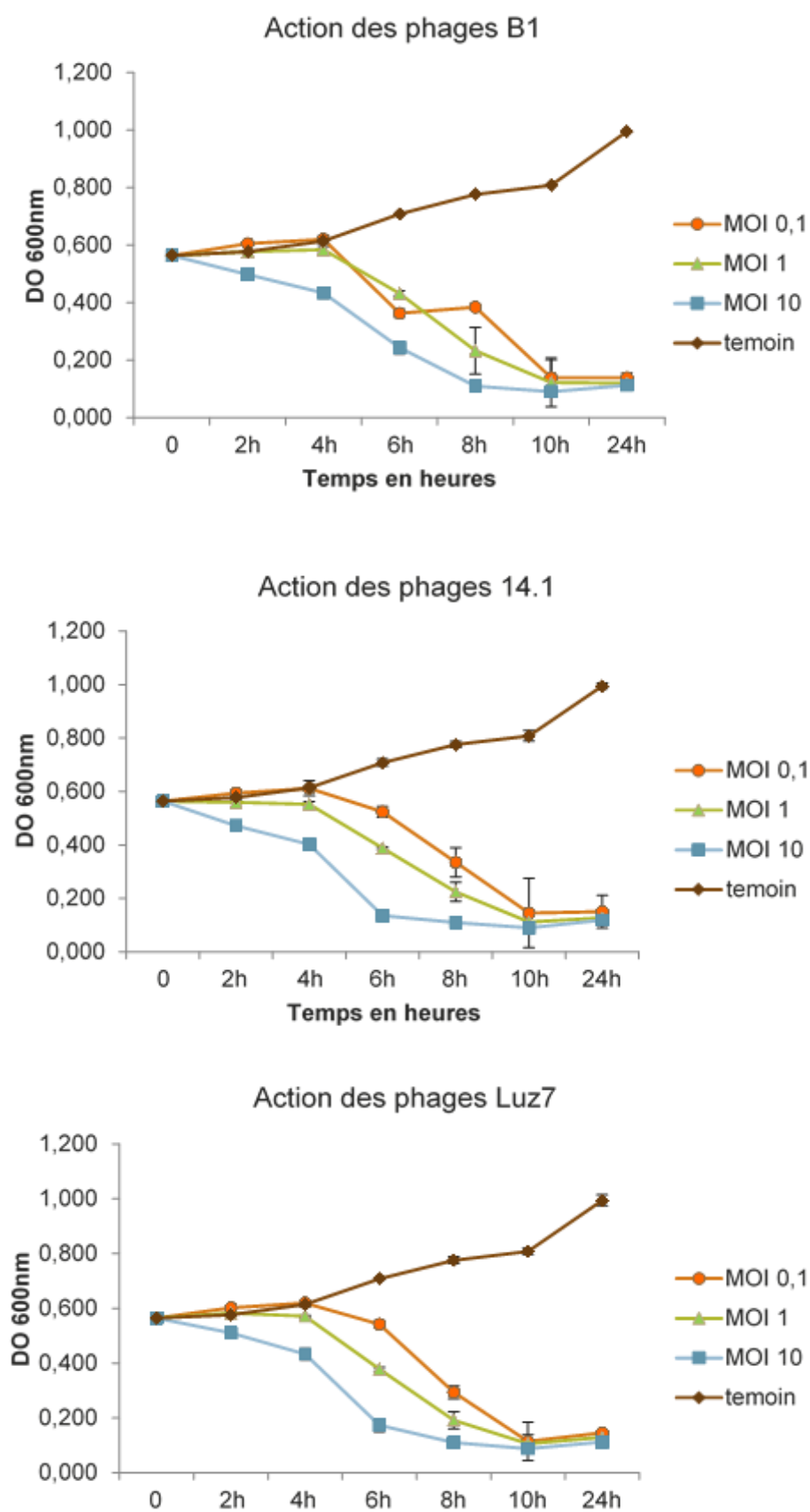


Figure 47 : Efficacité des phages B1, 14.1 et Luz7 sur la souche D1 cultivée en milieu liquide minimum

En présence des phages, le comportement de la souche D1 d'origine thermale est semblable à celui de la souche de référence PAO1. Contrairement aux souches précédentes MLM et ST395E pour lesquelles différents profils d'actions des phages ont été obtenus, dans le cas de la souche D1, seule l'efficacité des phages diffère. En effet, bien que les trois phages, d'après les données de densité optique, diminuent de 90 % la population bactérienne des tubes en 24 h, il est à noter que :

- Leur efficacité sur la souche est dépendante de la MOI utilisée lors de l'infection. Ainsi après 8 h d'action des phages, les populations bactériennes (au regard de la densité optique) sont divisées par 7 pour les MOI 10, par 4 pour les MOI 1 et par 2 pour les MOI 0,1.

- Les phages 14.1 et LUZ7 agissent plus rapidement sur la population bactérienne que les phages B1. Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette différence de virulence. Dans la littérature, les phages LUZ7 et 14.1 sont décrits comme des virus utilisant les LPS (lipopolysaccharides) présents à la surface des bactéries hôtes comme récepteurs pour l'étape d'adsorption (Ceyssens *et al*, 2009, 2010). Il est donc possible que les phages B1 n'utilisent pas le même types de récepteurs bactériens. Selon leur quantité et leur affinité avec le récepteur viral, le délais de relargage des premiers virions dans le milieu peut donc être plus ou moins long et leur action de lyse bactérienne retardée. D'autre part le « burst size » déterminé comme étant le nombre de virions relargués par une bactérie, diffère d'un phage à un autre et impacte la population bactérienne dans des délais variables (Weinbauer, 2004).

- Après 10 h d'action, la population bactérienne atteint un seuil minimal avec des valeurs d'absorbance proche de 0,1. Néanmoins, les relevés suivant effectués 14 h après sont supérieurs aux précédents. A titre d'exemple, pour les phages LUZ7 ajoutés à une MOI 10, l'absorbance augmente de 0,088 à 0,112 ou encore de 0,11 à 0,15 pour la MOI 0,1. Dans les conditions de cette étude, il est difficile de statuer sur une éventuelle recroissance des bactéries en se basant sur une seule mesure ($t = 24$ h). En revanche, des expérimentations préliminaires réalisées sur des temps plus long (35 h) m'ont permis d'observer ce phénomène de recroissance sur la souche D1 après 10 h d'action des phages B1 et 14.1. Bien que les phages soient virulents et permettent une diminution significative de la population bactérienne > 80 %, 12 h supplémentaires ont été suffisantes pour doubler à nouveau la concentration en bactéries. L'étude de Pires *et al*, (Pires *et al.*, 2011) portant également sur des infections en milieu liquide de *P. aeruginosa* montrent également qu'après 10 h de traitement avec les phages, la phase initiale de déclin de la population de *P. aeruginosa* et suivie d'une période de recroissance dû à l'apparition de résistances.

Cette étude a mis en avant la sensibilité de la souche D1 aux phages LUZ7, B1 et 14.1, dès les premières heures qui suivent leur ajout. Leur action anti-bactérienne se traduit par une diminution de l'absorbance mesurée, proportionnelle aux quantités de phages ajoutés. Les phages LUZ7 et 14.1 appartiennent à des genres différents, toutefois les données existantes indiquent qu'ils utilisent tout deux les LPS bactériens comme récepteur d'adsorption, ce qui pourrait expliquer cette différence d'efficacité en comparaison aux phages B1, n'ayant pas encore été caractérisés.

III.4 Conclusion

Dans cette partie, la croissance en milieu liquide minéral minimum de quatre souches de *P. aeruginosa* a été vérifiée dans le temps avant d'être utilisée pour évaluer le potentiel bactéricide des trois phages sélectionnés en amont. Les phages LUZ7, B1 et 14.1 issus du panel ont été sélectionnés pour leur capacité infectieuse vis-à-vis des souches par la méthode des plages de lyses sur géloses.

Afin d'écarter l'hypothèse de mécanismes de type « Lysis from without » énoncés dans la partie précédente, les phages ont été caractérisés en isolant la première étape du cycle de multiplication. Les paramètres de lyse ont pu être déterminés, confirmant ainsi le caractère lytique des trois phages.

Les observations de microscopie ont permis de confirmer l'aspect morphologique des phages 14.1 et LUZ7 (Ceyssens *et al.*, 2010, 2009), tous deux étant connus dans la littérature comme des phages appartenant respectivement aux familles des *Myoviridae* et *Podoviridae*. Celles-ci forment, avec la famille des *Siphoviridae*, l'ordre des *Caudovirales* qui regroupent 96 % des phages connus. Leur séquence en ADN double brin respective est empaquetée dans une capsidie icosaédrique sur laquelle il est possible de voir greffé, un appendice généralement > à 30 nm de long, contractile pour les *Myoviridae*, et flexible pour les *Siphoviridae*. Des observations de l'extrait de phages isolés des eaux usées permettent de poser l'hypothèse que les particules virales B1 appartiennent à la famille des *Podoviridae*. Cependant, les résultats de ces observations sont interprétés avec prudence dû fait de l'existence de certains artefacts. L'amélioration de l'analyse pourrait être envisagée en ajoutant des protéines au contrastant pour réduire l'incidence de la coloration positive (Ackermann and Tiekotter, 2012). Afin de limiter la contamination des extraits de phages par des débris cellulaires bactériens, des techniques d'ultracentrifugation par gradients de Chlorure Césium (CsCl), par précipitation au Polyéthylène Glycol (PEG) ou de purification sur colonne échangeuse d'ions, pourraient être envisagées en amont (cf partie I, chapitre 1.4) 146

Bien que l'aspect morphologique des particules soit utilisé pour la classification des phages, il n'est pas possible de se limiter à des observations par MET pour caractériser très finement un phage. Une analyse plus précise des particules virales peut être envisagée sur la base de leur génome. Ceci nécessiterait d'extraire l'ADN de chacun des phages puis de réaliser des profils de restriction permettant une identification de chaque phage grâce à leur empreinte génétique, également appelée RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). En choisissant des enzymes capables de reconnaître des sites de restriction identiques sur les séquences d'ADN des phages, il est ensuite possible de comparer les produits de la digestion après migrations sur un gel d'agarose électrophorétique. Pour les phages dont le génome est déjà séquencé, la séquence en format FASTA peut être utilisée dans le logiciel NEBcutter V2.0 (Vincze *et al.*, 2003) pour sélectionner les enzymes de restriction et simuler le résultat du gel électrophorétique après une digestion enzymatique (<http://tools.neb.com/NEBcutter>). Ce type de démarche a été utilisée en complément des images de microscopie pour caractériser une collection de 68 phages infectant *P. aeruginosa* isolés à partir de l'environnement et d'échantillons d'eaux usées, au centre du Mexique (Sepúlveda-Robles O., Kameyama L., 2012).

Dans le cas des particules virales B1, un séquençage du génome pourrait être envisagé et par la suite comparé aux séquences déjà connues dans les bases de données (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Il serait ainsi possible par homologie de séquence de s'assurer qu'il ne s'agisse pas d'un phage déjà connu (Ceyssens *et al.*, 2009). Dans le cas contraire, il sera possible d'identifier des séquences codantes pour des protéines d'intérêts telles que les dépolymérases ainsi que d'autres protéines architecturales susceptibles de fournir des informations sur les mécanismes d'infection de la particule. Dans leur étude, Alves *et al.* (Alves *et al.*, 2015) ont ainsi annoté le génome de 6 phages en utilisant le logiciel de comparaison et d'analyse des séquences Artemis (Rutherford *et al.*, 2000).

Le milieu minimum mis au point en amont à partir d'eau minérale naturelle a permis de réaliser des cultures de chacune des souches tout en respectant des conditions de croissance favorables à la multiplication cellulaire. Plusieurs études ont déjà montré qu'un taux maximum de prolifération, ainsi qu'un rendement élevé en phages sont observés pour des conditions de croissance optimales de l'hôte (Cerca *et al.*, 2007; Lenski, 1988; Sillankorva *et al.*, 2004b). Le statut nutritionnel et métabolique des bactéries est également susceptible d'impacter l'infection virale (Weinbauer, 2004). Moins riche que les milieux Luria Broth (LB), King B ou Tryptic Soy Broth (TSB) souvent utilisés dans la littérature pour des cultures cellulaires, ce milieu contient les éléments nutritifs nécessaires au bon fonctionnement du métabolisme bactérien tout en étant plus représentatif d'un environnement hydrique dans lequel les contaminations bactériennes sont susceptibles de se développer.

Les phages ont également été amplifiés puis extraits en milieu minéral minimum permettant de s'affranchir du milieu LB d'origine et de ne pas interférer sur la culture lors de leur ajout dans la culture bactérienne. Pour chaque souche, une culture standardisée a été réalisée en erlenmeyer puis transférée dans des tubes en verre. Des séries de trois tubes sont utilisées pour tester l'effet des phages selon leur concentration dans le milieu (MOI). Durant les 24 h suivant l'ajout, la lecture de la densité optique par un spectrophotomètre à tubes a permis d'établir des profils de virulence de chacun des phages sur chacune des souches en milieu liquide tout en prenant en compte l'impact de la dose virale (MOI).

L'analyse des résultats obtenus pour chaque souche revient à comparer l'efficacité d'un phage par rapport à un autre sur une souche donnée et pour une concentration donnée. Pour simplifier cette analyse un tableau de synthèse a été construit en annexe 4. Il regroupe les pourcentages des populations bactériennes restantes après ajout des phages et ce pour trois temps d'action intermédiaires (4 h, 8 h et 24 h) en fonction des MOI testées. Tous les calculs ont été réalisés en se basant sur le suivi de la densité optique des tubes témoins (DO_{600nm} témoin) ainsi que des tubes traités avec les phages (DO_{600nm}).

Exemple : Phages 14.1 [MOI 0,1] / souche PAO1_{ref}

Pourcentage de la population restante (à $t = 8$ h) : $((DO_{600nm} \text{ } t = 8 \text{ h}) * 100) / (DO_{600nm} \text{ témoin } t = 8 \text{ h})$

$$\text{Soit } (0,119 * 100) / 0,691 = 17,2 \%$$

De cette manière, il est possible de différencier les souches PAO1 et D1 des souches MLM et ST395E.

Les profils d'actions obtenus pour la souche PAO1 confirment sa sensibilité aux trois phages avec des populations réduites de 60 % dès 4 h d'action des phages à la MOI 10 et de 99 % après 24 h. Dans la littérature, PAO1 est la souche préférentiellement utilisée pour isoler de nouveaux phages et/ou en amplifier d'autres.

Comme déjà mis en évidence dans la partie précédente de cette étude, la souche D1 issue d'un environnement thermal présente des comportements similaires à la souche PAO1. Il est à noter toutefois que l'action des phages durant 24 h sur cette souche ne semble pas avoir une action bactéricide totale, les 10 % des populations restantes étant susceptibles d'héberger des bactéries résistantes et de permettre une re-croissance de la souche bactérienne dans les heures qui suivent.

148

Les souches MLM et ST395E sont issues d'environnements hospitaliers. Sur ces deux souches, 24 h après l'ajout des phages LUZ7, seulement 10 % de la population bactérienne est lysée pour la MOI 10 et environ 30 % en présence des phages 14.1 dans des concentrations identiques. L'action bactéricide des phages B1 entraînant une lyse supérieure à 40 % de la souche MLM, n'est observable que pour la MOI la plus élevée, en revanche, sur la souche ST395E, les phages B1 lysent jusqu'à 60 % de la population en 24 h. Pour chacune de ces deux souches, l'impact des phages B1 intervient tardivement.

La capacité de virulence des phages lytiques conditionne l'efficacité antibactérienne. Le temps de génération des phages, qui dépend de l'efficacité d'adhésion, de la période de latence et de la libération des virions, est un élément important. Le deuxième point concerne le taux de croissance de la population de phages, autrement dit le nombre de particules de phages formées au cours d'un cycle de vie. Un taux élevé d'adsorption aux bactéries, additionné d'un « burst size » important et d'un temps de génération court, définissent une forte efficacité antibactérienne.

Néanmoins, la variation de certains paramètres influence la virulence des phages. Parmi eux :

- L'état physiologique de la culture des cellules hôtes est important, car les prédateurs peuvent se propager plus aisément sur des populations bactériennes à croissance exponentielle (Weinbauer, 2004). Tuomi *et al.*, (Tuomi *et al.*, 1995) avaient déjà émis l'hypothèse qu'un apport suffisant en nutriments dans le milieu de culture permettait d'améliorer la croissance bactérienne et par conséquent la production des phages. L'ajout de nutriments augmente le taux de prolifération des phages ϕ R2f infectant les bactéries *Pseudomonas fluorescence* en suspension (Smit *et al.*, 1996). Dans certains cas un apport en nitrates et phosphates fortement diminué, réduit le « burst size » ainsi que le titre viral.
- Le deuxième concerne la multiplicité de l'infection (MOI), qui est dépendante du titre de phages ainsi que de la concentration en bactéries présentes dans le milieu de culture. En présence de l'hôte bactérien, le titre en phage peut augmenter et atteindre une concentration efficace pouvant être maintenue sur le site de l'infection, jusqu'à (i) élimination de toutes les bactéries hôtes ou (ii) mise en place de mécanismes de résistance chez les bactéries qui dans ce cas ne permet plus aux phages de réaliser leurs cycles infectieux (Shabbir *et al.*, 2016).

Malgré une sélection des phages en amont basée sur leur spectre d'activité lytique vis-à-vis des isolats environnementaux de *P. aeruginosa*, ces expériences d'infection sur des cultures planctoniques montrent que certains de ces phages ne parviennent pas à infecter efficacement leurs hôtes, et cela dans des conditions de croissance bactérienne en milieu liquide décrites comme étant favorables. Les travaux de Pires *et al.* (Pires *et al.*, 2011) ont également rapporté ce phénomène et les auteurs suggèrent que la sélection des phages ne peut être faite en s'appuyant uniquement sur leur spectre d'hôtes. Plus récemment, la coopération de trois chercheurs a permis de développer et de valider une méthode plus robuste réalisée en microplaque permettant d'établir la gamme d'hôte des bactériophages tout en évaluant en même temps leur virulence (Xie *et al.*, 2018).

En raison de la faible activité lytique, et parfois tardive, des phages, sur les souches MLM et ST395E en cultures planctoniques, seules les souches, PAO1 et D1 ont été choisies. Leur profil de sensibilité sera exploité afin de les utiliser comme modèle pour évaluer l'efficacité des phages 14.1 et LUZ7 sur le biofilm implanté à la surface de coupons en INOX.

SOMMAIRE Partie IV

PARTIE IV : EVALUATION DU POTENTIEL DES PHAGES POUR ELIMINER LE BIOFILM DE <i>P. AERUGINOSA</i> DEVELOPPE A LA SURFACE DE COUPONS EN INOX IMMERGES	152
IV.1 Introduction :	152
IV.2 Matériel et méthodes :	154
1. Matériel biologique :	154
2. Formation du biofilm et paramètres d'infection :	154
2.1. Préparation des coupons en INOX :	154
2.2. Développement du biofilm sur les coupons en INOX :	154
2.3. Traitement par les phages du biofilm âgé de 24 h développé sur les coupons en Inox :	155
3. Utilisation de la PCR quantitative :	155
3.1 Principe de la PCR viable quantitative (q-PCR viable) :	155
3.2 Protocole de traitement des échantillons :	157
3.3 Paramètres des PCR quantitatives :	158
3.4 Réalisation de la gamme étalon de référence :	159
IV.3 Résultats :	161
1. Droites de standardisation :	161
2. Evaluation de l'activité bactéricide des phages 14.1 et LUZ7 sur le biofilm de 24h de <i>P. aeruginosa</i> :.....	163
2.1 Efficacité du traitement par les phages 14.1 sur le biofilm des souches PAO1 et D1 :	163
2.2 Efficacité du traitement par les phages LUZ7 sur le biofilm de 24h des souches PAO1 et D1 :	165
IV.4 Discussion :	170
IV.5 Conclusion :	175

Partie IV : Evaluation du potentiel des phages pour éliminer le biofilm de *P. aeruginosa* développé à la surface de coupons en INOX immergés

IV.1 Introduction :

En milieu planctonique, les essais ont permis de mettre en évidence l'efficacité de deux phages sur la souche D1 de *P. aeruginosa*. En présence des phages 14.1 ou LUZ7, celle-ci présente un profil de sensibilité similaire à la souche de référence PAO1, avec en 24 h une réduction de 90 % de la population planctonique. Dans ces conditions, la disponibilité des bactéries en suspension dans le milieu augmente la probabilité de rencontre des particules phagiques avec les récepteurs bactériens. L'activité métabolique, des cellules en phase de croissance ainsi que l'environnement sont favorables à la multiplication des virus dans l'hôte.

Toutefois, *P. aeruginosa* a également la capacité de s'implanter à la surface des matériaux sous la forme de biofilms. Les cellules, protégées par la matrice extracellulaire autoproduite, deviennent alors beaucoup plus résistantes aux biocides et autres traitements antibactériens. Dans ce contexte l'objectif de cette dernière partie a pour objectif d'analyser l'efficacité de phages 14.1 et LUZ7 pour éliminer des biofilms issus de la souche de référence PAO1 et de l'isolat D1. Les essais ont été réalisés dans le milieu minéral minimum permettant le développement d'un biofilm de 24 h à la surface de coupons (51,2 cm²) en INOX 316 L, un alliage de plusieurs métaux, très souvent utilisé dans les environnements humides et plus représentatif des conditions réelles que les modèles d'infection réalisés en plaques 24 et 96 puits.

152

Après 14 h de traitement des biofilms, le potentiel bactéricide des virus a été mis en évidence en utilisant la PCR quantitative viable. Cette méthode basée sur l'amplification de l'ADN était utilisée à l'origine pour la détection de pathogènes dans un environnement. Elle permet contrairement aux techniques de dénombrement par culture, ou autres techniques usuelles présentées en Annexe 5, de rendre compte de l'ensemble des bactéries d'une population. En effet, certaines bactéries, y compris *P. aeruginosa*, peuvent entrer dans un état viable mais non cultivable (VBNC) comme stratégie de survie pour faire face à des conditions de stress environnemental et dans ce cas ne peuvent plus être dénombrées sur milieu nutritif. Un prétraitement des échantillons avec des intercalants photo-activables de l'ADN, permet de quantifier spécifiquement l'ADN des cellules métaboliquement actives (viable et VBNC). Une qPCR standard a également été réalisée pour quantifier la population totale. La population des biofilms a donc été quantifiée et exprimée en équivalent Log d'UFC par cm² de coupon, permettant d'identifier au sein d'un même biofilm les différentes populations et de comparer cette composition avec celle d'un biofilm traité par les bactériophages.

Lors des essais, la population des biofilms de la souche PAO1 et de l'isolat D1, à 24 h et à 38 h, a été quantifiée par dénombrements sur boîtes pour suivre leur développement. Le titre des phages après 14 h de traitement, a également été évalué afin de déterminer la quantité de phages restant disponibles dans le milieu environnant, ainsi que la part étant liée au biofilm. Les populations

bactériennes des milieux de culture autour des coupons, traités et non traités par les phages, ont été comparées par mesure de la densité optique à 600 nm. L'ensemble de ces données a permis d'une part de mettre en évidence l'efficacité des bactériophages mais également la complexité des interactions avec le biofilm, malgré son jeune âge.

IV.2 Matériel et méthodes :

1. Matériel biologique :

Les phages 14.1 et LUZ7 conservés en solutions stock à 10^{10} PFU.mL⁻¹ en milieu minimum et les souches *P. aeruginosa* D1 et PAO1, ont été choisis sur la base des résultats obtenus précédemment en milieu planctonique. Les souches sont conservées sur des cryobilles (AES Chemunex, Combour, France) à -80 °C avant d'être utilisées pour préparer une culture standardisée selon le protocole décrit partie III.

2. Formation du biofilm et paramètres d'infection :

2.1. Préparation des coupons en INOX :

Des coupons en INOX 316 L de forme rectangulaire : 64 mm de longueur, 40 mm de largeur, 2 mm d'épaisseurs soit 51,20 cm² ont été utilisés pour l'étude. Avant utilisation, ils ont été nettoyés par immersion totale dans un bain d'éthanol à 70 % pendant 10 min avant de subir une sonication d'une heure à 60 °C et deux rinçages successifs de 10 min par immersion totale dans de l'eau déminéralisée stérile à 60 °C (**Figure 48**). Les coupons sont ensuite séchés à l'air libre en conditions stériles sous poste de sécurité microbiologique. L'efficacité du protocole de nettoyage a été évaluée en s'assurant de l'absence de flore aérobie revivifiable dans la dernière eau de rinçage. A cet effet, la dernière eau de rinçage a été filtrée sur membrane 0,45 µm incubée sur milieu PCA pendant 4 jours à 30 °C.

154

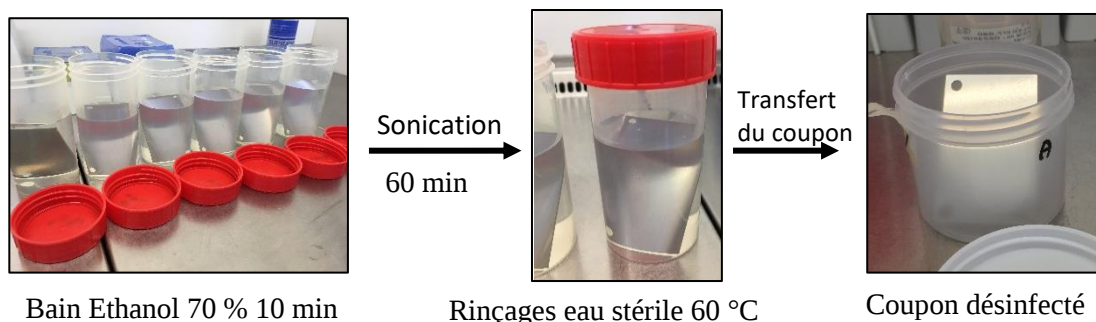


Figure 48 : Etapes de préparation des coupons en INOX : décontamination des surfaces par immersion dans l'éthanol puis par rinçage dans l'eau déminéralisée

2.2. Développement du biofilm sur les coupons en INOX :

Les coupons, préalablement aseptisés, ont été placés séparément dans des pots en plastique autoclavables (Grosseron, France) complétés par 130 mL d'une culture standardisée, de manière à ce que les deux faces soient immergées (**Figure 48**). Les pots ont été fermés par le couvercle mais pas totalement scellés pour permettre une aération minimum, puis ont été placés à 30 °C dans l'incubateur, durant 24 h sans agitation et sans ajout de milieu. Une série de 3 pots a été préparée pour tester l'efficacité des phages et 3 autres pots ont été utilisés comme témoins sans traitement pour vérifier que

les effets observés soient bien dû aux phages et non au détachement du biofilm au cours des rinçages et changement de milieu.

2.3. Traitement par les phages du biofilm âgé de 24 h développé sur les coupons en Inox :

Après 24 h à 30 °C, les coupons ont été sortis des pots puis rincés par immersion dans 130 mL de milieu minimum pendant 5 min, avant d'être replacés dans des pots contenant soit uniquement un volume de 133 mL de milieu minimum (pots sans traitement), soit 130 mL de milieu minimum + 3 mL de la solution de phages (pots avec traitement) donnant une concentration finale de l'ordre de 10^8 PFU.mL⁻¹. Trois pots distincts par condition ont été suivis. Tous les pots (traités ou non avec les phages) ont ensuite été replacés à 30 °C sous agitation à 60 rpm à raison d'1 min toutes les 30 minutes et cela durant 14 h (**Figure 49**). Le traitement terminé, 30 mL de milieu de culture ont été prélevés dans chaque pot, afin de quantifier les phages restants disponibles et infectieux présents dans l'environnement du biofilm. Un volume de 1mL a également été prélevé, pour réaliser le dénombrement sur boîtes des bactéries cultivables, par dilutions en série, ainsi qu'un volume de 1mL par pot pour mesurer la densité optique à 600 nm du milieu.

Les coupons (traités et non traités) ont été, en parallèle, sortis des pots puis rincés 1 fois par immersion dans du milieu minéral minimum avant d'être placés chacun dans un nouveau pot contenant le même volume de milieu minimum (133 mL). Le biofilm développé à la surface des coupons non traités et le biofilm restant à la surface des coupons traités, est décroché et remis en suspension par sonication durant 5 min (**Figure 49**). Un volume de 30 mL du milieu de culture est à nouveau prélevé dans chaque pot pour quantifier les phages qui étaient associés au biofilm. Sur les pots sans traitement, un volume de 1 mL de ce même milieu a été utilisé pour dénombrer le biofilm âgé de 24+14 h.

155

3. Utilisation de la PCR quantitative :

La PCR quantitative (q-PCR) a été utilisée dans cette étude pour amplifier spécifiquement une séquence de 220 pb du gène *gyrB* présent chez *P. aeruginosa* (Lavenir *et al.*, 2007; Motoshima *et al.*, 2007).

3.1 Principe de la PCR viable quantitative (q-PCR viable) :

Pour détecter et dénombrer sélectivement les bactéries viables, différents colorants se liant à l'acide nucléique sous forme de propidium monoazide (PMA) ou éthidium monoazide (EMA) peuvent être utilisés en association avec la q-PCR (Nocker and Camper, 2009). L'EMA et le PMA peuvent pénétrer dans les membranes cellulaires endommagées et s'intercaler dans l'ADN. L'activation à la lumière de ces molécules liées à l'ADN, aboutit à une liaison covalente empêchant l'amplification par PCR de l'ADN modifié.

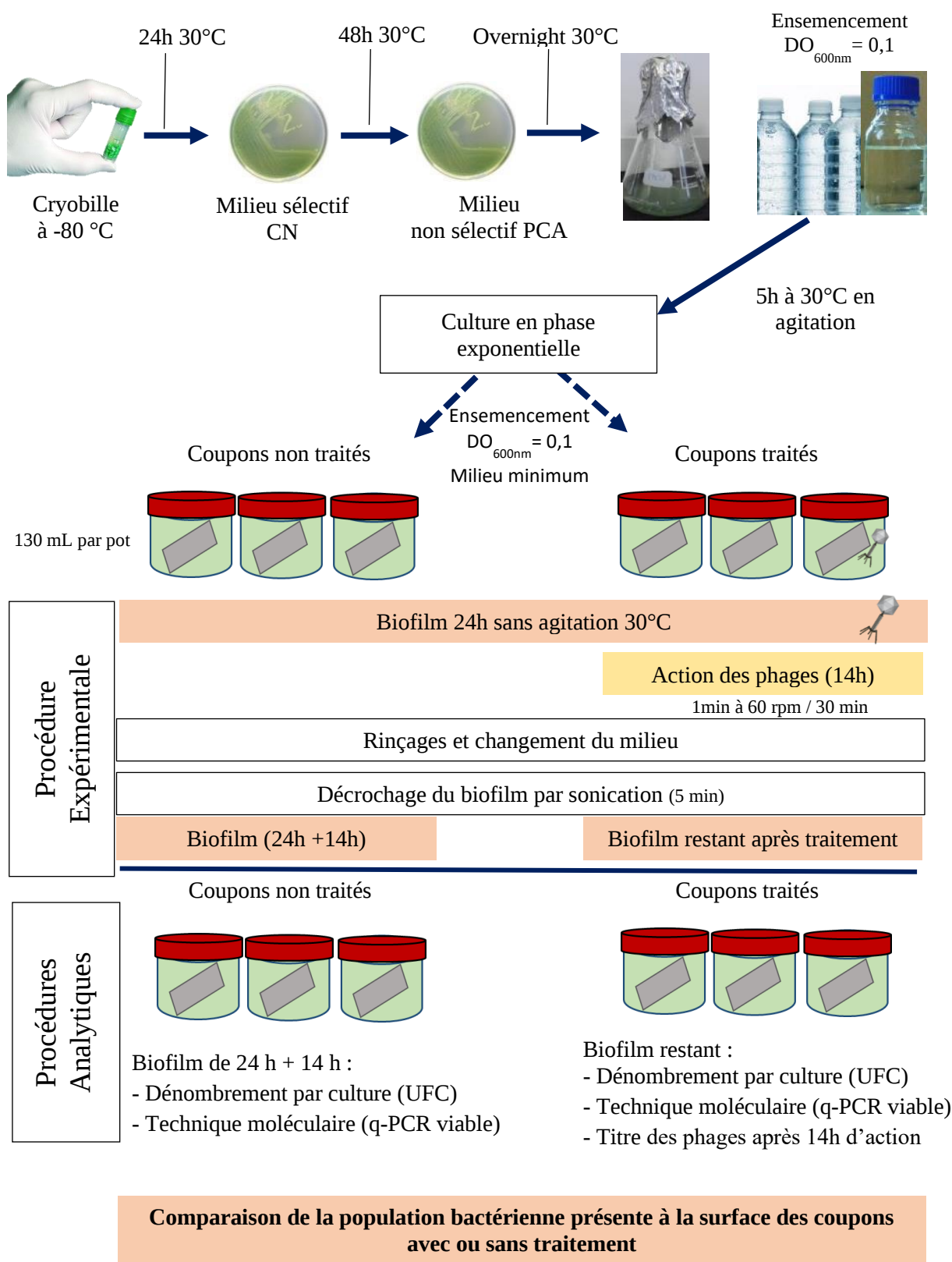


Figure 49 : Etapes expérimentales et analytiques permettant d'évaluer l'action des phages sur le biofilm de *P. aeruginosa* à la surface de coupons INOX immergés

Cependant, l'utilisation de ces deux colorants implique certaines limites. Dans notre étude, une nouvelle approche, basée sur l'utilisation d'un réactif composé d'un mélange de formes azide photo-réactives de phénanthridium; le PEMAXTM (**Figure**), améliore la portée de la q-PCR viable (Agustí *et al.*, 2017). Après traitement de la suspension bactérienne avec le PEMAXTM, seul l'ADN des cellules viables (cultivables ou VBNC) ayant une membrane intacte et un métabolisme actif, est détecté lors de la q-PCR.

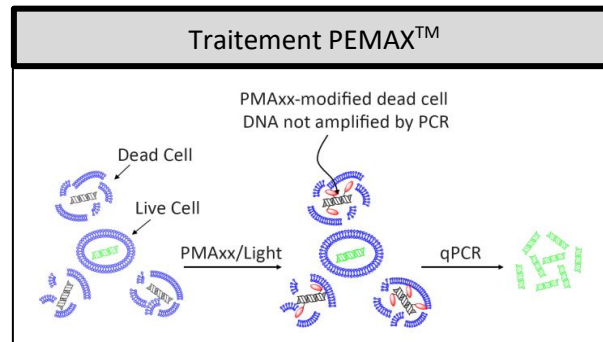


Figure 50 : Agent intercalant PEMAXTM utilisé pour inhiber l'amplification des cellules métaboliquement inactive

3.2 Protocole de traitement des échantillons :

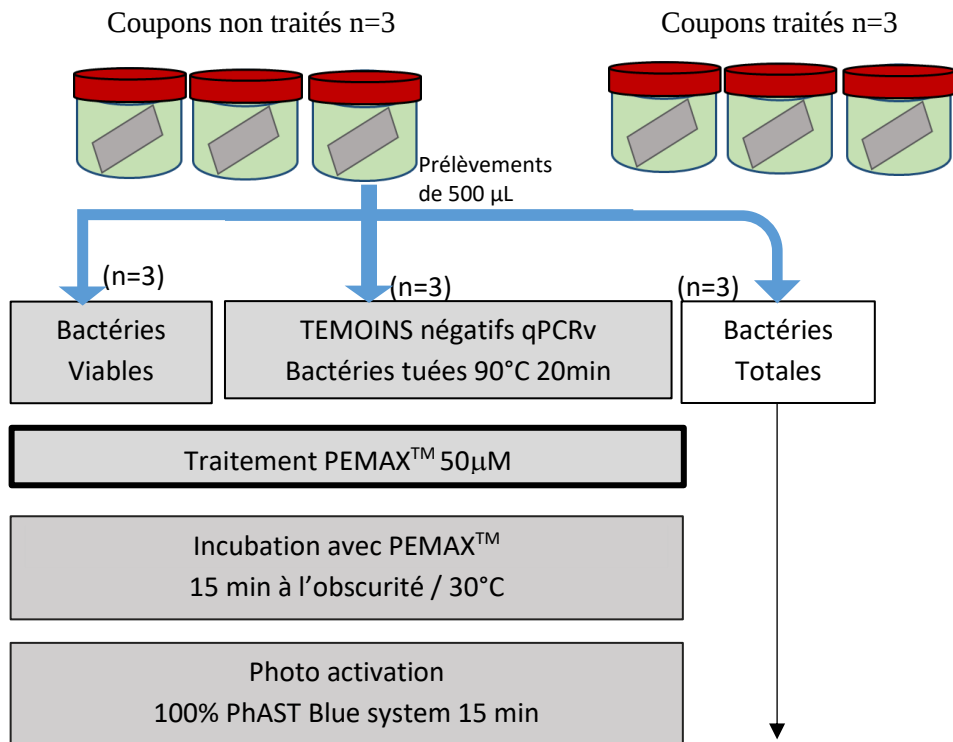
Après remise en suspension du biofilm de chaque coupon par sonication pendant 5 min, trois fractions ont été prélevées et traitées conformément aux recommandations du fournisseur (**Figure**):

- Un premier prélèvement de 500 µL est utilisé pour la détection de l'ADN des cellules viables. Le réactif PEMAXTM (GenIUL, Barcelona, Espagne) est ajouté à une concentration finale de 50 µM, incubé 15 min à 30 °C puis photo-activé à 100 % pendant 15 min dans un système PhAST Blue (GenIUL).
- Un second prélèvement de 500 µL est utilisé pour réaliser une q-PCR classique sur l'ensemble de l'ADN de l'échantillon permettant d'estimer la population totale.
- Un troisième de 500 µL pour réaliser le contrôle négatif de la q-PCR viable. Pour ce dernier, l'échantillon est placé à 90 °C durant 20 min pour tuer toutes les bactéries avant d'être traité au PEMAXTM comme décrit ci-dessus. De ce fait, l'amplification par qPCR devant être inhibée en totalité, la fluorescence détectée dans cet échantillon est donc considérée comme non spécifique. La lyse des bactéries est en parallèle, vérifiée en étalant 100 µL sur boîte PCA incubée à 30 °C durant 24 h.

La concentration en PEMAXTM utilisée a été vérifiée comme non limitante dans les conditions de l'étude et des triplicats ont été réalisés pour chaque prélèvement (n= 3).

L'ADN des échantillons traités et non traités au PEMAXTM est ensuite extrait et purifié en utilisant le système NucliSENS® miniMAG, selon les instructions du fabricant (BioMérieux). Brièvement, après la lyse des bactéries dans le tampon, des billes de silices ont été ajoutées. L'ADN libre peut alors se fixer aux billes sous l'effet de l'attraction des charges. Les billes peuvent ensuite être retenues par un aimant permettant ainsi de réaliser 5 lavages avant de décrocher l'ADN de la silice dans

50 µL de tampon d'élu­tion. Des témoins d'extraction négatifs ont été également réalisés. Après la purification de l'ADN, les échantillons ont été analysés par q-PCR.



Figure

3.3 Par

3.3.1 An

2009; L

Des dil

de fusio

ont été

10 µM.

Tableau

Types

Prim

Prim

Se

* T_m = 2

** T_a = T

ADN.

en amont (Anuj *et al.*,
tions (**Tableau 23**).
la PCR et les courbes
amorces et la sonde
µM, puis aliquotés à

T _a ** (°C)	Origine
67	Eurogentec
65	
83	

cléotide

3.3.2 Préparation des milieux réactionnels et programmation du thermocycler :

Le milieu réactionnel a été réalisé à partir du kit de PCR TaqMan QuantiNova Probe de chez QIAGEN et se décompose comme ceci (**Tableau 24**) pour un échantillon :

Tableau 24 : Composition des milieux réactionnels de la qPCR quantitative

Mix PCR TaqMan® QuantiNova Probe (QIAGEN)	
Mix Taq Polymerase /nucléotides	12,5 µL
Primer Forward (10 µM)	1 µL
Primer Reverse (10 µM)	1 µL
Sonde TaqMan (10 µM)	0,5 µL
ADN (échantillon)	5 µL
H ₂ O ultra pure	5 µL
Volume réactionnel final	25 µL
Programme Thermocycler	
Activation de la Taq polymérase	2 min à 95 °C
Nombre de cycles	40
Dénaturation	5 s à 95°C
Hybridation et élongation	30 s à 60 °C

Les PCR ont été réalisées avec le Rotor Gene Q thermocycler (QIAGEN, Allemagne) programmé pour une étape initiale de dénaturation durant 2 min à 95 °C puis 40 cycles successifs alternant l'étape de dénaturation des brins d'ADN et l'étape d'hybridation des oligonucléotides assurant l'élongation. Des contrôles négatifs ont été inclus dans chaque « run » en remplaçant l'ADN par 5 µL d'eau ultra pure, ainsi qu'un autre contrôle en ajoutant 5 µL du témoin négatif d'extraction. Chaque amplification est réalisée au minimum deux fois par échantillon d'ADN.

159

3.4 Réalisation de la gamme étalon de référence :

Pour réaliser une gamme de référence de quantification, 1mL d'une culture en phase exponentielle de la souche PAO1 de *P. aeruginosa* a été dilué directement en série au dixième. Un volume de 100 µL de chaque dilution est étalé sur des boîtes PCA. Elles ont été ensuite placées durant 24 h à 30°C avant dénombrement des colonies permettant de calculer la concentration (en UFC/mL) de la culture initiale et par conséquent des dilutions.

En parallèle, 1 mL de la même culture a également été prélevé puis l'ADN a été extrait en utilisant le système NucliSENS® miniMAG. L'élution a été réalisée dans un volume de 50 µL, dilué ensuite en série au dixième. Pour chacune des dilutions, trois réactions d'amplification par PCR ont été réalisées en respectant les paramètres cités auparavant, selon qu'il s'agisse d'une qPCR en SYBR® Green ou en sonde TaqMan®.

Les points de la gamme ont été ensuite reportés sur un graphique en respectant l'équation $Ct=f(\text{Log UFC})$, avec en ordonnée le nombre de Ct obtenues par q-PCR (exprimées en « Cycle Threshold ») pour chaque dilution et en abscisse la quantité de bactéries correspondante, exprimées en Log d' UFC par réaction.

La droite standard permet de connaître le coefficient de corrélation r^2 ainsi que l'efficacité E de la PCR qui a été calculée à partir de la pente de la droite par la formule suivante : $E = 10^{1/\text{pente}}$. On considère que le domaine acceptable d'efficacité est compris entre 75 % et 125 % selon la norme NF T90-471.

IV.3 Résultats :

1. Droites de standardisation :

Plusieurs étapes ont été respectées afin d'obtenir une droite standard permettant, par corrélation de quantifier de manière relative l'ensemble des échantillons (**Figure.A, B, C**).

Les qPCR de la gamme d'étalonnage, réalisées avec la sonde TaqMan®, fournissent une courbe d'amplification en fluorescence pour chacune des dilutions (**Figure.C**) À partir de ces courbes d'amplification, il est possible de positionner la ligne seuil (« baseline threshold ») juste au-dessus des signaux de fluorescence des témoins négatifs sans ADN, ce qui permet d'éliminer le bruit de fond. Les points d'intersection de chacune de ces courbes d'amplification avec la ligne seuil permettent de déterminer le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence est détectée, pour chaque dilution de la gamme (**Figure.C**). Une moyenne de 2 Ct est obtenue pour chaque dilution, puis reportée en fonction de la quantité de bactéries dénombrées et permet de tracer une droite standard de corrélation négative (**Graphique 8**).

Le **Tableau 25** regroupe l'ensemble des équations concernant les amplifications de la gamme en sonde TaqMan®. Une équation de synthèse a été tirée de ces résultats et est présentée dans le **Graphique 8**, les écarts types pour chaque point ont été calculés. L'équation a permis de calculer l'efficacité (E) de la réaction et le coefficient de corrélation r^2 . Pour l'ensemble des essais, l'efficacité est comprise entre 72 - 100 % et le coefficient de corrélation tend vers 1, permettant de se placer dans des conditions optimales.

161

Tableau 25: Synthèse des équations correspondantes aux différentes qPCR de la gamme, réalisées en sonde TaqMan

qPCR	Souche	Nom du « run »	Équation des droites	r ²	Pente	Efficacité
Sonde TaqMan®	PAO1	PAO1_14.1 num 1	y = -4,025x + 45,513	0,9571	-4,025	1,77
		PAO1_14.1 num 2	y = -4,0799x + 43,664	0,9675	-4,0799	1,76
	D1	D1_14.1 num 1	y = -4,2557x + 53,382	0,9782	-4,5725	1,72
		D1_14.1 num 2	y = -4,2527x + 46,581	0,968	-4,2527	1,72
	PAO1	PAO1 (Biofilm 24h)	y = -3,3164x + 39,118	0,9992	-3,3164	2,00
		PAO1_LUZ7 num 1	y = -3,747x + 43,431	0,9808	-3,747	1,85
		PAO1_LUZ7 num 2	y = -3,7774x + 43,569	0,9807	-3,7774	1,84
		D1 (Biofilm 24h)	y = -3,757x + 43,604	0,9757	-3,757	1,85
	D1	D1_LUZ7 num 1	y = -4,0157x + 43,476	0,9789	-4,0157	1,77
		D1_LUZ7 num 2	y = -4,253x + 46,075	0,9775	-4,253	1,72
Équation de synthèse			y = -3,9186x + 44,024	0,9735	-3,9186	1,80

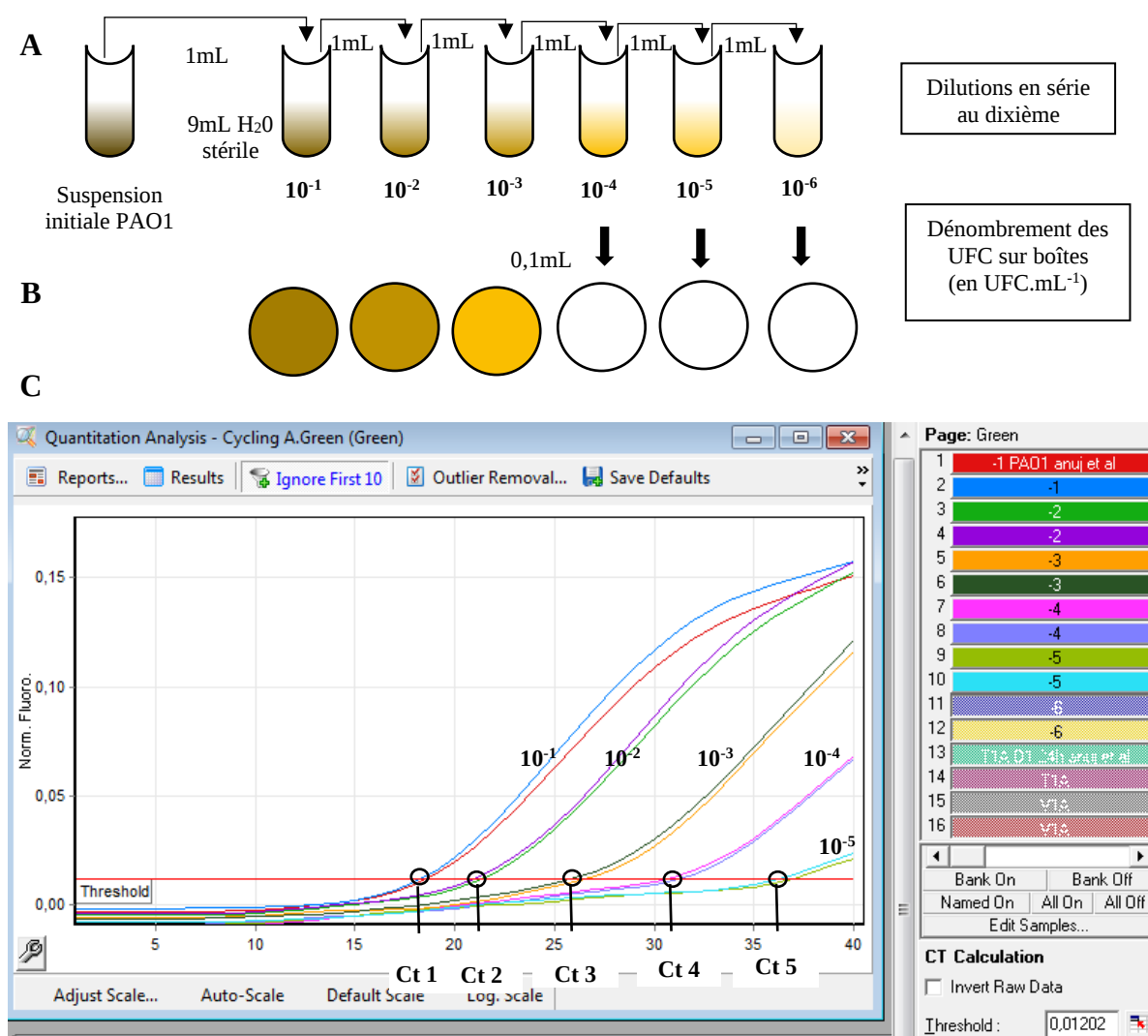


Figure 52 : Etape de réalisation de la droite d'étalonnage.

A. Dilutions en série d'une suspension bactérienne en phase exponentielle. **B.** Dénombrement des UFC permettant de déterminer la concentration de la solution initiale ainsi que de chacune des dilutions. **C.** Courbes des fluorescences obtenues à partir des réactions d'amplification des différentes dilutions de la gamme. En rouge la ligne seuil permet de définir les valeurs des Ct qui sont ensuite reportées en fonction des UFC correspondantes pour tracer la droite d'étalonnage.

2. Evaluation de l'activité bactéricide des phages 14.1 et LUZ7 sur le biofilm de 24h de *P. aeruginosa*:

2.1 Efficacité du traitement par les phages 14.1 sur le biofilm des souches PAO1 et D1 :

L'efficacité du traitement par les phages 14.1 a été évaluée sur le biofilm des souches PAO1 d'une part, puis de D1, en s'appuyant sur plusieurs points d'analyse, présentés dans la **Figure 49** et réalisés lors de chaque essai. Les mesures (dénombrement et amplification par PCR) ont été faites à la fois sur les pots contenant les coupons en INOX non traités ainsi que sur les trois autres pots ayant reçus une dose infectieuse identique correspondant à $4,1 \cdot 10^{10}$ PFU/pot. L'ensemble des résultats est présenté dans le **Tableau 31**.

Après 14 h, l'activité des phages est visible dans un premier temps en comparant le milieu de culture (**étape P1**) des pots sans phages et avec phages. Le milieu des pots contenant les phages est en effet beaucoup moins trouble que celui des pots non traités (**Figure 49**). A cette étape le même milieu a été utilisé pour dénombrer la part de phages étant toujours disponible et infectieuse. En moyenne $6,3 \cdot 10^{11}$ PFU/pot ont été dénombrés dans le cas des essais réalisés avec la souche PAO1 et $5 \cdot 10^{10}$ PFU/pot pour la souche D1. Le milieu de culture est ensuite éliminé puis les coupons ont été replacés dans 130 mL de milieu minium frais. Le biofilm est alors décroché et remis en suspension, ce qui correspond au milieu prélevé à l'étape **P2** (**Figure 49**). Dans le cas des pots témoins non traités, le biofilm a été dénombré par la méthode des UFC ce qui a permis d'établir que le biofilm âgé de 38 h de la souche PAO1 contenait environ 6,4 Log d'UFC et 7,9 Log d'UFC pour la souche D1. Pour les pots dont le biofilm a été infecté, le milieu est utilisé pour quantifier à nouveau le nombre de phages, considéré cette fois comme étant la part de phage infectieux qui était associée au biofilm. Pour les deux souches, une moyenne de 10^8 PFU/pot a été obtenue soit entre 2 et 3 Log de moins que pour le milieu prélevé à l'étape **P1**.

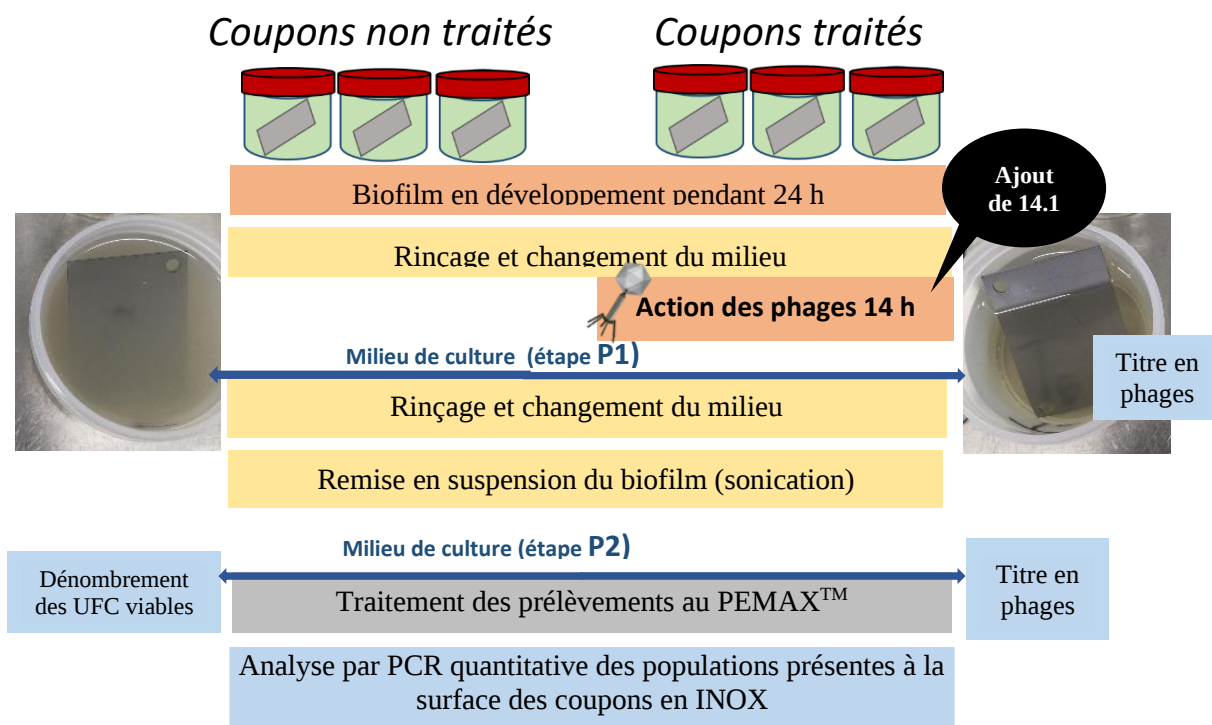
163

Tableau 26. Répartition des phages 14.1 dans le système étudié

	Phages 14.1 (PFU)	
	$4,1 \times 10^{10}$	
Dose infectieuse initiale	en suspension* (étape P1)	associés au biofilm* (étape P2)
souche PAO1	$6,3 \times 10^{11}$	$2,1 \times 10^8$
isolat D1	5×10^{10}	$5,9 \times 10^8$

* quantité de phages infectieux, après 14h de traitement, en suspension dans le milieu ou associés au biofilm

La suite des analyses repose sur l'utilisation de la qPCR viable réalisée en sonde TaqMan®. Dans chacun des pots (traités et non traités), 9 prélèvements de milieu (**étape P2**) ont été réalisés ; 3 ont permis d'amplifier la totalité de l'ADN (population totale/ sans PEMAX), 3 autres ont été utilisés pour amplifier uniquement l'ADN des cellules dont le métabolisme était toujours actif (population viable/ avec PEMAX) et les 3 derniers, pour réaliser les témoins en tuant les bactéries.



L'amplification des extraits d'ADN issus des extractions faites sur les prélèvements à l'étape **P2** a permis d'obtenir les courbes de fluorescences, à partir desquelles il a été possible de quantifier les différentes populations pour chacun des biofilms présents en surface des coupons en INOX et ayant subi ou non un traitement avec les phages. Les résultats pour chaque souche sont présentés sur la **Figure 49** sous la forme d'histogrammes et les données sont exprimées en équivalent de Log d'UFC par cm² de coupon dans le

164

Tableau 27.

Tableau 27. Dénombrement des cellules de *P. aeruginosa* présentes dans les biofilms des souches PAO1 et D1, traités ou non par les phages 14.1.

		Non traités	Traités***
		Quantités de cellules (en équivalent Log CFU/cm ² de coupon)	
PAO1	qPCR*	6,90 ± 0,25	5,95 ± 0,37
	v-qPCR**	6,68 ± 0,24	5,30 ± 0,84
D1	qPCR*	8,1 ± 0,55	6,5 ± 0,47
	v-qPCR**	7,6 ± 0,21	6,2 ± 0,51

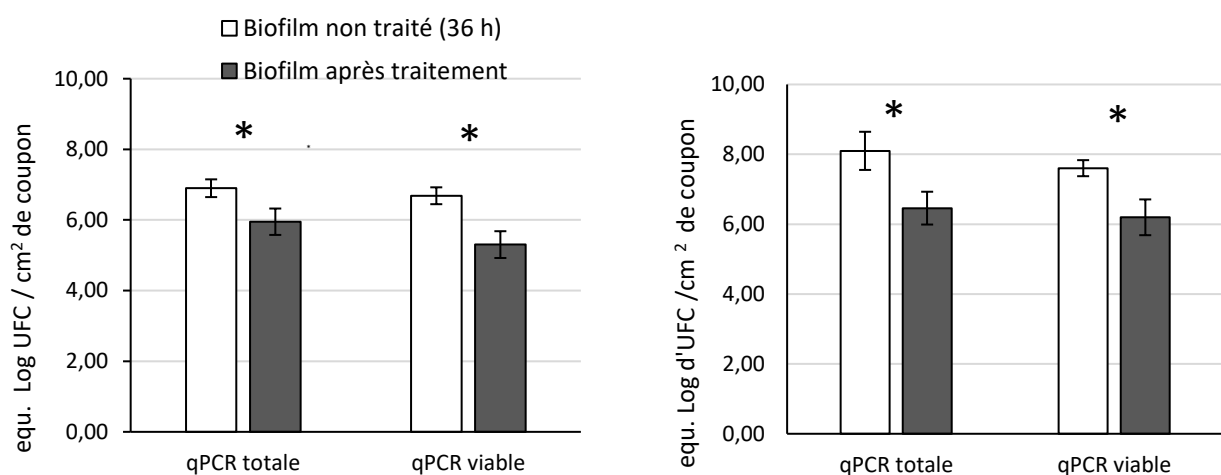
* population totale des cellules du biofilm

** population des cellules viables et VBNC du biofilm

***biofilms de 24 h traités par les phages 14.1 durant 14 h

Dans le cas du biofilm (24 h +14 h) non traité de la souche PAO1, la population de cellules viables est équivalente à la population totale (**Tableau 27**), soient $6,68 \pm 0,24$ Log d'UFC /cm² et $6,90 \pm 0,25$ Log d'UFC /cm² de coupon respectivement. Des résultats similaires sont obtenus pour la souche D1 dont le biofilm est composé d'une population totale de $8,1 \pm 0,55$ Log d'UFC /cm² qui ne diffère peu de la population viable ($7,6 \pm 0,21$)

De la même manière, les résultats mettent en avant une composition relativement identique de la population des biofilms sur lesquels les phages ont eu une activité. Plus précisément, pour la souche PAO1, la population viable restante équivaut à $5,30 \pm 0,84$ Log d'UFC/cm² de coupon, très proche de la population totale représentant $5,95 \pm 0,37$ Log d'UFC /cm².



65

Figure 49 : Efficacité du traitement par les phages 14.1 sur le biofilm de la souche PAO1(A) et de l'isolat D1 (B). Analyse statistique : (*) p value < 0,05 après application du test Student.

biof

les p

avar

max

ainsi

2.2 f

para

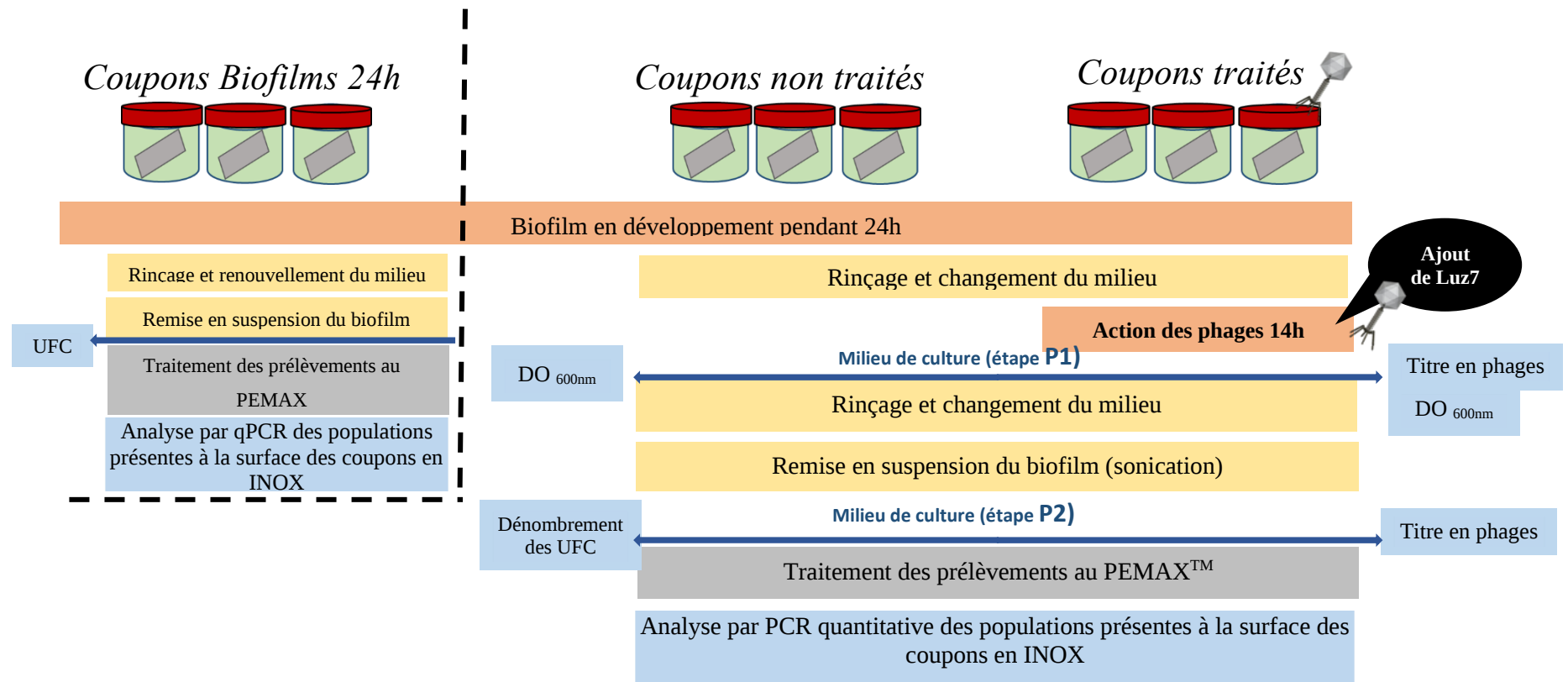
sup

deux

utili

mais

pour



Une moyenne de 7,4 Log d'UFC/ cm² de coupon a été dénombrée pour la souche PAO1 et 8,20 Log d'UFC/ cm² pour la souche D1. Sur ces mêmes pots les qPCR ont permis de quantifier la population totale à $7,31 \pm 0,23$ équivalent Log d'UFC / cm² de coupon et la population viable à $7,12 \pm 0,33$ pour la souche PAO1, ainsi que $7,44 \pm 0,44$ équivalent Log d'UFC / cm² et $7,18 \pm 0,39$ équivalent Log d'UFC / cm² pour la souche D1. Ces données ont été rassemblées dans le **Tableau 31**.

Tableau 28. Quantification des cellules d'un biofilm de 24 h pour la souche PAO1 et l'isolat D1

Biofilms de 24 h	Souche PAO1		Isolat D1	
	qPCR*	$7,31 \pm 0,23$	qPCR*	$7,44 \pm 0,4$
	v-qPCR*	$7,12 \pm 0,33$	v-qPCR*	$7,18 \pm 0,39$
	Dénombrement des UFC	7,40	Dénombrement des UFC	8,20

La suite de l'essai reprend les mêmes étapes que précédemment avec les phages 14.1. Une dose infectieuse de $6,1.10^{10}$ PFU/pot est ajoutée dans 3 des 6 pots contenant les coupons en INOX sur lesquels le biofilm s'est développé durant 24 h (**Figure 50**). Après 14 h, le milieu de culture présente également une différence de turbidité entre les pots traités et non traités comme cela avait pu être observé pour les essais avec les phages 14.1. La turbidité a donc été mesurée par spectrophotométrie à 600 nm afin de pouvoir comparer la population de bactéries planctoniques des pots avec traitement et sans traitement. Pour la souche PAO1, une moyenne de 0,170 de DO_{600nm} est obtenue pour le milieu des pots non traités contre 0,003 pour les pots contenant les phages. Pour la souche D1, les DO_{600nm} obtenues sont 0,380 et 0,017 respectivement. A cette étape (**P1**), le milieu a également été prélevé dans les pots traités permettant de dénombrer les phages restants libres à hauteur de $1,1.10^{11}$ PFU et $3.4.10^9$ PFU par pot, pour les souches PAO1 et D1 (**Tableau 29**).

Tableau 29. Répartition des phages LUZ7 dans le système étudié

Dose infectieuse initiale	Phages LUZ7 (PFU)	
	$6,4 \times 10^{10}$	
	en suspension* (étape P1)	associés au biofilm* (étape P2)
souche PAO1	$1,1 \times 10^{11}$	$5,5 \times 10^7$
isolat D1	$3,41 \times 10^9$	$1,4 \times 10^8$

* quantité de phages infectieux, après 14h de traitement, en suspension dans le milieu ou associés au biofilm

Le biofilm est ensuite décroché puis remis en suspension dans du milieu minéral minimum pour l'ensemble des pots. A cette étape (**P2**), le milieu de culture des pots contenant les coupons ayant été traités a permis de dénombrer la présence d'environ 10^7 à 10^8 particules de phages par pot et qui étaient

associés aux biofilms, selon la souche (**Tableau 29**). Le milieu de culture a également été utilisé, dans le cas des pots non traités, pour dénombrer la quantité de bactéries présentes dans un biofilm âgé de 38 h. Pour les deux souches, les résultats du dénombrement sont similaires à ceux obtenus pour le biofilm de 24 h (**Tableau 28**) et s'élèvent à 7,4 Log d'UFC/ cm² de coupon pour PAO1 et 8,1 Log d'UFC/ cm² de coupon pour D1.

La population totale et la population viable des biofilms ont été comparées afin de mettre en évidence l'effet des phages LUZ7(**Tableau 30**). Après 14 h d'activité, les résultats montrent une différence maximum de 1 équivalent Log d'UFC/ cm² entre les coupons traités et non traités pour la souche PAO1 et de 0,50 équivalent Log d'UFC/ cm², pour la souche D1 (**Figure 51**).

Tableau 30. Dénombrement des cellules de *P. aeruginosa* présentes dans les biofilms des souches PAO1 et D1, traités ou non par les phages LUZ7.

		Non traités	Traités***
		Quantités de cellules (en équivalent Log CFU/cm ² de coupon)	
PAO1	qPCR*	7.16 ± 0.46	5.69 ± 0.39
	v-qPCR**	6.15 ± 0.60	5.11 ± 0.55
D1	qPCR*	7.12 ± 0.68	6.81 ± 0.27
	v-qPCR**	7.13 ± 0.41	6.60 ± 0.22

* population totale des cellules du biofilm
** population des cellules viables et VBNC du biofilm
***biofilms de 24 h traités par les phages LUZ7 durant 14 h

168

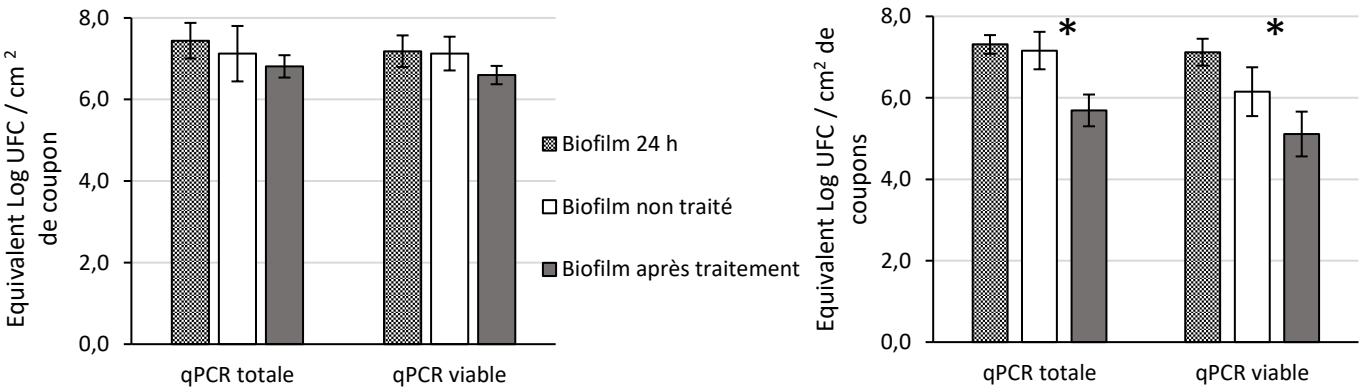


Figure 51 : Efficacité du traitement par les phages Luz7 sur le biofilm de l'isolat D1 (A) de la souche PAO1(B). Analyse statistique : (*) p value < 0,05 après application du test Student.

IV.3 Résultats :

Tableau 31 : Impacte du traitement par les phages 14.1 et LUZ7 sur les souches PAO1 et D1 :Synthèse des paramètres biologiques

			Traitements appliqués			
			14.1		LUZ7	
Souches <i>P. aeruginosa</i>			PAO1	D1	PAO1	D1
Dose infectieuse Initiale (en PFU/ pot) (130mL)			4,1.10 ¹⁰		6,1.10 ¹⁰	
Titres en phages	En suspension (étape P1)	PFU/pot (130mL) Moyenne (n=3)	6,3.10 ¹¹	5.10 ¹⁰	1,1.10 ¹¹	3,41.10 ⁹
	Associés au biofilm (étape P2)		2,1.10 ⁸	5,9.10 ⁸	5,5.10 ⁷	1,4.10 ⁸
Biofilm de 24h	Biofilm de 24h [Dénombrement]	Log CFU/cm ² de coupon Moyenne (n=3)			7,40	8,20
	PCR Population totale	[Équivalent Log CFU/cm ² de coupon]			7,31 ± 0,23	7,44 ± 0,44
	PCR Population viable				7,12 ± 0,33	7,18 ± 0,39
Biofilm de 24h +14h [Dénombrement]		Log CFU/cm ² de coupon Moyenne (n=3)	6,40	7,86	7,38	8,08
Coupons non traités	PCR Population totale	[Équivalent Log CFU/cm ² de coupon]	6,90 ± 0,25	8,1 ± 0,55	7,16 ± 0,46	7,12 ± 0,68
	PCR Population viable	[Équivalent Log CFU/cm ² de coupon]	6,68 ± 0,24	7,6 ± 0,21	6,15 ± 0,60	7,13 ± 0,41
Coupons traités	PCR Population totale	[Équivalent Log CFU/cm ² de coupon]	5,95 ± 0,37	6,5 ± 0,47	5,69 ± 0,39	6,81± 0,27
	PCR Population viable	[Équivalent Log CFU/cm ² de coupon]	5,30 ± 0,84	6,2 ± 0,51	5,11± 0,55	6,60 ± 0,22

IV.4 Discussion :

Dans cette partie, les phages 14.1 et LUZ7, sélectionnés auparavant pour leur pouvoir bactéricide sur les populations planctoniques de *P. aeruginosa*, ont été évalués pour leur capacité à éliminer un biofilm de 24 h implanté sur une surface en INOX.

L'utilisation des phages 14.1 sur le biofilm de la souche de laboratoire PAO1 et de l'isolat D1 met en évidence un abattement de la population atteignant un maximum de 1,4 Log pour la souche PAO1 ainsi que pour la souche D1. Dans le cas des phages LUZ7, un maximum de 1,0 équivalent Log d'UFC/cm² est atteint pour la souche PAO1 et 0,5 pour la souche D1.

Au-delà du fait d'évaluer l'efficacité bactéricide des phages sur les deux souches, différents paramètres ont été mesurés durant les essais permettant de mieux comprendre le comportement des bactéries suite à leur adhésion sur la surface en INOX, d'une part, puis des virus vis-à-vis du biofilm.

La population d'un biofilm de 24 h et de 38 h pour chacune des deux souches a donc été quantifiée par dénombrement sur milieu nutritif gélosé afin :

- de s'assurer que les effets observés sur les coupons traités soient issus de l'activité des virus
- de suivre le développement du biofilm entre 24 h et 38 h
- de pouvoir estimer la MOI (rapport phages/bactéries) appliquée pour l'infection.

170

Les résultats exprimés en Log UFC/cm² de coupon ne mettent pas en évidence de différence significative. Ainsi pour la souche D1 un biofilm de 24 h équivaut à 8,2 Log UFC/cm² de coupon et à 8,08 Log UFC/cm² de coupon pour un biofilm de 38 h. Pour la souche PAO1 un biofilm de 24 h équivaut à 7,4 Log UFC/cm² de coupon et 7,38 pour un biofilm de 38 h. Des résultats similaires ont été rapportés dans la littérature scientifique concernant la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (Pires *et al.*, 2011). Dans cette étude, les auteurs montrent que la quantité de cellules d'un biofilm de 24 h cultivé en plaque 24 puits dans du milieu YPD est identique à celle d'un biofilm de 48 h, soit environ 8 Log UFC/cm² après dénombrement (Pires *et al.*, 2011). En revanche, ils montrent que la biomasse totale d'un biofilm de 48 h est plus élevée que celle d'un biofilm de 24 h et qu'à l'inverse, l'activité métabolique des cellules décroît avec l'âge du biofilm (Pires *et al.*, 2011). Ces résultats suggèrent qu'entre 24 h et 48 h, les cellules d'un biofilm participent davantage à la structuration du biofilm via la synthèse des composés de la matrice extracellulaire tout en débutant leur adaptation métabolique.

Pour suivre la répartition des virus dans le système étudié, la quantité de phages présents dans le milieu autour des coupons, après le traitement de 14 h, a été déterminée, ainsi que la quantité étant associée au biofilm. Dans le cas des essais réalisés avec les phages 14.1, 4,1.10¹⁰ PFU ont été ajoutés par pot. Après 14 h, 6,3.10¹¹ PFU en suspensions ont été dénombrés pour la souche PAO1 et 5.10¹⁰ PFU pour la souche D1. Cette fraction représente uniquement les phages étant totalement libres dans le milieu puisqu'au cours du protocole d'extraction, une partie des virus en cours d'infection et adsorbés aux récepteurs

bactériens, a probablement été éliminée avec les débris des cellules bactériennes. Malgré tout, la quantité de phages infectieux est identique voire supérieure à la dose qui avait été ajoutée au départ et confirme leur multiplication en présence de leur hôte. Les résultats mettent également en évidence l'existence d'une population de phages ayant adhéré au biofilm (10^8 PFU). Toutefois, cette population est inférieure à celle retrouvée dans le milieu liquide, bien qu'elle puisse être sous-estimée, si l'on considère l'impact négatif de la sonication sur la viabilité des particules phagiques mise en évidence par Melo *et al.* (Melo *et al.*, 2016). Les phages LUZ7 ont présentés un comportement similaire avec une part plus importante de phages circulant librement dans le milieu que la part associée au biofilm.

Cette répartition inégale des phages entre la phase liquide et solide est en adéquation avec les résultats de spectrophotométries qui ont mis en évidence, lors des essais avec les phages LUZ7, une lyse très importante de la population planctonique se trouvant dans le milieu P1. La turbidité du milieu de culture autour du biofilm a été mesurée dans les pots contenant les phages actifs depuis 14 h ainsi que dans les autres. La densité optique à 600 nm permet de suivre la concentration de la population bactérienne, comme cela a été fait dans la partie expérimentale sur les cultures planctoniques. Elle correspondait à une moyenne de 0,1 pour les pots non traités de la souche PAO1 et de 0,3 pour la souche D1. Dans les pots traités, la densité optique du milieu proche de zéro, suggère l'absence de bactéries planctoniques. Partant de ce constat il est possible de discuter des mécanismes concernant le mode d'action des bactériophages, en suggérant que :

- Les phages ajoutés dans le milieu ont exercé leur action bactéricide en priorité sur les cellules planctoniques issues du biofilm, leur permettant de se multiplier dans le milieu minimum autour des coupons.
- Une partie de ces phages a également adhéré au biofilm, parvenant ainsi à interférer sur le développement, ainsi que la dissémination du biofilm, dans le milieu autour des coupons.

171

Parmi les paramètres susceptibles d'influencer l'efficacité des phages, la dose infectieuse utilisée pour le traitement est un facteur important. Dans le cas des essais réalisés avec LUZ7, la quantification des cellules du biofilm de 24 h sur lesquelles est ajoutée la dose infectieuse, a permis d'estimer la MOI à 50 pour la souche PAO1 et entre 50-300 pour la souche D1. Ces concentrations bien supérieures à celles qui ont été utilisées lors des essais en milieu planctonique (MOI 0,1 ; 1 ; 10) révèlent la complexité d'une attaque ciblant le biofilm. Dans la littérature, Hanlon *et al.* (Hanlon *et al.*, 2001) avaient également mis en évidence une susceptibilité plus importante aux phages, des cellules en suspension, au détriment des cellules du biofilm. En effet, l'architecture et la composition du biofilm ne facilitent pas l'accès aux phages (Hanlon *et al.*, 2001). La superposition de plusieurs couches de cellules engendre une répartition inégale des nutriments et de l'oxygène, et favorise l'apparition de sous populations bactériennes dont le métabolisme est modifié. Ces modifications peuvent également impacter l'expression de certains gènes et de ce fait la concentration et/ou la présence des récepteurs utilisés par les phages lors de l'infection, à la surface des cellules (Corbin *et al.*, 2001) (Hentzer *et al.*, 2005).

L'infection étant en partie conditionnée par l'état physiologique des cellules (Sillankorva *et al.*, 2004b), l'utilisation de la qPCR viable a donc été envisagée dans cette partie dans le but :

- d'identifier au sein d'un même biofilm les différentes populations sur la base de leur activité métabolique.
- de comparer cette composition avec celle d'un biofilm traité avec les bactériophages et ainsi mettre en évidence l'existence d'une partie de la population qui sous l'effet d'un stress deviendrait métaboliquement inactive.

Dans les conditions de cette étude, les résultats obtenus par cette méthode n'ont pas permis de mettre en évidence une hétérogénéité métabolique des cellules au sein d'un même biofilm. Ceci se traduit par une population bactérienne viable (métaboliquement active) équivalente à la population totale (obtenue par qPCR classique). Ce constat soulève plusieurs questionnements et hypothèses, notamment sur les biais de la méthode utilisée. En effet, si la méthode de dénombrement par culture ne permet pas de détecter les bactéries VNBC (Pinto *et al.*, 2015), la qPCR viable peut, quant à elle, surestimer la part de la population viable si l'intercalant utilisé ne permet d'inhiber totalement l'amplification de l'ADN des bactéries métaboliquement inactives. Dans cette optique, l'utilisation de témoins faux positifs avait pour objectifs de quantifier la part de fluorescence non spécifique de l'ADN des échantillons. Après un traitement à 90 °C durant 20 min, la totalité de l'ADN des cellules a été libéré et incubé à l'obscurité avec l'intercalant PEMAX™. En présence de l'ADN libre, ce dernier est capable de s'insérer, puis après activation aux UV de se lier de manière covalente, inhibant ainsi la réaction d'amplification par la Taq polymérase. Toutefois, des essais réalisés en qPCR SYBR Green sur plusieurs dilutions, ont mis en évidence un signal de fluorescence qui équivaut à une quantité de 3,5 à 5,1 Log UFC/mL malgré l'absence de bactéries viables détectées sur milieu nutritif gélosé.

Dans la littérature, plusieurs études utilisant les intercalants type EMA ou PMA de 1^{ère} génération mettent en avant l'existence d'un signal de fluorescence pour les témoins faux positifs. A titre d'exemple, l'exposition de spores de *Bacillus subtilis* tuées par autoclave à 121°C durant 20 min, à l'agent EMA, ne permet pas de supprimer totalement le signal de fluorescence (Rawsthorne *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont été obtenus chez différents microorganismes tels que *Listeria innocua* (Løvdal *et al.*, 2010), *Listeria monocytogenes* (Rudi *et al.*, 2005), *Lactobacillus plantarum* (Daranas *et al.*, 2018), les bactéries fécales (Bae *et al.*, 2009), les protozoaires (Fittipaldi *et al.*, 2011), les mycobactéries (Kralik *et al.*, 2010).

Une des difficultés de la qPCR viable consiste donc à adapter le protocole selon l'espèce bactérienne et la séquence ciblée (Fittipaldi *et al.*, 2012). Malgré les avantages avérés de cet outil analytique, il existe des études démontrant les limites de la v-PCR. Fittipaldi *et al.* (Fittipaldi *et al.*, 2012) discutent ainsi dans leur revue de l'ensemble des paramètres qu'il est nécessaire de prendre en considération afin d'obtenir des données de viabilité les plus représentatives et précises possibles. Bien choisir l'intercalant à utiliser selon l'espèce bactérienne, déterminer la concentration à ajouter, la source lumineuse d'activation, le temps et la température d'incubation sont autant d'éléments qui peuvent faire

l'objet de modifications. La composition des tubes dans lesquels la réaction se produit peut également impacter l'efficacité des intercalants (Agustí *et al.*, 2017). Plus récemment, l'étude de Daranas *et al.*, (Daranas *et al.*, 2018) qui utilise également le PEMAXTM comme intercalant, met en avant l'importance de la taille de l'amplicon. Bien que la longueur optimale de l'amplicon en qPCR soit inférieure à 100 bp (Bustin *et al.*, 2009), leurs travaux ont montrés que pour la q-PCR viable l'amplification de séquences plus longues est nécessaire. En effet, la probabilité pour que les colorants s'intercalent dans la séquence d'ADN ciblée par la q-PCR viable des bactéries mortes, est proportionnelle avec la taille de cette même séquence. En passant d'un amplicon de 92 bp à 188 bp par modification d'un des primers, Daranas *et al.*, (Daranas *et al.*, 2018) obtiennent ainsi jusqu'à 1/3 de réduction du signal lors de la v-PCR pour la population de bactéries mortes, ce qui traduit une meilleure efficacité d'inhibition de l'amplification de l'ADN des cellules mortes et donc une estimation plus juste de la population viable (cultivable et VBNC). D'autres études soulignent également l'importance de la taille de la cible nucléotidique et proposent même de réaliser une première PCR avec un amplicon de grande taille pour avoir une efficacité maximum du traitement, puis une seconde PCR plus spécifique (Contreras *et al.*, 2011). Chez *Salmonella enterica* l'utilisation de la PMA-qPCR ciblant une longue séquence de 1641 pb permet de diminuer le signal des cellules tuées par la chaleur de 7 Log (Banihashemi *et al.*, 2012).

Les résultats de qPCR/ v-qPCR permettent de faire le postulat que les cellules d'un jeune biofilm de 24 h sont majoritairement de cellules viables, mais également après 14 h de croissance supplémentaire. L'application de phages sur les biofilms dans les conditions de cette étude permet de réduire de quelques Log la population de cellules viables selon la souche, en revanche, il est possible que parmi les bactéries viables restantes détectées par v-qPCR la proportion de bactérie VBNC ait augmenté. Dans notre cas, la présence de phages rend impossible une vérification par un dénombrement sur boîte des bactéries cultivables. Pourtant il serait intéressant de pouvoir quantifier cette part de la population moins sensible aux agents antibactériens mais qui toute fois constitue toujours un danger en conservant leur pouvoir infectieux (Oliver, 2005).

IV.5 Conclusion :

Le travail réalisé dans cette partie confirme la complexité des interactions entre les phages et les cellules bactériennes lorsque celles-ci sont enchâssées dans la matrice extracellulaire du biofilm.

Le dénombrement des bactéries dans le biofilm à 24 h et à 38 h coïncide avec les observations déjà faites dans la littérature sur le changement d'activité métabolique des cellules ainsi que leur état physiologique qui n'est pas en faveur d'une multiplication. Toutefois, il pourrait être intéressant de confirmer cette tendance en utilisant des méthodes complémentaires visant à caractériser la biomasse du biofilm (cristal violet), son activité métabolique (XTT, luminométrie) comme cela a pu être fait dans l'étude de Pires *et al.*, (Pires *et al.*, 2011), mais également par microscopie pour ce qui est de la structure (Zhang *et al.*, 2013) et ce, avec ou sans traitement.

Les conditions de cette étude ont été limitées à un type de surface, deux souches de *P. aeruginosa*, deux phages, un seul temps de traitement de 14 h en milieu minimum et des doses infectieuses comprises entre 50 et 300. Or dans la littérature, il a été démontré que l'efficacité des phages pour contrôler le biofilm de *Pseudomonas spp* varie selon la souche utilisée, le type de surface considéré, l'âge et l'environnement du biofilm, le type de phages et leur modalité d'application. Ce qui suggère que les paramètres testés ici sont non exhaustifs et tous peuvent faire l'objet de futurs essais.

Pour des raisons logistique, l'effet du traitement a été constaté au bout de 14 h seulement, or il serait intéressant de suivre durant cette période la population bactérienne du biofilm afin de vérifier s'il n'existe pas une action plus précoce et plus marquée des phages, suivie de l'apparition de résistances bactériennes. Ces informations permettraient de définir un protocole de traitement plus adapté, tel que l'utilisation d'un cocktail de phages ou d'un traitement combiné à d'autres molécules.

En termes de méthodologie, la qPCR viable est probablement une méthode intéressante pour suivre l'efficacité d'un traitement sur le biofilm mais nécessite d'être adaptée afin de rendre les résultats plus pertinents. Il peut être envisagé dans un premier temps de modifier la taille de l'amplicon ciblé qui n'était ici que de 220 pb, puis en cas d'échec de choisir un autre agent intercalant. Elle pourra également être envisagée sur des biofilms plus âgés permettant probablement de mettre plus facilement en évidence les différentes sous populations.

CONCLUSION GENERALE :

Le nouvel intérêt porté aux phages pour des utilisations en biotechnologies a favorisé le développement de la recherche visant à mieux comprendre l'interaction des phages avec leurs hôtes bactériens. Néanmoins, la diversité de ces virus ainsi que des espèces bactériennes pouvant être ciblées nécessite d'étudier le comportement d'un système virus/hôte de manière spécifique. Pour des applications antibactériennes, il est important de considérer l'environnement dans lequel évolue l'hôte afin de sélectionner les virus les plus adaptés.

P. aeruginosa fait partie des bactéries Gram - capables de s'implanter à la surface des matériaux sous la forme de biofilms dans les environnements humides. La complexité de l'architecture du biofilm ainsi que les changements de statut physiologique des cellules, liés au passage au mode de vie sessile, renforce la résistance aux agents antibactériens utilisés pour désinfecter les réseaux ou les surfaces contaminées. Dans les réseaux d'eau publics, mais également des établissements thermaux, des protocoles de traitements en préventifs et curatifs sont appliqués pour respecter les normes de qualité microbiologique. Toutefois, lorsqu'un biofilm n'est pas éliminé, il devient un réservoir de bactéries susceptibles d'être disséminées et de contaminer un nouvel environnement. Dans le cas du bacille pyocyanique, bien qu'inoffensif pour la population générale, son opportunisme est responsable de nombreuses infections chez les personnes fragilisées, immunodéprimées ou chez les grands-brûlés. Le manque d'efficacité des traitements existants pour lutter contre les biofilms nécessite de développer des méthodes complémentaires.

Dans ce contexte l'utilisation de phages a d'ores et déjà été envisagée dans les secteurs médicaux et agroalimentaires pour contribuer à l'élimination de biofilms issus de diverses espèces tels que *Listeria spp.*, et *Staphylococcus spp.* implantés sur des surfaces à partir desquelles les risques de disséminations de la bactérie peuvent avoir des conséquences sur la santé humaine. Dans le secteur du traitement de l'eau, l'efficacité des bactériophages est étudiée pour limiter l'installation du biofilm des bactéries du genre *Bacillus*, *Mycobacterium* ou encore *Pseudomonas*, sur les membranes de filtration des systèmes de désalinisation de l'eau par osmose inverse. Pour *P. aeruginosa*, la majorité des études concernent cependant des isolats cliniques et très peu d'études ont identifié des phages capables d'infecter des isolats provenant d'environnements plus spécifiques.

L'objectif de ce travail était donc de mettre en évidence des phages capables d'infecter des isolats de *P. aeruginosa* issus majoritairement de réseaux d'eau. La démarche expérimentale a permis de progresser vers un modèle d'infection du biofilm dans des conditions représentatives d'un environnement hydrique et favorable à l'implantation d'un biofilm, en sélectionnant en amont les couples virus/hôte les plus efficaces.

Pour y parvenir, une collection de phages a été constituée à partir de bactériophages déjà connus et de bactériophages isolés de l'environnement pour cette étude. Leurs propriétés antibactériennes ont été testées sur un panel de sept isolats bactériens correspondant à des isolats de différents réseaux d'eau (eau destinée à la consommation humaine ou eau thermale), à un isolat clinique et à la souche de référence PAO1. Un premier screening a permis de sélectionner des couples phages infectieux/bactéries sensibles par la technique du « spot-test ». Ainsi, les trois isolats de *P. aeruginosa* MLM, D1, ST395E et la souche PAO1 ont été sélectionnées pour leur sensibilité. Les deux phages 14.1 et LUZ7 appartenant respectivement à la famille des *Myoviridae* et *Podoviridae* ainsi que les phages B1, nouvellement isolés et appartenant probablement à la famille des *Podoviridae* sur la base des images obtenues par MET, ont été retenus.

L'efficacité des bactériophages à l'égard des souches de *P. aeruginosa* a été ensuite étudiée en milieu liquide permettant de mettre en évidence différents profils de sensibilité des populations bactériennes en suspensions après 24 h de traitement. On distingue ainsi selon les couples :

(ii) une activité lytique réduisant au minimum de 90 % la population bactérienne. La souche D1 qui présenté un profil de sensibilité pour les phages LUZ7, 14.1 et B1 très proche de celui de la souche PAO1 de référence, avec une lyse de plus de 90 % de la population.

(iii) un effet retardé de quelques heures. L'action des phages B1 a été observée sur la culture planctonique des isolats MLM et ST395E 8h après leur ajout. Cet effet retardé souligne l'existence de mécanismes complexes d'interactions entre les deux entités qui évoluent en faveur d'une infection par les phages des populations planctoniques.

(i) l'absence de lyse bactérienne efficace. Les phages 14.1 et LUZ7 n'ont pas, voir peu, impacté la population planctonique des souches MLM et ST395E.

Malgré le premier screening en amont réalisé par « spot test » mettant en évidence l'action des bactériophages ainsi que leur gamme d'hôtes, l'interaction de certains couples virus/bactéries en milieu liquide n'a pas conduit à une lyse efficace (> 90 %) de la population planctonique. Le comportement des phages, susceptible d'être modifié en fonction de l'état physiologique de l'hôte, doit être pris en compte et confirme le fait que la sélection d'un phage ne peut se faire uniquement sur la base des essais en « spot test ».

Au cours de ces essais en milieu liquide, l'influence de différentes doses infectieuses (MOI) a été étudiée (1; 10; 100). Les résultats ont montré une diminution de la population planctonique proportionnelle à la quantité de phages qui a été ajouté. Ces données suggèrent que l'utilisation de doses infectieuses croissantes permettrait de réduire la durée du traitement. Malgré tout, les résultats montrent une re-croissance de la population après 10 h de traitement qui semble être liée à la sélection de bactéries

ayant acquis des résistances et sur lesquelles l'application d'un second traitement avec les mêmes phages n'a montré aucun effet.

Les profils d'efficacité obtenus sur les isolats en milieu liquide ont permis de sélectionner la souche de référence PAO1 ainsi que l'isolat D1. Plusieurs choix ont ensuite été faits afin d'établir un modèle de biofilm sur lequel tester l'action bactéricide des phages 14.1 et LUZ7. Un biofilm de 24 h a été cultivé sur des coupons en INOX 316 L immergés, permettant de se placer dans des conditions plus représentatives de la réalité que lorsque les essais sont réalisés en plaques (96 ou 24 puits). Les traitements ont été réalisés durant 14 h avec des MOI comprises entre 50 et 300. La comparaison des populations de *P. aeruginosa* constituant les biofilms traités et non traités a révélé une différence maximum de population de 1,4 équivalent Log UFC /cm² de coupon.

Une partie des résultats a permis également de souligner une répartition des phages en faveur d'infections ciblant les cellules planctoniques et inhibant leur prolifération autour du biofilm. Au-delà de leur pouvoir lytique sur le biofilm existant, les phages ont ainsi probablement contribué à limiter la dispersion des cellules du biofilm dans le milieu et sont parvenus à jouer leur rôle antimicrobien. En milieu liquide, la disponibilité des cellules favorise leur rencontre avec les phages circulant librement dans le milieu. Les nutriments nécessaires au développement bactérien sont également plus facilement accessibles pour les cellules planctoniques que pour les cellules du biofilm et maintiennent un métabolisme actif favorable à la multiplication des virus. D'autre part lorsque les cellules bactériennes passent d'un mode de vie planctonique à sessile, l'expression de certains gènes est susceptible d'être modifiée voir supprimée. Lorsqu'il s'agit de gènes codant pour les récepteurs de la surface cellulaire reconnus par les phages, l'infection n'est plus possible. D'une manière générale, la superposition des cellules au sein du biofilm ne facilite pas l'accès des phages aux cellules des différentes strates.

178

Pour augmenter l'action des phages sur les biofilms, il serait intéressant de poursuivre l'étude en testant d'autres phages, et principalement ceux possédant des dépolymérases. La présence de cette enzyme facilite l'accès des phages aux cellules du biofilm en dégradant les polysaccharides de la matrice. Dans ces conditions, l'utilisation de la microscopie en complément des données quantitatives permettrait d'apporter des informations sur l'évolution de la structure de la matrice extracellulaire en présence des virus. En effet, la matrice extracellulaire restante après un traitement est susceptible de participer à une recolonisation en offrant des points d'ancrage supplémentaires aux microorganismes colonisateurs. Il pourrait également être envisagé d'utiliser des doses infectieuses bien supérieures (MOI > 300) et un temps de traitement plus long (> 14 h).

Tout comme dans le cas de l'antibiothérapie, certaines bactéries en présence des virus, évoluent et mettent en place des systèmes leur permettant de contourner l'infection. Parmi ces systèmes, ceux qualifiés de résistance innée permettent aux bactéries (i) de masquer leurs récepteurs et ainsi empêcher l'adsorption des phages à leur surface, (ii) de bloquer l'injection du génome viral, ou lorsque le génome

parvient à entrer dans le cytoplasme, (iii) d'empêcher sa réplication par l'intermédiaire de systèmes de restriction et modifications de l'ADN, (iv) d'interrompre le cycle infectieux en provoquant la mort de la cellule infectée, ou encore (v) d'interférer avec l'assemblage des particules virales. D'autres systèmes qualifiés d'adaptatifs peuvent cibler et cliver spécifiquement une séquence d'ADN et tout autre élément mobile génétique considéré comme étranger à la bactérie (CRISPR-Cas).

En revanche, à l'inverse des molécules pharmaceutiques, les phages, en tant qu'entités biologiques vivantes, sont également capables à leur tour d'évoluer et de rétablir l'infection par des mutations/modifications ponctuelles de leur génome ou en injectant en même temps que leur génome des protéines capables d'inhiber l'action du système CRISPR-Cas. L'utilisation des phages ne peut cependant reposer sur ces processus non prédictibles. L'émergence de bactéries résistantes n'étant pas une issue envisageable, les recherches ont permis notamment en médecine, de préconiser une utilisation des phages en cocktail ou combinés à d'autres molécules. Au-delà de l'efficacité bactéricide qui est souvent supérieure à celle d'un traitement mono phage, la mise en place de mécanismes de défenses se révèle plus coûteuse énergétiquement pour les bactéries et diminue donc fortement la probabilité d'apparition de résistances (Schmerer *et al.*, 2014). Parmi les molécules envisagées, les antibiotiques sont souvent testés puisque les souches sont majoritairement cliniques (Chaudhry *et al.*, 2017; Dickey and Perrot, 2019), mais d'autres essais mettent en avant l'utilisation d'huiles essentielles et de molécules végétales, plus durables, dont les propriétés antibactériennes sont déjà prouvées (Henriques *et al.*, 2017).

179

Les études s'intéressant à l'implantation du biofilm sur différentes surfaces soulignent de plus en plus souvent les bénéfices apportés par un traitement appliqué en préventif. Dans le cas des surfaces, l'application des phages pourrait être envisagée sous la forme d'un bain immersifs lorsqu'il s'agit de pièces démontables, ou en appliquant un flux d'une solution contenant des phages pour des surfaces plus difficiles d'accès. Dans certains cas, l'application d'un hydrogel contenant les phages sur les surfaces susceptibles d'être contaminées se révèle être efficace mais ne pourrait concerner que les pièces et ustensiles à usages uniques. Dans le cas contraire, les pièces devront être reconditionnées avant une nouvelle utilisation. Chacune de ces applications, nécessiterait toutefois de mettre au point des solutions de phages purifiées et stables lors de leur conservation. Des essais devront également apporter la preuve de leur efficacité et de leur innocuité.

Annexe 1

Tableau a : Essai n°1 : Titres minimum (en PFU.mL⁻¹) de chaque extrait de phages nécessaire pour obtenir une lyse totale de la souche *P. aeruginosa* testée

		Noms des souches <i>P. aeruginosa</i>				
		PAO1	MLM	D1	ST395E	ST111/E1/E6/D2/ST395P
Noms des phages (Titre minimum pour une lyse totale en PFU.mL ⁻¹)	EL	2,1.10 ⁴	2,1.10 ⁸	2,1.10 ⁶	2,1.10 ⁸	
	LUZ7	1.10 ⁶	1.10 ⁸	1.10 ⁸	1.10 ⁸	
	LuZ19	8.10 ⁵	8.10 ⁷	8.10 ⁷	1.10 ⁹	
	Pev 2	1,7.10 ⁶	1,7.10 ⁸	1,7.10 ⁶	1,7.10 ¹⁰	
	B1	1,2.10 ⁵	1,2.10 ⁹	1,2.10 ⁷	1,2.10 ⁷	
	14.1	6,9.10 ⁵	6,9.10 ⁹	6,9.10 ⁷	6,9.10 ⁷	
	MP22	4,30.10 ⁶	4,30.10 ¹⁰	4,30.10 ⁸	4,30.10 ⁸	
	LDK16	1,6.10 ⁶	1,6.10 ¹⁰	1,6.10 ⁸	1,6.10 ⁸	

Tableau b : Essai n°2 : Titres minimum (en PFU.mL⁻¹) de chaque extrait de phages nécessaire pour obtenir une lyse totale de la souche *P. aeruginosa* testée

		Noms des souches <i>P. aeruginosa</i>				
		PAO1	MLM	D1	ST395E	ST111/E1/E6/D2/ST395P
Noms des phages (Titre minimum pour une lyse totale en PFU.mL ⁻¹)	EL	1.10 ⁵	>10 ¹⁰	1.10 ⁸	>10 ¹⁰	
	LUZ7	1.10 ⁵	1.10 ⁷	1.10 ⁷	1.10 ⁷	
	LuZ19	1.10 ⁵	>10 ¹⁰	1.10 ⁷	>10 ¹⁰	
	Pev 2	1.10 ⁵	1.10 ⁷	1.10 ⁶	1.10 ⁷	
	B1	1.10 ⁵	>10 ¹⁰	1.10 ⁷	>10 ¹⁰	
	14.1	1.10 ⁵	1.10 ⁹	1.10 ⁷	1.10 ⁹	
	MP22	1.10 ⁵	>10 ¹⁰	1.10 ⁸	>10 ¹⁰	
	LDK16	1.10 ⁵	>10 ¹⁰	1.10 ⁷	>10 ¹⁰	

Annexe 2

Tableau a : Compositions des milieux de cultures des souches de *P. aeruginosa*

Milieu LB	Milieu minimum
Tryptone 10g/L Sodium Chlorure 10g/L Extrait de Levure 5g/L pH du milieu prêt à l'emploi à 25°C : 7,0 ±0.2	Eau minérale faible minéralité Glucose 0.2% Acides casamines 0.005%

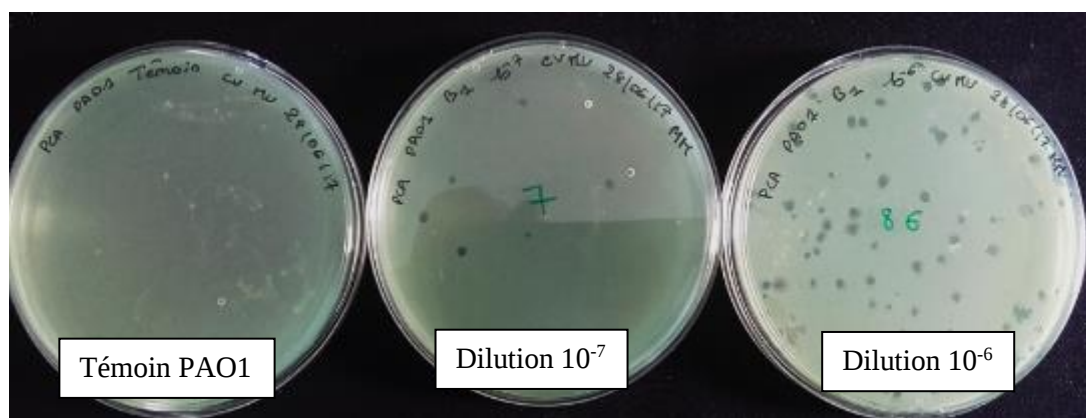


Figure a Numération des bactériophages B1 de la solution stock, conservés à +4°C en milieu minimum
 Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} de la solution stock ont été réalisées dans du tampon SM. 10µL de chaque dilution sont ajoutés à 100µL d'une culture PAO1 en phase exponentielle de croissance et 5mL d'agar 0.7%, avant d'être coulés sur des boîtes différentes en double layer et identifiées par le facteur de dilution. Ci-dessus, la solution de phages B1 titrée en Juin 17. Seules les boîtes comportant entre 30 et 300 plages de lyses permettent une lecture du titre viral. A droite de l'image, la boîte correspondant à la dilution 10^{-6} comporte 86 plages de lyse : $[B1 \text{ en PFU.mL}^{-1}] = 86 \cdot 10^6 \cdot 100 = 8,6 \cdot 10^9 \text{ PFU.mL}^{-1}$.

Tableau b : Conservation des phages B1, 14.1 et LUZ7 en milieu minéral minimum : suivi dans le temps des titres (en PFU.mL⁻¹) :

Phages	04.2017	06.2017	07.2017	11.2017	01.2018	06.18
B1	$1 \cdot 10^{10}$	$8,6 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^{10}$	$1,1 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{10}$	$1,1 \cdot 10^{10}$
14.1	$8,5 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$2,19 \cdot 10^{10}$	$1,6 \cdot 10^{10}$	$1,4 \cdot 10^{10}$	$3,6 \cdot 10^{10}$
LUZ7	$1,7 \cdot 10^{10}$	$1,7 \cdot 10^{10}$	$2,47 \cdot 10^{10}$	$1,5 \cdot 10^{10}$	$6 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^{10}$

Annexe 3

Tableau a : Progression des valeurs de densité optique des cultures préparées à partir de la souche PAO1, entre 4 et 24h après ajout des phages

Phages	MOI	4h		6h		8h		10h		24h
		DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	Δ DO
14.1	0,1	0,443	0,158	0,257	0,154	0,119	0,059	0,060	0,019	~0,01
	1	0,399		0,165		0,079		0,049		
	10	0,285		0,103		0,060		0,041		
B1	0,1	0,426	0,218	0,138	0,081	0,123	0,062	0,065	0,03	~0,01
	1	0,362		0,206		0,092		0,047		
	10	0,208		0,125		0,061		0,035		
LUZ7	0,1	0,405	0,120	0,214	0,109	0,096	0,052	0,049	0,025	~0,01
	1	0,369		0,241		0,132		0,074		
	10	0,285		0,132		0,080		0,052		
témoin		0,583		0,670		0,691		0,729		

Tableau b : Progression des valeurs de densité optique des cultures préparées à partir de la souche MLM, entre 6 et 24h après ajout des phages

Phages	MOI	6h		8h		10h		24h	
		DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO
14.1	0,1	0,610	0,027	0,643	0,059	0,649	0,072	0,694	0,060
	1	0,599		0,614		0,615		0,663	
	10	0,583		0,584		0,577		0,634	
B1	0,1	0,581	0,028	0,615	0,042	0,626	0,019	0,663	0,180
	1	0,594		0,642		0,645		0,592	
	10	0,609		0,600		0,600		0,483	
LUZ7	0,1	0,629	0,056	0,678	0,043	0,700	0,053	0,881	0,141
	1	0,633		0,673		0,693		0,840	
	10	0,577		0,635		0,647		0,740	
témoin		0,614		0,667		0,677		0,841	

Tableau c : Progression des valeurs de densité optique des cultures préparées à partir de la souche ST395E, entre 6 et 24h après ajout des phages, ainsi que pour les tubes témoins

Phages	MOI	6h		8h		10h		24h	
		DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO
14.1	0,1	0,714	0,08	0,764	0,10	0,765	0,13	0,887	0,26
	1	0,716		0,737		0,747		1,004	
	10	0,635		0,650		0,634		0,740	
B1	0,1	0,751	0,02	0,787	0,06	0,814	0,15	0,429	0,09
	1	0,742		0,798		0,776		0,390	
	10	0,734		0,735		0,659		0,340	
LUZ7	0,1	0,722	0,04	0,782	0,03	0,865	0,03	1,037	0,11
	1	0,759		0,817		0,883		1,143	
	10	0,741		0,790		0,893		1,053	
témoin		0,737		0,810		0,893		1,193	

Tableau d : Progression des valeurs de densité optique des différentes cultures de la souche D1, entre 4 et 24h après ajout des phages et selon les différentes MOI

Phages	MOI	4h		6h		8h		10h		24h	
		DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO	DO _{600nm}	Δ DO
14.1	0,1	0,612	0,2	0,524	0,4	0,335	0,2	0,145	0,05	0,150	0,03
	1	0,552		0,388		0,224		0,110		0,127	
	10	0,402		0,136		0,109		0,090		0,119	
B1	0,1	0,620	0,2	0,363	0,2	0,384	0,3	0,139	0,05	0,139	0,03
	1	0,584		0,432		0,233		0,123		0,119	
	10	0,433		0,244		0,110		0,091		0,113	
LUZ7	0,1	0,619	0,2	0,542	0,4	0,293	0,2	0,114	0,03	0,146	0,03
	1	0,571		0,378		0,192		0,107		0,130	
	10	0,433		0,174		0,110		0,088		0,112	
témoin		0,614		0,708		0,776		0,808		0,995	

Annexe 4

Tableau a : Pourcentages des populations restantes, basés sur la lecture des densités optique, après 4 h, 8 h et 24 h d'action des phages 14.1, B1 et LUZ7 en fonction des MOI testées

		PAO1 _{reference}			MLM			ST395E			D1		
Phages	MOI	4h	8h	24h	4h	8h	24h	4h	8h	24h	4h	8h	24h
14.1	0,1	72%	17%	<1%	78%	96%	83%	98 à 101%	94%	74%	100%	44%	15%
	1	65%	11%		77%	92%	79%		91%	84%	90%	29%	13%
	10	46%	9%		78%	87%	75%		80%	62%	65%	14%	12%
B1	0,1	69%	17%	<1%	77%	92%	79%	~98%	97%	36%	101%	50%	14%
	1	59%	13%		79%	96%	70%		99%	33%	95%	31%	12%
	10	34%	9%		78%	89%	57%		90%	28%	70%	14%	11%
LUZ7	0,1	66%	14%	<1%	80%	101%	105%	~96%	96%	87%	101%	38%	15%
	1	60%	19%		79%	100%	100%		101%	96%	93%	25%	13%
	10	46%	12%		81%	95%	88%		97%	88%	70%	14%	11%
témoin DO _{600nm}		0,61	0,69	0,97	0,71	0,67	0,84	0,63	0,81	1,19	0,61	0,76	1,0

Annexe 5

Tableau a: Principales méthodes de détection et quantification des bactéries viables dans un prélèvement environnemental

Techniques		Principe	Matériel	Limites	Références
Numération	Détection sur boîtes	Compter les colonies	- Boîtes de pétri	- Temps selon la croissance de l'espèce - Ne détecte pas les VBNC	(Pujol <i>et al.</i> , 2006)
	LIVE/DEAD® BacLight™	Marquage permettant de différencier les cellules selon leur intégrité membranaire et numération par microscopie	- Colorants fluorescents : SYTO®9 (vert) & propidium iodide (rouge) - Microscope à épifluorescence	- Temps - Equipement lourd - Nécessite des cellules isolées - Nécessite d'adapter le protocole selon l'espèce	(Cunningham <i>et al.</i> , 2009)
	LIVE/DEAD® BacLight™ combiné avec la cytométrie en flux	Marquage différentiel et numération par cytométrie	- Colorants - Cytomètre en flux		(Allegra <i>et al.</i> , 2008)
	Acridine orange ou (DAPI) 4,6-diamidino-2-phenylindole	Marquage des cellules et irradiation aux UV / numération par microscopie	- Acridine orange/DAPI - Microscope avec laser UV		(Du <i>et al.</i> , 2007)
Activité Métabolique	Sels de tétrazolium: INT p-iodonitrotetrazolium violet CTC 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium chloride	Suivi de l'activité de la chaîne de transport des électrons. Molécules pouvant entrer en compétition avec l'oxygène, accepteur final de la chaîne et former un précipité >Détection DO 480 nm	- INT / CTC/ XTT - Formaldéhyde 37% - Filtres - Spectrophotomètre	- Limites de détection - Ne permet pas de cibler spécifiquement une espèce	(Nocker and Camper, 2009) (Alves <i>et al.</i> , 2015)
	Bioluminescence (Luciferase Test)	Estimation de l'ATP générer par les cellules >Détection DO 562 nm	- Kit luminométrie - Luminomètre	- [ATP] peut varier selon le stress imposé aux cellules [fausse interprétation] - Ne permet pas de cibler une espèce	(Sánchez <i>et al.</i> , 2013)
Acides Nucléiques	qPCR	Détection des acides nucléiques à partir d'ADN ou d'ARN avec les amorces F&R spécifiques	- Kit extraction ADN/ARN - Kit PCR (amorces, Taq, dNTP) - Thermocycler	- Amplifie l'ADN des cellules viables mais aussi des cellules mortes [sur-estimation]	(Pujol <i>et al.</i> , 2006)
	RT-PCR			- L'expression des ARNm varie selon l'état physiologique de la cellule [fausse interprétation] - Instabilité des ARN	(Trevors, 2011) (Elizaquivel <i>et al.</i> , 2014)
	qPCR viable	Détecte et amplifie uniquement les acides nucléiques de cellules viables, après traitement	- Agents intercalants de l'ADN : EMA, PMA ou PEMAX - Fixation sur l'ADN = inhibition de la PCR	- Nécessite d'adapter le protocole selon l'espèce ciblée	(Fittipaldi <i>et al.</i> , 2012)



Article

Selection of Bacteriophages to Control In Vitro 24 h Old Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Drinking and Thermal Water

Vanessa Magin ^{1,2,*}, Nathalie Garrec ¹ and Yves Andrés ²

¹ Centre Scientifique et Technique du Bâtiment, Plateforme AQUASIM, 44300 Nantes, France

² Institut Mines Télécom Atlantique, Laboratoire de Génie des Procédés Environnement Agro-alimentaire (UMR CNRS 6144), 44300 Nantes, France

*Correspondence: vanessa.magin@cstb.fr; Tel.: +33-619-480-916



Received: 12 June 2019; Accepted: 11 August 2019; Published: 13 August 2019

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes public healthcare issues. In moist environments, this Gram-negative bacterium persists through biofilm-associated contamination on surfaces. Bacteriophages are seen as a promising alternative strategy to chemical biocides. This study evaluates the potential of nine lytic bacteriophages as biocontrol treatments against nine environmental *P. aeruginosa* isolates. The spot test method is preliminarily used to define the host range of each virus and to identify their minimum infectious titer, depending on the strain. Based on these results, newly isolated bacteriophages 14.1, LUZ7, and B1 are selected and assessed on a planktonic cell culture of the most susceptible isolates (strains MLM, D1, ST395E, and PAO1). All liquid infection assays are achieved in a mineral minimum medium that is much more representative of real moist environments than standard culture medium. Phages 14.1 and LUZ7 eliminate up to 90% of the PAO1 and D1 bacterial strains. Hence, their effectiveness is evaluated on the 24 h old biofilms of these strains, established on a stainless steel coupon that is characteristic of materials found in thermal and industrial environments. The results of quantitative PCR viability show a maximum reduction of 1.7 equivalent Log CFU/cm² in the coupon between treated and untreated surfaces and shed light on the importance of considering the entire virus/host/environment system for optimizing the treatment.

Keywords: bacteriophages; *Pseudomonas aeruginosa* isolates; planktonic cells; biofilms; stainless steel surfaces; disinfection; viability q-PCR

Références Bibliographiques

- Abdallah, Marwan, Benoliel, Corinne, Drider, Djamel, et al., 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 196, 453–472. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
- Abedon, Stephen T., 2011. Lysis from without. *Bacteriophage* 1, 46–49. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13980>
- Ackermann, H.W., 2011. Bacteriophage taxonomy. *Microbiol. Aust.* 32, 90–94. <https://doi.org/10.1071/MA11090>
- Ackermann, H.W., 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res. Microbiol.* 154, 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6)
- Ackermann, H.W., Tiekotter, Kenneth L., 2012. Murphy's law—if anything can go wrong, it will. *Bacteriophage* 2, 122–129. <https://doi.org/10.4161/bact.20693>
- Ackermann, H.W., Tremblay, Denise, Moineau, Sylvain, 2004. Long - Term Bacteriophage Preservation.
- Adams, M.H., Hancock, R.E., 1959. Bacteriophages. New York, Interscience.
- Adriaenssens, Evelien M., Lehman, Susan M., Vandersteegen, Katrien, et al., 2015. CIM ® Monolithic Anion- Exchange Chromatography as a Useful Alternative to CsCl Gradient Purification of Bacteriophage Particles. *Virology* 434, 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.018>
- Agirrezabala, Xabier, Martín-Benito, Jaime, Valle, Mikel, et al., 2005. Structure of the connector of bacteriophage T7 at 8Å resolution: structural homologies of a basic component of a DNA translocating machinery. *J. Mol. Biol.* 347, 895–902. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.02.005>
- Agustí, Gemma, Fittipaldi, Mariana, Codony, Francesc, 2017. False-Positive Viability PCR Results : An Association with Microtubes. *Curr. Microbiol.* 0, 0. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1189-3>
- Aksyuk, Anastasia A., Rossmann, Michael G., 2011. Bacteriophage assembly. *Viruses* 3, 172–203. <https://doi.org/10.3390/v3030172>
- Al-Attar, Sinan, Westra, Edze R., Van Der Oost, John, et al., 2011. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol. Chem* 392, 277–289. <https://doi.org/10.1515/BC.2011.042>
- Alkawash, Mustafa A., Soothill, James S., Schiller, Neal L., 2006. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Apmis* 114, 131–138. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2006.apm_356.x
- Allegra, Séverine, Berger, Françoise, Berthelot, Philippe, et al., 2008. Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7813–7816. <https://doi.org/10.1128/AEM.01364-08>
- Alves, Diana R., Perez-Esteban, P., Kot, W., et al., 2015. A novel bacteriophage cocktail reduces and disperses *Pseudomonas aeruginosa* biofilms under static and flow conditions. *Microb. Biotechnol.* 9, 61–74. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12316>
- Aminov, Rustam I., 2010. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbiol.* 1, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Anaissie, Elias J., Penzak, Scott R., Dignani, M. Cecilia, 2002. The hospital water supply as a source of nosocomial infections: A plea for action. *Arch. Intern. Med.* 162, 1483–1492. <https://doi.org/10.1001/archinte.162.13.1483>
- Anany, H., Chen, W., Pelton, R., et al., 2011. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in Meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 6379–6387. <https://doi.org/10.1128/aem.05493-11>

-
- Berry, Joel, Savva, Christos, Holzenburg, Andreas, et al., 2010. The lambda spanin components Rz and Rz1 undergo tertiary and quaternary rearrangements upon complex formation. *Protein Sci.* 19, 1967–77. <https://doi.org/10.1002/pro.485>
- Berry, Joel, Summer, Elizabeth J., Struck, Douglas K., et al., 2008. The final step in the phage infection cycle: the Rz and Rz1 lysis proteins link the inner and outer membranes. *Mol. Microbiol.* 70, 341–51. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06408.x>
- Bertozzi Silva, Juliano, Storms, Zachary, Sauvageau, Dominic, 2016. Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, 1–11. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
- Betts, Alex, Vasse, Marie, Kaltz, Oliver, et al., 2013. Back to the future: Evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Evol. Appl.* 6, 1054–1063. <https://doi.org/10.1111/eva.12085>
- Bickle, T.A., Kruger, D.H., 1993. Biology of DNA restriction. *Microbiol Rev* 57, 434–450. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02255.x>
- Bingham, Ryan, Ekunwe, S.I.N., Falk, Sherry, et al., 2000. The major head protein of bacteriophage T4 binds specifically to elongation factor Tu. *J. Biol. Chem.* 275, 23219–23226. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002546200>
- Blanc, D.S., Nahimana, I., Petignat, C., et al., 2004. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Med.* 30, 1964–1968. <https://doi.org/10.1007/s00134-004-2389-z>
- Bläsi, U., Nam, K., Hartz, D., et al., 1989. Dual translational initiation sites control function of the lambda S gene. *EMBO J.* 8, 3501–3510.
- Blower, T.R., Fineran, P.C., Johnson, M.J., et al., 2009. Mutagenesis and functional characterization of the RNA and protein components of the toxIN abortive infection and toxin-antitoxin locus of *Erwinia*. *J. Bacteriol.* 191, 6029–6039. <https://doi.org/10.1128/JB.00720-09>
- Bolotin, Alexander, Quinkis, Benoit, Sorokin, Alexei, et al., 2005. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Bondy-Denomy, Joe, Pawluk, April, Maxwell, Karen L., et al., 2012. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493, 429–432. <https://doi.org/10.1038/nature11723>
- Bondy-Denomy, Joseph, Garcia, Bianca, Strum, Scott, et al., 2015. Multiple mechanisms for CRISPR–Cas inhibition by anti-CRISPR proteins. *Nature* 526, 136–139. <https://doi.org/10.1038/nature15254>
- Bonilla, Natasha, Rojas, Maria Isabel, Netto Flores Cruz, Giuliano, et al., 2016. Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ* 4, e2261. <https://doi.org/10.7717/peerj.2261>
- Born, Yannick, Bosshard, Lars, Duffy, Brion, et al., 2015. Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds. *Bacteriophage* 5, e1074330. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1074330>
- Bornemann, Gerhild, Waßer, Kai, Tonat, Tim, et al., 2015. Natural microbial populations in a water-based biowaste management system for space life support. *Life Sci. Sp. Res.* 7, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2015.09.002>
- Bos, Rolf, Van Der Mei, Henny C., Busscher, Henk J., 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions - Its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 179–229. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(99)00004-2)
- Boulé, J., Sholberg, P.L., Lehman, S.M., et al., 2011. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 33, 308–317.

- Bourdin, Gilles, Schmitt, Bertrand, Guy, Laure Marvin, et al., 2014. Amplification and purification of T4-Like *Escherichia coli* phages for phage therapy: From laboratory to pilot scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 1469–1476. <https://doi.org/10.1128/AEM.03357-13>
- Bradeley, DE, 1965. The morphology and physiology of bacteriophages as revealed by the electron microscope. *J. R. Microsc. Soc.* 84, 257–316.
- Bradley, D.E., 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31, 230–314.
- Bradley, D.E., 1966. The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acids. *J. Gen. Microbiol.* 44, 383–91.
- Braun, Volkmar, Patzer, Silke I., 2013. Intercellular communication by related bacterial protein toxins: Colicins, contact-dependent inhibitors, and proteins exported by the type VI secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* 345, 13–21. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12180>
- Breitbart, Mya, 2012. Marine Viruses: Truth or Dare. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 425–448. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142805>
- Brenner, S., Horne, R.W., 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 34, 103–110. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(59\)90237-9](https://doi.org/10.1016/0006-3002(59)90237-9)
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., et al., 2011. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: A review. *Biofouling* 27, 1017–1032. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899>
- Brié, Adrien, Bertrand, Isabelle, Meo, Marie, et al., 2016. The Effect of Heat on the Physicochemical Properties of Bacteriophage MS2. *Food Environ. Virol.* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9248-2>
- Brigulla, Matthias, Wackernagel, Wilfried, 2010. Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1027–1041. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2489-3>
- Brouns, Stan J.J., Jore, Matthijs M., Lundgren, Magnus, et al., 2008. Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Science* (80-.). 321, 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689> 190
- Busscher, Henk J., van der Mei, Henny C., 2006. Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 127–41. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.127-141.2006>
- Bustin, Stephen A., Benes, Vladimir, Garson, Jeremy A., et al., 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Butler, C.S., Boltz, J.P., 2014. Biofilm Processes and Control in Water and Wastewater Treatment. *Compr. Water Qual. Purif.* 3, 90–107. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00083-9>
- Buttimer, Colin, McAuliffe, Olivia, Ross, R.P., et al., 2017. Bacteriophages and bacterial plant diseases. *Front. Microbiol.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>
- Campbell, A.M., 1992. Chromosomal insertion sites for phages and plasmids. *J. Bacteriol.* 174, 7495–7499.
- Carson, Louise, Gorman, Sean P., Gilmore, Brendan F., et al., 2010. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 59, 447–55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2010.00696.x>
- Carstens, Alexander, Jacobs-Sera, Deborah, Hansen, Lars, et al., 2018. Unlocking the Potential of 46 New Bacteriophages for Biocontrol of *Dickeya Solani*. *Viruses* 10, 621. <https://doi.org/10.3390/v10110621>
- Catalao, Maria Joao, Gil, Filipa, Moniz-Pereira, José, et al., 2013. Diversity in bacterial lysis systems: Bacteriophages Show the way. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 554–571. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12006>
- Cerca, N., Oliveira, R., Azeredo, J., 2007. Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* planktonic cells

-
- and biofilms to the lytic action of staphylococcus bacteriophage K. Lett. Appl. Microbiol. 45, 313–317. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02190.x>
- Ceyssens, Pieter Jan, Brabban, Andrew, Rogge, Larissa, et al., 2010. Molecular and physiological analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the ‘N4-like viruses’. Virology 405, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.06.011>
- Ceyssens, Pieter Jan, Miroshnikov, Konstantin, Mattheus, Wesley, et al., 2009. Comparative analysis of the widespread and conserved PB1-like viruses infecting *Pseudomonas aeruginosa*. Environ. Microbiol. 11, 2874–2883. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02030.x>
- Chan, Benjamin K., Abedon, Stephen T., 2015. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. Curr. Pharm. Des. 21, 85–99.
- Chaturongakul S., Ounjai P., 2014. Phage-host interplay: examples from tailed phages and Gram-negative bacterial pathogens. Front. Microbiol. 5, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00442>
- Chaudhry, Waqas Nasir, Concepcion-Acevedo, Jeniffer, Park, Taehyun, et al., 2017. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. PLoS One 12, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168615>
- Chauthaiwale, Vijay M., Therwath, A., Deshpandel, Vasanti V., 1992. Bacteriophage lambda as a cloning vector. Microbiol. Rev. 56, 577–591.
- Chen, John, Novick, Richard P., 2009. Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. Science (80-.). 323, 139–141. <https://doi.org/10.1126/science.1164783>
- Chopin, Marie Christine, Chopin, Alain, Bidnenko, Elena, 2005. Phage abortive infection in lactococci: Variations on a theme. Curr. Opin. Microbiol. 8, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.006>
- Christiaen, Steven E.A., Matthijs, Nele, Zhang, Xiao Hua, et al., 2014. Bacteria that inhibit quorum sensing decrease biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Pathog. Dis. 70, 271–279. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12124>
- Chung, I.Y., Jang, H.J., Bae, H.W., et al., 2014. A phage protein that inhibits the bacterial ATPase required for type IV pilus assembly. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 11503–11508. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403537111>
- Chung, In Young, Sim, Nuri, Cho, You Hee, 2012. Antibacterial efficacy of temperate phage-mediated inhibition of bacterial group motilities. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 5612–5617. <https://doi.org/10.1128/AAC.00504-12>
- Chylinski, Krzysztof, Makarova, Kira S., Charpentier, Emmanuelle, et al., 2014. SURVEY AND SUMMARY Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res. 42, 6091–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/gku241>
- CNETh, 2016. Communiqué de presse saison 2015.
- Comeau, André M., Tétart, Françoise, Trojet, Sabrina N., et al., 2007. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. PLoS One 2, e799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>
- Contreras, Paz Jopia, Urrutia, Homero, Sossa, Katherine, et al., 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. J. Microbiol. Methods 87, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.016>
- Conway, J.F., Duda, R.L., Cheng, N., et al., 1995. Proteolytic and conformational control of virus capsid maturation: the bacteriophage HK97 system. J. Mol. Biol. 253, 86–99. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0538>
- Corbin, Brian D., McLean, Robert JC, Aron, Gary M., 2001. Bacteriophage T4 multiplication in a glucose-limited *Escherichia coli* biofilm. Can. J. Microbiol. 47, 680–684. <https://doi.org/10.1139/w01-059>

- Cornelissen, Anneleen, Ceyssens, Pieter-Jan, Krylov, Victor N., et al., 2012. Identification of EPS-degrading activity within the tail spikes of the novel *Pseudomonas putida* phage AF. *Virology* 434, 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.030>
- Cornelissen, Anneleen, Ceyssens, Pieter-Jan, T'Syen, Jeroen, et al., 2011. The T7-Related *Pseudomonas putida* Phage ϕ 15 Displays Virion-Associated Biofilm Degradation Properties. *PLoS One* 6, e18597. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018597>
- Corre, Guillaume, 2015. Hétérogénéité phénotypique dans les populations d'origine clonale : Origine et conséquences.
- Costa, D., Bousseau, A., Thevenot, S., et al., 2015. Nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* associated with a drinking water fountain. *J. Hosp. Infect.* 91, 271–274. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.07.010>
- Costerton, J.W., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* (80-.). 284, 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Cunningham, Eilís, O'Byrne, Conor, Oliver, James D., 2009. Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: Evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food Control* 20, 1141–1144. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.005>
- Curtin, John J., Donlan, Rodney M., Curtin, John J., et al., 2006. Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated Biofilms by *Staphylococcus epidermidis* Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated Biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1268–1275. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1268>
- Czajkowski, Robert, Ozymko, Zofia, de Jager, Victor, et al., 2015. Genomic, Proteomic and Morphological Characterization of Two Novel Broad Host Lytic Bacteriophages Φ PD10.3 and Φ PD23.1 Infecting Pectinolytic *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. *PLoS One* 10, e0119812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119812>
- D'Herelle F., 1917. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *C. R. Acad. Sci. Paris* 165, 373–375. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.07.005>
- D'Hérelle F., 1921. Le Bactériophage: son rôle dans l'immunité. Paris, France.
- D'Hérelle F., 1918a. Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. *Comptes-rendus l'Académie des Sci.* 970–972.
- D'Hérelle F., 1918b. Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). *Comptes-rendus la Société Biol.* 1160–1162.
- Daranas, Núria, Bonaterra, Anna, Francés, Jesús, et al., 2018. Monitoring Viable Cells of the Biological Control Agent *Lactobacillus plantarum* PM411 in Aerial Plant Surfaces by Means of a Strain-Specific Viability Quantitative PCR Method. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e00107-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00107-18>
- De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., et al., 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1131–1138. <https://doi.org/10.1002/bit.260431118>
- Deltcheva, Elitza, Chylinski, Krzysztof, Sharma, Cynthia M., et al., 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–7. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Destoumieux-Garzón, Delphine, Duquesne, Sophie, Peduzzi, Jean, et al., 2005. The iron-siderophore transporter FhuA is the receptor for the antimicrobial peptide microcin J25: role of the microcin Val11-Pro16 beta-hairpin region in the recognition mechanism. *Biochem. J.* 389, 869–76. <https://doi.org/10.1042/BJ20042107>
- Deveau, Hélène, Barrangou, Rodolphe, Garneau, Josiane E., et al., 2008. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190, 1390–400. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-07>

-
- Dewey, Jill S., Savva, Christos G., White, Rebecca L., et al., 2010. Micron-scale holes terminate the phage infection cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 2219–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914030107>
- DGS, 2000. Circulaire DGS / VS 4 N ° 2000-336 du 19 juin 2000 relative à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux 1–25.
- DGS, Sous-direction de la gestion des risques des milieux Bureau des Eaux, 2005. La qualité microbiologique des eaux minérales naturelles utilisées à des fins thérapeutiques en milieu thermal au cours de la saison thermale 2001.
- Dickey, James, Perrot, Véronique, 2019. Adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic concentration against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *PLoS One* 14, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209390>
- Dika, C., Gantzer, C., Perrin, A., et al., 2013. Impact of the virus purification protocol on aggregation and electrokinetics of MS2 phages and corresponding virus-like particles. *Phys. Chem.* 15, 5691. <https://doi.org/10.1039/c3cp44128h>
- Dokland, T., Murialdo, H., 1993. Structural transitions during maturation of bacteriophage lambda capsids. *J. Mol. Biol.* 233, 682–94. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1545>
- Donlan, Rodney M., 2009. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.* 17, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.002>
- Donlan, Rodney M., 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Doolittle, M.M., Cooney, J.J., Caldwell, D.E., 1996. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *J. Ind. Microbiol.* 16, 331–341. <https://doi.org/10.1007/BF01570111>
- Dötsch, Andreas, Eckweiler, Denitsa, Schniederjans, Monika, et al., 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *PLoS One* 7, e31092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031092>
- Drulis-Kawa, Zuzanna, Majkowska-Skrobek, Grazyna, Maciejewska, Barbara, 2015. Bacteriophages and phage-derived proteins--application approaches. *Curr. Med. Chem.* 22, 1757–73.
- Du, Meng, Chen, Jixiang, Zhang, Xiaohua, et al., 2007. Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1349–1354. <https://doi.org/10.1128/AEM.02243-06>
- Dublanchet A., Bourne S., 2007. The epic of phage therapy. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 18, 15–18.
- Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.J., et al., 1988. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Rev. Biophys.* 21, 129–228.
- Dussoix, Daisy, Arber, Werner, 1962. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*H: II Control over acceptance of DNA from infecting phage lambda. *J. Mol. Biol.* 5, 37–49. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(62\)80059-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(62)80059-X)
- Eboigbodin, E., Seth, A., Biggs, C.A., 2008. A review of biofilms in domestic plumbing. *J. Am. Water Work. Assoc.* 100, 131–138.
- Edgar, Rotem, Friedman, Nir, Shahar, Molshanski Mor, et al., 2012. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 744–751. <https://doi.org/10.1128/AEM.05741-11>
- Eichler, Stefan, Christen, Richard, Hölte, Claudia, et al., 2006. Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1858–1872. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1858-1872.2006>

- Elizaquível, P., Aznar, R., Sánchez, G., 2014. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J. Appl. Microbiol.* 116, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.12365>
- Ellis, E.L., Delbrück, M., 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22, 365–84.
- Endersen, Lorraine, Coffey, Aidan, Neve, Horst, et al., 2013. Isolation and characterisation of six novel mycobacteriophages and investigation of their antimicrobial potential in milk. *Int. Dairy J.* 28, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.07.010>
- Erez, Zohar, Steinberger-Levy, Ida, Shamir, Maya, et al., 2017. Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. *Nature* 541, 488–493. <https://doi.org/10.1038/nature21049>
- Evans, T.J., Ind, A., Komitopoulou, E., et al., 2010. Phage-selected lipopolysaccharide mutants of *Pectobacterium atrosepticum* exhibit different impacts on virulence. *J. Appl. Microbiol.* 109, 505–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04669.x>
- Exner, M., Kramer, A., Lajoie, L., et al., 2005. Prevention and control of health care-associated waterborne infections in health care facilities. *Am. J. Infect. Control* 33, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.04.002>
- Fauquet, C.M., Fargette, D., 2005. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virol. J.* 2, 64. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-64>
- Fernández, Lucía, Breidenstein, Elena B.M., Hancock, Robert E.W., 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resist. Updat.* 14, 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2011.01.001>
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., et al., 2009. The phageabortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *PNAS* 106, 894–899. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808832106>
- Fineran, P.C., Charpentier, Emmanuelle, 2012. Memory of viral infections by CRISPR-Cas adaptive immune systems: Acquisition of new information. *Virology* 434, 202–209. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.10.003>
- Fineran, P.C., Gerritzen, Matthias J.H., Suárez-Diez, María, et al., 2014. Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E1629–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400071111>
- Fish, R., Kutter, E., Wheat, G., et al., 2016. Bacteriophage treatment of intransigent diabetic toe ulcers: a case series. *J. Wound Care* 25, S27–S33. <https://doi.org/10.12968/jowc.2016.25.7.s27>
- Fister, Susanne, Robben, Christian, Witte, Anna K., et al., 2016. Influence of environmental factors on phage-bacteria interaction and on the efficacy and infectivity of phage P100. *Front. Microbiol.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01152>
- Fittipaldi, Mariana, Nocker, Andreas, Codony, Francesc, 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J. Microbiol. Methods* 91, 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.007>
- Flemming, Hans-Curt, Neu, Thomas R., Wozniak, Daniel J., 2007. The EPS matrix: the house of biofilm cells. *J. Bacteriol.* 189, 7945–7. <https://doi.org/10.1128/JB.00858-07>
- Floyd, Madison, Winn, Matthew, Cullen, Christian, et al., 2016. Swimming Motility Mediates the Formation of Neutrophil Extracellular Traps Induced by Flagellated *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 12, 1–32. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005987>
- Fokine, Andrei, Rossmann, Michael G., 2014. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages. *Bacteriophage* 4, e28281. <https://doi.org/10.4161/bact.28281>
- Frampton, Rebekah A., Taylor, Corinda, Holguín Moreno, Angela V., et al., 2014. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2216–2228. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-14>
- Friedman, Lisa, Kolter, Roberto, 2004. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa*

-
- PA14 biofilms. *Mol. Microbiol.* 51, 675–690. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03877.x>
- Fu, W., Forster, T., Mayer, O., et al., 2010. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 397–404. <https://doi.org/10.1128/AAC.00669-09>
- Fuller, Derek N., Raymer, Dorian M., Kottadiel, Vishal I., et al., 2007. Single phage T4 DNA packaging motors exhibit large force generation, high velocity, and dynamic variability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16868–16873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704008104>
- G.J.Jensen, 2010. Cryo-EM, Part B: 3-D Reconstruction, *Methods in Enzymology*, Methods in Enzymology. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)82023-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)82023-3)
- Gagnon, Graham A., Slawson, Robin M., Huck, Peter M., 2000. Effect of easily biodegradable organic compounds on bacterial growth in a bench-scale drinking water distribution system. *Can. J. Civ. Eng* 27, 412–420. <https://doi.org/10.1139/cjce-27-3-412>
- Garbe, Julia, Wesche, Andrea, Bunk, Boyke, et al., 2010. Characterization of JG024, a *pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC Microbiol.* 10, 301. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-301>
- Garvey, M.I., Bradley, C.W., Tracey, J., et al., 2016. Continued transmission of *Pseudomonas aeruginosa* from a wash hand basin tap in a critical care unit. *J. Hosp. Infect.* 94, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.05.004>
- Georges, Fawzy, Ray, Heather, 2017. Genome editing of crops: A renewed opportunity for food security. *GM Crops Food* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1080/21645698.2016.1270489>
- Gimbel, Rolf, Graham, Nigel, Collins, M. Robin (Eds.), 2006. Recent Progress in Slow Sand and Alternative Biofiltration Processes. International Water association.
- Glonti, T., Chanishvili, N., Taylor, P.W., 2010. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.* 108, 695–702. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04469.x>
- Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., et al., 2015. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J.* 34, 169–183. <https://doi.org/10.15252/embj.201489455>
- Goyal, M., Saunders, N.A., van Embden, J.D., et al., 1997. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by spoligotyping and IS6110 restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 35, 647–651.
- Grasemann H, Ioannidis I, Tomkiewicz RP, et al., 1998. Nitric oxide metabolites in cystic. *Arch. Dis. Child.* 78, 49–53.
- Groenen, Peter M.A., Bunschoten, Annelies E., Soolingen, Dick van, et al., 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of ; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol. Microbiol.* 10, 1057–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
- Gründling, A., Manson, M.D., Young, R., 2001. Holins kill without warning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9348–9352. <https://doi.org/10.1073/pnas.151247598>
- Grundling, A., Smith, D.L., Blasi, U., et al., 2000. Dimerization between the holin and holin inhibitor of phage lambda. *J. Bacteriol.* 182, 6075–6081. <https://doi.org/10.1128/JB.182.21.6075-6081.2000>
- Gupta, R., Gupta, N., Rathi, P., 2004. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763–781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- Guttman, B., Raya, R., Kutter, E., 2005. Basic Phage Biology, in: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. (Ed.), . pp. 29–66.

- Hadas, Hilla, Einav, Monica, Fishov, Ltzhak, et al., 1997. Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. *Microbiology* 144, 179–1.
- Haft, Daniel H., Selengut, Jeremy, Mongodin, Emmanuel F., et al., 2005. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>
- Hagens, Steven, Loessner, Martin, 2010. Bacteriophage for Biocontrol of Foodborne Pathogens: Calculations and Considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11, 58–68. <https://doi.org/10.2174/138920110790725429>
- Hall-Stoodley, Luanne, Stoodley, Paul, 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13, 228–233. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00318-X](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00318-X)
- Hambsch, Beate, Sacré, Clara, Wagner, Ivo, 2004. Heterotrophic plate count and consumer's health under special consideration of water softeners. *Int. J. Food Microbiol.* 92, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.007>
- Hammad, A.M.M., 1998. Evaluation of alginate-encapsulated {*Azotobacter*} chroococcum as a phage-resistant and an effective inoculum. *J. Basic Microbiol.* 38, 9–16. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4028\(199803\)38:1<9::AID-JOBM9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4028(199803)38:1<9::AID-JOBM9>3.0.CO;2-4)
- Hankin M.E., 1896. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur* 10, 511:523. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16736>
- Hanlon, G.W., 2007. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 118–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.04.006>
- Hanlon, Geoffrey W., Denyer, Stephen P., Olliff, Cedric J., et al., 2001. Reduction in Exopolysaccharide Viscosity as an Aid to Bacteriophage Penetration through *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2746–2753. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2746-2753.2001>
- Hasan, Jafar, Crawford, Russell J., Ivanova, Elena P., 2013. Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials. *Trends Biotechnol.* 31, 295–304. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.01.017>
- Havelaar, A.H., Butler, M., 1991. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Res.* 25, 529–545. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(91\)90126-B](https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90126-B)
- Hazan, R., Engelberg-Kulka, H., 2004. *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Mol. Genet. Genomics* 272, 227–234. <https://doi.org/10.1007/s00438-004-1048-y>
- Henriques, Ana F., Melo, Luís D.R., Rodrigues, Célia F., et al., 2017. Synergistic Antimicrobial Interaction between Honey and Phage against *Escherichia coli* Biofilms. *Front. Microbiol.* 8, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02407>
- Hentzer, M., Eberl, L., Givskov, M., 2005. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: anaerobic respiration and iron limitation. *Biofilms* 2, 37–61. <https://doi.org/10.1017/S1479050505001699>
- Heo, Yun Jeong, Chung, In Young, Choi, Kelly B., et al., 2007. Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22. *Microbiology* 153, 2885–2895. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/007260-0>
- Hibma, Aaron M., Jassim, Sabah A.A., Griffiths, Mansel W., 1997. Infection and removal of L-forms of *Listeria monocytogenes* with bred bacteriophage. *Int. J. Food Microbiol.* 34, 197–207. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01190-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01190-7)
- Hilbert, Brendan J., Hayes, Janelle a., Stone, Nicholas P., et al., 2015. Structure and mechanism of the ATPase that powers viral genome packaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201506951. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506951112>
- Hogan, D.A., 2002. *Pseudomonas-Candida Interactions: An Ecological Role for Virulence Factors.* *Science* (80-.). 296, 2229–2232. <https://doi.org/10.1126/science.1070784>

-
- Højby, Niels, Bjarnsholt, Thomas, Givskov, Michael, et al., 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 322–332. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011>
- Holloway, B.W., 1955. Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 13, 572–581. <https://doi.org/10.1099/00221287-13-3-572>
- Hornstra, L.M., Smeets, P.W.M.H., Medema, G.J., 2011. Inactivation of bacteriophage MS2 upon exposure to very low concentrations of chlorine dioxide. *Water Res.* 45, 1847–1855. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.041>
- Huang, J., Wang, Li, Nanqi, Ren, et al., 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Res.* 31, 607–613. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00275-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00275-8)
- Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Clark, J., et al., 1998. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases - novel tools for study of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 85, 583–590. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.853541.x>
- Hughes, K. A., Sutherland, I.W., Clark, J., et al., 1998. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases--novel tools for study of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 85, 583–90.
- Hussain, Malik a., Liu, Huan, Wang, Qi, et al., 2015. Use of Encapsulated Bacteriophages to Enhance Farm to Fork Food Safety. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 8398. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1069729>
- Hwang, Geelsu, Liang, Jiaming, Kang, Seoktae, et al., 2013. The role of conditioning film formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to inert surfaces in aquatic environments. *Biochem. Eng. J.* 76, 90–98. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.03.024>
- Iacumin, Lucilla, Manzano, Marisa, Comi, Giuseppe, 2016. Phage Inactivation of *Listeria monocytogenes* on San Daniele Dry-Cured Ham and Elimination of Biofilms from Equipment and Working Environments. *Microorganisms* 4, 4. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010004>
- INVS/CCLIN/RAISIN, 2012. Enquete de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti infectieux. *La Rev. Médecine Interne* 20, 559–560. [https://doi.org/10.1016/S0248-8663\(99\)80102-7](https://doi.org/10.1016/S0248-8663(99)80102-7)
- Iriarte, F.B., Balogh, B., Momol, M.T., et al., 2007. Factors Affecting Survival of Bacteriophage on Tomato Leaf Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1704–1711. <https://doi.org/10.1128/aem.02118-06>
- Ishino, Yoshizumi, Shinagawa, Hideo, Makino, Kozo, et al., 1987. Nucleotide Sequence of the iap Gene, Responsible for Alkaline Phosphatase Isozyme Conversion in *Escherichia coli*, and Identification of the Gene Product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433.
- Isidro, Anabela, Henriques, Adriano O., Tavares, Paulo, 2004. The portal protein plays essential roles at different steps of the SPP1 DNA packaging process. *Virology* 322, 253–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.02.012>
- Issa, R., Chanishvili, N., Caplin, J., et al., 2019. Anti-biofilm potential of purified environmental bacteriophage preparations against early stage *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.14241>
- Jackson, Ryan N., Golden, Sarah M., van Erp, Paul B.G., et al., 2014. Structural biology. Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*. *Science* 345, 1473–9. <https://doi.org/10.1126/science.1256328>
- Jansen, Ruud., Embden, Jan. D.A. van, Gaastra, Wim., et al., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 43, 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jardine, P.J., Coombs, D.H., 1998. Capsid expansion follows the initiation of DNA packaging in bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 284, 661–72. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2179>
- Jarrell, K., Kropinski, a M., 1976. The isolation and characterization of a lipopolysaccharide-specific

- Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage. J. Gen. Virol. 33, 99–106. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-33-1-99>
- Jarrell, K.F., Vidykhan, T., Lee, P., et al., 1997. Isolation and characterization of bacteriophage BCJA1, a novel temperate bacteriophage active against the alkaliphilic bacterium, *Bacillus clarkii*. Extremophiles 1, 199–206. <https://doi.org/10.1007/s007920050034>
- Jennes, Serge, Merabishvili, Maia, Soentjens, Patrick, et al., 2017. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia in a patient with acute kidney injury-a case report. Crit. Care 21, 2016–2018. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1709-y>
- Jensen, Rasmus Bugge, Gerdes, Kenn, 1995. Programmed cell death in bacteria: proteic plasmid stabilization systems. Mol. Microbiol. 17, 205–210. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17020205.x
- Jepson, Catherine D., March, John B., 2004. Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. Vaccine 22, 2413–2419. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.11.065>
- Jiang, Wen, Li, Zongli, Zhang, Zhixian, et al., 2003. Coat protein fold and maturation transition of bacteriophage P22 seen at subnanometer resolutions. Nat. Struct. Biol. 10, 131–135. <https://doi.org/10.1038/nsb891>
- Jończyk, E., Kłak, M., Międzybrodzki, R., et al., 2011. The influence of external factors on bacteriophages--review. Folia Microbiol. (Praha). 56, 191–200. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0039-8>
- Jones, Jeffrey B., Vallad, Gary e., Iriarte, Fanny B., et al., 2012. Considerations for using bacteriophages for plant disease control. Bacteriophage 2, 208–214. <https://doi.org/10.4161/bact.23857>
- Jones, Brian V., Nzakizwanayo, Jonathan, Clark, Jason, et al., 2015. Bacteriophage Can Prevent Encrustation and Blockage of Urinary Catheters by *Proteus mirabilis*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 1530–1536. <https://doi.org/10.1128/aac.02685-15>
- Karatan, E., Watnick, P., 2009. Signals, Regulatory Networks, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 310–347. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00041-08>
- Kędzierska, S., Wawrzynów, A., Taylor, A., 1996. The Rz1 gene product of bacteriophage lambda is a lipoprotein localized in the outer membrane of *Escherichia coli*. Gene 168, 1–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00712-1](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00712-1)
- Kick, Leonhard, Kirchner, Marion, Schneider, Sabine, 2017. CRISPR-Cas9: From a bacterial immune system to genome-edited human cells in clinical trials. Bioengineered 8, 280–286. <https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1299834>
- Kim, Min Hee, Park, Seong Wan, Kim, Young Kee, 2011. Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the biological control of brown blotch disease. J. Appl. Biol. Chem. 54, 99–104. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2011.014>
- King, M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., et al., 2012. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses, Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. [https://doi.org/ISBN 9780123846846](https://doi.org/ISBN%209780123846846)
- Kirisits, Mary Jo, Margolis, Jeffrey J., Purevdorj-Gage, Boloroo L., et al., 2007. Influence of the hydrodynamic environment on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. J. Bacteriol. 189, 8357–60. <https://doi.org/10.1128/JB.01040-07>
- Knirel, Y.A., Vinogradov, E. V., L'vov, V.L., et al., 1984. Sialic acids of a new type from the lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella boydii*. Elsevier Sci. Publ. B.V 133, 6–8.
- Koonin, Eugene V., Krupovic, Mart, 2014. Evolution of adaptive immunity from transposable elements combined with innate immune systems. Nat. Rev. Genet. 16, 184–192. <https://doi.org/10.1038/nrg3859>

-
- Koskella, Britt, Brockhurst, Michael A., 2014. Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 916–931. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12072>
- Krüger, D.H., Bickle, T.A., 1983. Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol. Rev.* 47, 345–60.
- Kruger, DH, Schneck, P., Gelderblom, HR, 2000. Helmut Ruska and the visualisation of viruses. *Lancet* 355, 1713–1717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02250-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02250-9)
- Kubista, Mikael, Andrade, José Manuel, Bengtsson, Martin, et al., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol. Aspects Med.* 27, 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Kuhl, Sarah J., Mazure, Hubert, 2011. d'Hérelle. Preparation of Therapeutic Bacteriophages, Appendix 1 from: *Le Phénomène de la Guérison dans les maladies infectieuses: Masson et Cie, 1938, Paris—OCLC 5784382. Bacteriophage 1*, 55–65. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15680>
- Kutateladze, Mzia, Adamia, Revaz, 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* 28, 591–595. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>
- Kutter E., Raya P., Carlson K., 2005. Molecular mechanism of phage infection., in: *Bacteriophages: Biology and Applications*. Elizabeth, Kutter Alexander, Sulakvellidze.
- Kwiatek, Magdalena, Parasion, Sylwia, Rutyna, Paweł, et al., 2017. Isolation of bacteriophages and their application to control *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm models. *Res. Microbiol.* 168, 194–207. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.009>
- LaBauve, A.E., Wargo, M.J., 2012. Growth and Laboratory Maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10955-011-0269-9>
- Latino, Libera, Midoux, Cédric, Hauck, Yolande, et al., 2016. Pseudolysogeny and sequential mutations build multiresistance to virulent bacteriophages in *pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. (United Kingdom)* 162, 748–763. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000263>
- Latz, Simone, Krüttgen, Alex, Häfner, Helga, et al., 2017. Differential effect of newly isolated phages belonging to PB1-like, phiKZ-like and LUZ24-like viruses against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* under varying growth conditions. *Viruses* 9, 1–19. <https://doi.org/10.3390/v9110315>
- Lavenir, R., Jocktane, D., Laurent, F., et al., 2007. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J. Microbiol. Methods* 70, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.03.008>
- Le, Shuai, He, Xuesong, Tan, Yinling, et al., 2013. Mapping the Tail Fiber as the Receptor Binding Protein Responsible for Differential Host Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages PaP1 and JG004. *PLoS One* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068562>
- Lee, Young Duck, Park, Jong Hyun, 2015. Characterization and application of phages isolated from sewage for reduction of *Escherichia coli* O157: H7 in biofilm. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.017>
- Lefebvre, A., Bertrand, X., Quantin, C., et al., 2017. Association between *Pseudomonas aeruginosa* positive water samples and healthcare-associated cases: nine-year study at one university hospital. *J. Hosp. Infect.* 96, 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.12.007>
- Lehman, Susan M., Donlan, Rodney M., 2015. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1127–1137. <https://doi.org/10.1128/AAC.03786-14>
- Lehman, Susan M., Mearns, Gillian, Rankin, Deborah, et al., 2019. Design and preclinical development of a phage product for the treatment of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Viruses* 11. <https://doi.org/10.3390/v11010088>

- Lehtola, Markku J., Miettinen, Ilkka T., Keinänen, Minna M., et al., 2004. Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes. *Water Res.* 38, 3769–3779. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2004.06.024>
- Leigh, Brittany, Karrer, Charlotte, Cannon, John P., et al., 2017. Isolation and characterization of a Shewanella phage-host system from the gut of the tunicate, *Ciona intestinalis*. *Viruses* 9. <https://doi.org/10.3390/v9030060>
- Leiman, Petr G., Basler, Marek, Ramagopal, Udupi a, et al., 2009. Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4154–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813360106>
- Leiman, Petr G., Chipman, Paul R., Kostyuchenko, Victor A., et al., 2004. Three-Dimensional Rearrangement of Proteins in the Tail of Bacteriophage T4 on Infection of Its Host. *Cell* 118, 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.022>
- Lenski, Richard E., 1988. Dynamics of Interactions between Bacterial and Virulent Bacteriophage. *Advances Microb. Ecol.* 10, 1–44.
- Leverentz, Britta, Conway, W.S., Alavidze, Z., et al., 2001. Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: a model study. *J. Food Prot.* 64, 1116–1121.
- Leverentz, Britta, Conway, William S., Camp, Mary J., et al., 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on Fresh-Cut Produce by Treatment with Lytic Bacteriophages and a Bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4519–4526. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4519>
- Leverentz, Britta, Conway, William S., Janisiewicz, Wojciech, et al., 2004. Optimizing Concentration and Timing of a Phage Spray Application To Reduce *Listeria monocytogenes* on Honeydew Melon Tissue. *J. Food Prot.* 67, 1682–1686.
- Lhuillier, Sophie, Gallopin, Matthieu, Gilquin, Bernard, et al., 2009. Structure of bacteriophage SPP1 head-to-tail connection reveals mechanism for viral DNA gating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8507–12. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812407106>
- Li, Laam, Mendis, Nilmini, Trigui, Hana, et al., 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Li, Xing-Fang, Mitch, William A., 2018. Drinking Water Disinfection Byproducts (DBPs) and Human Health Effects: Multidisciplinary Challenges and Opportunities. *Environ. Sci. Technol.* [acs.est.7b05440](https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05440). <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05440>
- Lillestøl, Reidun K., Redder, Peter, Garrett, Roger a, et al., 2006. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* 2, 59–72. <https://doi.org/10.1155/2006/542818>
- Lone, Ayesha, Anany, Hany, Hakeem, Mohammed, et al., 2016. Development of prototypes of bioactive packaging materials based on immobilized bacteriophages for control of growth of bacterial pathogens in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 217, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.011>
- Loveday, H.P., Wilson, J.A., Kerr, K., et al., 2014. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: A rapid systematic review. *J. Hosp. Infect.* 86, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.010>
- Lu, Meng-Ji, Henning, Ulf, 1994. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends Microbiol.* 2, 137–139.
- Lu, T.K., Collins, J.J., 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11197–202. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704624104>
- Lucchetti-Miganeh, Céline, Redelberger, David, Chambonnier, Gaël, et al., 2014. *Pseudomonas aeruginosa* Genome Evolution in Patients and under the Hospital Environment. *Pathogens* 3, 309–340. <https://doi.org/10.3390/pathogens3020309>
- Luhtanen, Anne Mari, Eronen-Rasimus, Eeva, Kaartokallio, Hermann, et al., 2014. Isolation and

-
- characterization of phage-host systems from the Baltic Sea ice. *Extremophiles* 18, 121–130. <https://doi.org/10.1007/s00792-013-0604-y>
- Lurz, R., Orlova, E. V., Günther, D., et al., 2001. Structural organisation of the head-to-tail interface of a bacterial virus. *J. Mol. Biol.* 310, 1027–37. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.4800>
- Ly-Chatain, Mai Huong, 2014. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Front. Microbiol.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00051>
- Magill, Shelley S., Edwards, Jonathan R., Bamberg, Wendy, et al., 2014. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *N. Engl. J. Med.* 370, 1198–1208. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1306801>.Multistate
- Makarova, Kira S., Haft, Daniel H., Barrangou, Rodolphe, et al., 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 467–77. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2577>
- Malik, Danish J., Sokolov, Ilya J., Vinner, Gurinder K., et al., 2017. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv. Colloid Interface Sci.* 249, 100–133. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.05.014>
- Mansfield, John, Genin, Stephane, Mafori, Shimpei, et al., 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Marchisio, Mario Andrea, Huang, Zhiwei, 2017. CRISPR-Cas type II-based Synthetic Biology applications in eukaryotic cells. *RNA Biol.* 0, 1–8. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1282024>
- McGrath, Stephen, Fitzgerald, Gerald F., Van Sinderen, Douwe, 2002. Identification and characterization of phage-resistance genes in temperate lactococcal bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 43, 509–520. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02763.x>
- McGuire, Joseph, Kirtley, Sidney A., 1989. On Surface Characterization of Materials Targeted for Food Contact. *J. Food Sci.* 54, 224–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb08609.x>
- Meaden, Sean, Koskella, Britt, 2013. Exploring the risks of phage application in the environment. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00358>
- Melo, Luís D.R., Veiga, Patrícia, Cerca, Nuno, et al., 2016. Development of a Phage Cocktail to Control *Proteus mirabilis* Catheter-associated Urinary Tract Infections. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01024>
- Mena, K.D., Gerba, C.P., 2009. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 201, 71–114. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0028-9>
- Mesyanzhinov, Vadim V., Leiman, P.G., Kostyuchenko, Victor A., et al., 2004. Molecular architecture of bacteriophage T7 capsid. *Biochemistry* 69, 1190–1202. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90294-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90294-5)
- Mills, Susan, Ross, R. Paul, Hill, Colin, 2017. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, S129–S153. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux022>
- Ministère de la santé et des solidarités, 2007. Arrêté du 27 février 2007 relatif aux traitements de l’eau minérale naturelle utilisée à des fins thérapeutiques dans les établissements thermaux, Journal officiel de la république française.
- Ministère de la Santé et des Solidarités, 2005. Guide technique de l’eau dans les établissements de sante.
- Mirzaei, Mohammadali Khan, Nilsson, Anders S., 2015. Isolation of phages for phage therapy: A comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. *PLoS One* 10, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118557>
- Miyata, Reina, Yamaguchi, Kotoe, Uchiyama, Jumpei, et al., 2014. Characterization of a novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, KPP25, of the family Podoviridae. *Virus Res.* 189, 43–

46. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.04.019>
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñ, C., García-Martínez, J., et al., 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* 155, 733–740. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023960-0>
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, César, García-Martínez, Jesús, et al., 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 60, 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, Cesar, Soria, Elena, et al., 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 36, 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Mojica, F.J.M., Ferrer, C., Juez, G., et al., 1995. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol. Microbiol.* 17, 85–93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x
- Molineux, I.J., 2001. No syringes please, ejection of phage T7 DNA from the virion is enzyme driven. *Mol. Microbiol.* 40, 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02357.x>
- Momba, M.N.B., Kfir, R., Venter, S.N., et al., 2000. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA* 26, 59–66.
- Montanaro, Lucio, Poggi, Alessandro, Visai, Livia, et al., 2011. Extracellular DNA in biofilms. *Int. J. Artif. Organs* 34, 824–831. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000051>
- Morag, Omry, Sgourakis, Nikolaos G., Baker, David, et al., 2015. The NMR–Rosetta capsid model of M13 bacteriophage reveals a quadrupled hydrophobic packing epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201415393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1415393112>
- Morin, J.P., Graber-duvernay, B., 2002. Surveillance des *Pseudomonas* et expérience de désinfection aux thermes nationaux d’Aix-Les-Bains. *Press. Therm. Clim.* 139, 41–51.
- Moritz, Miriam M., Flemming, Hans Curt, Wingender, Jost, 2010. Integration of *Pseudomonas aeruginosa* and *Legionella pneumophila* in drinking water biofilms grown on domestic plumbing materials. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.05.003>
- Moter, Annette, Göbel, Ulf B., 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Methods*. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00152-4)
- Motoshima, Maiko, Yanagihara, Katsunori, Fukushima, Kazuko, et al., 2007. Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 58, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.11.007>
- Moye, Zachary D., Woolston, Joelle, Sulakvelidze, Alexander, 2018. Bacteriophage applications for food production and processing. *Viruses* 10, 1–22. <https://doi.org/10.3390/v10040205>
- Müller-Merbach, M., Rauscher, T., Hinrichs, J., 2005. Inactivation of bacteriophages by thermal and high-pressure treatment. *Int. Dairy J.* 15, 777–784. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.019>
- Muniesa, Maite, Recktenwald, J., Bielaszewska, Martina, et al., 2000. Characterization of a shiga toxin 2e-converting bacteriophage from an *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect. Immun.* 68, 4850–5. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.4850-4855.2000>
- Murphy, K.C., 2012. Phage recombinases and their applications, in: *Advances in Virus*. pp. 367–414.
- Nakai, T., Sugimoto, R., Park, K.H., et al., 1999. Protective effects of bacteriophage on experimental *Lactococcus garvieae* infection in yellowtail. *Dis. Aquat. Organ.* 37, 33–41. <https://doi.org/10.3354/dao037033>
- Nakai, Toshihiro, Park, Se Chang, 2002. Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.* 153, 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01280-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01280-3)

-
- Nakayama, Keisuke, Takashima, Kayoko, Ishihara, Hiroshi, et al., 2000. The R-type pyocin of *Pseudomonas aeruginosa* is related to P2 phage, and the F-type is related to lambda phage. *Mol. Microbiol.* 38, 213–231. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02135.x>
- Nathwani, Dilip, Raman, Gowri, Sulham, Katherine, et al., 2014. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resist. Infect. Control* 3, 1–16. <https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-32>
- Newton, Nelson, Bevis, Robert E., 1959. Purification of animal viruses with Zn(OH)₂. *Virology* 8, 344–351. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(59\)90034-0](https://doi.org/10.1016/0042-6822(59)90034-0)
- Nocker, Andreas, Camper, Anne K., 2009. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 137–142. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01429.x>
- Nogales, Eva, Scheres, Sjors H.W., 2015. Cryo-EM: A Unique Tool for the Visualization of Macromolecular Complexity. *Mol. Cell* 58, 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.019>
- Nordström, K., Forsgren, A., 1974. Effect of protein A on adsorption of bacteriophages to *Staphylococcus aureus*. *J. Virol.* 14, 198–202.
- Novick, Richard P., Christie, Gail E., Penadés, Jose R., 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 541–551. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2393>
- Novick, Richard P., Subedi, Abhignya, 2007. The SaPIs: Mobile pathogenicity islands of *Staphylococcus*. *Chem. Immunol. Allergy* 93, 42–57. <https://doi.org/10.1159/0000100857>
- Nuñez, James K., Kranzusch, Philip J., Noeske, Jonas, et al., 2014. Cas1–Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>
- Orlova, E. V., 2015. A molecular syringe that kills cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22, 357–359.
- Orlova, E. V., Gowen, Brent, Dröge, Anja, et al., 2003. Structure of a viral DNA gatekeeper at 10 Å resolution by cryo-electron microscopy. *EMBO J.* 22, 1255–1262. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg123>
- Orlova, E. V., 2012. Bacteriophages and their structural organisation, in: Dr. Ipek Kurtboke (Ed.), *Bacteriophages*. InTech, pp. 1–26.
- Parker, M.H., Prevelige, P.E., 1998. Electrostatic interactions drive scaffolding/coat protein binding and procapsid maturation in bacteriophage P22. *Virology* 250, 337–49. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9386>
- Parma, D.H., Snyder, M., Sobolevski, S., et al., 1992. the Rex System of Bacteriophage-Lambda - Tolerance and Altruistic Cell-Death. *Genes Dev.* 6, 497–510. <https://doi.org/10.1101/gad.6.3.497>
- Parracho, Helena Mrt, Burrowes, Ben H., Enright, Mark C., et al., 2012. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J. Mol. Genet. Med.* 6, 279–86. <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000050>
- Pascal, John M., 2008. DNA and RNA ligases: structural variations and shared mechanisms. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.12.008>
- Patey, Olivier, McCallin, Shawna, Mazure, Hubert, et al., 2019. Clinical indications and compassionate use of phage therapy: Personal experience and literature review with a focus on osteoarticular infections. *Viruses* 11, 1–21. <https://doi.org/10.3390/v11010018>
- Pawluk, April, Bondy-denomy, Joseph, Cheung, Vivian H.W., 2014. A New Group of Phage Anti-CRISPR Genes Inhibits the Type I-E CRISPR-Cas System of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* 5, 1–7. <https://doi.org/10.1128/mBio.00896-14.Editor>
- Pawluk, April, Staals, Raymond H.J., Taylor, Corinda, et al., 2016. Inactivation of CRISPR-Cas systems

- by anti-CRISPR proteins in diverse bacterial species. *Nat. Microbiol.* 1, 16085. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.85>
- Pecota, Douglas C., Wood, Thomas K., 1996. Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *J. Bacteriol.* 178, 2044–2050.
- Pedruzzi, Ivo, Rosenbusch, Jurg P., Locher, Kaspar P., 1998. Inactivation in vitro of the *Escherichia coli* outer membrane protein FhuA by a phage T5-encoded lipoprotein. *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 119–125. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13264.x>
- Pereira, Maria Olivia, Kuehn, Martin, Wuertz, Stefan, et al., 2002. Effect of flow regime on the architecture of a *Pseudomonas fluorescens* biofilm. *Biotechnol. Bioeng.* 78, 164–171. <https://doi.org/10.1002/bit.10189>
- Perera, Meenu N., Abuladze, Tamar, Li, Manrong, et al., 2015. Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiol.* 52, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.006>
- Pessereau, Coline, 2015. Etude de facteurs biotiques et abiotiques qui contrôlent l'implantation des biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* dans les réseaux de distribution d'eau thermale. University Nantes Angers Le Mans.
- Pinto, Daniela, Santos, Mário A., Chambel, Lélia, 2015. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 61–76. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.794127>
- Pires, Diana P., Oliveira, Hugo, Melo, Luís D.R., et al., 2016. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>
- Pires, Diana P., Sillankorva, Sanna, Faustino, Alberta, et al., 2011. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Res. Microbiol.* 162, 798–806. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.06.010>
- Pirnay, Jean-Paul, Blasdel, Bob G., Bretaudeau, Laurent, et al., 2015. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm. Res.* 32, 2173–9. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1617-7>
- Plisson, Celia, White, Helen E., Auzat, Isabelle, et al., 2007. Structure of bacteriophage SPP1 tail reveals trigger for DNA ejection. *EMBO J.* 26, 3720–8. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601786>
- Polstein, Lauren R., Gersbach, Charles A., 2015. A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. *Nat. Chem. Biol.* 11, 198–200. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1753>
- Popoff G., 2010. Eaux Minérales Naturelles Utilisées Dans. *Press. Therm. Clim.* 147, 93–106.
- Pujol, Marta, Badosa, Esther, Manceau, Charles, et al., 2006. Assessment of the Environmental Fate of the Biological Control Agent of Fire Blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on Apple by Culture and Real-Time PCR Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2421–2427. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2421>
- Pul, Ümit, Wurm, Reinhild, Arslan, Zihni, et al., 2010. Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* 75, 1495–1512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07073.x>
- Raettig H., 1967. Bakteriophagie 1957-1965, Gustav Fis. ed. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Rakhuba, D. V., Kolomiets, E.I., Szwajcer Dey, E., et al., 2010. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish J. Microbiol.* 59, 145–155.
- Raman, Gowri, Avendano, Esther E., Chan, Jeffrey, et al., 2018. Risk factors for hospitalized patients with resistant or multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections : a systematic review and meta-analysis. *Antiimicrobial Resist. Infect. Control* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0370-9>

-
- Rao, V.B., Mitchell, M.S., 2001. The N-terminal ATPase site in the large terminase protein gp17 is critically required for DNA packaging in bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 314, 401–11. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5169>
- Rath, Devashish, Amlinger, Lina, Rath, Archana, et al., 2015. The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 117, 119–128. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025>
- Ravat, F., Jault, P., Gabard, J., 2015. Bacteriophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels. *Ann. Burns Fire Disasters* 28, 13–20.
- Ray, Krishanu, Oram, Mark, Ma, Jinxia, et al., 2009. Portal control of viral prohead expansion and DNA packaging. *Virology* 391, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.029>
- Raya, Raul R., Varey, Peter, Oot, Rebecca A., et al., 2006. Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6405–6410. <https://doi.org/10.1128/AEM.03011-05>
- Reddy, Bhaskara L., Saier, Milton H., 2013. Topological and phylogenetic analyses of bacterial holin families and superfamilies. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2654–71. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.07.004>
- Reuter, Stefan, Sigge, Anja, Wiedeck, Heidemarie, et al., 2002. Analysis of transmission pathways of *Pseudomonas aeruginosa* between patients and tap water outlets. *Crit. Care Med.* 30, 2222–8. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000025907.12833.10>
- Rhoads, D.D., Wolcott, R.D., Kuskowski, M.A., et al., 2014. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J. Wound Care* 18, 237–243. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.6.42801>
- Riede, Isolde, Eschbach, Marie-Luise, 1986. Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 205, 241–245. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80905-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80905-X)
- Rifat, Dalin, Wright, Nathan T., Varney, Kristen M., et al., 2008. Restriction endonuclease inhibitor IPI* of bacteriophage T4: a novel structure for a dedicated target. *J. Mol. Biol.* 375, 720–34. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.10.064>
- Ripp, Steven, Miller, Robert V., 1997. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology* 143, 2065–2070. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-2065>
- Risselada, Herre Jelger, Grubmüller, Helmut, 2012. How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 187–96. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.01.007>
- Roberts, Richard J., Marinus, Martin G., 2003. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Res.* 31, 1805–1812.
- Rollins, MaryClare F., Schuman, Jason T., Paulus, Kirra, et al., 2015. Mechanism of foreign DNA recognition by a CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res.* 43, 2216–22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv094>
- Rombouts, Sofie, Volckaert, Anneleen, Venneman, Sofie, et al., 2016. Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *porri*. *Front. Microbiol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00279>
- Rotily, M., Potelon, J.L., 1991. Les Pathologies liées aux bains dans les SPAS collectifs. *Bull. épidémiologique Hebd.* 199.
- Rouillon, Christophe, Zhou, Min, Zhang, Jing, et al., 2013. Structure of the CRISPR Interference Complex CSM Reveals Key Similarities with Cascade. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.020>
- Roy, Ankoor, Bhardwaj, Anshul, Cingolani, Gino, 2011. Crystallization of the nonameric small terminase subunit of bacteriophage P22. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*

- 67, 104–110. <https://doi.org/10.1107/S174430911004697X>
- Roy, Ankoor, Bhardwaj, Anshul, Datta, Pinaki, et al., 2012. Small terminase couples viral DNA binding to genome-packaging ATPase activity. *Structure* 20, 1403–13. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.014>
- Roy, Ankoor, Cingolani, Gino, 2012. Structure of P22 headful packaging nuclease. *J. Biol. Chem.* 287, 28196–28205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349894>
- Russel, M., 1995. Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends Microbiol.* 3, 223–228. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88929-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88929-5)
- Ryan, Elizabeth M., Gorman, Sean P., Donnelly, Ryan F., et al., 2011. Recent advances in bacteriophage therapy: How delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J. Pharm. Pharmacol.* 63, 1253–1264. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01324.x>
- Ryan, Robert P., Fouhy, Yvonne, Garcia, Belen Fernandez, et al., 2008. Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 68, 75–86. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06132.x>
- Rydman, Pia S., Bamford, Dennis H., 2003. Identification and mutational analysis of bacteriophage PRD1 holin protein P35. *J. Bacteriol.* 185, 3795–3803. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3795-3803.2003>
- Sadekuzzaman, Mohammad, Mizan, Md Furkanur Rahaman, Yang, Sungdae, et al., 2018. Application of bacteriophages for the inactivation of *Salmonella spp.* in biofilms. *Food Sci. Technol. Int.* 24, 424–433. <https://doi.org/10.1177/1082013218763424>
- Saier, Milton H., Reddy, Bhaskara L., 2015. Holins in bacteria, eukaryotes, and archaea: Multifunctional xenologues with potential biotechnological and biomedical applications. *J. Bacteriol.* 197, 7–17. <https://doi.org/10.1128/JB.02046-14>
- Sánchez, María Carmen, Llama-Palacios, Arancha, Marín, María José, et al., 2013. Validation of atp bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouthrinses in an in vitro subgingival-biofilm model. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal* 18. <https://doi.org/10.4317/medoral.18376>
- Sands, J.A., Auperin, D., 1977. Effects of temperature and host cell genetic characteristics on the replication of the lipid-containing bacteriophage PR4 in *Escherichia coli*. *J Virol* 22, 315–320.
- Sanger F., Air G.M., Barrell B.G., Brown N.L., Coulson A.R., Fiddes C.A., Hutchison C.A., Slocombe P.M., Smith M., 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687–695.
- Sao-Jose, C., Parreira, R., Vieira, G., et al., 2000. The N-terminal region of the *Oenococcus oeni* bacteriophage fOg44 lysin behaves as a bona fide signal peptide in *Escherichia coli* and as a cis-inhibitory element, preventing lytic activity on oenococcal cells. *J. Bacteriol.* 182, 5823–5831. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5823-5831.2000>
- Savva, C.G., Dewey, J.S., Moussa, S.H., et al., 2014. Stable micron-scale holes are a general feature of canonical holins. *Mol. Microbiol.* 91, 57–65. <https://doi.org/10.1038/nature13314.A>
- Scarascia, Giantommaso, Yap, Scott A., Kaksonen, Anna H., et al., 2018. Bacteriophage Infectivity Against *Pseudomonas aeruginosa* in Saline Conditions. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00875>
- Schmerer, Matthew, Molineux, Ian J., Bull, James J., 2014. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. *PeerJ* 2, e590. <https://doi.org/10.7717/peerj.590>
- Schneider, René Peter, 1996. Conditioning film-induced modification of substratum physicochemistry - Analysis by contact angles. *J. Colloid Interface Sci.* 182, 204–213. <https://doi.org/10.1006/jcis.1996.0452>
- Sepúlveda-Robles O., Kameyama L., Guarneros G., 2012. High diversity and novel species of

-
- Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4510–4515. <https://doi.org/10.1128/AEM.00065-12>
- Serwer, Philip, Hayes, Shirley J., Lieman, Karen, et al., 2007. In situ fluorescence microscopy of bacteriophage aggregates. *J. Microsc.* 228, 309–321. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2007.01855.x>
- Shabbir, Muhammad A.B., Hao, Haihong, Shabbir, MZ, et al., 2016. Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenal. *Z. Front. Microbiol.* 7, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01292>
- Shafique, Muafia, Alvi, Iqbal Ahmad, Abbas, Zaigham, et al., 2017. Assessment of biofilm removal capacity of a broad host range bacteriophage JHP against *Pseudomonas aeruginosa*. *Apmis* 125, 579–584. <https://doi.org/10.1111/apm.12691>
- Shawn H, M.V., 2015. Antimicrobial resistance in the intensive care unit. *J. Intensive Care Med.* 1–13. <https://doi.org/10.1177/0885066615619895>
- Sillankorva, Sanna, Neubauer, Peter, Azeredo, Joana, 2008. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A. *BMC Biotechnol.* 8, 79. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-79>
- Sillankorva, Sanna, Oliveira, Rosário, Vieira, Maria João, et al., 2004a. *Pseudomonas fluorescens* infection by bacteriophage Φ s1: The influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.058>
- Sillankorva, Sanna, Oliveira, Rosário, Vieira, Maria João, et al., 2004b. Bacteriophage Φ S1 Infection of *Pseudomonas fluorescens* Planktonic Cells versus Biofilms. *Biofouling* 20, 133–138. <https://doi.org/10.1080/08927010410001723834>
- Silva, Yolanda J., Costa, Liliana, Pereira, Carla, et al., 2014. Influence of environmental variables in the efficiency of phage therapy in aquaculture. *Microb. Biotechnol.* 7, 401–413. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12090>
- Simons, A.A., Tao, Y., Leiman, P.G., et al., 2000. Structure of the bacteriophage ϕ 29 DNA packaging motor 408, 745–750. <https://doi.org/10.1038/nature13314.A>
- Smeets, P.W.M.H., Medema, G.J., Van Dijk, J.C., 2009. The Dutch secret: How to provide safe drinking water without chlorine in the Netherlands. *Drink. Water Eng. Sci.* 2, 1–14. <https://doi.org/10.5194/dwes-2-1-2009>
- Smit, E., Wolters, A.C., Lee, H., et al., 1996. Interactions Between a Genetically Marked *Pseudomonas fluorescens* Strain and Bacteriophage R2f in Soil: Effects of Nutrients, Alginate Encapsulation, and the Wheat Rhizosphere. *Microb. Ecol.* 125–140.
- Smith, Donald R., 2006. Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Folic Acid. Final rule. *Fed. Regist.* 71, 47729–47732. <https://doi.org/doi:10.1201/9780203504529.chb6>
- Smith, Douglas E., 2011. Single-molecule studies of viral DNA packaging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1, 134–141. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_24
- Smith, G.P., 1985. Filamentous Fusion Phage: Novel expression vector that display cloned antigens on the virion surface. *Science* (80-.). 228, 1315–1317.
- Smith, H.W., Huggins, M.B., 1982. Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. *Microbiology* 128, 307–318. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-2-307>
- Smits, Callum, Chechik, Maria, Kovalevskiy, Oleg V, et al., 2009. Structural basis for the nuclease activity of a bacteriophage large terminase. *EMBO Rep.* 10, 592–598. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.53>
- Snyder, Larry, 1995. Phage-exclusion enzymes: A bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol. Microbiol.* 15, 415–420. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02255.x>

- Spilman, Michael, Cocozaki, Alexis, Hale, Caryn, et al., 2013. Structure of an RNA Silencing Complex of the CRISPR-Cas Immune System. cell Press.
- Stern, Adi, Sorek, Rotem, 2011. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes. Bioessays 33, 43–51. <https://doi.org/10.1002/bies.201000071>
- Sternberg, Claus, Christensen, Bjarke B., Johansen, Tove, et al., 1999. Distribution of Bacterial Growth Activity in Flow-Chamber Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4108–4117.
- Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F., et al., 2001. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. J. Appl. Microbiol. 91, 525–532.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., et al., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. Annu. Rev. Microbiol. 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Stoodley, P., Wilson, Suzanne, Hall-Stoodley, Luanne, et al., 2001. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5608–5613. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.12.5608-5613.2001>
- Stoodley, Paul, Dodds, I., Boyle, J.D., et al., 1999. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. J. Appl. Microbiol. 85, 19S–28S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05279.x>
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., et al., 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406, 959–64. <https://doi.org/10.1038/35023079>
- Stummeyer, Katharina, Schwarzer, David, Claus, Heike, et al., 2006. Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: Lessons from Escherichia coli K1-specific phages. Mol. Microbiol. 60, 1123–1135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05173.x>
- Summer, Elizabeth J., Berry, Joel, Tran, Tram Anh T., et al., 2007. Rz/Rz1 lysis gene equivalents in phages of Gram-negative hosts. J. Mol. Biol. 373, 1098–112. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.08.045>
- Summers, William C., 2012. The strange history of phage therapy. Bacteriophage 2, 130–133. <https://doi.org/10.4161/bact.20757>
- Sun, Siyang, Kondabagil, Kiran, Draper, Bonnie, et al., 2008. The structure of the phage T4 DNA packaging motor suggests a mechanism dependent on electrostatic forces. Cell 135, 1251–62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.015>
- Sun Yoon, Sang, Hennigan, Robert F., Hilliard, George M., et al., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis of toxic NO, a byproduct of anaerobic respiration. Pro- teomic analyses identified an outer membrane protein. Dev. Cell 3, 593–603. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00295-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00295-2)
- Sutherland, Ian W., Hughes, Kevin A., Skillman, Lucy C., et al., 2004. The interaction of phage and biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 232, 1–6. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(04\)00041-2](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(04)00041-2)
- Suttle, Curtis A., 2005. Viruses in the sea. Nature 437, 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature04160>
- Tavares, P., Lurz, R., Stiege, A., et al., 1996. Sequential headful packaging and fate of the cleaved DNA ends in bacteriophage SPP1. J. Mol. Biol. 264, 954–67. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0689>
- Taylor, Alina, Benedik, Michael, Campbell, Allan, 1983. Location of the Rz gene in bacteriophage lambda. Gene 26, 159–163. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(83\)90185-3](https://doi.org/10.1016/0378-1119(83)90185-3)
- Thomas, John O., 1974. Chemical linkage of the tail to the right-hand end of bacteriophage lambda DNA. J. Mol. Biol. 87, 1–9. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90555-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90555-5)
- Thomas, John O., Sternberg, Nat, Weisberg, Robert, 1978. Altered arrangement of the DNA in injection-defective lambda bacteriophage. J. Mol. Biol. 123, 149–161. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(78\)90318-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(78)90318-2)
- Thompson, Shawn S., Yates, Marylynn V., 1999. Bacteriophage inactivation at the air-water-solid interface in dynamic batch systems. Appl. Environ. Microbiol. 65, 1186–1190.

-
- Thurber, Rebecca V., Haynes, Matthew, Breitbart, Mya, et al., 2009. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat. Protoc.* 4, 470–483. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.10>
- To, Kam H., Young, Ry, 2014. Probing the structure of the S105 hole. *J. Bacteriol.* 196, 3683–3689. <https://doi.org/10.1128/JB.01673-14>
- Tock, Mark R., Dryden, D.T.F., 2005. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 466–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.06.003>
- Tolker-Nielsen, T., Brinch, U.C., Ragas, P.C., et al., 2000. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J. Bacteriol.* 182, 6482–6489. <https://doi.org/10.1128/JB.182.22.6482-6489.2000>
- Tormo, María Angeles, Ferrer, María Desamparados, Maiques, Elisa, et al., 2008. *Staphylococcus aureus* pathogenicity island DNA is packaged in particles composed of phage proteins. *J. Bacteriol.* 190, 2434–40. <https://doi.org/10.1128/JB.01349-07>
- Torres-Barceló, Clara, Hochberg, Michael E., 2016. Evolutionary Rationale for Phages as Complements of Antibiotics. *Trends Microbiol.* 24, 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.011>
- Trevors, J.T., 2011. Viable but non-culturable (VBNC) bacteria: Gene expression in planktonic and biofilm cells. *J. Microbiol. Methods* 86, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.018>
- Tripathy, Abinash, Sen, Prosenjit, Su, Bo, et al., 2017. Natural and bioinspired nanostructured bactericidal surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 248, 85–104. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.030>
- Tsai, Yung-Pin, 2005. Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria. *Biofouling* 21, 267–77. <https://doi.org/10.1080/08927010500398633>
- Tuomi, P., Fagerbakke, K.M., Bratbak, G., et al., 1995. Nutritional enrichment of a microbial community - the effects on activity, elemental composition, community structure and virus production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 123–134. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1995.tb00276.x>
- Twort F.W., 1915. An investigation on the nature of ultra microscopic viruses. *Lancet* 186, 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3)
- Uchiyama, Jumpei, Rashel, Mohammad, Takemura, Iyo, et al., 2012. Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10. *Arch. Virol.* 157, 733–738. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1210-x>
- Valpuesta, J.M., Sousa, N., Barthelemy, I., et al., 2000. Structural analysis of the bacteriophage T3 head-to-tail connector. *J. Struct. Biol.* 131, 146–55. <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4281>
- Vandenheuve, D., Rombouts, S., Adraenssens, E.M., 2018. Purification of Bacteriophages Using Anion-Exchange Chromatography Dieter, in: Martha R. J. Clokie (Ed.), *Bacteriophages: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*, pp. 59–69.
- Vieira, Maria João, Melo, Luis F., Pinheiro, Maria Manuela, 1993. Biofilm formation: Hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling* 7, 67–80. <https://doi.org/10.1080/08927019309386244>
- Vincze, Tamas, Posfai, Janos, Roberts, Richard J., 2003. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31, 3688–3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>
- Walker, J.T., Jhutti, A., Parks, S., et al., 2014. Investigation of healthcare-acquired infections associated with *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in taps in neonatal units in Northern Ireland. *J. Hosp. Infect.* 86, 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.10.003>
- Wang, I.N., Deaton, J., Young, R., 2003. Sizing the Holin Lesion with an Endolysin- -Galactosidase Fusion. *J. Bacteriol.* 185, 779–787. <https://doi.org/10.1128/JB.185.3.779-787.2003>
- Watanabe, Ryohei, Matsumoto, Tetsuya, Sano, Go, et al., 2007. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 446–452. <https://doi.org/10.1128/AAC.00635-06>

- Wei, Qing, Ma, Luyan Z., 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Mol. Sci. 14, 20983–21005. <https://doi.org/10.3390/ijms141020983>
- Wei, Yunzhou, Terns, Rebecca M., Terns, Michael P., 2015. Cas9 function and host genome sampling in Type II-A CRISPR–Cas adaptation. Gene Dev. 29, 356–361. <https://doi.org/10.1101/gad.257550.114>
- Weinbauer, Markus G., 2004. Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiol. Rev. 28, 127–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>
- Weinbren, M., Bree, L., Sleight, S., et al., 2017. Giving the tap the elbow? An observational study. J. Hosp. Infect. 96, 328–330. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.05.009>
- Wen, Zezhang T., Yates, David, Ahn, Sang-Joon, et al., 2010. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. BMC Microbiol. 10, 111. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-111>
- Werner, Erin, Roe, Frank, Bugnicourt, Amandine, et al., 2004. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6188–6196. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6188>
- White, Rebecca, Chiba, Shinobu, Pang, Ting, et al., 2011. Holin triggering in real time. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108, 798–803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011921108>
- WHO, 2011. Guidelines for drinking-water quality. WHO Chron. 104–108. [https://doi.org/10.1016/S1462-0758\(00\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S1462-0758(00)00006-6)
- Wiedenheft, Blake, Bondy-Denomy, Joseph, 2017. CRISPR control of virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Cell Res. 27, 163–164. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.6>
- Williamson, Kurt E., Helton, Rebekah R., Wommack, K. Eric, 2012. Bias in bacteriophage morphological classification by transmission electron microscopy due to breakage or loss of tail structures. Microsc. Res. Tech. 75, 452–457. <https://doi.org/10.1002/jemt.21077>
- Wilson, E.J.N., 1996. Fifty years of synchrotrons. 5th Eur. Part. Accel. Conf. C960610, 135–139.
- Wingender, Jost, Flemming, Hans Curt, 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 417–423. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.05.009>
- World medical association, 2013. World Medical Association Declaration of Helsinki. Clin. Rev. Educ. 310, 2013–2016.
- Wright, A., Hawkins, C.H., Anggard, E.E., et al., 2009. A controlled clinical trial of a therapeutic phage preparation in chronic otitis due to resistant PA- a preliminary report of efficacy. Clin. Otolaryngol. 34, 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>
- Xie, Yicheng, Wahab, Laith, Gill, Jason J., 2018. Development and validation of a microtiter plate-based assay for determination of bacteriophage host range and virulence. Viruses 10. <https://doi.org/10.3390/v10040189>
- Xu, Min, Struck, Douglas K., Deaton, John, et al., 2004. A signal-arrest-release sequence mediates export and control of the phage P1 endolysin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 6415–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400957101>
- Yamamoto, Keith R., Alberts, Bruce M., Benzinger, Rolf, et al., 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. Virology 40, 734–744. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(70\)90218-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(70)90218-7)
- Yang, Liang, Hu, Yifan, Liu, Yang, et al., 2011a. Distinct roles of extracellular polymeric substances in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Environ. Microbiol. 13, 1705–1717. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02503.x>
- Yang, Liang, Liu, Yang, Wu, Hong, et al., 2011b. Current understanding of multi-species biofilms. Int. J. Oral Sci. 3, 74–81. <https://doi.org/10.4248/IJOS11027>
- Yosef, Ido, Goren, Moran G., Qimron, Udi, 2012. Proteins and DNA elements essential for the CRISPR

-
- adaptation process in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 40, 5569–5576. <https://doi.org/10.1093/nar/gks216>
- Young, Ry, 2013. Phage lysis: do we have the hole story yet? Curr. Opin. Microbiol. 16, 790–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.08.008>
- Young, Ry, Wang, Ing-Nang, Roof, William D., 2000. Phages will out: strategies of host cell lysis. Trends Microbiol. 8, 120–128. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01705-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01705-4)
- Yu, Yan-Ping, Gong, Ting, Jost, Günter, et al., 2013. Isolation and characterization of five lytic bacteriophages infecting a *Vibrio* strain closely related to *Vibrio owensii*. FEMS Microbiol. Lett. 348, 112–9. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12277>
- Zhang, Jian-Hua, Adikaram, Poorni, Pandey, Mritunjay, et al., 2016. Optimization of genome editing through CRISPR-Cas9 engineering. Biengineered 7, 166–174. <https://doi.org/10.1080/21655979.2016.1189039>
- Zhang, Junpeng, Li, Weiying, Chen, Jiping, et al., 2018. Impact of biofilm formation and detachment on the transmission of bacterial antibiotic resistance in drinking water distribution systems. Chemosphere 203, 368–380. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.143>
- Zhang, Yanyan, Hu, Zhiqiang, 2013. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. Biotechnol. Bioeng. 110, 286–295. <https://doi.org/10.1002/bit.24630>
- Zhang, Yanyan, Hunt, Heather K., Hu, Zhiqiang, 2013. Application of bacteriophages to selectively remove *Pseudomonas aeruginosa* in water and wastewater filtration systems. Water Res. 47, 4507–4518. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.014>
- Zhao, Haiyan, Christensen, Theodore E., Kamau, Yvonne N., et al., 2013. Structures of the phage Sf6 large terminase provide new insights into DNA translocation and cleavage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 8075–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301133110>
- Zhao, Haiyan, Finch, Casey J., Sequeira, Reuben D., et al., 2010. Crystal structure of the DNA-recognition component of the bacterial virus Sf6 genome-packaging machine. PNAS 107, 1971–1976. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908569107>
- Zlatanović, Lj, van der Hoek, J.P., Vreeburg, J.H.G., 2017. An experimental study on the influence of water stagnation and temperature change on water quality in a full-scale domestic drinking water system. Water Res. 123, 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.019>
- Zwirgmaier, Katrin, 2005. Fluorescence in situ hybridisation (FISH) - The next generation. FEMS Microbiol. Lett. 246, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.015>

Titre : Exploration du potentiel des bactériophages dans le traitement des surfaces en contact avec l'eau, contaminées par un biofilm de *Pseudomonas aeruginosa*

Résumé : *P. aeruginosa* fait partie des bactéries classées comme multirésistantes. Ce bacille est un agent pathogène opportuniste susceptible d'être présent dans les réseaux d'eau. Les contaminations sont souvent localisées au niveau des points d'usage et sont à l'origine de risques sanitaires et économiques pour les établissements de santé et les industries. Bien que différents procédés de traitements soient couramment appliqués certaines contaminations persistent sous la forme de biofilm et altèrent la qualité de l'EDCH, tout en devenant un potentiel réservoir de dissémination. L'absence de traitements efficaces et l'impact négatif des biocides sur l'environnement sont en faveur du développement de nouvelles alternatives. Les bactériophages sont exclusivement des virus de bactéries. Ces prédateurs naturels sont omniprésents dans l'environnement, ce qui nous permet de disposer d'une grande diversité et ont l'avantage de s'auto-répliquer en présence de leur hôte. Dans ce contexte, cette étude évalue le potentiel de ces virus en tant qu'agents de biocontrôle pour éliminer les biofilms de *P. aeruginosa*.

Neuf souches de *P. aeruginosa*, incluant la souche référence PAO1 et des souches environnementales, ont été utilisées pour étudier l'activité de neuf phages appartenant à la famille des *Caudovirales*.

Un screening a été réalisé permettant par la méthode des spots test de sélectionner les phages les plus efficaces et les souches sensibles. Les bactéries ont ensuite été cultivées dans un milieu minéral minimum et l'efficacité des phages a été étudiée sur une culture exponentielle. Le suivi de la densité optique a permis de mettre évidence trois profils d'activités différents. Sur la base de ces résultats, deux phages et deux souches ont été conservés pour réaliser des tests sur des biofilms de 24 h implantés à la surface de coupons en INOX, représentatif des surfaces industrielles ou thermales. L'efficacité du traitement par les phages durant 14 h a été évaluée par qPCR viable. Une réduction maximale de 1,7 équivalent Log UFC.cm²/coupon a été obtenu selon le couple étudié. Les résultats mettent également en avant une répartition des phages en faveur des cellules planctoniques, contrôlant ainsi efficacement la dissémination du biofilm dans l'environnement.

Cette étude met en évidence une action des phages qui est dépendante de la souche de *P. aeruginosa* ainsi que de l'état physiologiques des cellules (planctoniques ou sessiles) ce qui rend difficile l'élimination d'un biofilm, même jeune. Dans le but d'améliorer l'infection de ces structures il pourrait être envisagé d'associer l'activité de plusieurs phages dans un cocktail ou de les combiner à d'autres molécules d'intérêts.

Mots clés: *P. aeruginosa*, bactériophages, biofilms, surfaces, qPCR viable

Title: Exploration of the potential of bacteriophages in the treatment of surfaces in contact with water, contaminated by a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract: *P. aeruginosa* is one of the bacteria classified as multiresistant. This bacillus is an opportunistic pathogen that may be present in water networks. Contaminations are often located at the point of use and are at the origin of health and economic issues for health facilities and industries. Although different treatment processes are commonly applied, certain contaminations persist in the form of biofilm, alter the quality of EDCH and represent a reservoir of dissemination. The lack of effective treatments and the negative impact of biocides on the environment favor the development of new alternatives. Bacteriophages are exclusively bacterial viruses. These natural predators are ubiquitous in the environment, which allows us to have a great diversity, and have the advantage of self-replication in the presence of their host. In this context, this work explores the potential of these viruses as biocontrol agents to eliminate *P. aeruginosa* biofilms in addition to existing solutions. Nine strains of *P. aeruginosa*, including PAO1 reference strain and environmental strains were used to study the activity of nine phages belonging to the family *Caudovirales*. A screening was carried out allowing by the spot test method to select the most effective phages and sensitive strains.

A screening was carried out allowing by the spot test method to select the most effective phages and sensitive strains. Bacteria were then cultivated in a mineral minimum medium and the efficiency of the phages was studied on an exponential culture phase. Monitoring of optical density has enabled to highlight three different activity profiles. On the basis of these results, two phages and two strains were kept for testing on 24-hour biofilms implanted on the surface of stainless steel coupons, representative of industrial or thermal surfaces. The efficacy of phage treatment for 14 h was evaluated by viable qPCR. A maximum reduction of 1.7 log equivalent UFC.cm² / coupon was obtained according to the couple studied. The results also highlight a phage distribution in favor of planktonic cells, effectively controlling the release of biofilm into the environment. This study demonstrates a phage action that is dependent on the *P. aeruginosa* strain as well as the physiological state of the cells (planktonic or sessile). The complexity of the biofilms' structure makes it difficult to eliminate them, even when young. In order to improve the infection of these structures it could be considered to associate the activity of several phages in a cocktail or to combine them with other molecules of interest.

Key words: *P. aeruginosa*, bacteriophages, biofilms, surfaces, viability qPCR

