



HAL
open science

Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité.

Nicolas Dufour

► To cite this version:

Nicolas Dufour. Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité. . Bactériologie. Université Paris Diderot Paris 7, 2015. Français. NNT: . tel-01330223

HAL Id: tel-01330223

<https://u-paris.hal.science/tel-01330223>

Submitted on 10 Jun 2016

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License



ED Bio Sorbonne Paris Cité
UFR Sciences du Vivant
Rue Hélène Brion
75205 PARIS Cedex 13



IAME - UMR 1137
UFR de Médecine Paris 7
16 rue Henri Huchard
75870 Paris cedex 18



Institut Pasteur

Unité de Biologie Moléculaire
du Gène chez les Extrêmophiles
25 rue du Dr. Roux
75724 PARIS Cedex 15

Thèse de doctorat de l'Université Paris 7 – Paris Diderot

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité
Département Infectiologie Microbiologie

Spécialité Microbiologie

Présentée par

Nicolas DUFOUR

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris 7

Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité

Soutenue publiquement le 23 octobre 2015, devant un jury composé de :

Pr. Frédéric MORINET

Président

Dr. Catherine SCHOULER

Rapporteur

Pr. Éric OSWALD

Rapporteur

Pr. Jean CHASTRE

Examinateur

Dr. Laurent DEBARBIEUX

Directeur de thèse

Pr. Jean-Damien RICARD

Directeur de thèse



ED Bio Sorbonne Paris Cité
UFR Sciences du Vivant
Rue Hélène Brion
75205 PARIS Cedex 13



IAME - UMR 1137
UFR de Médecine Paris 7
16 rue Henri Huchard
75870 Paris cedex 18



Institut Pasteur

Unité de Biologie Moléculaire
du Gène chez les Extrêmophiles
25 rue du Dr. Roux
75724 PARIS Cedex 15

Thèse de doctorat de l'Université Paris 7 – Paris Diderot

École doctorale Bio Sorbonne Paris Cité
Département Infectiologie Microbiologie

Spécialité Microbiologie

Présentée par

Nicolas DUFOUR

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Paris 7

Phagothérapie et pneumonies acquises sous ventilation mécanique à *Escherichia coli* : une approche thérapeutique possible ? Aspects fondamentaux et éléments de faisabilité

Soutenue publiquement le 23 octobre 2015, devant un jury composé de :

Pr. Frédéric MORINET

Président

Dr. Catherine SCHOULER

Rapporteur

Pr. Éric OSWALD

Rapporteur

Pr. Jean CHASTRE

Examinateur

Dr. Laurent DEBARBIEUX

Directeur de thèse

Pr. Jean-Damien RICARD

Directeur de thèse

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du jury sans qui la validation de ce travail ne pourrait avoir lieu. Merci à Éric Oswald et à Catherine Schouler d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit, avec tout ce que cela impose. Merci à Jean Chastre d'avoir bien voulu examiner ce travail. Merci enfin à Frédéric Morinet d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie Patrick Forterre, responsable de l'unité Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrêmophiles à l'Institut Pasteur, pour m'avoir permis de réaliser la plus grande partie de ma thèse au sein de son laboratoire. Je remercie également chaleureusement Erick Denamur, responsable de l'unité Inserm UMR 1137 Infection-Antimicrobiens-Modélisation-Evolution, pour l'accueil qu'il m'a réservé à Bichat dans son unité, les discussions échangées, sa disponibilité et son apprentissage de l'optimisme (un verre à moitié vide et un autre à moitié plein, est-ce si différent...).

D'énormes remerciements vont ensuite à mes deux directeurs de thèse, Laurent Debarbieux et Jean-Damien Ricard. Si trois ans se sont écoulés sans qu'un seul jour n'ait été habité par l'ennui, c'est un peu grâce à vous. Merci Laurent pour ton accueil, ta confiance, tes conseils, tes points de vue, ta disponibilité légendaire et ta bonne humeur perpétuelle. Merci Jean-Damien pour m'avoir branché en connexion directe avec le royaume des phages, quelle bonne idée ! Merci pour ta confiance, nos discussions, tes idées et tes encouragements. Sans vous, nous n'en serions pas là !

Merci également à mes compagnons de paillasse pour les moments passés ensemble, pour votre joie de vivre et votre humour. Chronologiquement, merci à Marine Henry pour m'avoir guidé et initié à tant de choses inconnues lorsque je suis arrivé. Merci à Matthieu Galtier pour sa bonne humeur et sa présence indispensable au sein de la petite pièce du 3^e étage où j'ai commencé mon travail. Merci aux deux filles avec qui j'ai ensuite partagé plus qu'un bureau : Anne Chevallereau pour m'avoir fait rire et découvrir des choses aussi indispensables que LV (je sais réciproquement qu'elle me sera éternellement reconnaissante de lui avoir fait découvrir FV et TPDC) et Luisa De Sordi pour sa bonne humeur, son rire, son LégoLab, son anglophonie et toutes nos petites histoires rigolotes. Merci également à Mélanie Fromentin et Raphaëlle Delattre pour leur aide à différents moments de ce projet. Je remercie également les autres membres de l'unité BMGE pour les moments partagés, leurs aides techniques, intellectuelles ou spirituelles : Emmanuelle Quemin, Helena Rensen, Pierre Béguin, Soizick Lucas, Nicole Desnoues.

Un grand merci à Chantal Archambaut et Estelle Atse, à la fois cuisinières et fées du logis, pour leurs mille et une attentions, la préparation des milieux, le coulage de boîtes, leur travail efficace et leur bonne humeur. Je remercie également l'ensemble du personnel de l'animalerie centrale de l'Institut Pasteur et Marie-Anne Nicola de la plateforme d'imagerie dynamique pour leur aide indispensable. Merci à Ana Cova Rodrigues pour son accueil et son efficacité dans la gestion des tâches administratives.

Du côté de l'UMR 1137 / Inserm-Université Paris-Diderot, je souhaite adresser mes remerciements à Olivier Clermont pour nos discussions et la gestion des souches, à Sara Dion sans qui les expérimentations animales entreprises à l'Inserm n'auraient pu être réalisées, à Françoise Chau et Mélanie Magnan qui ont toujours été disponibles et ont répondu à toutes mes questions matérielles.

Comme il s'agit d'un travail d'équipe, je souhaiterais également remercier toutes les personnes ayant permis le recueil des souches ColoColi à travers la France, notamment les services cliniques et les laboratoires de microbiologie ayant participé. Plus localement, je remercie particulièrement Béatrice La Combe, Jonathan Messika, Tiphaine Billard et Catherine Branger pour leur aide dans ce projet. Merci également à Didier Dreyfuss, chef du service de réanimation médico-chirurgicale de l'hôpital Louis Mourier, pour m'avoir accueilli après mon clinicat comme praticien dans son service il y a maintenant quatre ans et pour son soutien dans ce projet.

J'exprime par ailleurs ma profonde gratitude à l'Institut Pasteur et à la Direction de la Recherche Clinique et du Développement de l'AP-HP. Ces deux institutions réunies ont en effet financé ces trois années de thèse, m'autorisant ainsi un investissement à temps plein dans la recherche. Je remercie à ce titre Geneviève Milon et François Bassompierre pour leur soutien indéfectible ainsi que David Hajage pour sa disponibilité et son aide, certes ponctuelle mais indispensable.

Enfin, mes remerciements vont à ma famille et mes proches. A mes parents en premier lieu... vous êtes par essence un peu responsables de tout ça... Merci de m'avoir fait confiance. Merci à TataWin pour ses relectures et corrections implacables. Merci à vous, les absents de corps ou d'esprit ; j'ai grandi grâce à vous, vous auriez été fier de moi. Merci à Charlotte pour son soutien sans faille et son intérêt. Merci à Olivier, pour son soutien constant, sa patience, ses conseils et ses relectures. Un peu grâce à toi, je vais bientôt devenir un vrai docteur.

Résumé

D'année en année, la multi-résistance bactérienne aux antibiotiques gagne du terrain. Véritable problème de santé publique, elle est particulièrement prégnante au cours des infections nosocomiales. Parmi les alternatives aux antibiotiques, l'utilisation thérapeutique des bactériophages apparaît comme crédible et est actuellement en pleine réévaluation dans les pays occidentaux.

Ce travail se propose d'étudier la faisabilité d'une approche thérapeutique par les bactériophages pour la prise en charge d'une infection nosocomiale grave et fréquente dans le contexte de la réanimation : la pneumonie acquise sous ventilation mécanique. Nous avons centré notre attention sur un des pathogènes couramment rencontré dans ce type d'infection respiratoire et particulièrement investi par le problème de l'antibiorésistance : *Escherichia coli*.

A partir d'une large collection multicentrique de souches isolées des voies aériennes de patients sous ventilation mécanique, nous avons ainsi montré qu'il n'existait pas d'obstacle pratique à l'isolement d'une collection de bactériophages capable de cibler un large éventail de souches. En étudiant la meilleure combinaison de spectre d'hôte, l'utilisation de 5 bactériophages permettait une couverture de 70 %. Nous avons ensuite démontré expérimentalement l'activité thérapeutique de deux bactériophages dans un modèle murin de pneumonie létale, permettant ainsi une survie de 100 %. Grâce à l'outil de bioluminescence nous avons pu observer que la cinétique de décroissance de l'inoculum bactérien provoqué par un bactériophage était identique à celle obtenue avec un antibiotique de référence. Enfin, nous nous sommes focalisés sur LM33-P1, un bactériophage hautement spécialisé car n'infectant que les souches O25b, un sérotype particulièrement problématique en termes d'antibiorésistance et de pathogénicité. LM33-P1, dont la spécificité est apparue dépendante d'une interaction avec le LPS, s'est montré capable de lyser 74 % des souches O25b testées et s'est avéré également efficace *in vivo*.

Ces travaux apportent de nouvelles connaissances permettant d'envisager de façon crédible le développement de la phagothérapie pour le traitement des infections respiratoires à *E. coli* dans le cadre de la ventilation mécanique, mais pas exclusivement. Compte tenu de la physiopathologie de ce type d'infection, une prise en charge prophylactique apparaît également prometteuse.

Abstract

Year after year, multi-drug resistant bacteria expand over the world. As a real public health concern, bacterial resistance is particularly significant within healthcare-associated infections. Among alternative therapy to antibiotics, phage therapy appears as one of the most promising approach and is now reappraised in western countries.

This work is dedicated to a feasibility approach in order to evaluate phage therapy potential in the most frequent and severe complication in the intensive care unit context: the ventilator-associated pneumonia. We focused on a commonly involved bacterium which is also highly affected by antibiotic resistance: *Escherichia coli*.

Starting from a large multicenter collection of strains isolated from airways of mechanically ventilated patients, we showed that there was no practical impediment to get a bacteriophage collection able to target efficiently a large range of strains. By selecting the best host range combination, we observed that 5 bacteriophages were able to cover 70% of the collection. We then experimentally demonstrated that two bacteriophages were able to rescue deadly infected mice in a murine pneumonia model. By using the bioluminescence imaging tool, we also observed that the kinetic of bacterial load decrease obtained with the bacteriophage treatment was as fast as the one obtained with a reference antibiotic. Finally, we concentrated on a highly specialized bacteriophage (LM33-P1) that turned out to be only able to infect O25b strains, a particularly worrisome serotype in terms of antibiotic resistance and pathogenicity. LM33-P1 was able to lyse 74% of O25b strains and its specificity was shown to be LPS-dependent. We also demonstrated that this bacteriophage was biologically active *in vivo*.

These results provide new knowledge allowing the consideration of phage therapy development in the field of respiratory infections due to *E. coli*, in the context of mechanical ventilation but not only. Given the pathophysiology of such infection, a preventive approach seems promising.

Table des matières

Remerciements	5
Résumé	7
Abstract	8
Liste des abréviations	15
Liste des tableaux	17
Liste des figures	18
Avant-propos	21

Première Partie – Revue bibliographique 23

Chapitre 1 – Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique et *E. coli* ... 25

Section 1 – Ventilation mécanique, réanimation et poumons 25

I – La ventilation mécanique : un acte thérapeutique courant en réanimation.....	25
II – L'appareil respiratoire : une vulnérabilité certaine	26
III – Les patients sous ventilation mécanique : un contexte particulier.....	27
IV – La sonde d'intubation.....	29
A – Description et situation anatomique	29
B – Le ballonnet : un dispositif essentiel	31
C – Les limites de l'étanchéité du ballonnet : le concept de micro-inhalation	31

Section 2 – La pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM)..... 33

I – Définitions	33
II – Physiopathologie de la PAVM	34
III – Les données épidémiologiques.....	35
A – Les données nationales	35
1. Le réseau de surveillance REA-Raisin	35
2. Les résultats pour l'année 2013	36
B – Les données internationales	37
IV – Les données microbiologiques au cours des PAVM	37
A – La distinction entre PAVM précoces et PAVM tardives	37
B – Les germes impliqués dans les PAVM	39

Section 3 – Escherichia coli : écologie et place dans les PAVM 41

I – Caractéristiques microbiologiques générales	41
A – Caractéristiques physiques et biochimiques.....	41
B – Les principaux outils utilisés pour la classification des souches	41
1. Le sérotypage	42
2. L'électrophorèse en champ pulsé	42
3. L'analyse des séquences répétées en tandem (MLVA)	43

4. L'étude de la variabilité protéique et génétique : MLEE et MLST	43
5. Le phylogroupage par PCR multiplex	44
C – Environnement, niche écologique	44
D – La phylogénie et ses relations avec la pathogénie	45
E – Caractéristiques génomiques, plasticité génétique	46
II – Les pathologies causées par <i>E. coli</i>	48
A – Les pathologies intestinales chez l'homme	48
B – Les pathologies extra-intestinales chez l'homme	51
C – Les pathologies chez l'animal	53
III – La résistance aux antibiotiques chez <i>E. coli</i>	53
A – Les principales résistances	54
1. La résistance aux β -lactamines : le problème des β LSE	54
2. La résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides	56
3. La résistance aux carbapénèmes	56
B – Epidémiologie des souches d'entérobactéries et d' <i>E. coli</i> β LSE	57
C – Une conséquence de l'antibiorésistance : une mortalité accrue	60
IV – Un complexe clonal particulier : le ST131-O25b	61
V – <i>E. coli</i> au cours des PAVM	62

Chapitre 2 – Les bactériophages : des agents thérapeutiques d'un nouveau genre

Section 1 – Historique

Section 2 – Généralités

I – Les cycles infectieux	67
A – Le cycle lytique	67
B – Le cycle lysogénique	69
C – Le cycle pseudolysogénique	70
D – Le cycle infectieux chronique	70
II – Transduction généralisée et spécialisée	70
A – Transduction généralisée	71
B – Transduction spécialisée (ou localisée)	72
III – La classification des bactériophages	72
A – Les <i>Podoviridae</i>	74
B – Les <i>Myoviridae</i>	74
C – Les <i>Siphoviridae</i>	74
D – Les autres virus n'appartenant pas à l'ordre des <i>Caudovirales</i>	75
IV – Génétique des bactériophages	76
V – La place et le rôle écologique des bactériophages	77
VI – Interaction bactérie-bactériophage : une course à l'armement raisonnée	78
A – La résistance par inhibition de l'adsorption virale	78
B – La résistance par blocage de l'injection d'ADN	79
C – La résistance par variation de phase	80
D – La résistance par dégradation du génome viral	80

1. Les systèmes de restriction-modification	80
2. Le système CRISPR-Cas	81
E – La résistance par infection abortive et les systèmes toxine-antitoxine.....	84
F – La résistance par un mécanisme nouveau : le BREX	85
Section 3 – La phagothérapie.....	86
I – Concept, notions fondamentales et autres points clés	86
A – Des bactériophages : pour quel type d’infection ?	86
B – Le spectre d’hôte d’un bactériophage.....	87
C – Cocktails, prêt-à-porter et sur-mesure	88
D – Les bactériophages : avec ou sans antibiotique ?	90
E – Propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques	91
F – Les problèmes posés par la réglementation actuelle	92
1. Les différents régimes d’enregistrement.....	93
2. Les conséquences pratiques	94
II – La toxicité des bactériophages : mythes et légendes	95
A – La toxicité physico-chimique, le caractère mutagène et reprotoxique	95
B – Immunogénicité directe : l’effet de la particule virale	96
1. Réponse immune innée et inflammation aiguë	96
2. Réponse immune adaptative et anticorps.....	98
C – L’immunogénicité indirecte : l’effet de la lyse bactérienne	99
III – Les preuves expérimentales chez l’animal et chez l’homme.....	101
A – Les données expérimentales chez l’animal	101
B – Les données cliniques chez l’homme	101
IV – Les avantages et les inconvénients de la phagothérapie	107
Section 4 – Les autres applications des bactériophages	109
I – L’utilisation des bactériophages dans l’agro-alimentaire	109
II – L’utilisation des bactériophages comme outil d’étude des interactions moléculaires à haut débit : le <i>phage display</i>	110
III – Des bactériophages modifiés comme détecteur de pathogènes	110
IV – Des bactériophages en tant que vecteur de régulation bactérienne	111

Deuxième Partie – Travail expérimental et résultats..... 113

Objectifs du travail..... 115

Matériel et méthodes 116

I – Souches bactériennes, milieux et conditions de croissance.....	116
A – Souches 536, PDP302 et LM33.....	116
B – Souches d’origine respiratoire isolées de patients sous ventilation mécanique : projet ColoColi, collections ECoPAVM I, II et III.....	117
C – Autres souches bactériennes.....	117
D – Conditions de croissance	118
II – Isolement et purification des bactériophages, microscopie électronique	118

III – Séquençage des bactériophages et des bactérie, analyses génomiques	119
IV – Evaluation du spectre d’hôte et efficacité à former des plages de lyses.....	120
A – Spectre d’hôte.....	120
B – Efficacité à former des plages de lyse	121
C – Recherche d’une éventuelle inhibition ou potentialisation.....	122
V – Cinétique de lyse <i>in vitro</i>	123
VI – Adsorption virale et des paramètres du bactériophage LM33-P1.....	124
A – Adsorption virale.....	124
B – Calcul des paramètres cinétiques viraux	124
VII – Confirmation du rôle du LPS comme récepteur et déterminant de l’interaction entre le bactériophage LM33-P1 et les souches O25b.....	125
A – Epreuve de compétition avec extraits de LPS	125
1. Extraction du lipopolysaccharide bactérien (LPS)	125
2. Test d’inhibition de la formation des plages de lyse	126
B – Inhibition de l’agrégation provoquée par un anticorps spécifique	127
VIII – Modèles murins utilisés.....	127
A – Dispositions éthiques communes	127
B – Modèle d’infection pulmonaire, acquisition du signal de bioluminescence	128
C – Modèle murin d’infection urinaire rétrograde	129
D – Modèle murin de septicémie à point de départ sous-cutané.....	129
IX – Transformation de la souche 536, stabilité du plasmide.....	130
X – Adaptation du bactériophage 536-P7 à la souche PDP302	131
XI – Analyses cytologiques et immunologiques du liquide de LBA.....	131
XII – Expressions des résultats et analyses statistiques	132

Chapitre 1 – Isolement et caractérisation du spectre d’hôte de bactériophages ciblant les souches d’*E. coli* impliquées dans les PAVM 133

Section 1 – Isolement et tests successifs de bactériophages d’intérêt..... 133

I – Collection ECoPAVM I	133
II – Collection ECoPAVM II	134
A – Spectre d’hôte des bactériophages.....	134
B – Sensibilité des souches	136
III – Collection ECoPAVM III.....	137
A – Spectre d’hôte des bactériophages.....	137
B – Sensibilité des souches	139
IV – Recherche d’un effet lié au service émetteur concernant la sensibilité aux bactériophages des souches collectées	139

Section 2 – Évaluation de l’efficacité des bactériophages isolés 141

I – Évaluation de l’efficacité à former des plages de lyses sur les souches sensibles (EOP).....	141
II – Recherche de la combinaison de bactériophages offrant le meilleur spectre d’hôte.....	142
III – Test du cocktail de 5 bactériophages sur la collection ECoPAVM I et II	144
IV – Recherche d’une interaction négative ou positive <i>in vitro</i> lors de l’association de plusieurs bactériophages en cocktail	144

Chapitre 2 – Phagothérapie expérimentale dans le cadre d’un modèle murin de pneumonie à <i>E. coli</i>	147
Section 1 – Prérequis avant utilisation de l’outil de bioluminescence	147
I – Vérification de la stabilité du plasmide sans pression antibiotique	147
II – Vérification de l’absence d’impact sur la croissance et la pathogénicité de la souche	149
Section 2 – Modèle murin de pneumonie utilisant la souche 536	149
I – Le bactériophage 536-P1	149
II – Protocole expérimental, déroulement chronologique	150
III – Données obtenues avec un inoculum de 1.10^7 cfu	151
A – Évolution du signal de bioluminescence au cours du temps	151
B – Mortalité et morbidité	152
C – Compte bactérien et viral, inflammation et cytologie	152
1. Évolution du compte bactérien et de la charge virale pulmonaire	153
2. Paramètres inflammatoires et cytologie du liquide de LBA	153
IV – Données obtenues avec un inoculum de 4.10^7 cfu	158
A – Evolution du signal de bioluminescence au cours du temps	158
B – Mortalité et morbidité	158
Section 3 – Modèle de pneumonie utilisant la souche PDP302	160
I – Souche, bactériophages et adaptation	160
II – Mortalité	161
III – Modification de l’activité <i>in vitro</i>	161
IV – Support génétique de cette adaptation	162
Chapitre 3 - Étude d’un bactériophage au spectre exclusif : LM33-P1	164
Section 1 – LM33-P1 : un bactériophage spécifique des souches O25b	164
I – Diversité des souches testées	165
II – Confirmation de la spécificité O25b	166
Section 2 – LM33-P1 et O25b : une spécificité dépendante du LPS	166
I – LM33-P1 prévient l’agrégation médiée par un anticorps spécifique anti-O25	166
II – Le LPS O25b antagonise l’interaction entre LM33-P1 et les bactéries O25b	167
Section 3 – Caractéristiques virologiques du bactériophage LM33-P1	171
I – Caractéristiques générales	171
II – Adsorption du virus sur son hôte	172
III – Latence, éclipse et nombre de virions libérés	172
IV – Cinétique de lyse de la souche LM33 par le bactériophage LM33-P1	174
Section 4 – Analyse génomique du bactériophage LM33-P1	175
Section 5 – LM33-P1 : un bactériophage également efficace <i>in vivo</i>	177
I – Modèle de septicémie à point de départ sous-cutané	177
II – Modèle d’infection-colonisation urinaire rétrograde	179
III – Modèle de pneumonie	181

Troisième partie – Discussion et perspectives	183
Synthèse des principaux résultats	185
Discussion	186
<i>Section 1 – Spectres d’hôtes et efficacité des bactériophages</i>	186
I – Une spécialisation bien réelle	186
II – Une activité préservée au-delà de l’hôte primaire	188
III – La quête des meilleurs bactériophages : chercher là-bas pour cibler ici ?	189
IV – Une activité par-delà les frontières	190
<i>Section 2 – Infection pulmonaire et phagothérapie</i>	191
I – L’outil de bioluminescence : une technologie robuste	191
II – Les limites des modèles infectieux pulmonaires	192
III – Antibiotique et bactériophage : une cinétique de décroissance bactérienne comparable ?	194
IV – Vers l’aérosol-phagothérapie ?	195
V – L’adaptation : un processus évolutif extrêmement puissant	196
<i>Section 3 – LM33-P1 : un bactériophage singulier ?</i>	200
I – Une activité <i>in vitro</i>	201
II – Une activité <i>in vivo</i>	201
III – Une couverture large mais une proportion non négligeable de souches résistantes	204
IV – Un bactériophage hautement valorisable	205
Perspectives et conclusions	207
Références bibliographiques	211
Annexes	237

Liste des abréviations

5-HMC	5-hydroxy-méthylcytosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIEC	<i>Adherent invasive E. coli</i>
AMM	Autorisation de mise sur le marché
APEC	<i>Avian pathogenic E. coli</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATMP	<i>Advanced therapy medicinal product</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BMR	Bactérie multi-résistante
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
CHU	Centre hospitalier universitaire
CLIN	Comité de lutte contre les infections nosocomiales
CNF1	<i>Cytotoxic necrotizing factor 1</i>
CRISPR-Cas	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CVC	Cathéter veineux central
DAEC	<i>Diffusely adherent E. coli</i>
DNAse	Désoxyribonucléase
DO	Densité optique
EAEC	<i>Enteraggregative E. coli</i>
ECOPAVM	Collection multicentrique de souches d' <i>E. coli</i> isolés dans les voies respiratoires de patients sous ventilation mécanique
ECOR	<i>E. coli collection of reference</i>
EHEC	<i>Enterohemorrhagic E. Coli</i>
EIEC	<i>Enteroinvasive E. coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EOP	<i>Efficiency of plaquing</i> (efficacité à former des plages de lyse)
ETEC	<i>Enterotoxinogenic coli</i>
ExPEC	<i>Extra-intestinal pathogenic E. coli</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
IM	Intra-musculaire
IN	Intra-nasal
InPEC	<i>Intestinal pathogenic E. coli</i>
IP	Intra-péritonéal
KC	<i>Keratinocytes chemoattractant</i>
LB	milieu de culture Luria-Bertani
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LDH	Lactate deshydrogénase
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Toxine thermolabile des souches enterotoxinogènes d' <i>E. coli</i>

MLEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MLVA	<i>Multiple-locus variable number tandem repeat analysis</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
NMEC	<i>Neonatal meningitis E. coli</i>
OmpC	<i>Outer membrane protein C</i>
ONERBA	Observatoire national de l'épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques
ORF	<i>Open reading frame</i>
PAVM	Pneumonie acquise sous ventilation mécanique
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PFU	<i>Plaque-forming unit</i>
PI	Post-infection
PLI	Plage de lyse individualisable
RAISIN	Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales
RM	Restriction-modification
RNAse	Ribonucléase
SC	Sous-cutané
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis</i>
ST	<i>Sequence type</i>
ST	Toxine thermostable des souches enterotoxinogènes d' <i>E. coli</i>
STEC	<i>Shigatoxine-producing E. coli</i>
UPEC	<i>Uropathogenic E. coli</i>
UV	Ultra-violet
VI	Ventilation invasive
VNI	Ventilation non invasive
VNTR	<i>Variable number tandem repeat</i>
VTEC	<i>Verotoxin-producing E. coli</i>
βLSE	β-lactamase à spectre élargi

Liste des tableaux (titres courts)

Tableau 1. Evolution du risque de PAVM selon la durée d'intubation	36
Tableau 2. Répartitions des différents microorganismes responsables de PAVM.....	38
Tableau 3. Evolution de la répartition des microorganismes responsables de PAVM .	40
Tableau 4. Prévalence des 4 phylogroupes majeurs rencontrés chez <i>E. coli</i>	45
Tableau 5. Les β -lactamines en thérapeutique humaine.....	55
Tableau 6. Les bactériophages dans des modèles d'infection pulmonaire.....	104
Tableau 7. Les bactériophages dans des modèles de brûlures et greffes cutanées.....	105
Tableau 8. Les bactériophages dans différents autres modèles infectieux.....	106
Tableau 9. Avantages et inconvénients de l'utilisation des bactériophages.....	108
Tableau 10. Bactériophages les plus actifs et couverture cumulée globale	144
Tableau 11. Titration de différents bactériophages à la recherche d'une interaction..	146
Tableau 12. Évolution du compte bactérien et viral au niveau pulmonaire	154
Tableau 13. Résumé de l'effet inhibiteur de différents extraits de LPS.....	169

Liste des figures (titres courts)

Figure 1. Sonde d'intubation trachéale	30
Figure 2. Principaux rapports anatomiques d'une sonde d'intubation oro-trachéale	30
Figure 3. Les différents pathovars et le lien avec leur groupe phylogénétique	46
Figure 4. Evolution de la répartition des souches d'entérobactéries β LSE	58
Figure 5. Densité d'incidence d'isolement de souches β LSE	59
Figure 6. Entérobactéries productrices de β LSE. Évolution au cours du temps.	59
Figure 7. Exemple de préparation fabriquée par le Laboratoire du Bactériophage.....	66
Figure 8. Schéma des différents cycles infectieux des bactériophages	68
Figure 9. Morphotype des virus infectant bactéries et archées.....	73
Figure 10. Les 3 familles de bactériophages composant l'ordre des Caudovirales.....	75
Figure 11. Structure du locus CRISPR-Cas chez E. coli.....	82
Figure 12. Transcription et maturation du locus CRISPR.....	83
Figure 13. Fonctionnement générique du système CRISPR-Cas	83
Figure 14. Exemple de cocktails commerciaux de bactériophages anti-listéria.....	109
Figure 15. Aspect de la technique des « sur-spots » et de la dilution sériées.....	120
Figure 16. Test semi-automatisé du spectre d'hôte de différents bactériophages	122
Figure 17. Test d'inhibition de l'interaction bactériophage-bactérie par le LPS.	126
Figure 18. Image obtenue après acquisition du signal de bioluminescence	128
Figure 19. pCM17 permettant l'obtention d'un phénotype bioluminescent.	130
Figure 20. Distribution de l'activité des bactériophages (ECoPAVM II)	135
Figure 21. Pourcentage de souches lysées par bactériophages (ECoPAVM II).....	135
Figure 22. Pourcentage de bactériophages actifs (ECoPAVM II).....	136
Figure 23. Répartition des phylogroupes au sein des 35 souches pan-résistantes.....	137
Figure 24. Distribution de l'activité des bactériophages (ECoPAVM III).....	138
Figure 25. Pourcentage de souches lysées par bactériophages (ECoPAVM III)	138
Figure 26. Répartition des souches selon leur sensibilité et leur provenance.	140
Figure 27. Nombre de souches par centre, proportion de souches pan-résistantes	140
Figure 28. Répartition de 124 EOP de différents bactériophages	141
Figure 29. Représentation graphique des tests phages-bactéries (ECoPAVM III).. ...	143
Figure 30. Répartition l'activité normalisée du cocktail (A_{co})	145
Figure 31. Évolution de la quantité de lumière produite au cours du temps	148

Figure 32. Pourcentage de colonies exprimant un phénotype bioluminescent.....	148
Figure 33. Le bactériophage 536-P1.....	149
Figure 34. Cinétique de lyse de la souche 536 par le bactériophage 536-P1	149
Figure 35. Protocole général utilisé pour le modèle de pneumonie	150
Figure 36. Signal de bioluminescence au niveau de l'aire thoracique (1.10^7 cfu)	151
Figure 37. Survie des souris infectées avec 1.10^7 cfu.....	152
Figure 38. Evolution du poids suite à l'infection par 1.10^7 cfu.....	152
Figure 39. Analyse cytologiques des liquides de LBA 16 heures post-infection.....	154
Figure 40. Analyses de différents paramètres inflammatoires (LBA).....	155
Figure 41. Examens cytologiques des liquides de LBA.....	157
Figure 42. Signal de bioluminescence au niveau de l'aire thoracique (4.10^7 cfu).	159
Figure 43. Survie des souris infectées avec 4.10^7 cfu.....	159
Figure 44. Évolution du poids suite à l'infection par 4.10^7	159
Figure 45. Le bactériophage 536-P7.....	160
Figure 46. Survie des souris infectées avec $1,5.10^7$ cfu de la souche PDP302	161
Figure 47. Cinétique de lyse du bactériophage 536-P7 et 536-P7-PDP302	162
Figure 48. Extrait de l'alignement du génome de 536-P7 et 536-P7-PDP302.....	163
Figure 49. Répartition des souches cliniques testées contre LM33-P1	165
Figure 50. Répartition des 64 valeurs d'EOP du bactériophage LM33-P1	166
Figure 51. Effet de LM33-P1 sur l'agrégation de LM33 induite par un Ac anti-O25	167
Figure 52. Effet du LPS O25b purifié sur la titration du bactériophage LM33-P1	168
Figure 53. Effet du LPS O25b purifié sur l'interaction bactérie-bactériophage.....	169
Figure 54. Cinétique de lyse de la souche LM33 par LM33-P1 en présence de LPS .	170
Figure 55. Augmentation de la taille des plages de lyse de LM33-P1	171
Figure 56. Illustration de la présence d'un halo autour des zones de lyse.....	171
Figure 57. Courbe d'adsorption du bactériophage LM33-P1 sur son hôte (LM33)....	172
Figure 58. Courbes de croissance dites de « one step growth » de LM33-P1	173
Figure 59. Cinétique de lyse de la souche LM33 par LM33-P1.....	174
Figure 60. Alignements comparatifs des génomes de différents bactériophages.....	176
Figure 61. Compte bactérien dans 3 sites métastatiques (infection sous-cutanée).....	178
Figure 62. Compte viral dans les différents organes (infection sous-cutanée).....	179
Figure 63. Compte bactérien dans la vessie et les reins (infection urinaire).....	180
Figure 64. Compte viral dans la vessie et les reins (infection urinaire)	181
Figure 65. Compte bactérien et viral au niveau pulmonaire (infection pulmonaire)..	182

Figure 66. Corrélation entre le nombre de bactéries lysées par un bactériophage et le nombre de bactériophages capables de lyser l'hôte de ce virus.	187
Figure 67. Répartition des phylogroupes selon la provenance des souches.....	191
Figure 68. Représentation en fréquence des bases composant la séquence consensus	198
Figure 69. Prédiction des structures secondaires des terminateurs de transcription....	199

Avant-propos

Chez les patients hospitalisés dans les services de réanimation, la pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) est la complication nosocomiale la plus grave et la plus fréquente. Elle apparaît inéluctable car consécutive à l'accès aux voies aériennes par un dispositif non physiologique. Les leviers d'intervention dont on dispose pour limiter cette complication sont peu nombreux et reposent sur la diminution de la colonisation oropharyngée, l'amélioration du diagnostic et du traitement ainsi que sur la limitation de la durée de ventilation mécanique.

Escherichia coli est un pathogène souvent rencontré comme agent causal des PAVM. Comme ce qui est observé dans les autres pathologies extra-intestinales induites par *E. coli*, les souches les plus virulentes, de phylogroupe B2, sont le plus souvent impliquées dans les PAVM et semblent parfaitement adaptées à l'environnement respiratoire.

Parallèlement, *E. coli* est une entérobactérie qui fait preuve d'un potentiel adaptatif inégalé, notamment concernant sa capacité à acquérir des résistances aux antibiotiques et à diffuser mondialement. Ainsi, l'épidémie actuelle de souches productrices de β -lactamases à spectre élargi fréquemment multi-résistantes et celle à venir de souches productrices de carbapénèmases sont autant d'évènements responsables d'une augmentation de morbi-mortalité.

Alors que la pénurie d'antibiotique se poursuit, il est urgent d'envisager des alternatives thérapeutiques à même d'enrayer la progression de cette situation. Parmi ces alternatives, l'utilisation thérapeutique des bactériophages apparaît comme crédible et est actuellement en pleine réévaluation dans les pays occidentaux. C'est ce que propose ce travail de thèse : apporter des éléments concourant à la validation de la phagothérapie dans les infections respiratoires à *E. coli*, sur un plan fondamental et pratique.

De façon à introduire le travail expérimental, la première partie propose au lecteur une revue bibliographique centrée sur deux sujets : la PAVM et ses éléments de contexte ainsi que la place et les caractéristiques d'*E. coli* d'une part, puis les bactériophages et leurs potentiels thérapeutiques d'autre part.

Le travail expérimental est divisé en trois chapitres et démontre essentiellement la faisabilité de l'utilisation thérapeutique des bactériophages. Dans le 1^{er} chapitre,

j'expose les résultats obtenus grâce à une collection de bactériophages que j'ai isolée puis testée sur une large collection multicentrique de souches provenant des voies respiratoires de patients sous ventilation mécanique. Nous verrons notamment qu'avec la constitution d'un cocktail associant plusieurs bactériophages, il est possible de couvrir une grande majorité de ces souches. Le second chapitre est centré sur des travaux *in vivo* visant à démontrer l'activité thérapeutique de deux bactériophages dans un modèle murin de pneumonie. L'outil de bioluminescence a été utilisé pour suivre l'évolution de l'inoculum infectieux au cours du temps et j'ai pu observer que celle-ci n'était pas différente lorsque les animaux étaient traités par un bactériophage ou par un antibiotique de référence. J'expose également les résultats obtenus en réalisant l'adaptation d'un bactériophage sur un hôte secondaire. Enfin, le 3^e chapitre est consacré à un bactériophage particulier, LM33-P1, isolé au cours de ma 2^e année de thèse et dont le spectre d'hôte est restreint au sérotype O25b. J'ai confirmé cette spécificité et montré qu'elle était dépendante d'une interaction bactériophage-bactérie passant par le LPS. Un travail de caractérisation a également été réalisé mettant en avant des paramètres virologiques remarquables. Enfin, l'activité biologique de ce bactériophage a été établie *in vivo* dans différents modèles.

Dans la dernière partie, je propose au lecteur une discussion des différents résultats, avec une orientation essentiellement thérapeutique.

Enfin, sont inclus en annexe deux articles publiés. Le premier article est issu d'un travail auquel j'ai participé, démontrant l'activité biologique *ex vivo* d'un cocktail de bactériophages anti-*Pseudomonas aeruginosa* au sein d'expectorations provenant de patients mucoviscidosiques colonisés par cet agent pathogène. Le deuxième article est la traduction des résultats expérimentaux présentés dans le 2^e chapitre de la 2^e partie, démontrant l'activité thérapeutique *in vivo* des bactériophages anti-*E. coli*.

Première Partie

—

Revue bibliographique

Chapitre 1 – Les pneumonies acquises sous ventilation mécanique et *Escherichia coli*

Section 1 – Ventilation mécanique, réanimation et poumons

I – La ventilation mécanique : un acte thérapeutique courant en réanimation

L'admission d'un patient en réanimation est avant tout conditionnée par l'existence d'une situation clinique engageant son pronostic vital au moment de sa prise en charge ou susceptible d'évoluer comme telle à court terme. L'engagement du pronostic vital est classiquement défini par la présence d'une défaillance d'un (ou plusieurs) organe(s) régulant les grandes fonctions vitales : système cardiovasculaire, respiratoire, rénal, neurologique, hépatique principalement.

La prise en charge de ces défaillances par les équipes de réanimation repose sur la mise en œuvre d'une suppléance temporaire associée à un traitement étiologique. Parmi les techniques de suppléance le recours à la ventilation mécanique constitue la thérapeutique la plus fréquemment utilisée, en rapport avec la prise en charge de la défaillance respiratoire (principal motif d'admission des patients en réanimation) et de la défaillance neurologique (coma imposant un contrôle de la ventilation avec protection des voies aériennes) [CUB-Réa-2010, *Society of Critical Care Medicine*-2005]. Ainsi, 67 % des patients admis en réanimation sur le territoire national en 2013 bénéficiaient d'une ventilation mécanique [Réa-RAISIN-2015].

On comprend dès lors que l'invention de la ventilation mécanique, qui constitue une pierre angulaire dans la prise en charge thérapeutique des patients graves, a clairement révolutionné leur pronostic [Snider-1989]. Cependant, chaque médaille ayant son revers, la ventilation mécanique expose le patient à une complication infectieuse grave : la pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM). Celle-ci représente actuellement la complication nosocomiale la plus fréquente et sans doute la plus sévère qu'un patient peut rencontrer au cours de son séjour en réanimation.

II – L'appareil respiratoire : une vulnérabilité certaine

Avec une surface alvéolaire évaluée entre 80 et 140 m² [*Gehr-1978, Knust-2009*], les poumons sont conditionnellement tournés vers l'extérieur pour assurer les échanges gazeux. Associés à cette importante surface, des impératifs physiques et anatomiques (diffusion gazeuse, interface air-sang) imposent au système une contrainte supplémentaire : la barrière alvéolo-capillaire séparant le compartiment aérien du compartiment vasculaire doit globalement présenter une épaisseur inférieure au micromètre, ultime rempart assurant la protection contre le « dehors ». En cas de pneumonie, les espaces alvéolaires sont rapidement envahis par un exsudat inflammatoire associé à l'afflux de cellules phagocytaires, aboutissant à la formation de pus. Le bilan net de cette réaction inflammatoire nécessaire aboutit néanmoins à une diminution de la surface alvéolaire fonctionnelle dont les conséquences sur les échanges gazeux apparaissent évidentes en cas de pneumonie extensive. On comprend dès lors la vulnérabilité relative de l'appareil respiratoire.

Ces considérations générales expliquent très vraisemblablement le fait que les infections respiratoires basses occupent la troisième place (à égalité avec la BPCO¹) dans les causes de décès dans le monde et la première dans les pays à faible revenu [*WHO -2008*]. De même, l'admission en réanimation des patients présentant les formes les plus sévères d'infections respiratoires basses est associée à une mortalité élevée, pouvant être supérieure à 50% dans certaines populations [*Wilkinson-2004*].

Néanmoins, d'importants moyens sont physiologiquement présents pour assurer une défense locale efficace et minimiser ainsi la probabilité qu'un agent infectieux pénètre le poumon profond. Ces mécanismes de défense sont principalement au nombre de trois : 1) la présence de multiples reflexes empêchant la pénétration de particules dans les voies aériennes inférieures (mise en jeu de la toux, fermeture de l'accès glottique, basculement de l'épiglotte) ; 2) la présence d'un épithélium bronchique cilié permettant le transport rétrograde des particules impactées sur le mucus ; 3) une très grande proportion (>90%) de cellules phagocytaires (macrophages alvéolaires) résidant en permanence dans les espaces alvéolaires.

¹ Broncho-pneumopathie obstructive chronique : il s'agit d'une pathologie induite par le tabac, touchant les bronches et les espaces alvéolaires, évoluant à terme vers l'insuffisance respiratoire chronique.

III – Les patients sous ventilation mécanique : un contexte particulier

Dans le cadre de l'urgence vitale (situation fréquemment rencontrée dans les services de réanimation), la réalisation d'une ventilation mécanique invasive impose le recours à une intubation trachéale, procédure consistant en la mise en place d'une sonde semi-rigide en position trachéale, par voie orale le plus souvent (intubation oro-trachéale) ou plus rarement par voie nasale (intubation nasotrachéale). Cette sonde autorise ainsi l'administration du mélange gazeux délivré par un respirateur en shuntant anatomiquement le principal dispositif de contrôle de l'accès aux voies aériennes basses : le larynx. Cette procédure, du fait de son caractère invasif (stimulation douloureuse, déclenchement du réflexe nauséux, toux, ...) ne peut s'envisager qu'après une anesthésie générale qui est ensuite maintenue pendant une durée variable, principalement dépendante de la vitesse à laquelle vont s'améliorer les échanges gazeux (globalement de 48 heures à plusieurs semaines). Parmi les patients présentant les tableaux respiratoires les plus graves, certains vont bénéficier parallèlement d'une curarisation profonde visant à supprimer toute activité musculaire respiratoire résiduelle, améliorant les asynchronismes patient-ventilateurs et diminuant ainsi les pressions pulmonaires dont on connaît l'implication dans les lésions induites par la ventilation [Papazian-2010]. Enfin, les patients sous ventilation mécanique bénéficient d'une alimentation artificielle, laquelle est essentiellement délivrée par voie entérale à l'aide d'une sonde nasogastrique. De ces considérations résultent les points suivants :

- La sonde d'intubation constitue un corps étranger établissant un continuum anatomique nouveau entre la bouche, l'oropharynx, l'appareil phonatoire et la trachée (cf. ci-dessous). Caractéristique commune aux corps étrangers, ce matériel ne possède aucun moyen de défense intrinsèque contre une colonisation bactérienne et ne peut interagir positivement avec le système immunitaire.
- L'anesthésie générale et *a fortiori* la curarisation :
 - suppriment le réflexe de déglutition permettant normalement l'élimination des sécrétions salivaires physiologiques. Il en résulte une accumulation de sécrétions dans les zones déclives (oropharynx et

région sous-glottique) qui ne sont que partiellement accessibles aux aspirations prodiguées régulièrement aux patients ;

- suppriment le réflexe de toux qui constitue l'arme la plus efficace générant l'expulsion des sécrétions présentes dans l'arbre trachéobronchique. Même si les aspirations trachéales réalisées régulièrement par le personnel soignant permettent de pallier en partie les conséquences de l'inhibition de ce réflexe naturel, elles ne peuvent prétendre à une efficacité similaire.
- La sonde nasogastrique, par sa position, facilite le reflux gastro-œsophagien de liquide gastrique [Ibanez-1992]. De plus, la majorité des patients de réanimation reçoivent un traitement anti-acide dans le cadre de la prévention de l'ulcère gastrique de stress, ce qui a pour effet d'augmenter le pH gastrique dans des zones autorisant la croissance bactérienne et donc la colonisation gastrique [Hillman-1982]. Ce reflux gastro-oesphagien chez le patient sous ventilation mécanique est à même de gagner la région sous-glottique, réalisant alors potentiellement un reflux gastro-oeso-trachéal, également impliqué dans la physiopathologie des PAVM [Chastre-2002].
- L'environnement biologique est modifié au niveau bucco-dentaire, conséquence de la stagnation salivaire et d'une hygiène buccale difficilement dispensée compte tenu des conditions locales (présence de la sonde d'intubation, absence de coopération du patient).
- De longue date, la présence de la sonde d'intubation et les aspirations trachéales indissociablement liées ont été prouvées comme responsables d'une diminution de la clairance mucociliaire par altération anatomique locale. Plus généralement, les différents stress physiologiques présents chez les patients de réanimation (inflammation, infection) et la ventilation elle-même entraînent une dysfonction de l'escalator mucociliaire [Wanner-1996].

L'ensemble de ces modifications anti-physiologiques consécutives à la prise en charge thérapeutique mise en place est ainsi responsable d'un bouleversement de l'écologie bactérienne locale, que ce soit au niveau de la cavité buccale [Fourrier-1998, Terezakis-2011], du pharynx [Bonten-1997, Johanson-1969, Torres-1993] et

de l'estomac [Bonten-1997, Torres-1993], point sur lequel nous reviendrons en détail plus loin (page 37).

Parallèlement à ces considérations respiratoires, il est nécessaire de souligner que les patients admis en réanimation présentent la plupart du temps un passé médical leur conférant un risque plus élevé de complications infectieuses. Ainsi, on notera essentiellement une prévalence élevée du diabète (jusqu'à 30%), de l'insuffisance rénale chronique, de l'hypertension, du cancer [Fuchs-2012, Zilberberg-1998]. Egalement, une proportion croissante de ces patients présente à l'admission une immunodépression (induite par un traitement immunosuppresseur, une chimiothérapie ou bien conséquence d'une pathologie telle qu'une hémopathie, une infection par le VIH, etc.). Ainsi, 15,6 % des patients admis en réanimation en France en 2013 présentaient une immunodépression [Réa-RAISIN-2015].

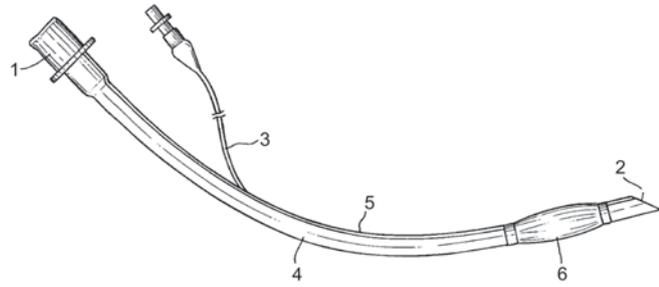
Enfin, des travaux plus récents font état d'altérations fonctionnelles des différents composants de l'immunité innée et adaptative chez les patients admis en réanimation, ceci indépendamment de tout traitement ou pathologie immunosuppressive : altération des capacités phagocytaires, dysfonction monocytaire, neutrophilique et lymphocytaire T [Kalanuria-2014].

IV – La sonde d'intubation

A – Description et situation anatomique

La sonde d'intubation (**Figure 1**) est un dispositif médical indissociable de la ventilation mécanique invasive et constitue le principal facteur de risque de PAVM. Son utilisation est rendue obligatoire par la nécessité d'obtenir un contrôle des voies aériennes supérieures chez le patient comateux ou anesthésié : garantir un accès permanent aux poumons pour l'apport de la ventilation (imposant un shunt des dispositifs anti-pénétration) et garantir une protection des voies aériennes, notamment vis-à-vis des sécrétions bucco-pharyngées et du liquide gastrique en cas de vomissement.

Figure 1. Sonde d'intubation trachéale (modèle standard). 1 : orifice proximal (connexion au respirateur), 2 : orifice distal (en position trachéale une fois en place), 3 : tubulure de gonflage du ballonnet, 4 : corps de la sonde d'intubation, 5 : bande longitudinale radio-opaque pour faciliter le repérage radiographique, 6 : ballonnet d'étanchéité. D'après un schéma de C. Kent.



Dans son trajet, on note l'effraction successive de deux systèmes anti-pénétration (**Figure 2**) : l'épiglotte et le larynx (la sonde d'intubation passe à travers les deux cordes vocales). On note également la proximité anatomique entre l'œsophage et la trachée, de même que les zones déclives où sont susceptibles de stagner les sécrétions oropharyngées chez un patient allongé sur le dos.

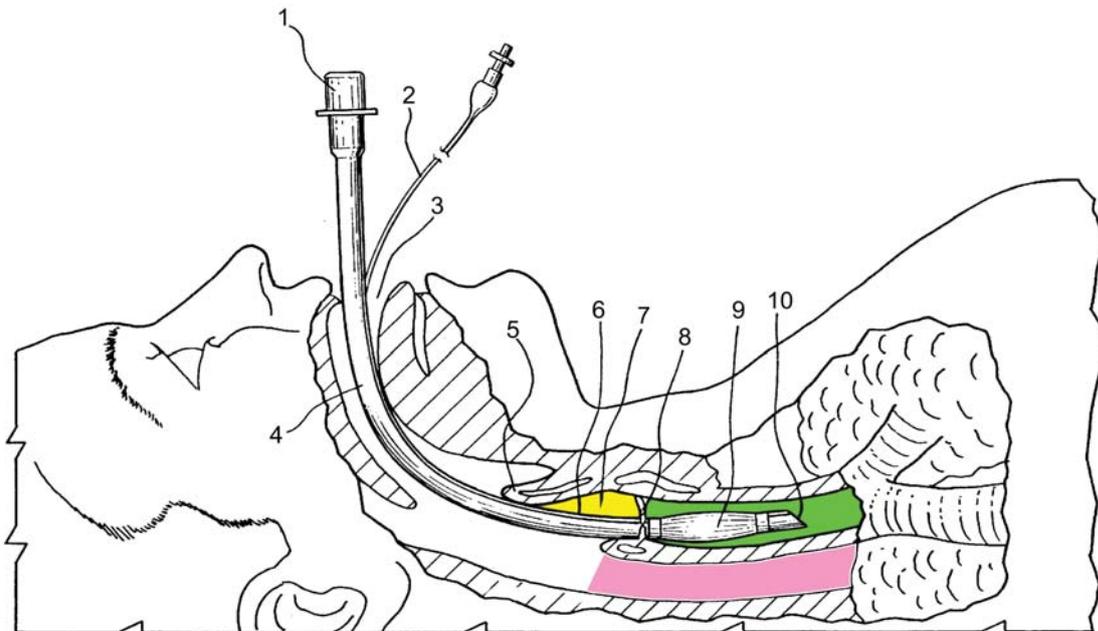


Figure 2. Principaux rapports anatomiques d'une sonde d'intubation oro-trachéale une fois celle-ci en place. 1 : extrémité proximale (connexion au respirateur), 2 : tubulure de gonflage du ballonnet, 3 : orifice buccal, 4 : portion buccale de la sonde d'intubation, 5 : épiglotte, 6 : portion sus-glottique de la sonde, 7 : espace sus-glottique, 8 : larynx et cordes vocales dont l'ouverture détermine l'orifice glottique (ou glotte), 9 : ballonnet de la sonde d'intubation (en position dégonflée ici), 10 : extrémité distale de la sonde. En jaune : l'espace sus-glottique, en vert l'espace sous-glottique (trachéal), en rose : l'œsophage (démessurément ouvert sur ce schéma mais présentant normalement une lumière quasi virtuelle). D'après un schéma de C. Kent.

B – *Le ballonnet : un dispositif essentiel*

La sonde d'intubation comporte un ballonnet souple à son extrémité distale, dont le gonflage permet son application circonférentielle sur la paroi trachéale et assure ainsi une étanchéité de connexion entre le patient et le respirateur. La pression de gonflage de ce ballonnet est un paramètre important afin d'atteindre deux objectifs : assurer l'étanchéité la plus totale du système afin d'assurer une protection du poumon contre les sécrétions oropharyngées accumulées en amont (pression souhaitée élevée) et limiter les lésions trachéales causées par la compression permanente de la muqueuse par ce ballonnet (pression souhaitée basse). À l'issue d'un nombre important de travaux sur ce sujet, un compromis entre ces objectifs opposés de pressions est néanmoins recommandé : entre 25 et 30 cm d'eau.

Le ballonnet délimite par ailleurs anatomiquement un espace amont (l'espace sus-glottique et sous-glottique au-dessus du ballonnet) rapidement comblé par les sécrétions oropharyngées et un espace aval (l'espace trachéal, sous le ballonnet), que l'on souhaite préserver de toute intrusion septique. L'espace sous-glottique présente un volume évalué à $3,6 \pm 2$ mL [Mahul-1992] et le débit de sécrétion collectée lors de la mise en place de sondes d'intubation dotées d'un canal permettant une aspiration de cette zone se situe en moyenne autour de 30 mL / 24 h [Muscedere-2011] ; mais peut atteindre pour certains patients plus de 100 mL / 24 h [Mahul-1992].

C – *Les limites de l'étanchéité du ballonnet : le concept de micro-inhalation*

Même si conçu afin d'assurer une étanchéité parfaite, de nombreuses études ont souligné son caractère imparfait, avec comme conséquence directe la possibilité pour les sécrétions oropharyngées de passer outre ce ballonnet et gagner ainsi le poumon. Deux facteurs sont identifiés comme contribuant à ce défaut d'étanchéité :

- Des régimes de pressions variables. Même si périodiquement contrôlée, la pression de gonflage du ballonnet peut varier grandement au cours du temps. Cette variation est principalement induite par les changements de position des patients (transports, toilettes, changement des draps, ...) tel que la mise en position latérale, les mouvements de la tête et du cou [Lizy-2014, Minonishi-

2013]. Des déplacements de la sonde (certes de faible amplitude) sont également fréquemment rapportés par ces études. Dans ces situations, la pression du ballonnet peut atteindre des valeurs inférieures à 20 cm d'eau, valeurs démontrées comme augmentant le risque de PAVM [*Rello-1996*].

- La formation de plis de la membrane du ballonnet sur la muqueuse. Contrairement à l'expansion d'un ballon de baudruche qui se fait sans apparition de pli, le déploiement total du ballonnet lors de son gonflage dans la trachée peut s'accompagner de la formation de plis au niveau de la membrane. Ces plis forment alors des zones de contact non parfaitement accolées à la surface trachéale, voire parfois de véritables canaux créant ainsi une communication entre la zone située en aval et en amont du ballonnet [*Asai-2001*, *Seegobin-1986*, *Young-1997*, *Zolfaghari-2011*]. On comprend par ailleurs que la variabilité du diamètre trachéal d'un patient à l'autre n'arrange rien en termes d'adéquation sonde-trachée.

Ainsi, l'ensemble de ces facteurs concoure à la survenue d'épisodes non souhaités de micro-inhalations des sécrétions oropharyngées stagnant en amont de ce ballonnet [*Blot-2014*].

Section 2 – La pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM)

I – Définitions

Une pneumonie est définie comme une infection du parenchyme pulmonaire, impliquant des territoires alvéolaires et/ou interstitiels. Les pneumonies font partie des infections respiratoires « basses » (avec les bronchites, sans néanmoins partager la même gravité), classiquement opposées aux infections respiratoires « hautes » (dominées par les rhinopharyngites, sinusites et angines).

Une PAVM correspond à « toute pneumonie survenant chez un malade dont la respiration est assistée par une machine soit de manière invasive par l'intermédiaire d'un tube endotrachéal ou d'une trachéotomie soit de manière non invasive par l'intermédiaire d'un masque facial ou d'un autre procédé, dans les 48 heures précédant la survenue de l'infection » [CTINILS-Mai 2007]. Il s'agit donc d'une infection nosocomiale (acquise en milieu de soins).

On notera que même si cette définition française consensuelle laisse une place aux PAVM développées chez des patients recevant une ventilation non invasive (VNI), il s'agit d'une entité beaucoup plus rare qui est généralement éliminée des articles et analyses se rapportant au sujet : seuls sont considérés les patients recevant une ventilation invasive à l'aide d'une sonde endotrachéale dans l'immense majorité des publications. Pour justifier ce point, on notera que la VNI n'est pas prodiguée aux mêmes types de patients que la ventilation invasive et ne requiert pas notamment d'anesthésie générale pour sa mise en œuvre. De même, l'absence de sonde endotrachéale dans le cas de la VNI laisse envisager des mécanismes physiopathologiques potentiellement différents dans la genèse des PAVM au cours de ces deux modalités de ventilation. Enfin, l'incidence des PAVM est drastiquement réduite sous VNI [Carron-2013, Girou-2000], contribuant à restreindre en pratique (du moins dans le langage courant, dans la littérature et dans ce manuscrit) le champ de la PAVM à celui de la pneumonie acquise sous ventilation invasive (il s'agit d'ailleurs de la définition américaine telle que proposée par le *Center for Disease Control*).

II – Physiopathologie de la PAVM

Ayant défini précédemment l'ensemble des modifications anatomiques et biologiques survenant chez les patients de réanimation, on comprend dès lors le caractère multifactoriel des mécanismes aboutissant à la survenue d'une PAVM. Des interactions complexes sont en jeu, impliquant la sonde d'intubation, les facteurs de risque propres aux patients mais également la virulence du pathogène en cause et la réponse immunitaire de l'hôte.

On peut très schématiquement proposer le déroulement cinétique suivant dans la genèse de la PAVM : rapidement après la mise sous ventilation mécanique (24 à 48 heures), le patient présente une colonisation de son oropharynx par des bactéries virulentes non habituellement présentes (aérobies Gram négatif principalement, [Rocha-2013, Zolfaghari-2011]). À la faveur de micro-inhalations répétées, ces sécrétions contaminées pénètrent dans la portion basse de la trachée et la colonisent [Cardenosa Cendrero-1999, Drakulovic-2001, Ewig-1999, George-1998]. Une certaine partie de cet inoculum peut également atteindre le poumon profond et dans un certain nombre de cas, dépasser les capacités des défenses locales (dont certaines sont altérées) et aboutir au développement d'un processus infectieux alvéolaire. L'évolution de ce processus – en l'absence d'antibiothérapie – sera dépendante de la réponse inflammatoire de l'hôte, de la virulence du germe en cause et de sa quantité.

Ainsi, contrairement à ce que l'on croyait à l'époque des balbutiements de la ventilation mécanique, la source de contamination bactérienne aboutissant à la genèse des PAVM est primitivement et essentiellement endogène. Ce propos doit cependant être nuancé dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, dont l'origine parfois environnementale (point d'eau, éviers, ...) est actuellement bien établie à l'aide d'analyses génotypiques des souches responsable de colonisations trachéales et de PAVM [Berthelot-2001, Trautmann-2005].

III – Les données épidémiologiques

A – Les données nationales

1. Le réseau de surveillance REA-Raisin

La base de données la plus fiable sur le plan national est la base de données tenue par l'Institut de Veille Sanitaire et plus particulièrement le réseau REA-Raisin (Réanimation Adulte – Réseau d'alerte, d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales). Les derniers résultats disponibles sont ceux de l'année 2013, publiés en janvier 2015 [*Réa-RAISIN-2015*]. La participation au dispositif REA-Raisin est proposée sur la base du volontariat à tous les services de réanimation, sur l'ensemble du territoire français, aussi bien aux établissements publics que privés (les unités de surveillance continue et de soins intensifs cardiologiques sont exclues de cette approche). S'il choisit d'y adhérer, chaque service déclare alors de façon autonome, standardisée et consécutive, pendant une durée minimale de 6 mois, les données cliniques et microbiologiques relatives à certaines complications infectieuses phares survenant chez tout patient admis en réanimation.

Seules les infections nosocomiales survenant plus de deux jours après l'entrée du patient dans le service de réanimation sont prises en compte. Sont ainsi ciblés les pneumonies, les colonisations de cathéters veineux centraux (CVC), les infections ou bactériémies associées aux CVC ainsi que les bactériémies isolées (non liées aux CVC). La participation des services de réanimation présents sur le territoire est loin d'être totale puisqu'elle est évaluée à 47,2 % pour l'année 2013 (taux de participation déterminé sur la base du nombre de lits de réanimation déclaré aux autorités sanitaires), avec cependant une représentation homogène de chaque région.

Néanmoins, avec 186 établissements participants (213 services, 2 579 lits), 34 278 patients ont été inclus dans l'analyse pour 2013, autorisant un état de lieux susceptible de représenter assez fidèlement la situation française en termes d'infections nosocomiales en réanimation.

2. Les résultats pour l'année 2013

Les patients admis en réanimation présentaient un âge moyen 63,9 ans (*sex ratio* de 1,65), provenaient pour 52 % d'entre eux de leur domicile (et pour 37,7 % d'un service de court séjour) et séjournèrent en moyenne 11,7 jours en réanimation. Une fois admis, 67,2 % des patients nécessitaient une prise en charge par ventilation mécanique pour une durée moyenne de 10,0 jours et étaient ainsi exposés au risque de PAVM. Il en résultait une incidence cumulée de 10,8 PAVM pour 100 patients exposés au risque, ou autrement exprimé une incidence de 13,0 PAVM pour 1000 jours d'exposition au risque. Les PAVM constituaient les infections nosocomiales les plus fréquentes (suivies par les bactériémies non liées aux CVC et les infections ou bactériémies liées aux CVC) et apparaissaient après un délai médian de 9 jours après l'intubation.

La durée de ventilation constituait le facteur de risque principal de PAVM avec un risque multiplié par plus de quinze dès lors que la ventilation était nécessaire plus de 5 jours (**Tableau 1**).

Durée de l'intubation	Odds ratio ²	IdC 95 % ³
1 à 2 jours	1	
3 à 4 jours	8,2	7,1 - 9,4
5 à 10 jours	17,0	14,8 - 19,4
11 à 39 jours	25,2	22,0 - 28,7
≥ 40 jours	20,0	16,6 - 24,0

Tableau 1. Evolution du risque de PAVM selon la durée d'intubation (d'après [Réa-RAISIN-2015]).

² *Odds ratio* (rapport des cotes) : il s'agit d'un rapport utilisé en statistiques épidémiologique pour évaluer le degré de dépendance d'un événement (ici la survenue d'une PAVM) vis-à-vis de deux populations différentes (ici celle exposée à la ventilation mécanique comparée à une population non exposée à la ventilation mécanique). Il s'agit d'une approche du risque relatif lorsque la fréquence de l'événement est faible. Une valeur supérieure à 1 témoigne d'une sur-représentation de l'événement dans la population étudiée (numérateur) par rapport à la population témoin (dénominateur).

³ Intervalle de confiance (à 95 % ici) : il s'agit d'un intervalle de valeurs qui a 95 % de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé (ici l'*odds ratio*).

B – *Les données internationales*

Les données disponibles dans la littérature souffrent intrinsèquement d'un certain degré d'inhomogénéité contrairement aux données issues du recueil national, rendant difficile la comparaison directe de l'une et l'autre. Les principales différences portent sur les méthodes diagnostiques, le caractère ancien de certaines études (avec des pratiques susceptibles d'avoir évolué en 20 ans) et la prise en charge thérapeutique (pour l'Europe, voir [Ricard-2012]).

Ces limites prises en compte, la PAVM constitue également la complication nosocomiale la plus fréquente chez les patients ventilés dans la plupart des séries américaines [Richards-1999] et européennes [Vincent-1995]. On estime sa survenue chez 9 à 27 % des patients ventilés avec une mortalité attribuable d'environ 13% [Melsen-2013].

IV – **Les données microbiologiques au cours des PAVM**

A – *La distinction entre PAVM précoces et PAVM tardives*

De longue date, une évidence est apparue aux cliniciens des services de réanimation : les PAVM survenant précocement dans les suites de la mise sous ventilation ne sont pas causées par les mêmes agents infectieux que les PAVM apparaissant chez des patients ventilés depuis plus longtemps. De même, l'influence d'une antibiothérapie préalable (prescrite pour une infection respiratoire ou autre) a été rapidement démontrée comme capable de faire émerger des germes plus résistants ne constituant pas habituellement la flore normale des voies aériennes supérieures (la flore oropharyngée normale étant intrinsèquement très sensible aux antibiotiques de 1^{re} ligne).

Une parfaite illustration de ce phénomène écologique est apportée par une ancienne étude toujours d'actualité, portant sur 135 épisodes consécutifs de PAVM survenus chez des patients sous ventilations mécanique [Trouillet-1998] : les auteurs montraient parfaitement l'influence des deux facteurs précédemment cités (la durée de ventilation et la présence d'une antibiothérapie dans les jours précédents le diagnostic de PAVM) sur le type de germe impliqué dans ces épisodes de PAVM. Ainsi, comme reporté dans le tableau ci-dessous (**Tableau 2**), l'effet de l'administration préalable d'une antibiothérapie était responsable d'une diminution

de la fraction des bactéries commensales des voies aériennes supérieures au profit d'une augmentation des bacilles Gram négatif et des souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline. De même, ces résultats illustrent clairement les modifications écologiques survenant spontanément en l'absence d'antibiothérapie dans les suites de la mise sous ventilation mécanique avec un remplacement progressif de la flore normale par une flore essentiellement composée de bacilles Gram négatif.

Durée de la ventilation mécanique (j) Antibiothérapie préalable	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
	<7 NON	<7 OUI	>7 NON	>7 OUI
Documentation microbiologique				
Bactéries multi-résistantes	0	30	12,5	58,6
<i>P. aeruginosa</i>	0	20	6,3	21,7
<i>A. baumannii</i>	0	5	3,1	13,2
<i>S. maltophilia</i>	0	0	0	3,9
SARM	0	5	3,1	19,7
Bactéries commensales de l'oro- et du nasopharynx	70,7	45	59,4	18,4
SASM	14,6	0	21,9	4,6
<i>S. pneumoniae</i>	7,3	0	0	0
Autres streptocoques	17,1	25	21,9	9,2
<i>Neisseria spp.</i>	12,2	10	12,5	2
<i>Haemophilus</i>	19,5	10	3,1	2,6
Autres bactéries	29,3	25	28,2	23
Entérobactéries	24,4	20	21,9	15,1
Autres	4,9	5	6,3	7,9

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, SASM : *S. aureus* sensible à la méthicilline.

Tableau 2. Répartitions (en %) des différents microorganismes responsables de PAVM dans une étude portant sur 135 épisodes consécutifs de PAVM. Classification selon la durée de ventilation mécanique et l'existence d'une antibiothérapie préalable. D'après [Trouillet-1998].

Ainsi est communément admise la dichotomisation entre PAVM précoce et PAVM tardive, principalement dans le but d'optimiser l'antibiothérapie initiale qui, rappelons-le, est empirique dans l'attente des résultats microbiologiques. Ainsi, les PAVM précoces survenant classiquement au cours des 5 à 7 premiers jours de ventilation mécanique sont essentiellement causées par des germes commensaux des voies aériennes supérieures (traitables par des antibiotiques de spectre étroit) et sont plus souvent fréquentes chez les patients ayant présentés des troubles de conscience initiaux ayant conduit à des inhalations. À l'opposé, les PAVM tardives présentes

après 5 à 7 jours de ventilations sont fréquemment causées par des germes multi-résistants, lesquels sont d'autant plus sélectionnés précocement que le patient a reçu préalablement une antibiothérapie [Chastre-2002].

Notons enfin, pour souligner l'importance de ce dernier point, que la proportion de patients déjà sous antibiothérapie lors de leur admission en réanimation est extrêmement élevée, atteignant 58,5 % en 2013 [Réa-RAISIN-2015].

B – Les germes impliqués dans les PAVM

Que ce soit au niveau national ou international, les statistiques descriptives sont globalement concordantes dès lors qu'elles portent sur des effectifs suffisants et qu'elles s'attachent aux grands groupes de pathogènes. Néanmoins, le type de micro-organismes varie énormément selon la population concernée, notamment selon la pathologie conduisant à l'admission en réanimation et la durée de la ventilation mécanique (cette durée ne conditionnant pas les mêmes risques écologiques comme illustré précédemment).

Au niveau international, on note une importante proportion de bacilles Gram négatif aérobies, occupant environ 60 % des isolats suivi par les cocci Gram positifs à hauteur de 30 % [Chastre-2002]. Dans une méta-analyse regroupant 1 689 épisodes de PAVM issus de 24 études [Chastre-2002], les auteurs retrouvaient les proportions suivantes concernant les 10 bactéries les plus fréquemment isolées (classées par ordre décroissant) : *Pseudomonas aeruginosa* (24,4 %), *Staphylococcus aureus* (20,4 %), *Haemophilus* (9,8 %), *Streptococcus* spp. (8,0 %), *Acinetobacter baumannii* (7,9 %), *Streptococcus pneumoniae* (4,1 %), *Escherichia coli* (3,4 %), *Proteus* spp. (3,1 %), *Enterobacter* spp. (2,7 %) et *Neisseria* spp. (2,6 %).

Au niveau national, les dernières données disponibles (année 2013, plus de 10 ans après l'étude présentée ci-dessus) font état d'une répartition proche sur les grandes catégories bactériennes (bacilles Gram négatif aérobie 67 %, cocci Gram positif 24 %). Les 10 bactéries les plus fréquemment isolées étaient les suivantes : *Pseudomonas aeruginosa* (19,9 %), *Staphylococcus aureus* (14,5 %), *Escherichia coli* (9,9 %), *Enterobacter* spp. (8,4 %), *Klebsiella Pneumoniae* (5,6 %),

Haemophilus (5 %), *Stenotrophomonas maltophilia* (4,1 %), *Proteus* spp. (2,6 %), *Streptococcus pneumoniae* (2,2 %), *Streptococcus* spp. (2,1 %).

Toujours au niveau national, l'évolution sur 9 ans (2005 à 2013) de la répartition des principaux microorganismes impliqués dans les PAVM est marquée par une relative stabilité, surtout sur les dernières années analysées (**Tableau 3**). Sur cette période, on note néanmoins une diminution progressive de la proportion de bacilles Gram négatif non entérobactérie (de 38,3 à 31,7 %) à la faveur d'une croissance continue de la fraction des entérobactéries (de 26,6 à 35,6 %). On note de façon stable la présence d'*E. coli* qui représente le troisième germe le plus fréquemment responsable de PAVM (10 %).

	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
CG+	26,1	31	26,6	27,4	26,2	25,1	24,5	22,9	23,9
<i>S. aureus</i>	18,4	21,9	18,3	18,6	17,6	15,9	15,6	14,7	14,5
<i>Enterococcus</i> spp.	1	0,7	0,5	1,2	1,2	1,6	1,6	1,8	2,3
<i>S. pneumoniae</i>	2,8	3	2,5	2	2,4	2,1	1,7	1,7	2,2
BG-, entérobactéries	26,6	29,4	33,3	32,6	32,1	32,4	34,3	35	35,6
<i>E. coli</i>	6,8	8,5	9,5	10	10	9,1	9	9,4	9,9
<i>K. pneumoniae</i>	2,2	3,4	3,8	3,5	3,9	5,6	5,3	5,2	5,6
<i>E. cloacae</i>	3,9	4,1	4,9	4,1	4,1	4,8	5,2	5	5,5
BG-, non entérobactérie	38,3	30,3	31,1	31,4	32,4	31,5	30,5	31,7	31,7
<i>P. aeruginosa</i>	28,4	18,1	19	19,9	21,2	20,5	19,3	20,5	19,9
<i>A. baumannii</i>	3,2	2,2	2,5	1,9	2,4	2,8	2,3	2,1	1,5
<i>Haemophilus</i>	3,7	6,6	5,5	5,1	4,9	3,8	4,1	4,4	5

Tableau 3. Evolution de la répartition (en %) des principaux microorganismes responsables de PAVM en France. CG+ : cocci Gram positif, BG- : bacilles Gram négatif. D'après [Réa-RAISIN-2015].

Section 3 – *Escherichia coli* : écologie et place dans les PAVM

I – Caractéristiques microbiologiques générales

A – *Caractéristiques physiques et biochimiques*

E. coli est un bacille Gram négatif non sporulant appartenant à la famille des entérobactéries (classe des gamma-protéobactéries), aéro-anaérobie facultatif, dont la longueur varie entre 0,5 à 3 µm selon les conditions de croissance. Les souches sont le plus souvent mobiles grâce à la présence d'un flagelle.

Différentes souches d'*E. coli* ont été montrées parfaitement tolérantes à une large amplitude de température (4 à 42 °C), de pH (souches entéro-hémorragiques O157:H7 acido-résistantes à pH 2,5 notamment) et d'osmolarité [van Elsas-2011].

Sur le niveau biochimique, il s'agit d'une bactérie peu exigeante sur le plan nutritif, principalement caractérisée par les traits suivants (sujet néanmoins à variation) : les souches d'*E. coli* ont la capacité de fermenter certains sucres (« lactose + »), possèdent une tryptophanase permettant la transformation du tryptophane en pyruvate et indole (« indole + »), sont capables de réduire les nitrates en nitrites (« nitrate réductase + »), ne possèdent pas de cytochrome-oxydase (« oxydase - »), sont incapables d'utiliser le citrate comme seule source de carbone en aérobiose (« citrate - ») et ne possèdent pas d'uréase permettant la dégradation d'urée en ammoniacale (« uréase - »).

Le temps de génération moyen d'*E. coli in vitro* en milieu liquide riche est relativement rapide, de 20 à 40 min à 37 °C selon les souches. Lorsqu'évalué *in vivo*, celui-ci est plus long et varie considérablement selon l'organe infecté et la température de l'hôte : il est par exemple chez la souris de 33 min dans la cavité péritonéale [Morris Hooke-1985], de 56 min dans le poumon [Morris Hooke-1985], de plus d'une heure dans le muscle [Polk-1971] et de 80 à 120 min dans les fèces [Rang-1999].

B – *Les principaux outils utilisés pour la classification des souches*

Du fait de la grande diversité phénotypique rencontrée chez *E. coli* (souches environnementales, souches hautement pathogènes, souches commensales du tube

digestif, ...), il est très vite apparu la nécessité de caractériser ce polymorphisme pour le classer et le distinguer, dans une optique initialement épidémiologique.

1. Le sérotypage

Il s'agit historiquement de la première méthode utilisée pour typer les souches, à partir des années 1940. L'utilisation de sérum obtenu par immunisation d'animaux a permis de définir 3 types d'antigènes : l'antigène somatique O définissant le séro groupe, l'antigène de surface K et l'antigène flagellaire H [Orskov-1992]. L'antigène O correspond à la partie externe du lipopolysaccharide bactérien (LPS), constitué de motifs oligosaccharidiques répétés. L'antigène K est de nature polysaccharidique et correspond aux formations exopolysaccharidiques présentes chez certaines souches (capsules ou autres). L'antigène H est de nature protéique et correspond à la flagelline, principal composant du flagelle. Ainsi, plus de 180 antigènes O, 80 antigènes K et 50 antigènes H ont été définis, à partir desquels les grands clones pathogènes ont pu être individualisés (O104:H4, O157:H7 par exemple). On parle de séro groupe lorsqu'on s'intéresse exclusivement à l'antigène O (O25 par exemple) et de séro type lorsque l'antigène H est également précisé (O25:H4 par exemple). La rapidité de la technique (agrégation sur lame) et son faible coût en font une technique de référence. Cependant, la nécessité de disposer d'un nombre important de sérum, le caractère parfois croisé des réactions et le masquage de l'antigène O par certains antigènes K rendent fastidieuse cette technique, qui s'est avec le temps avérée également moins discriminante que les techniques de biologie moléculaire. Le séro groupage est actuellement possible en utilisant une approche génétique, notamment basée sur les variations de séquences de l'opéron *rfb* contenant les gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS et donc responsable de la variabilité des motifs oligosaccharidiques de l'antigène O [Clermont-2007].

2. L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE, *Pulsed-field gel electrophoresis*)

Il s'agit d'une technique développée à partir des années 1985, s'avérant beaucoup plus discriminante que les techniques MLST et MLEE présentées plus loin et ayant fait ses preuves dans le cadre des enquêtes épidémiologiques (notamment lors

d'intoxications alimentaires). L'empreinte génétique de la souche est réalisée à partir de son ADN génomique : après digestion par une enzyme de restriction, l'échantillon est soumis à une migration induite par un champ électrique non linéaire discontinu qui permet la séparation des fragments d'ADN de grandes tailles. Le profil électrophorétique ainsi obtenu constitue l'empreinte génétique de chaque souche.

3. L'analyse des séquences répétées en tandem (MLVA, Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis)

Comme l'électrophorèse en champ pulsé, cette technique est essentiellement utilisée dans les enquêtes épidémiologiques et permet d'obtenir une empreinte génétique également hautement discriminante. Le principe est basé sur une amplification préalable des séquences variables répétées en tandem (*Variable number tandem repeat*, VNTR) par PCR multiplex à partir de l'ADN génomique de la souche. Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse capillaire, seule technique permettant de mettre en évidence des variations minimales de taille des amplicons. Cette taille est proportionnelle au nombre de répétitions (VNTR), autorisant ainsi la construction d'un profil spécifique à chaque souche.

4. L'étude de la variabilité protéique et génétique : MLEE et MLST

MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) : dans cette approche, peu utilisée de nos jours, les souches sont caractérisées par la mobilité électrophorétique différentielle de différentes enzymes cellulaires conservées au sein de l'espèce, permettant la genèse de profils alléliques.

MLST (*multilocus sequence typing*) : mis au point à la fin des années 1990, cet outil performant est toujours d'actualité pour l'étude des populations d'*E. coli*. La séquence nucléotidique de différents gènes de ménage⁴ (7 à 8) est déterminée pour chaque isolat, fournissant un profil allélique génique définissant le classique ST (*sequence type*) de la souche. Trois schémas de classification sont actuellement validés pour *E. coli* : celui développé par T. Whittam (Université du Michigan, États-Unis), celui développé par M. Achtman (Université de Warwick, Royaume Uni) et

⁴ Un gène de ménage (*house keeping gene*) est un gène ubiquitaire dans un type cellulaire donné, codant généralement pour une protéine assurant des fonctions non spécialisées.

celui développé par S. Brisse et É. Denamur (Institut Pasteur de Paris, France) [Clermont-2015].

5. Le phylogroupage par PCR multiplex

L'intérêt du phylogroupage est présenté plus loin. L'utilisation d'une technique de PCR multiplex permet, de façon rapide et simple, l'attribution d'un phylogroupe à une souche avec un excellent pouvoir discriminant, sans recourir à la lourdeur du MLST [Clermont-2013].

C – Environnement, niche écologique

Bien qu'également présent dans différents environnements (sols, eau), l'habit primaire d'*E. coli* est avant tout le tube digestif des vertébrés à sang chaud où il représente l'organisme commensal aérobic prédominant. Chez l'homme, l'essentiel de la biomasse est localisé dans le caecum et le colon avec une concentration de 10^7 à 10^9 cfu par gramme de selles. Cette colonisation digestive s'effectue dès les premiers jours suivant la naissance, *E. coli* faisant partie des premières espèces bactériennes colonisant le système digestif du nouveau-né [Avershina-2014, Penders-2006].

Une fois établi, *E. coli* est retrouvé notamment au niveau de la couche de mucus à la surface de l'épithélium digestif, occupant ainsi une niche écologique qui limite la colonisation par des organismes pathogènes [Hudault-2001, Rastegar Lari-1990, Schamberger-2004] tout en profitant d'un environnement approprié sur le plan nutritionnel [Chang-2004].

À côté de cette position commensale centrale et régulière, un nombre incalculable de souches d'*E. coli* est quotidiennement isolé dans les laboratoires de microbiologie du monde entier, en lien avec un éventail extrêmement large de pathologies humaines et animales (cf. ci-dessous).

D – La phylogénie et ses relations avec la pathogénie

Depuis son origine, l'évolution et l'expansion de l'espèce *E. coli* s'est essentiellement faite de façon clonale, autorisant une classification basée sur la phylogénie. L'intérêt d'une telle classification apparaît nettement puisque les niches écologiques occupées par *E. coli* et sa capacité à être pathogène varient avec son origine phylogénétique.

Ainsi, les outils précédemment cités ont permis de mettre en évidence 4 phylogroupes principaux (A, B1, B2 et D) et 3 mineurs (C, E, F). Les souches de phylogroupe B2 et D sont essentiellement isolées de sites extra-intestinaux (appareil urinaire, septicémie, méningite, poumons, ...) dans le cadre de pathologie non digestive [Picard-1999] et beaucoup plus rarement de l'environnement [Walk-2007]. Cette dichotomie n'exclue aucunement le portage asymptomatique digestif du groupe B2 (et D) puisque ce phylogroupe occupe 30 à 50% des souches d'*E. coli* isolées dans les selles de volontaires sains dans les pays industrialisés (alors que cette proportion est globalement 2 à 6 fois plus faible dans les populations pauvres habitant en zone tropicale) [Escobar-Paramo-2004], **Tableau 4**.

Population	n	Prévalence respective des 4 phylogroupes majeurs (%)			
		A	B1	D	B2
France					
Bretagne (fermiers)	25	32,0	28,0	24,0	16,0
Bretagne (étudiants)	21	14,3	23,8	28,6	33,3
Région Parisienne (France)	27	29,6	11,1	22,2	37,1
Bretagne (secteur tertiaire)	25	24,0	24,0	20,0	32,0
Tours	24	25,0	21,0	25,0	29,0
Autres pays					
Tokyo (Japon)	61	28,0	0,0	28,0	44,0
Michigan (États-Unis)	88	20,5	12,5	19,3	47,7
Bogota (Colombie)	28	57,1	3,6	14,3	25,0
Cotonou (Bénin)	46	50,0	32,6	0,0	17,4
Guyane (peuple amérindien)	93	63,4	20,4	12,9	3,2

n : nombre d'individu (1 échantillon par individu)

Tableau 4. Prévalence respective (en %) des 4 phylogroupes majeurs rencontrés chez *E. coli* au niveau des selles de volontaires sains issus de 10 populations différentes. D'après [Escobar-Paramo-2004].

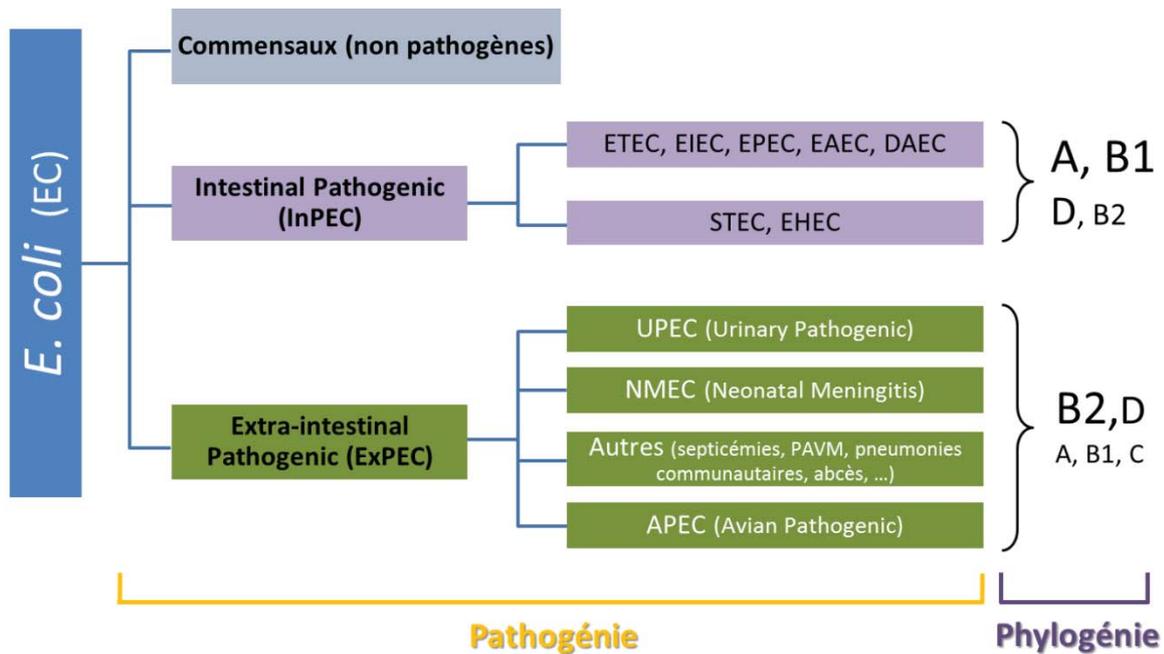


Figure 3. Représentation schématique des différents pathovars et le lien avec leur groupe phylogénétique. La proportion des phylogroupes est grossièrement approchée par la taille de la police. Les différents acronymes sont détaillés plus loin.

Lorsqu'ils sont impliqués dans un processus pathologique, les isolats des phylogroupes A et B1 sont essentiellement responsables d'infections intra-intestinales, aussi bien chez l'homme que chez l'animal [Clermont-2011].

Comme expliqué plus haut, un lien fort mais non absolu existe entre phylogénie et pathogénie. Il peut être schématisé **Figure 3** où sont représentés les principaux pathovars actuellement admis dans la littérature. Les ST majoritairement impliqués en pathologie humaine et animale sont essentiellement les ST10, ST69, ST73, ST95, ST131, ST117 et ST393 [Blanco-2011, Manges-2015, Riley-2014].

E – Caractéristiques génomiques, plasticité génétique

E. coli est une espèce caractérisée par sa très grande diversité, expliquant le polymorphisme des situations biologiques rencontrées (de la souche digestive commensale bienveillante à la souche extra-intestinale virulente en passant par la souche pathogène digestive), aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Cette diversité phénotypique est corrélée à une grande diversité génétique, appréhendée par

de nombreux auteurs. On peut schématiser les principales données comme suit [Touchon-2009] :

- il est observé une grande variation concernant la taille du génome entre les différentes souches (3,9 à 5,8 Mpb, base NCBI, 122 génomes d'*E. coli* complets analysés [NCBI-2015]) ;
- sur un nombre moyen de 4 700 gènes par souche, on estime la taille du génome commun (*core genome*, portion présente dans l'ensemble des souches) à 2 000 gènes et celle du pan-génome (l'ensemble des gènes connus à ce jour dans l'espèce) à 18 000 gènes ;
- le pan-génome peut être assimilé à un réservoir virtuel de gènes dans lequel les souches prélèvent (gain de gènes) ou déposent (perte de gènes) par transfert horizontal, au gré des interactions et des forces évolutives imposées par l'environnement ;
- la mobilisation génique, confinée à un nombre de régions limitées dans le chromosome (mais pouvant intéresser simultanément de grandes régions impliquant plusieurs dizaines de gènes constituant un îlot de pathogénicité ou un prophage par exemple), survient à haute fréquence chez *E. coli*. Les mécanismes de transfert horizontaux de gènes et les différents acteurs de ces échanges (plasmides, bactériophages, intégrons et plus rarement transposons) assurent le brassage de ces informations génétiques ;
- les mutations spontanées, également impliquées dans l'émergence de nouveaux traits phénotypiques, apparaissent comme étant des événements moins fréquents que la mobilisation génique.

Cette plasticité génomique explique sans aucun doute la place prépondérante d'*E. coli* en pathologie humaine et animale, sa propension hors norme à l'acquisition de résistance aux antibiotiques et l'émergence de nouveaux clones pathogènes, plus de 100 ans après sa découverte.

II – Les pathologies causées par *E. coli*

Au sein de son pan-génomique, *E. coli* possède un nombre incommensurable de facteurs de virulence dont la description dépasse le cadre de ce travail. On retiendra essentiellement les principaux éléments suivants comme autant d'armes permettant une meilleure intégration et résistance à l'hôte : des facteurs d'adhésion (adhésines fimbriaires et afimbriaires, intimine), des toxines cytolytiques (CNF1, hémolysine, shigatoxine, ...), des toxines modifiant les flux hydro-électrolytiques digestifs (entérotoxines ST et LT, ...), des systèmes de sidérophores (aérobactine, ...), des systèmes de masquage antigénique et de résistance au complément (capsule K1 par exemple), des facteurs de mobilité (flagelle). Par ailleurs, de façon singulière (et avec toutes les contraintes phénotypique que cela impose pour la bactérie) certaines souches sont parfaitement capables de multiplication intracellulaire, au sein des entérocytes ou même des macrophages (souches entéro-invasives des diarrhées invasives et souches adhérentes-invasives associées à la maladie de Crohn par exemple) [Kaper-2004].

A – Les pathologies intestinales chez l'homme

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, les diarrhées infantiles constituent la 2^e cause de mortalité des enfants de moins de 5 ans dans les pays en voie de développement. *E. coli* apparaît comme le pathogène le plus fréquemment en cause après les rotavirus, avec une mortalité touchant plusieurs millions d'enfants chaque année [WHO-2009]. Dans les pays industrialisés, ces pathologies digestives sont plus rares (et associées à une mortalité beaucoup plus faible) mais il est parfois constaté l'explosion de forme épidémique de colites hémorragiques liées à des pathovars particuliers transmis par l'alimentation (cf. ci-dessous). Six pathovars majeurs, dont la traduction clinique commune est le syndrome diarrhéique, sont ainsi identifiés et classés, essentiellement sur la base de leur pathogénie à l'échelle cellulaire [Kaper-2004]. Un 7^e pathovar, plus rare, est également décrit : il s'agit des souches adhérentes-invasives (AIEC), associées à la maladie de Crohn [Darfeuille-Michaud-2002, Negroni-2012]. Ces pathovars sont décrits ci-dessous (l'acronyme anglais est utilisé) :

- **Les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) :** cause majeure de déshydratation et de mortalité infantile dans les pays en voie de développement, ils agissent quasi exclusivement par un mécanisme toxigène (toxines ST et LT) entraînant une dérégulation des flux sodés trans-épithéliaux (de façon analogue à ce qui est observé avec la toxine cholérique). Les formes cliniques sont essentiellement dominées par des diarrhées aqueuses, sans syndrome dysentérique.
- **Les *E. coli* entéro-invasifs (EIEC) :** ils sont capables de procéder à une invasion muqueuse avec multiplication intracellulaire épithéliale. La lyse de l'épithélium et la réaction inflammatoire associée sont responsables d'un classique syndrome dysentérique.
- **Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) :** ils possèdent, de façon non exclusive, la capacité d'induire des lésions d'attachement-effacement à la surface des entérocytes et détruisent l'architecture micro-villositaire. Ce trait phénotypique, porté par un îlot de pathogénicité appelé LEE (*locus of enterocyte effacement*) peut être partagé par d'autres souches que les EPEC, ce qui aboutit parfois à leur regroupement sous l'acronyme AECC (*Attaching-Effacing E. coli*). Ceci ne doit pas être confondu avec le pathovar suivant (EAEC).
- **Les *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC) :** initialement regroupées au sein des EPEC, ces souches sont capables d'adhérer intensément à la surface de l'épithélium de l'intestin grêle et du colon (phénotype agrégatif-adhérent avec empilement en brique) aboutissant à la formation d'un véritable biofilm épais. Associées à la mise en jeu de toxines, ces souches sont impliquées dans la pathogenèse de diarrhées chroniques avec retard de croissance chez les enfants des pays en voie de développement [Okhuysen-2010].
- **Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) :** également initialement classées au sein des EPEC, ces souches sont maintenant bien individualisées. Elles sont capables d'imposer aux entérocytes des modifications anatomiques de leurs bordures en brosse avec formation de microvillosités allongées capables de se replier sur la bactérie, potentiellement dans une optique de protection [Croxen-2010].
- **Les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC)** appartenant au groupe des STEC (pour *ShigaToxin-producing E. coli*, ou historiquement VTEC pour *VeroToxin*-

producing E. coli) : ils sont responsables des colites hémorragiques dont les formes les plus graves peuvent aboutir aux tableaux de microangiopathies thrombotiques (syndrome hémolytique et urémique ou purpura thrombotique thrombocytopénique) associés à une lourde morbi-mortalité. Ces souches produisent des shigatoxines (Stx1 et/ou Stx2) qui traversent la barrière épithéliale, diffusent par voie hématogène et vont exercer une cytotoxicité marquée sur les cellules endothéliales, principalement digestives, rénales et cérébrales. L'habitat naturel de ces souches étant principalement le tube digestif des bovins, la contamination de l'homme s'effectue par l'alimentation avec ingestion de produits ayant été en contact direct (viande) ou indirect (graines de fenugrec germées par exemple) avec des matières fécales bovines. Ces souches donnent régulièrement naissance à des bouffées épidémiques (la dernière de taille datant de 2011 en Allemagne, secondaire au sérotype O104:H4). On notera enfin qu'*E. coli* entéro-hémorragique (EHEC) n'est pas synonyme d'*E. coli* producteur de shigatoxine (STEC) : les EHEC constituent un sous-groupe parmi les STEC (les EHEC sont les souches de STEC pathogènes pour l'homme, la production de shigatoxine étant essentielle mais non suffisante pour la virulence des EHEC) [Caprioli-2005].

- **Les *E. coli* adhérents-invasifs (AIEC)** : ces souches, épidémiologiquement associées à la maladie de Crohn, présentent également un phénotype invasif (comme les EIEC) avec la capacité de se multiplier à l'intérieur des entérocytes et des macrophages. Les mécanismes cellulaires à l'origine de l'internalisation de ces souches apparaissent différents des autres souches capables d'invasion (EIEC, *Shigella*, *Yersinia* ou *Listeria*) : pour les AIEC, ce processus est doublement dépendant des microtubules et des microfilaments d'actine alors qu'il n'est qu'actine-dépendant pour les autres souches invasives. Enfin, la pénétration intracellulaire s'effectue par un mécanisme proche de la macropinocytose. Capables de transcytose (entrée au pôle apical, sortie au pôle basal des entérocytes), ces souches peuvent envahir les tissus profonds et ainsi générer une importante activation inflammatoire chronique [Darfeuille-Michaud-2002].

B – Les pathologies extra-intestinales chez l'homme

Elles sont dominées par **les infections du système urinaire** chez la femme, séparées cliniquement (et également sur le plan pronostic) en infection urinaire basse touchant la vessie (cystite) et haute affectant le parenchyme rénal (pyélonéphrite). Chez l'homme, les infections urinaires sont dominées par les prostatites, à une fréquence incomparablement plus faible. La cystite constitue l'infection la plus fréquente en médecine ambulatoire avec une incidence chez la femme variant de 0,07 à 0,7 épisode par personne et par an selon l'âge. Le risque de pyélonéphrite est plus faible avec un ratio estimé à 1 cas de pyélonéphrite pour 28 cas de cystite. *E. coli* est le germe occupant de loin le devant de la scène, retrouvé dans 75 à 95% des cystites et pyélonéphrites communautaires non compliquées de la femme, dont l'origine est systématiquement digestive [Hooton-2012]. Les infections urinaires constituent donc l'expression dominante de la pathogénie d'*E. coli*. En termes de santé publique, le principal problème est l'extrême fréquence de cette pathologie dans la population générale, source d'exposition importante aux antibiotiques et donc facteur de progression de l'antibiorésistance.

Les **autres infections** causées par *E. coli* chez l'adulte sont essentiellement des pathologies impliquant des infections d'organes intra-abdominaux dont la colonisation s'est faite soit par voie hématogène (à partir du réservoir fécal à la faveur d'une altération locale de la barrière digestive), soit par contiguïté (communication canalaire existante). Il s'agit des péritonites (effraction physique franche de la barrière digestive), des sigmoïdites diverticulaires, des appendicites, des abcès (principalement hépatiques), des infections de la vésicule biliaire (cholécystites) ou des voies biliaires (angiocholites), des infections des collections nécrotiques accompagnant les pancréatites aiguës. Les pneumonies peuvent survenir plus rarement et font le plus généralement suite à une inhalation à la faveur d'un trouble de conscience chez des patients avec comorbidités (alcoolisme, dénutrition, mauvais état bucco-dentaire).

Plus rares en termes de fréquence, comparées aux infections urinaires, mais source d'une morbi-mortalité beaucoup plus lourde, **les infections néonatales** sont indissociables d'*E. coli*. C'est la deuxième bactérie responsable de sepsis néonatal dans les 72 premières heures de vie [Kuhn-2010], la 1^{re} bactérie responsable de méningite néonatale et la 1^{re} bactérie chez le nouveau-né prématuré de faible poids

[Stoll-2011]. Dans les infections néonatales tardives (entre 72 heures et 90 jours de vie), *E. coli* occupe encore la première place, principalement par le biais des infections urinaires [Didier-2012].

Concernant son rôle dans les **infections nosocomiales** chez l'adulte, nous avons déjà vu la place d'*E. coli* dans les PAVM (3^e agent le plus fréquemment rencontré en France) où son implication détaillée est également discutée plus bas. En réanimation, *E. coli* est aussi l'une des bactéries la plus fréquemment isolée au cours des bactériémies (toutes causes confondues). Ainsi, en 2013 [Réa-RAISIN-2015], les quatre agents infectieux les plus souvent isolés lors des bactériémies (au moins une hémoculture positive) étaient répartis comme suit : *S. aureus* (11,1 %), *E. coli* (10,4 %), *S. epidermidis* (9,6 %), *P. aeruginosa* (9,5 %). Cette répartition est stable lorsqu'on étudie les 5 années précédentes. Abstraction faite de *S. epidermidis* dont l'isolement dans une hémoculture (en dehors de situations particulières telles qu'immunodépression, infection de cathéter, ...) s'avère être la plupart du temps le fruit d'une contamination du prélèvement par la flore cutanée du patient, on retrouve les trois germes pathogènes déjà majoritaires dans les PAVM. Les causes de ces bactériémies sont multiples (infections liées aux cathéters, PAVM, complications du site opératoire, infections urinaires, foyers infectieux intra-abdominal, ...). Toujours dans le cadre nosocomial mais en dehors de la réanimation, *E. coli* est principalement retrouvé comme agent étiologique des infections sur dispositif d'accès intravasculaire (cathéters, chambre d'accès intravasculaire implantable), des complications du site opératoire, des infections urinaire sur sonde, etc.

Enfin, on soulignera un point marquant : sur l'ensemble des hémocultures analysées dans les laboratoires de microbiologie, *E. coli* est systématiquement le germe le plus fréquemment isolé, quel que soit le pays investigué, le plaçant comme l'**agent causal « numéro 1 » des bactériémies dans le monde**. Si l'on s'intéresse à l'origine des patients ayant présenté ces hémocultures positives à *E. coli*, il s'agit dans 53 à 68 % des cas de patients venant de leur domicile (infections communautaires) [Laupland-2013]. Ces bactériémies sont en lien avec l'ensemble des pathologies présentées plus haut et sont le témoin des formes graves septicémiques de ces maladies.

C – Les pathologies chez l'animal

Les ETEC constituent la cause la plus importante de diarrhées et septicémies chez les jeunes veaux et porcelets. Parmi les pathologies extra-digestives chez les mammifères, on note également les mammites chez les vaches allaitantes.

Enfin, une entité intéressante pour son éventuel parallélisme physiopathologique chez l'homme est constituée par la colibacillose aviaire, principale cause de pertes économiques dans le secteur avicole. Les souches impliquées dans cette pathologie (APEC, *Avian Pathogenic E. coli*) appartiennent à des sérogroupes bien particuliers (O78, O1, O2 principalement). Les manifestations cliniques sont très polymorphes allant de la mortalité embryonnaire *in ovo* après la ponte à la forme pulmonaire éventuellement septicémique qui représente l'expression principale de la colibacillose aviaire. Dans cette forme pulmonaire, affectant poulets, canards, faisans et dindes, la porte d'entrée principale du pathogène est respiratoire (de façon atypique pour *E. coli*) par inhalation de particules contaminées par des souches APEC excrétées du tractus digestif d'animaux sains (qui constituent le réservoir principal des APEC). La plupart des études s'accordent à souligner la nécessité d'un facteur fragilisant les défenses locales ou générales pour que les souches APEC puissent initier leur pathogénie respiratoire. Sont retenues principalement les infections à mycoplasmes (*Mycoplasma gallisepticum*), les viroses à tropisme respiratoire, une immunodépression (maladie de Gumboro) et la présence d'une atmosphère susceptible de provoquer une agression épithéliale (concentration élevée en poussières ou en ammoniacque générée par la décomposition microbienne de l'acide urique de la litière). Après une phase de multiplication au niveau du tractus respiratoire, les bactéries colonisent le poumon profond (pneumonie), peuvent envahir par contiguïté les organes voisins (foie, cœur) et provoquer des bactériémies avec métastases septiques. La mortalité est très importante, pouvant atteindre 30 à 50 % [Stordeur-2002].

III – La résistance aux antibiotiques chez *E. coli*

E. coli, de par sa prévalence élevée en pathologie humaine et ses capacités adaptatives, est la bactérie qui soulève le plus d'inquiétude quant à la problématique de l'antibiorésistance à travers le monde : celle-ci est fréquente et multiple. Plusieurs

facteurs sont à l'origine de ce triste constat : une exposition de l'ensemble du microbiote « *E. coli* » lors de la consommation d'antibiotique chez l'homme, l'existence d'un portage sain chez les animaux de rente très fortement exposés aux antibiotiques, la transmission interhumaine, homme-animal et animal-environnement des souches, favorisée par leur relative résistance dans l'environnement [Aarestrup-2008, Berendonk-2015, van Cleef-2011, Vincent-2010].

A – Les principales résistances

Les principaux phénotypes de résistance posant problème sont dominés par la résistance aux β -lactamines, aux quinolones et aux aminosides. Ces trois classes constituent des molécules utilisées en 1^{re} intention compte-tenu de leurs caractéristiques pharmacodynamiques et pharmacocinétiques. Notamment, les β -lactamines et les aminosides sont utilisés en bithérapie dans les infections sévères car ils possèdent un bon profil de diffusion, de bactéricidie et de tolérance avec une action synergique.

1. La résistance aux β -lactamines : le problème des β -lactamases à spectre élargi (β LSE)

Les données épidémiologiques relatives à ce phénotype sont abordées plus loin (page 57). La résistance aux β -lactamines est de loin médiée par l'expression bactérienne d'une famille d'enzymes regroupées sous le terme β -lactamase dont les membres présentent différents spectres, propres à chaque classe de bêta-lactamines (pénicillinase, céphalosporinase, beta-lactamase à spectre élargie, carbapénèmases). Les β LSE constituent la principale menace chez *E. coli* comme chez les autres entérobactéries [Pitout-2008] car elles confèrent aux souches la capacité d'hydrolyser les pénicillines, les céphalosporines (1^{re}, 2^e, 3^e et 4^e génération), l'aztréonam mais pas les céphamycines et les carbapénèmes (**Tableau 5**).

Face à une souche exprimant une β LSE, l'alternative la mieux validée en cas d'infection sévère est le recours à l'utilisation des carbapénèmes [Paterson-2005], dernières β -lactamines disponibles (imipénème principalement).

Familles et sous-familles	Particularité	Molécules principales (date d'invention)	Hydrolyse par les β LSE
Pénicillines			
G	Forme injectable	benzylpénicilline (1944)	OUI
V	Forme orale	phénoxy-pénicilline (1958)	OUI
M	Spectre antisphaphylococcique	Méticilline* (1959) Oxacilline (1963)	OUI
A	Spectre élargi aux bacilles Gram négatif	Ampicilline (1965) Amoxicilline (1972)	OUI
Uréidopénicillines	Activité anti- <i>Pseudomonas</i>	Pipéracilline (1980)	OUI
Carboxypénicillines	Activité anti- <i>Pseudomonas</i>	Ticarilline (1981)	OUI
Céphalosporines			
1 ^{re} génération	Relative résistance aux pénicillinases, actives sur les CGP	Céfalotine (1968)	OUI
2 ^e génération	Relative résistance aux céphalosporinases	Céfamandole (1979)	OUI
3 ^e génération			OUI
	Sans activité anti- <i>Pseudomonas</i>	Cefotaxime (1980)	
	Avec activité anti- <i>Pseudomonas</i>	Ceftazidime (1986)	
4 ^e génération	Résistance supérieure aux céphalosporinases, actives sur CGP et BGN	Céfépime (1993)	OUI
Monobactams	Actif uniquement sur les BGN, y compris <i>P. aeruginosa</i>	Aztréonam (1988)	OUI
Carbapénèmes	Grande stabilité vis-à-vis des diverses β -lactamases	Imipénème (1988)	NON
Céphamycines	Apparenté aux céphalosporines de 2 ^e génération	Céfoxitine (1978)	NON

Légende : BGN : bacilles Gram négatif, CGP : cocci Gram positif, * : non utilisée en thérapeutique

Tableau 5. Les β -lactamines en thérapeutique humaine. Résistance vis-à-vis des β -lactamases à spectre élargi (β LSE).

Les céphamycines (la cefoxitine constituant la seule molécule utilisable en thérapeutique), bien qu'efficaces *in vitro*, ne sont pas validées ni recommandées dans la prise en charge des infections à β LSE (absence d'AMM⁵ dans cette indication, efficacité inférieure à celle de l'imipénème [Paterson-2005]).

⁵ AMM : autorisation de mise sur le marché. Il s'agit de l'autorisation légale permettant la commercialisation d'un médicament, dans laquelle est par ailleurs précisée la pathologie ciblée par le médicament (le type d'infection dans le cas d'un antibiotique).

Enfin, la co-résistance (multi-résistance) fréquente des souches β LSE à d'autres classes d'antibiotique pose le problème de l'alternative thérapeutique, principalement dans les infections graves [Pitout-2008]. En France, en 2011 [ONERBA-2012], 73,5 % des souches d'*E. coli* β LSE étaient également résistantes aux quinolones classiques (65 % pour la ciprofloxacine) et 19 à 31 % des souches résistantes aux aminosides (amikacine et gentamicine respectivement).

Les multi-résistances peuvent aboutir à des situations d'impasse thérapeutique dans lesquelles les antibiotiques de choix sont inutilisables, amenant à considérer par défaut l'utilisation de molécules moins efficaces ou non suffisamment évaluées dans une telle indication.

2. La résistance aux fluoroquinolones et aux aminosides

La résistance aux fluoroquinolones est plus fréquente que la résistance aux céphalosporines de 3^e génération, atteignant en France 17 % en moyenne sur les années 2012 et 2013 alors qu'elle n'était que de 8,2 % en 2002 [EuroCDC-2013]. Comme nous l'avons vu plus haut, cette résistance est 4 fois plus fréquente lorsqu'on se focalise sur les souches β LSE.

Moins fréquente que la résistance aux fluoroquinolones, la résistance aux aminosides atteignait 8 % en moyenne en 2012 et 2013 (4,2 % en 2002).

3. La résistance aux carbapénèmes (souches sécrétrices de carbapénémase)

Heureusement encore peu développé, ce phénotype de résistance est une grande source d'inquiétude dans les milieux de soins et pour les autorités sanitaires. En première approximation, on peut dire que l'ensemble des β -lactamines n'est alors plus utilisable, privant les patients d'une classe thérapeutique robuste et éprouvée. Le problème de co-résistance est bien évidemment également présent avec ces souches. Affectant l'ensemble des entérobactéries, la résistance aux carbapénèmes est encore rare chez *E. coli*, estimée inférieure à 0,1 % des souches, mais croissante [BMR-RAISIN-2014].

B – *Epidémiologie des souches d'entérobactéries et d'E. coli βLSE*

En France, les principales données épidémiologiques sont issues de différents réseaux de surveillance (CLIN : Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales, ONERBA : Observatoire Nationale de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques).

Sur le plan international, les tendances évolutives sont identiques, à savoir une augmentation croissante des infections causées par des souches d'*E. coli* résistantes ou multi-résistantes. Il existe en revanche une grande hétérogénéité quant à la prévalence de ces souches d'un pays à l'autre, variations principalement expliquées par les politiques de santé (notamment en matière d'antibiothérapie), les flux migratoires et le niveau de richesse.

Seules les données françaises seront abordées ici, dont les chiffres clés sont résumés ci-dessous :

- En 2012, les entérobactéries βLSE étaient principalement isolées (sur 10 778 isolats) des urines (69,5 %), des hémocultures (7,7 %), de prélèvements respiratoires (7,3 %) et de prélèvements profonds non respiratoires (5,3 %) [ONERBA-2012]. En 2013, en réanimation, 19,8 % des entérobactéries isolées exprimaient une βLSE [Réa-RAISIN-2015].
- Aux seins des entérobactéries, une importante évolution a été observée au cours des 10 dernières années avec une proportion croissante du poids d'*E. coli* passant de 18,5 % en 2002 à 59,2 % en 2012 (multiplication par un facteur 3), ceci dans l'ensemble des inter-régions françaises (**Figure 4**).
- Cette variation en proportion est également vérifiée en valeur absolue (nombre de souches isolées, **Figure 6**).
- Sur les souches d'*E. coli* isolées au cours de bactériémies, la proportion de souches d'*E. coli* productrices de βLSE n'a cessé d'augmenter, passant de 0,3 % en 2001 à 7,7 % en 2011. Le phénotype βLSE chez *E. coli* est cependant moins fréquent comparé à ce qui est observé avec *K. pneumoniae* et *E. cloacae* (respectivement 30,7 et 23,1 % en 2011), deux

entérobactéries majeures plus souvent résistantes mais moins fréquemment rencontrées [ONERBA-2012].

- Ainsi, la densité d'incidence⁶ pour 1000 jours d'hospitalisation est passée de 0,02 en 2002 à 0,31 en 2012 (soit une multiplication par un facteur 15, **Figure 5**, [BMR-RAISIN-2014]).

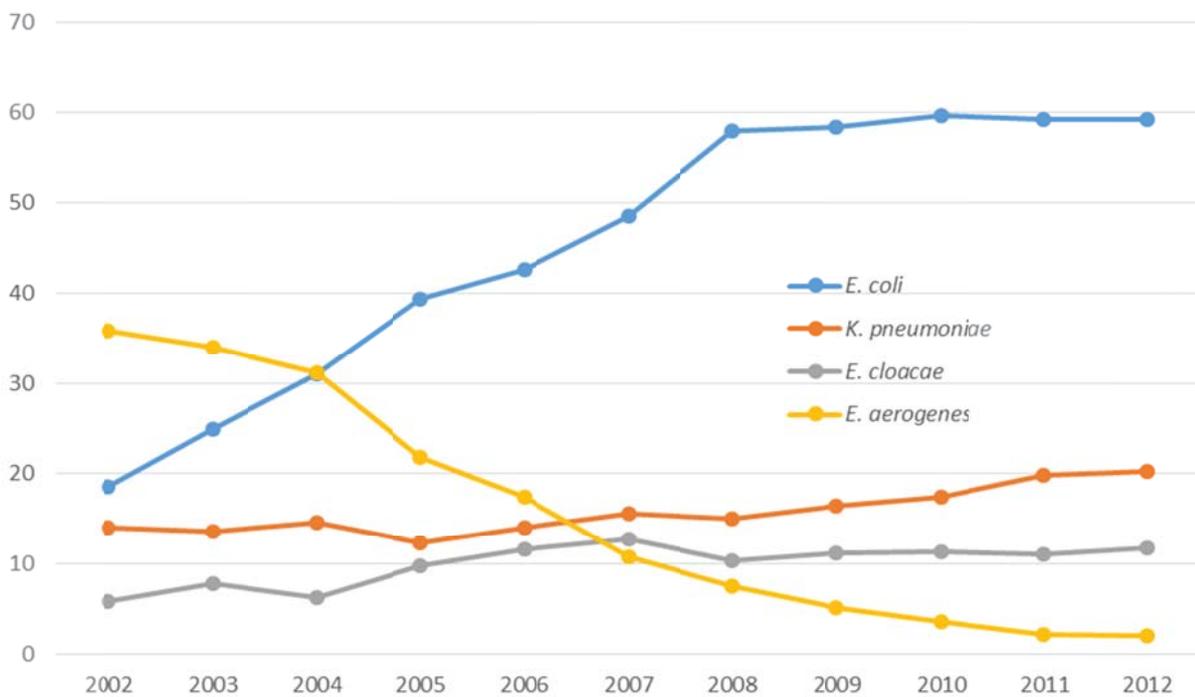


Figure 4. Evolution de la répartition (en %) des souches d'entérobactéries βLSE selon les 4 principales espèces d'entérobactéries (d'après [BMR-RAISIN-2014]).

⁶ La densité d'incidence est un indicateur épidémiologique permettant d'évaluer l'exposition au risque rapporté à une durée. C'est le rapport entre le nombre de nouveaux cas survenus dans une population et le nombre moyen de personnes exposées au risque, multiplié par la durée de cette période.

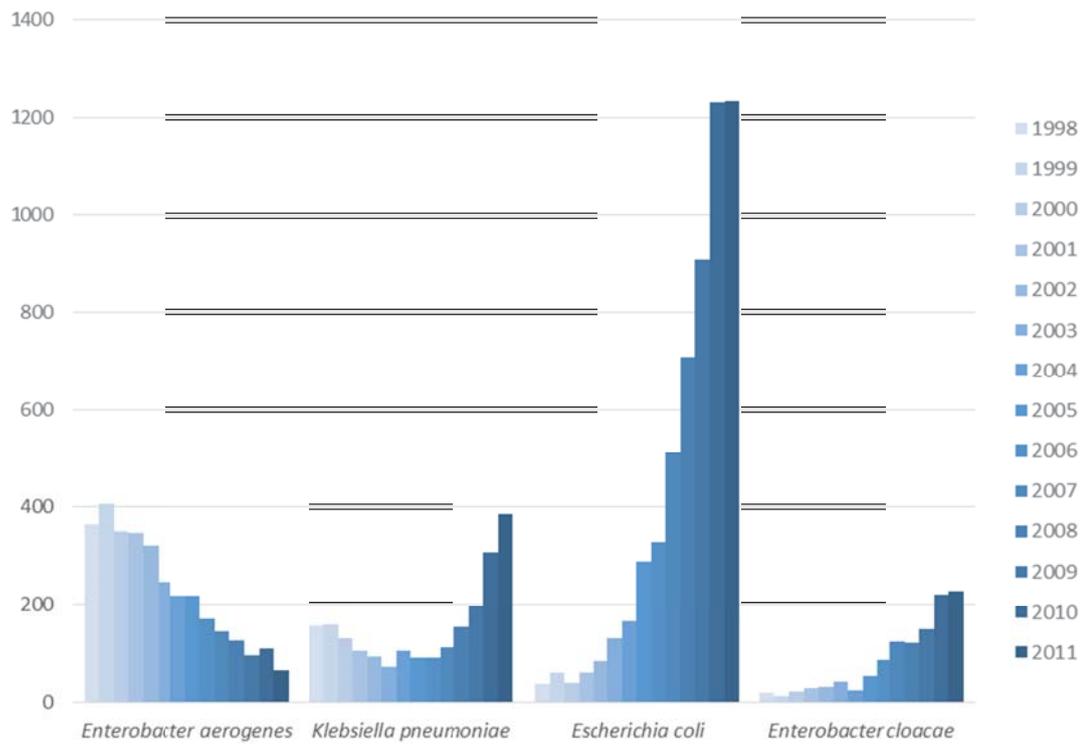


Figure 6. Entérobactéries productrices de β LSE. Évolution du nombre de souches par espèce au cours du temps (C-CLIN Paris Nord, recueil sur 3 mois par an, d'après [ONERBA-2012]).

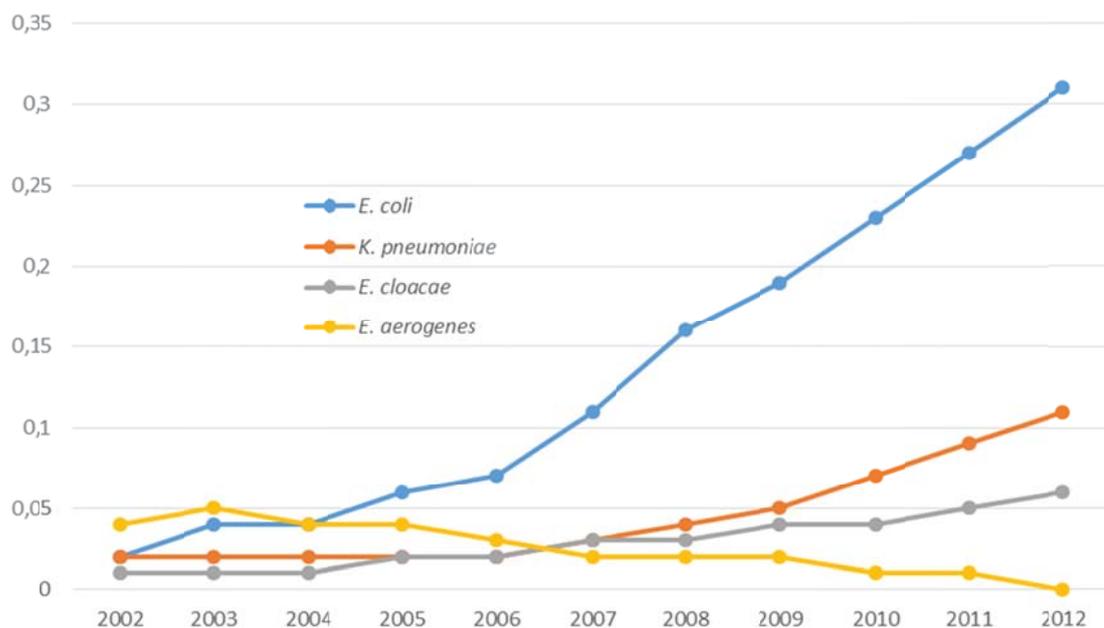


Figure 5. Densité d'incidence (pour 1000 jours d'hospitalisation) d'isolement de souches β LSE, au sein des 4 principales entérobactéries (d'après [BMR-RAISIN-2014]).

C – Une conséquence de l'antibiorésistance : une mortalité accrue

L'initiation d'une antibiothérapie est dans la quasi-totalité des cas empirique : les résultats définitifs (identification du pathogène, antibiogramme) ne sont en effet en général disponibles que 24 à 48 heures après l'isolement du germe. Et ceci uniquement lorsque le germe en cause a pu être isolé (situation variable selon la pathologie en cause).

La base de la décision thérapeutique en matière d'antibiothérapie repose sur 2 principes : 1) choisir les molécules efficaces sur le ou les agents infectieux présumés responsables de l'infection (données épidémiologiques statistiques) ; 2) choisir parmi ces molécules celle(s) ayant le spectre le plus étroit vis-à-vis du ou des agents infectieux présumés afin de limiter les conséquences écologiques et l'apparition de résistances.

Dès lors que s'installe le problème de l'antibiorésistance et *a fortiori* le problème de la multi-résistance, la sécurité du patient prévaut sur les considérations écologiques, amenant à utiliser des antibiotiques de spectre de plus en plus large en 1^{re} intention. Par ailleurs, lorsqu'il s'agit d'infections menaçant le pronostic vital où tout retard thérapeutique est préjudiciable (bactériémies, choc septique, PAVM, ...), une bithérapie est le plus souvent recommandée pour augmenter la vitesse de bactéricidie et diminuer la probabilité d'échec thérapeutique (la probabilité d'avoir au moins une molécule active sur un germe multi-résistant est plus importante en bithérapie qu'en monothérapie).

Trois conséquences découlent des points abordés ci-dessus : 1) pour minimiser le risque de traitement inefficace, le clinicien est tenté de prescrire l'antibiothérapie la plus large possible, recourant alors aux molécules les plus précieuses (recours aux carbapénèmes notamment) ; 2) le clinicien, soucieux de l'impact écologique d'une telle antibiothérapie sur le microbiote intestinal, susceptible de faire émerger une résistance à ces molécules de dernier recours, va tenter d'en restreindre l'utilisation ; 3) de ce compromis « efficacité/écologie » apparaissent inmanquablement des situations où le traitement optimal (concernant son efficacité) n'est pas administré, aboutissant à un retard thérapeutique. L'antibiothérapie efficace n'est alors mise en place que secondairement, devant une évolution clinique non favorable faisant

suspecter une antibiothérapie inefficace, ou une fois les données de l'antibiogramme disponibles.

Ainsi, les infections causées par les germes multi-résistants apparaissent comme associées à une morbi-mortalité supérieure comparée aux germes « sensibles », non du fait d'une virulence majorée mais essentiellement par le retard thérapeutique qu'elles occasionnent [Combes-2006, Schwaber-2007]. Dans une méta-analyse récente, la mortalité était nettement majorée en cas de bactériémies causées par des entérobactéries sécrétrices de β LSE, avec un *odds ratio* non ajusté de 2,35 (IdC⁷ 95 % : 1,90-2,91) passant à 1,52 (IdC 95 % : 1,15-2,01) après ajustement sur différents facteurs confondants [Rottier-2012]. Le retard à l'initiation d'une antibiothérapie efficace apparaissait comme la principale cause de sur-risque de mortalité.

IV – Un complexe clonal particulier : le ST131-O25b

Parmi l'importante diversité des souches d'*E. coli*, le complexe clonal O25b-ST131 est particulièrement inquiétant. Le *sequence type* 131 est en effet membre de la liste des complexes clonaux les plus fréquemment impliqués en pathologie humaine [Blanco-2011, Manges-2015, Riley-2014]. Ce ST131 exprime dans l'immense majorité des cas (> 95 %) un sérotype O25b:H4 et plus exceptionnellement O16:H5.

Depuis sa première description en 2008 dans un nombre limité de pays (et rétrospectivement sa présence depuis 2003), ce clone est maintenant présent dans le monde entier, témoignant ainsi d'une capacité de diffusion chez l'homme jamais observée à cette échelle [Nicolas-Chanoine-2014, Nicolas-Chanoine-2008, Rogers-2011].

Ces souches O25b-ST131, véritables agents pathogènes [Russo-2000], appartiennent au groupe phylogénétique B2 où la plupart des ExPEC (Extraintestinal-Pathogenic *E. coli*) sont classés [Picard-1999]. Elles expriment un nombre important de facteurs de virulence [Mora-2014] dont la pathogénicité a été vérifiée *in vivo* chez la souris [Johnson-2012]. Impliqués aussi bien dans des infections communautaires que nosocomiales, les isolats O25b-ST131 sont responsables d'un large éventail de

⁷ IdC : intervalle de confiance (à 95 % ici). Il s'agit d'un intervalle de valeurs qui a 95 % de chance de contenir la vraie valeur du paramètre estimé.

pathologies, allant de la simple cystite à la méningite mortelle [Nicolas-Chanoine-2014].

Enfin, ce complexe clonal est d'autant plus préoccupant qu'il est associé à un haut niveau de résistance aux β -lactamines (principalement par production de β -lactamase à spectre élargi de type CTX-M-15) et aux fluoroquinolones [Coque-2008, Nicolas-Chanoine-2008]. Ainsi, le complexe clonal ST131 représente approximativement 70 à 80 % des isolats résistants aux fluoroquinolones et presque deux tiers des isolats sécrétant une β LSE [Banerjee-2014]. De façon plus alarmante, une étude récente s'intéressant à la résistance aux antibiotiques chez *E. coli*, a souligné une forte implication du complexe clonal ST131 au sein de souches résistantes collectées dans le monde entier : ainsi, 35 % des souches d'*E. coli* productrices de carbapénèmase appartenaient au ST131 [Peirano-2014].

V – *E. coli* au cours des PAVM

Comme nous l'avons détaillé plus haut, *E. coli* représente la 1^{re} entérobactérie causale dans les PAVM et le 3^e germe isolé en fréquence. Même si très peu de travaux se sont intéressés à ces souches, notamment sur le plan moléculaire, les données disponibles sont concordantes avec la phylogénie observée dans les autres types d'infection.

Ainsi, Messika *et al.* [Messika-2012] ont étudié une collection de souches isolées du rectum, de l'oropharynx et du poumon de 25 patients sous ventilation mécanique présentant tous des prélèvements positifs à *E. coli* sur ces 3 sites. Les auteurs retrouvaient une participation prépondérante du phylogroupe B2, présent respectivement dans 49 %, 51 % et 66 % des isolats rectaux, oropharyngés et pulmonaires. Ils ont également confirmé que ces souches comportaient un nombre plus important de facteur de virulence que les souches n'appartenant pas au groupe B2. De même, le phylogroupe B2 semblait plus fréquent dans les prélèvements pulmonaires des patients développant une PAVM (76 %) que chez ceux présentant une simple colonisation (50 %, $p = 0,10$).

La Combe *et al.* [La Combe-2014], dans le cadre de l'étude multicentrique ColoColi (en cours), ont confirmé ces tendances sur 84 isolats respiratoires provenant de 80 patients sous ventilation mécanique : le phylogroupe B2 était majoritaire, que ce soit

chez les patients colonisés (56 %) ou ceux développant une PAVM (58 %), avec également un profil de virulence supérieur aux autres phylogroupes. La prévalence des isolats sécréteurs de β LSE atteignait néanmoins 13 %, tous phylogroupes confondus.

Chapitre 2 – Les bactériophages : des agents thérapeutiques d'un nouveau genre

Section 1 – Historique

Comme dans beaucoup de cas dans l'histoire des sciences, la découverte des virus « mangeurs de bactéries » s'est déroulée en plusieurs phases. On estime aujourd'hui que H. Hankin (1865-1939), bactériologiste britannique, est le premier auteur à avoir mis en évidence l'existence d'un agent bactéricide présent dans l'eau. Travaillant sur le bacille cholérique, au sein d'un laboratoire gouvernemental en Inde, il décrit dans une publication princeps en 1896 [*Hankin-1896*] la destruction rapide du bacille lorsqu'une culture de celui-ci est mise en contact avec de l'eau du Gange et de la Jumna. Il démontre que cet agent est détruit par l'autoclavage et possède une très petite taille, car capable de traverser un filtre Chamberland⁸. Il montre également que l'eau récupérée des puits ne possède pas cette capacité. Même si à l'époque Hankin est incapable d'appréhender ce phénomène avec plus de précision, il démontre l'existence d'un agent antibactérien très efficace, présent naturellement dans des eaux qui contiennent elles-mêmes la bactérie à lyser.

Parallèlement, les premiers balbutiements de la virologie se font ailleurs : dès 1881, Pasteur montre que l'agent infectieux de la rage est invisible au microscope, qu'il passe librement à travers un filtre Chamberland et est transmissible. En 1892, Ivanovski découvre le virus de la mosaïque du tabac : la sève d'un plant malade, filtrée à travers un filtre Chamberland, contient un agent invisible capable de causer la maladie lorsque mis en contact avec un plant sain.

Ces découvertes parallèles et globales sont importantes sur un plan général : elles démontrent l'existence de nouveaux agents infectieux (s'attaquant à des cellules humaines dans le cas de la rage, à des plantes dans le cas du virus de la mosaïque du tabac ou à des bactéries dans le cadre des bactériophages), transmissibles et ultra-filtrables.

⁸ Le filtre Chamberland ou « Filtre Chamberland – Système Pasteur », inventé par Charles Chamberland en 1884, est un filtre de porcelaine poreuse, retenant les bactéries et permettant d'obtenir une eau a-bactérienne. C'est également un nouvel instrument de recherche qui permettra la découverte des toxines diphtériques et tétaniques, passant à travers ce filtre alors que les bactéries responsables de leur sécrétion y sont retenues.

Si nous revenons aux bactériophages, Frederick Twort (1877-1950) est le second bactériologiste à aborder plus directement ces agents antibactériens : il confirme leur caractère ultra-filtrable et inactivable par la chaleur. Il montre également que ces particules ne se développent plus après avoir fait disparaître la bactérie [Twort-1915]. Deux ans plus tard, en 1917, c'est le chercheur franco-canadien Félix d'Hérelle (Paris, 1873 - Paris, 1949), alors qu'il travaille à l'Institut Pasteur, qui pose certains fondamentaux virologiques [d'Herelle-1917] : il décrit l'isolement et la spécificité de ces virus ainsi que les plages de lyses formées sur un tapis bactérien. Il proposera l'appellation « bactériophage » et sera le premier à les utiliser dans une optique thérapeutique, notamment dans les dysenteries bacillaires provoquées par *Shigella*, donnant ainsi naissance à la phagothérapie.

Suites à ces découvertes, les bactériophages vont prendre un essor important, que ce soit en thérapeutique (production de lots thérapeutiques, distribution pharmaceutique, cf. **Figure 7**) ou en recherche fondamentale dans le domaine de la biologie moléculaire où ils permettront des découvertes capitales (l'ADN comme support de l'hérédité, le séquençage par la méthode de Sanger, l'ARN comme intermédiaire entre ADN et protéine, les enzymes de restriction, ...).

En thérapeutique, les bactériophages ne feront malheureusement pas, en France comme ailleurs, l'objet d'une évaluation rigoureuse telle que requise par les standards actuels (notamment avec des essais thérapeutiques randomisés, contre placebo). Les succès thérapeutiques des bactériophages au début du XX^e siècle auront un impact limité en termes de santé publique car associés à des productions peu ou pas encadrées sur le plan quantitatif et qualitatif, ainsi qu'une utilisation parfois large et non ciblée. À partir de 1942 et à la sortie de la 2^{nde} guerre mondiale, l'arrivée sur le marché du miracle « pénicilline » et ses succès mettent la phagothérapie en arrière-plan dans les pays riches alliés. Dans le contexte géopolitique particulier de l'après-guerre, les pays situés à l'est du rideau de fer seront les seuls à continuer le développement de l'utilisation des bactériophages à usage thérapeutique grâce notamment à l'existence de centres de recherche et de thérapeutique dédiés tel que l'Institut Eliava en Géorgie (créé en 1923) ou l'Institut Hirsfeld d'immunologie et de thérapie expérimentale à Wroclaw en Pologne (créé en 1952).

Ce n'est que récemment, poussée par une certaine nécessité, que l'utilisation thérapeutique de ces virus fait son retour dans les pays occidentaux. À la lumière des

connaissances accumulées depuis un siècle sur ces êtres longtemps impalpables et à l'aune d'une approche médicale et scientifique rigoureuse, nous réévaluons actuellement ces virus... en espérant bien y trouver des compagnons d'armes efficaces pour nous aider à combattre un ennemi commun : les bactéries, notamment celles résistantes aux antibiotiques.



Figure 7. Exemple de préparation fabriquée par le Laboratoire du Bactériophage, « sous le contrôle scientifique du Professeur d'Hérelle ». Cet exemplaire semble destiné à la réalisation d'essais thérapeutiques, dans le cadre d'une collaboration franco-russe ou franco-géorgienne, probablement initiée par Felix d'Hérelle (années 1940-50 ?). La préparation « Bacté-Intesti-Phage » comporte, comme indiqué, un « mélange de races sélectionnées de Bactériophages pour le traitement des troubles intestinaux d'origine bactérienne ».

Section 2 – Généralités

Les bactériophages sont des virus infectant spécifiquement les bactéries et ne possèdent pas la capacité d'infecter les cellules eucaryotes.

I – Les cycles infectieux

Les bactériophages sont capables de présenter différents types de cycles infectieux, dépendant des informations codées dans leur génome et de l'état métabolique des cellules parasitées. On distingue quatre types de cycle infectieux. Deux occupent majoritairement le devant de la scène : le cycle lytique et le cycle lysogénique. Les deux autres sont beaucoup plus rares en termes de fréquence et également beaucoup moins étudiés : il s'agit du cycle pseudolysogénique et de l'infection chronique [Weinbauer-2004]. La première phase, commune à l'ensemble de ces cycles, comprend l'adsorption du bactériophage à la surface de la cellule hôte via un ou plusieurs récepteurs spécifiques puis le transfert de l'acide nucléique viral (ADN ou ARN) dans le cytoplasme. Les différents cycles sont schématisés sur la **Figure 8**.

La lysogénie et la pseudolysogénie peuvent être vues comme des stratégies développées par les virus pour leur permettre une transmission verticale : si les cellules hôtes sont trop rares ou si les conditions environnementales limitent la survie des particules virales, alors la quiescence au sein de l'hôte est une stratégie de préservation.

A – *Le cycle lytique*

Il s'agit du cycle le plus simple et le plus intéressant sur le plan thérapeutique, réalisé par les bactériophages ainsi qualifiés de lytiques ou virulents (les bactériophages T4 et T7 par exemple). Dès l'introduction du génome viral, les premiers gènes précoces sont transcrits puis traduits par la machinerie cellulaire de l'hôte, aboutissant à la synthèse de protéines virales dont la tâche est essentiellement de détourner le métabolisme cellulaire au profit de la synthèse protéique et génomique virale.

Ainsi sont synthétisées dans le cas du bactériophage T7, une protéine virale inhibant les enzymes de restriction bactérienne, une ARN polymérase virale, des inhibiteurs de la transcription de l'hôte, des nucléases qui vont fragmenter le génome de l'hôte augmentant le *pool* de nucléotides disponibles, une ADN polymérase virale, etc.

Les protéines structurales virales et le génome viral sont ensuite produits en grande quantité, puis respectivement assemblés et encapsidés, aboutissant à la formation de virions matures. La dernière étape consiste à provoquer une lyse active de la bactérie, essentiellement par déstructuration de son architecture membranaire, aboutissant à la libération des virions.

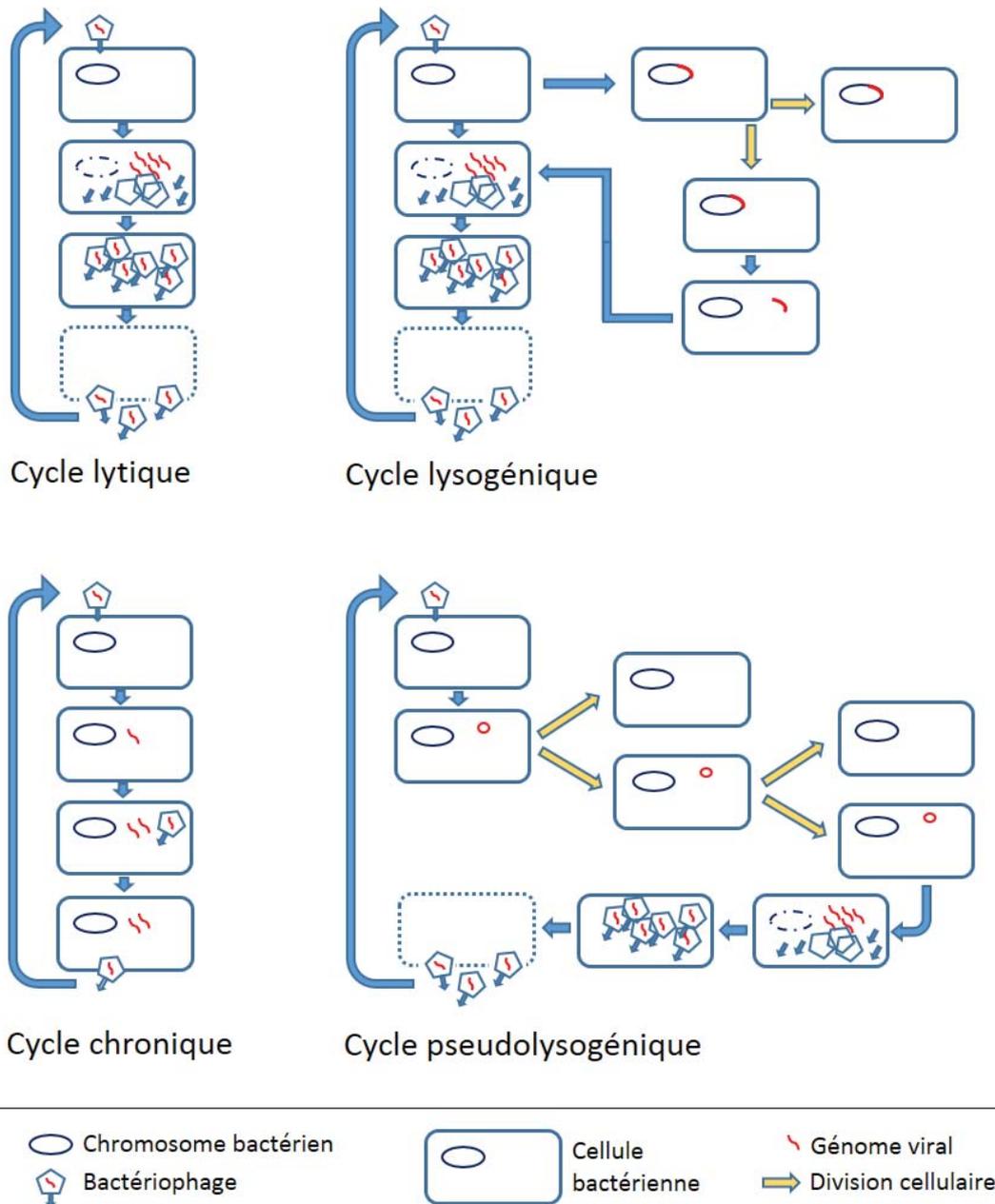


Figure 8. Schéma des différents cycles infectieux des bactériophages. Une description détaillée de chacun de ces cycles est donnée dans le texte.

B – *Le cycle lysogénique*

Il s'agit d'un cycle plus complexe, propre aux bactériophages qualifiés de tempérés (le bactériophage lambda par exemple). Après pénétration du génome viral dans le cytoplasme, deux voies distinctes sont possibles : la poursuite du cycle vers la voie lytique décrite plus haut ou bien la poursuite du cycle vers une phase de latence aboutissant à l'intégration du génome viral au sein du chromosome bactérien.

Le choix entre ces deux voies est dépendant du ratio de différentes protéines régulatrices virales clés, fonction de l'état physiologique de la cellule (stade du cycle cellulaire, réserve énergétique disponible). Une fois la phase de latence engagée, le génome viral (prophage) est répliqué à chaque division cellulaire car partie intégrante du chromosome bactérien et ainsi transmis à la descendance (on qualifie alors la bactérie de lysogène). Une transcription virale latente à bas bruit de certains régulateurs fondamentaux est généralement présente, à même de percevoir des modifications physiologiques importantes chez l'hôte. En cas de stress physiologique, le prophage est alors capable de s'exciser du chromosome bactérien (induction) et de débiter un cycle infectieux lytique classique aboutissant à la lyse de la cellule hôte. Cette induction peut être provoquée *in vitro* par différents agents stressants, les plus connus étant l'irradiation UV et la mitomycine.

Les bactériophages tempérés représenteraient environ 1 % de la population des virus des océans et leur induction spontanée serait relativement faible, évaluée entre 10^{-2} et 10^{-5} bactériophages par bactérie par génération [Chibani-Chennoufi-2004]. Du côté bactérien, on considère ainsi que 40 % des bactéries marines sont lysogènes [Fuhrman-1999]. Cela n'est pas limité aux bactéries marines, puisque la plupart des souches d'*E. coli* séquencées portent des prophages ou des restes de prophages dans leur génome. Chez certaines souches on trouve jusqu'à 18 génomes de bactériophages représentant en volume près de 10 % du génome bactérien [Ohnishi-2001]. Enfin, le maintien des génomes de bactériophages dans les populations bactériennes ne peut généralement se faire qu'en conférant en contrepartie un avantage aux souches assurant « l'hébergement » de ces prophages.

C – *Le cycle pseudolysogénique*

La pseudolysogénie peut être interprétée comme un état de non-choix entre un cycle lytique et un cycle lysogénique [Los-2012]. Après l'injection du matériel génétique dans la cellule hôte, celui-ci reste quiescent, sous forme extra-chromosomique, tel un plasmide, sans intégration dans le génome de la cellule hôte. La transmission de ce matériel génétique viral à la descendance est asymétrique car il n'y a pas de réplication : seule une des cellules filles en hérite. Exceptionnellement, dans le cas du phage P1, des mécanismes particuliers aboutissent à la copie du génome viral et à sa distribution équitable lors de la division cellulaire.

La pseudolysogénie est généralement observée lors de conditions de croissance non favorables pour la bactérie (et donc également pour la réplication virale). Secondairement, le virus peut adopter l'une des deux voies classiques décrites précédemment (cycle lytique ou lysogénique). Les bases moléculaires assurant le contrôle de ces voies sont actuellement inconnues.

D – *Le cycle infectieux chronique*

Employé par certains bactériophages, dont le célèbre bactériophage filamenteux M13 très utilisé dans les techniques de *Phage display* (cf. page 110), le cycle infectieux abouti à la production chronique de particules virales, à faible débit, qui sont excrétées par bourgeonnement ou extrusion. Point particulier, les virus nouvellement synthétisés sont sécrétés de la cellule hôte sans que celle-ci ne soit lysée. Les cellules infectées continuent à se diviser, transmettant le virus à la descendance et sont peu altérées par ce parasitisme chronique [Wilson-1998].

II – **Transduction généralisée et spécialisée**

Les bactériophages, comme les autres virus, peuvent assurer un transfert génétique entre bactéries : il s'agit de la transduction [Harley-2010]. Celle-ci peut être généralisée ou spécialisée. Elle permet l'acquisition de nouveaux gènes pour la bactérie receveuse, participant au brassage génétique interindividuel. En matière de phagothérapie, la transduction généralisée est un événement non souhaité car potentiellement source de transfert de toxines ou gènes de résistance aux

antibiotiques par exemple (la transduction spécialisée, générée par les bactériophages tempérés – non utilisés en phagothérapie – est écartée de ce champ).

A – *Transduction généralisée*

La transduction généralisée est une erreur d'encapsidation : ce n'est pas l'acide nucléique viral qui est encapsidé mais un fragment d'ADN bactérien (ADN génomique ou plasmidique). La particule virale est alors capable de délivrer ce fragment à une autre bactérie, mais sans entraîner de cycle infectieux réel puisque le matériel génétique viral n'est pas présent (particule virale défective). Une fois délivré dans la cellule, une deuxième étape doit être franchie pour qu'il y ait transmission verticale : l'ADN étranger doit s'intégrer au chromosome bactérien, par recombinaison homologue. Le fragment peut cependant rester libre et être exprimé sans recombinaison homologue mais sera alors progressivement perdu au fur et à mesure des divisions cellulaires. Même si parfaitement réalisable *in vitro*, plusieurs limites sont présentes dès que l'on place la transduction généralisée dans un système complexe, comme c'est le cas en phagothérapie *in vivo* :

- la transduction ne peut aboutir que s'il existe un hôte secondaire capable d'être « infecté » par la particule virale défective (*i.e.* un hôte sensible au bactériophage) ;
- cet hôte secondaire ne doit pas être lysé par les particules virales fonctionnelles (lesquelles sont largement majoritaires par rapport aux particules virales défectives) ;
- le fragment d'ADN étranger doit comporter des régions d'homologie avec l'ADN génomique de l'hôte secondaire pour qu'une recombinaison homologue puisse s'effectuer avec succès.

On conçoit donc que seule la succession d'événements individuellement rares permet d'aboutir au final à une transmission effective d'un ou plusieurs gènes. La probabilité qu'un tel phénomène aboutisse de façon complète apparaît donc extrêmement faible.

B – Transduction spécialisée (ou localisée)

Par son mécanisme, elle ne concerne que les bactériophages dotés d'un cycle lysogénique. Lorsque le génome du prophage (inséré à un site spécifique) s'extrait du chromosome bactérien (excision), des erreurs peuvent survenir à faible fréquence (typiquement 10^{-6} avec le bactériophage λ) aboutissant ainsi à l'excision d'une molécule d'ADN "hybride" constituée d'un fragment d'ADN phagique et d'un fragment d'ADN bactérien. Ce fragment d'ADN bactérien est alors adjacent à la zone d'intégration du prophage d'où l'appellation de transduction spécialisée (ou localisée). La particule virale contenant ce matériel hybride est fonctionnelle sur le plan de l'adsorption et de l'injection du matériel génétique mais rarement en mesure d'aboutir à la formation de virus autonomes qui sont souvent privés de l'intégralité de leur génome. Néanmoins, le fragment peut s'insérer dans le génome bactérien via les mécanismes habituels.

III – La classification des bactériophages

Différentes classifications ont successivement été opérationnelles, depuis les premières observations microscopiques dans les années 1940 jusqu'à nos jours. Aucune de ces classifications, basées sur la morphologie, le type d'acide nucléique supportant le génome (ADN simple ou double brin, ARN) ou la présence d'une enveloppe par exemple, ne permet de classer dans des catégories homogènes l'ensemble des virus de procaryotes tant leur diversité est grande. La classification actuelle, telle que définie par l'ICTV (*International Comittee on Taxonomy of Viruses*) est basée pour les bactériophages et les virus d'archées sur une approche morphologique (**Figure 9**).

Ainsi, l'immense majorité (96 %) des bactériophages appartient à l'ordre des *Caudovirales* (virus avec une queue) et sont des virus à ADN double brins, non enveloppés [Ackermann-2009]. D'une taille variable (25 à 800 nm, axe tête-queue), leur organisation générale comporte :

- une tête (capside) de symétrie icosaédrique, générée par l'assemblage répété de sous-unités (les capsomères, composées elles-mêmes des protéines majeures et mineures de capsides) ;

- un génome (ADN double brin), de taille variable (17 Kb à 498 Kb), protégé par la capside ;
- une zone d'interface entre capside et queue, permettant la liaison de ces deux éléments ;
- une queue de longueur variable (réduite à sa plus simple expression chez les *Podoviridae*), créée par la répétition de protéines organisées de façon tubulaire, au centre de laquelle transite l'acide nucléique lors de son éjection dans le cytoplasme de l'hôte ;
- des fibres de queue et une plateforme basale (*baseplate*) permettant l'interaction du virus avec les récepteurs spécifiques de l'hôte et assurant les changements conformationnels nécessaires à l'introduction du génome viral dans la cellule hôte.

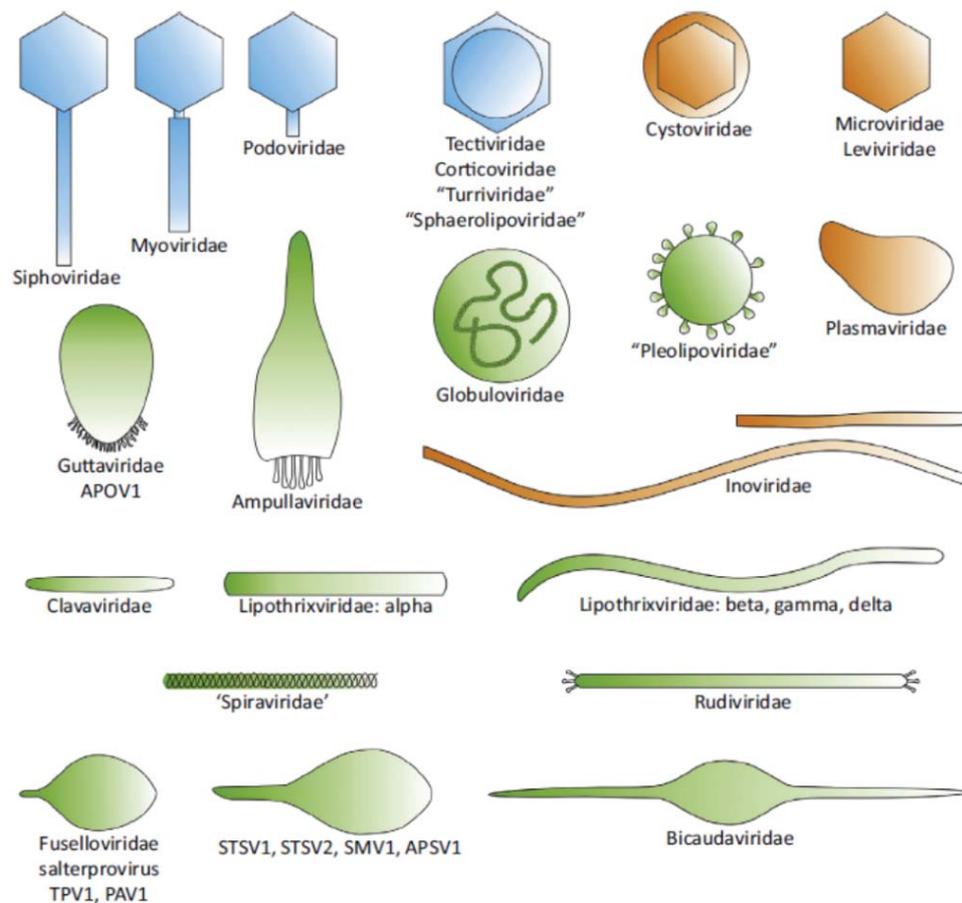


Figure 9. Morphotype des virus infectant les bactéries seulement (colorés en bleu), les bactéries et les archées (marron) ou les archées seules (vert). Ces dessins n'ont pas été réalisés à l'échelle. D'après [Pietila-2014].

L'ordre des *Caudovirales* regroupe trois familles (**Figure 10**) : les *Podoviridae* (queue courte), les *Myoviridae* (queue contractile) et les *Siphoviridae* (queue longue et flexible).

Les bactériophages n'intégrant pas l'ordre des *Caudovirales* sont certes minoritaires sur le plan écologique mais illustrent bien la grande variété virale existante (par exemple M13, phiX174, P1, ...).

A – *Les Podoviridae*

Ils sont les moins représentés au sein des *Caudovirales* (10 %) avec 50 espèces référencées (ICTV, juillet 2014). Il s'agit de petits virus, dont la queue est réduite à un empilement de quelques protéines différentes plutôt qu'une réelle polymérisation. La taille du génome est typiquement de 40 à 50 Kb. Le bactériophage T7 est le virus modèle de cette famille.

B – *Les Myoviridae*

Ils représentent environ 25 % des *Caudovirales* [Ackermann-2009] et sont définis par la présence d'une queue non flexible et contractile. La contraction de cette queue génère un raccourcissement nécessaire à la phase d'éjection du génome virale dans l'hôte. Le virus modèle de cette famille est le bactériophage T4 (sous famille des *Tevenvirinae*, genre *T4likevirus*), sans aucun doute le bactériophage le plus étudié. Quarante-treize espèces sont recensées par l'ICTV (juillet 2014).

C – *Les Siphoviridae*

Leur queue est non contractile, souple (apparaissant souvent courbée en microscopie électronique) et en général plus longue que celle des *Myoviridae*. Il s'agit de la famille la plus représentée au sein des *Caudovirales* (65 %), comportant 313 espèces recensées par l'ICTV (juillet 2014). C'est également dans cette famille que l'on retrouve le plus de bactériophages tempérés. Le virus modèle dans cette famille est le bactériophage lambda (λ).

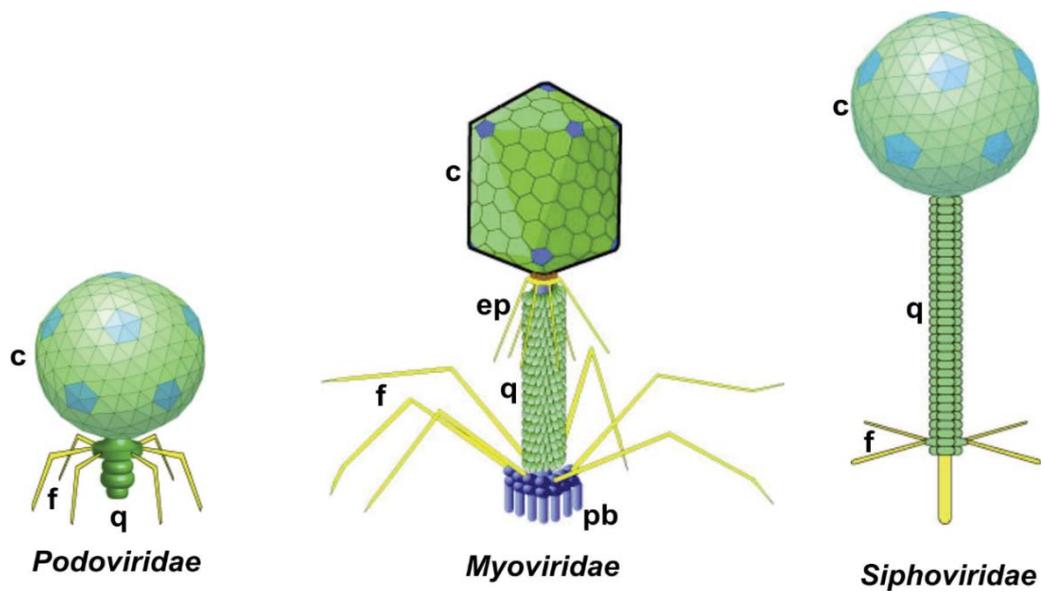


Figure 10. Représentation schématique des 3 familles des bactériophages composant l'ordre des *Caudovirales*. Légende : c=capside, f=fibres de queue, q=queue, pb=plateforme basale, ep=fibres secondaires. D'après [Hulo-2011].

D – Les autres virus n'appartenant pas à l'ordre des *Caudovirales*

Une très grande diversité est présente dans ce groupe minoritaire, tant au niveau des morphologies virales que de la complexité de leurs cycles infectieux ou encore du type d'acide nucléique support de l'information génétique. Cette catégorie contient un certain nombre de bactériophages ayant permis des avancées majeures en sciences. On citera quelques exemples célèbres :

- Le bactériophage phiX174 : il s'agit d'un virus très simple, appartenant à l'ordre de *Microviridae*, composé d'une capsid sans queue. Il présente un génome formé d'ADN simple brin, de 5,3 Kb, comportant 11 gènes. Il s'agit, grâce à son ADN simple brin, du 1^{er} virus à avoir été séquencé par F. Sanger à l'aide de sa technique révolutionnaire en 1977 [Sanger-1977].
- Le bactériophage MS2, membre des *Leviviridae* est également un virus sans queue, de morphologie icosaédrique, comportant un génome à ARN

simple brin positif. Il a la particularité d'infecter uniquement les souches d'entérobactéries (dont *E. coli*) exprimant le pilus conjugatif F, qui sert de récepteur au virus [van Duin-2006].

- Le bactériophage M13 : il s'agit d'un long bactériophage tubulaire filamenteux (diamètre 7 nm, longueur 700 à 2000 nm), appartenant à l'ordre des *Inoviridae* et composé d'ADN simple brin. Il s'adsorbe également à la cellule hôte (*E. coli*) via les pili de type F et a la particularité de réaliser un cycle infectieux chronique (cf. page 70), dans lequel l'hôte infecté va sécréter indéfiniment du virus à bas bruit, sans être lysé [Rakonjac-2011].

IV – Génétique des bactériophages

En accord avec leur diversité vertigineuse, l'ensemble des analyses génomiques comparatives sont concordantes : lorsqu'un bactériophage est séquencé, la plupart du contenu génomique est en général de fonction inconnue. Par ailleurs, deux bactériophages semblant strictement identiques sur le plan morphologique et infectant le même hôte peuvent être le plus probablement très différents sur le plan génétique.

Ainsi, on estime qu'environ 60 % des gènes des bactériophages sont de fonctions inconnues, que ce soit par exemple concernant les populations marines [Paul-2005] ou chez les bactériophages non marins infectants *S. aureus* [Kwan-2005], *M. tuberculosis* [Pedulla-2003] ou *P. aeruginosa* [Kwan-2006].

La deuxième information obtenue de ces analyses génomiques est le caractère hautement « multi-recombiné » des bactériophages, dont les génomes présentent un très grand mosaïcisme, fruit des événements de recombinaisons en place depuis de milliards d'années [Hatfull-2011].

Enfin, mosaïcisme n'excluant pas ordre, on constate que la plupart des gènes sont ordonnés dans l'espace et regroupés fonctionnellement (assurant une expression temporelle synchrone par groupe) : les gènes assurant la protection et la transcription/réplication de l'ADN viral apparaissent distincts des gènes codant pour les protéines structurales (exprimés secondairement) ou bien encore des gènes impliqués dans la lyse bactérienne, exprimés en fin de cycle [Hendrix-2002].

V – La place et le rôle écologique des bactériophages

Les bactériophages sont présents dans l'ensemble des écosystèmes. Nous en avons sur la peau, dans notre tube digestif, sur nos muqueuses et ils sont partie intégrante de notre alimentation [*Letarov-2009, Mendez-2004*].

Les bactériophages représentent les virus les plus importants sur la planète, en nombre et en diversité. On estime le nombre de bactériophages supérieur à 10^{30} sur la planète, grossièrement 10 fois supérieur à celui des bactéries. Le milieu marin constitue notamment un important réservoir de bactériophages avec une concentration moyenne évaluée à 10^7 virus/mL [*Chibani-Chennoufi-2004*]. Lors d'une étude des communautés virales des eaux côtières, une analyse métagénomique établissait que 75 à 90 % des hits correspondaient à des bactériophages lorsque soumis à la base de données GenBank, suggérant que ceux-ci sont numériquement dominants dans cet écosystème [*Breitbart-2002*]. La diversité des bactériophages, même s'il s'agit d'une donnée mal appréhendée, est de façon certaine énorme : on estime que 100 millions de génomes différents seraient présents dans la nature [*Rohwer-2003*].

Par ailleurs, les bactériophages (essentiellement les tempérés) participent à l'évolution bactérienne : ils permettent l'acquisition de nouveaux traits génétiques et la variabilité de ceux-ci en étant des acteurs importants du transfert horizontal de gènes, via la transduction généralisée et spécialisée [*Weinbauer-2004*].

Enfin, indissociable du règne bactérien qui assure leur pérennité, les bactériophages sont également de puissants régulateurs quantitatifs des populations bactériennes dans l'ensemble des écosystèmes. La nature des relations entretenues entre ces deux protagonistes (relation proie-prédateur) n'est pas sans rappeler ce qui est observé dans les macro-systèmes de régulation des populations animales, à l'échelle des chaînes alimentaires. Ainsi, dans les écosystèmes aquatiques, les bactériophages sont responsables de la lyse de 10 à 20 % de la biomasse bactérioplanctonique⁹ par jour [*Suttle-1994*]. D'autres études font état de données analogues, voire supérieures, soulignant leur rôle fondamental [*Fuhrman-1999, Wommack-2000*].

⁹ Le plancton (ensemble des organismes vivants dans les eaux) peut être divisé en plancton végétal (phytoplancton, dominé par les diatomées et dinoflagellés), plancton animal (zooplancton), plancton bactérien (bactérioplancton) et plancton viral (virioplancton, dont les bactériophages font partie).

Vu la nécessaire interdépendance de l'un et l'autre des partenaires, la viabilité du système impose une situation d'équilibre dynamique. Cet équilibre est obtenu par une compétition ininterrompue entre d'un côté les bactéries qui mettent en œuvre différents mécanismes de résistance et de l'autre les bactériophages qui œuvrent à les contourner (cf. ci-dessous). La relative rareté des événements permettant l'acquisition de nouveaux traits phénotypiques à l'échelle d'un bactériophage et d'une bactérie (mutation, transfert génique) est ici compensée par le nombre considérable d'individus concernés par ces processus. Un exemple bien connu de cet équilibre oscillatoire des populations virales et bactériennes est illustré par le cas du choléra : au Bangladesh, la concentration des vibrions cholériques dans l'écosystème aquatique subit des fluctuations saisonnières inversement corrélées à celles des bactériophages anti-choléra, responsable d'une limitation de l'expansion bactérienne. En prenant en compte l'effet de ces mêmes bactériophages *in vivo* (dont la concentration augmente fortement dans les selles de patients atteints de choléra et qui sont également rejetés dans l'environnement), les bactériophages jouent un rôle de macro-régulation des épidémies et participe à leur extinction spontanée [Faruque-2005a, Faruque-2005b].

VI – Interaction bactérie-bactériophage : une course à l'armement raisonnée pour un équilibre des populations

Les bactéries, qui occupent ici la place de la proie (conditionnant une action défensive) sont des organismes plus évolués et complexes que les virus, donc à même de mettre en œuvre différents mécanismes de résistance. Nous aborderons sommairement ces différents systèmes et parallèlement nous analyserons les stratégies des bactériophages pour contrecarrer ces mécanismes.

A – La résistance par inhibition de l'adsorption virale

Une première solution pour devenir résistant à une attaque virale consiste tout simplement à empêcher son adsorption en supprimant, modifiant ou masquant le récepteur viral. On peut citer les exemples suivants :

- La protéine OmpA est la cible d'attache de nombreux phages d'*E. coli*. Lorsque les souches possèdent le plasmide F, la lipoprotéine TraT (codée par ce plasmide) interagit avec OmpA et inhibe l'adsorption virale [Achtman-1977] ;
- Des mutations ponctuelles peuvent plus simplement aboutir à une modification de la cible : elle n'est alors plus reconnaissable par le virus [Koebnik-1999] ;
- La bactérie peut produire des polymères extracellulaires qui vont agir comme un bouclier et masquer la cible. Si cette capacité est portée par un plasmide, ce phénotype de résistance est héritable et transférable [Forde-2003].

Les bactériophages contrecarrent assez facilement ces mécanismes : ils sont également capables de modifier leurs protéines de fibres pour qu'elles interagissent avec des ligands bactériens modifiés ou nouveaux. Par exemple, lorsque l'expression du récepteur LamB est diminuée chez *E. coli* pour limiter l'adsorption du phage λ , apparaît alors dans la population virale des bactériophages capables d'infecter la bactérie en utilisant un nouveau récepteur (OmpF) suite à la mutation de seulement 4 nucléotides dans le gène codant pour la fibre de queue [Meyer-2012]. On peut citer également l'exemple du bactériophage T7, utilisant le LPS d'*E. coli* pour son adsorption : lorsque celui-ci est modifié par différentes mutations, l'adsorption est diminuée ou supprimée. Après plusieurs cycles d'amplification, un variant est capable d'apparaître : son adsorption s'est révélée indépendante du LPS [Qimron-2006]. Enfin, pour contrer les boucliers exo-polysaccharidiques, de nombreux phages possèdent au niveau de leur fibre de queue un équipement enzymatique capable de dépolymériser ces sucres : le bactériophage K1F possède par exemple une endosialidase capable d'hydrolyser la capsule des souches d'*E. coli* K1 [Scholl-2005].

B – La résistance par blocage de l'injection d'ADN

Ces systèmes empêchent la pénétration de l'ADN viral dans la cellule et sont en général, de façon paradoxale, codés par les bactériophages eux-mêmes (très souvent des prophages). La bactérie est alors protégée d'une surinfection par un autre bactériophage (s'il est sensible à ces systèmes). Ces procédés sont imprécisément

connus sur le plan de leur mode d'action. On peut citer les protéines *Imm* et *Sp* du bactériophage T4 qui bloquent la translocation de l'ADN viral des phages de la famille T2, T4 et T6 [Lu-1994].

C – La résistance par variation de phase

La variation de phase est un mécanisme général de régulation permettant l'activation ou l'inhibition de réactions générant *in fine* une variation de phénotype (dont la résistance aux bactériophages ici, mais pas seulement). Ce mécanisme est particulier dans la mesure où la variation de phase est supportée génétiquement (donc héritable) mais avec un caractère aléatoire, réversible et temporaire, fonctionnant sur le principe du tout ou rien. Des réarrangements génétiques avec inversions localisées (par exemple) ou bien des erreurs d'appariement générant des décalages du cadre de lecture lors de la réplication de l'ADN génomique au niveau de zones riches en séquences répétées (*Slipped-strand mispairing*) sont à l'origine des variations de phase. Ce phénomène aboutit à une hétérogénéité de phénotype au sein de la population bactérienne, favorisant les bactéries les plus adaptées, mais sans générer de perte définitive de phénotype, le mécanisme pouvant se produire dans le sens inverse. La variation de phase, mécanisme complexe, a été décrit dans différentes espèces bactériennes, aboutissant le plus souvent à des modifications d'expression de composés membranaires (LPS, transporteurs, capsule exo-polysaccharidique, flagelles, ...) [Henderson-1999].

D – La résistance par dégradation du génome viral

1. Les systèmes de restriction-modification

Les systèmes de restriction-modification (RM) peuvent être comparés à un système assurant une immunité innée avec distinction entre le soi et le non soi. L'introduction d'ADN étranger dans la cellule bactérienne est perçue comme tel car celui-ci comporte des bases non méthylées à des sites spécifiques. Cette absence de méthylation autorise l'action des endonucléases de restriction aboutissant à une fragmentation du génome viral. Le génome bactérien est lui protégé de ces endonucléases car la partie « modification » du système (codant une

méthyltransférase) a méthylé les séquences bactériennes spécifiques, les rendant inattaquables par les enzymes de restriction.

Les stratégies développées par les bactériophages pour échapper à ces systèmes sont multiples. On peut citer par exemple la synthèse précoce d'un leurre dans le cas du bactériophage T7 : la protéine Ocr, codée par le tout premier gène exprimé dans les suites de l'injection de l'ADN viral, va mimer par dimérisation une matrice d'ADN. Ce leurre va attirer les enzymes de restriction dont l'affinité s'avère être 50 fois plus importante envers cette protéine qu'envers l'ADN viral [Walkinshaw-2002]. Dans le cas du bactériophage T4, ce virus utilise d'emblée des bases modifiées (5-hydroxyméthyl-cytosine, 5-HMC) dans son génome, qui lui permettent d'échapper aux enzymes de restriction. L'évolution des systèmes RM chez les bactéries a permis l'acquisition d'un type particulier (RM de type IV) qui reconnaît les bases atypiques telle que la 5-HMC... ce à quoi le phage peut répondre par une modification supplémentaire en apportant une glycosylation des résidus 5-HMC, dès lors non repérés par le système de RM de type IV [Labrie-2010].

2. Le système CRISPR-Cas

Le système CRISPR-Cas (*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated genes*) est un composant essentiel de l'immunité adaptative présent dans respectivement environ 40 % et 60 % des génomes bactériens et d'archées [Horvath-2010]. Il est transféré à la descendance. Il s'agit d'un système fonctionnant par interférence ARN, ciblant des séquences précises d'ADN étranger, couplé à une nucléase. Plusieurs systèmes existent selon l'organisme considéré, seul le fonctionnement général est exposé ici. Brièvement, le fonctionnement de ce système peut être découpé suivant les 3 phases décrites ci-dessous (**Figure 13**) [Horvath-2010, Karginov-2010] :

- **a) Phase d'acquisition :** au sein du locus CRISPR-Cas (**Figure 11**), une zone dédiée à l'acquisition (mémoire) des séquences nucléotidiques étrangères est présente. Celle-ci est composée de séquences répétées identiques de 23-47 pb alternant avec des séquences variables (*spacers*) dérivées d'ADN étrangers (21-72 pb). Ces *spacers* sont des séquences acquises au cours de précédentes rencontres avec des acides nucléiques

étrangers (bactériophages, plasmides) et intégrées dans le locus CRISPR-Cas *via* les différentes protéines codées par ce locus.

- **b) Phase d'expression (Figure 12) :** la transcription des séquences répétées (*repeats* et *spacers*) génère un long ARN immature (*pre-crRNA*) qui va être clivé au niveau de chaque *repeat*. Après maturation, chacun de ces fragments d'ARN contient alors un *spacer* complémentaire de la séquence d'ADN originelle ciblée (*crRNA*).
- **c) Phase d'interférence :** associés à un complexe protéique comportant une nucléase (codé par le locus CRISPR-Cas), les *crRNAs* vont s'hybrider aux séquences d'ADN complémentaires étrangères si celles-ci sont présentes, déclenchant l'activité endonucléasique sur la matrice d'ADN étranger.

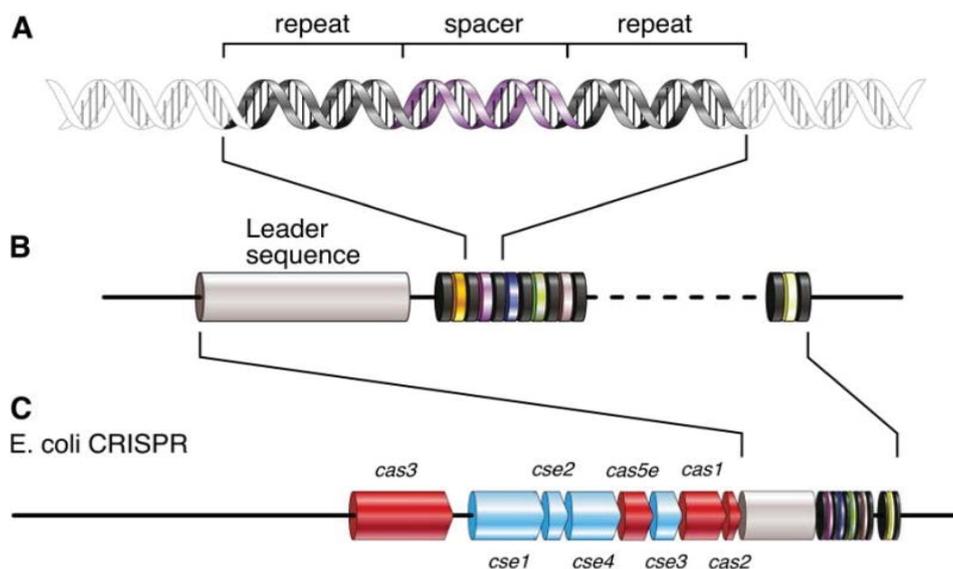


Figure 11. Structure du locus CRISPR-Cas chez *E. coli*. (A) Séquences répétées palindromiques (*repeats*) alternant avec les séquences variables (*spacers*). (B) Le nombre de *spacer* est variable selon les souches, en moyenne inférieur à 50 unités. Une séquence conservée (*leader sequence*) de plusieurs centaines de paires de base sépare la région codant les gènes associés (à gauche) de la région comportant les *repeats* et *spacers*. (C) Les gènes *Cas* sont différents selon l'organisme considéré : les gènes présents dans l'ensemble des espèces sont représentés en rouge, les gènes spécifiques d'*E. coli* en bleu. D'après [Karginov-2010].

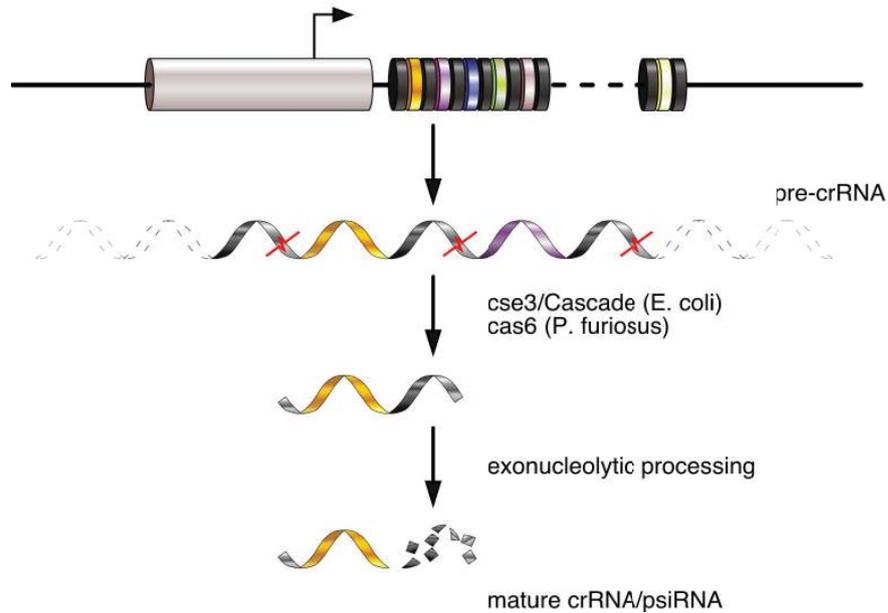


Figure 12. Transcription et maturation du locus CRISPR. Le locus est transcrit à partir de la séquence initiale (*leader sequence*) formant un transcrit immature (pre-crRNA). L'ARN est ensuite clivé entre les repeats (croix rouges) et une étape supplémentaire de maturation aboutit à l'excision de la séquence répétée en aval. D'après [Karginov-2010].

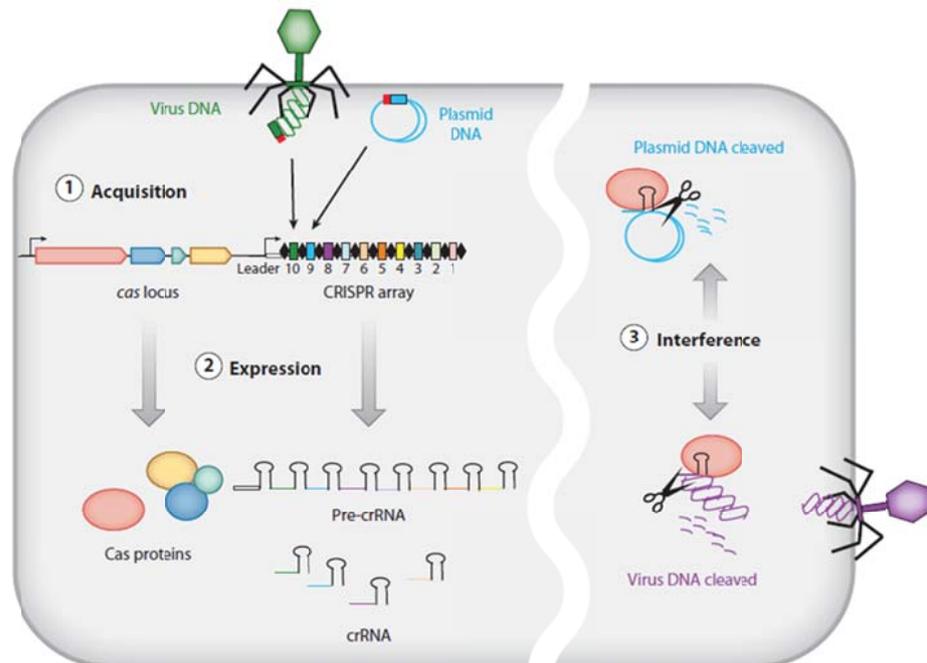


Figure 13. Représentation schématique du fonctionnement générique du système CRISPR-Cas. Le lecteur est invité à se rapporter au texte pour les commentaires relatifs à ce schéma. D'après [Bhaya-2011].

Malgré l'efficacité théorique d'un tel système, les bactériophages ont trouvé différentes parades pour échapper à la reconnaissance des sondes d'ARN présentes en permanence dans le cytoplasme de leur hôte. Le premier mécanisme mis en évidence porte sur la modification d'un motif de reconnaissance qui doit être présent pour les systèmes CRISPR-Cas de type I et II (chez *E. coli* et *Pseudomonas* respectivement) : le PAM (*proto-spacer adjacent motif*). Ce court motif de quelques nucléotides, présent en amont ou en aval de la séquence ciblée par le système CRISPR-Cas, sur l'ADN étranger, est impératif pour la fixation du complexe crRNAs/Cas. Ainsi, une mutation touchant une unique base sur cette courte séquence confère une résistance totale au système CRISPR-Cas [Deveau-2008]. Néanmoins, l'acquisition de nouveaux *spacers*, restaurant la résistance au bactériophage, est un phénomène qui peut survenir quasi immédiatement dans certains systèmes (CRISPR-Cas de type I) et permet ainsi de limiter les contre-mesures virales [Fineran-2014]. Enfin, certains bactériophages contiennent dans leur génome des gènes anti-CRISPR (dont le mode d'action n'est pas précisément décrit) : leur expression permet de diminuer fortement une résistance médiée par le système CRISPR-Cas [Bondy-Denomy-2013].

E – La résistance par infection abortive et les systèmes toxine-antitoxine

Dans une démarche collectiviste et altruiste (protection des autres membres de la population), les bactéries peuvent décider de se suicider et ainsi conduire à une infection virale avortée (production virale absente ou faible). Le premier système décrit est le système *rexAB* codé paradoxalement par le prophage λ : en cas d'infection par d'autres bactériophages, la protéine *rexA* est activée lors de la réplication de l'ADN viral et permet l'activation de *rexB* qui forme alors un canal ionique transmembranaire à l'origine d'une dépolarisation conduisant à la mort de la cellule. Ce système n'est cependant pas à proprement parler contrôlé par la bactérie elle-même. D'autres mécanismes cellulaires, détaillés dans [Dy-2014], sont utilisés selon les espèces bactériennes étudiées : ils agissent essentiellement par blocage de la traduction des ARNm viraux ou également en activant très précocement l'étape de lyse normalement activée par le phage en fin de cycle, une fois l'ensemble des particules virales assemblées (système *abiZ* chez *Lactococcus lactis*).

Les systèmes toxine-antitoxine (TAT), bien que non spécifiques de la lutte antivirale, sont pour certains d'entre eux impliqués dans la réponse aux bactériophages, provoquant *in fine* une infection avortée. Lors de l'infection virale, le détournement de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de l'hôte est responsable d'un déséquilibre de la balance TAT (activité toxine > antitoxine) car l'antitoxine est généralement de plus courte demi-vie, conduisant à la mort cellulaire ou à la bactériostase [Dy-2014].

Pour l'ensemble de ces systèmes, différentes parades ont pu être mises en évidence chez les bactériophages, leur permettant d'inhiber ces programmes suicidaires [Dy-2014].

F – *La résistance par un mécanisme nouveau : le BREX*

De découverte récente chez *B. subtilis*, le BREX (BacteRiophage EXclusion) est composé d'un cluster de 6 gènes codant pour des protéines inconnues possédant des domaines catalytiques variés (ATPase, méthylase, phosphatase alcaline, Lon-like protéase). Ce système semble présent (et conservé) chez 10 % des bactéries et archées analysées par les auteurs [Goldfarb-2015]. Indépendant des mécanismes précédemment décrits, le BREX agit par blocage de la transcription de l'ADN viral sans provoquer de fragmentation génomique (contrairement aux systèmes de restriction-modification). Les mécanismes moléculaires à l'œuvre ne sont pas actuellement connus mais la méthylation du génome bactérien semble jouer un rôle dans la reconnaissance du soi et du non soi par ce système.

De façon amusante, la description du BREX a été concomitamment associée à la découverte de bactériophages présentant d'emblée une résistance à ce système [Goldfarb-2015].

Section 3 – La phagothérapie

I – Concept, notions fondamentales et autres points clés

L'utilisation de bactériophages lytiques infectant naturellement et mortellement leurs hôtes bactériens pour traiter les infections (phagothérapie) n'est pas conceptuellement nouvelle puisque envisagée et mise en œuvre quasiment dès leur découverte par F. d'Hérelle en 1917 [d'Herelle-1917]. Le principe, d'apparence simple, est dans la réalité du traitement *in vivo* compliqué par un nombre important de facteurs qui, encore aujourd'hui, ne sont pas tous maîtrisés. Plusieurs notions et points fondamentaux seront abordés dans ce chapitre afin d'appréhender globalement la phagothérapie, son caractère non universel (et donc ses limites) mais aussi son potentiel considérable.

A – Des bactériophages : pour quel type d'infection ?

Les bactériophages n'infectent, par définition, que des cellules bactériennes. Ils sont donc d'un recours limité pour les bactéries pathogènes ayant un développement exclusivement intracellulaire (par exemple *Coxiella burnetii*, *Chlamydia* spp, *Rickettsia* spp, *Tropheryma whipplei*) et/ou à croissance intra-cellulaire facultative (par exemple *Legionella pneumophila*, *Bartonella* spp, *Brucella melitensis*, *Helicobacter pylori*). Une autre limite est l'incapacité des bactériophages à cibler les bactéries lorsque celles-ci sont sous forme de spores.

Un deuxième point important est le type d'infection considéré, notamment quant à son caractère aigu ou chronique (cinétique intrinsèque) et sa morbi-mortalité. Souvent non abordée dans la littérature, cette problématique doit pourtant être logiquement à la base du choix stratégique que l'on souhaite emprunter. Ainsi, dans la plupart des infections chroniques, deux points sont évidents : la bactérie causale est connue et le pronostic vital des patients n'est généralement pas engagé en termes d'heures. Il est alors possible d'adopter une approche personnalisée (cf. D, page 88). Inversement, dans le cas des infections aiguës menaçant le pronostic vital, on souhaite un traitement le plus rapidement efficace possible en sachant que la plupart du temps, la bactérie causale n'est pas isolée microbiologiquement à ce stade. Dans ce cas, une phagothérapie personnalisée apparaît hors de propos. Il est par ailleurs

évident que cette dichotomisation catégorique admet de multiples situations intermédiaires qui doivent moduler ces approches thérapeutiques.

Enfin, même si aucun obstacle conceptuel ne s'oppose à l'action théorique des bactériophages quel que soit le type d'infection, certaines considérations pratiques en limitent l'applicabilité. Les infections plurimicrobiennes graves, telles que les péritonites, ne semblent pas constituer de bons candidats du fait même du spectre étroit des bactériophages. Les méningites, par l'existence de la barrière hémato-encéphalique qui impose déjà une majoration des posologies d'antibiotiques par un facteur 5, constituent des infections dont la prise en charge thérapeutique par des bactériophages n'apparaît pas prioritaire en termes de balance bénéfice-risque, même si expérimentalement efficace chez le rat nouveau-né [Pouillot-2012]. Inversement, la capacité des bactériophages à augmenter leur concentration sur le lieu même de l'infection, en font des alliés particulièrement intéressants dans les infections où les antibiotiques diffusent mal : infections osseuses, articulaires, sur matériel prothétique, collections de type abcès, empyèmes, ...

B – *Le spectre d'hôte d'un bactériophage*

Par définition, il s'agit du nombre de bactéries qu'un bactériophage est capable de lyser, avec une dimension quantitative évidente mais également qualitative. Si un bactériophage peut lyser 100 souches différentes mais de filiation quasi clonale, le spectre d'hôte apparaît finalement moins large (et intéressant sur un plan thérapeutique) que celui d'un autre bactériophage capable de lyser seulement 50 souches mais qui représentent la quasi-totalité de la diversité phénotypique retrouvée au sein de l'espèce bactérienne considérée.

Les bactériophages ont intrinsèquement des spectres étroits : un bactériophage donné ne pourra en général pas infecter deux bactéries d'un genre différent (*Klebsiella* et *Staphylococcus* par exemple), il sera donc quasi-systématiquement spécifique d'une espèce (*Klebsiella pneumoniae* par exemple) et le plus souvent d'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce (*K. pneumoniae* de sérotype K1 par exemple). Des exceptions existent, comme le bactériophage P1, capable d'infecter *E. coli* K12 et certaines souches de *Shigella* et *Salmonella* [Yarmolinsky-1998] ou encore certains phages de *Sphaerotilus natans* capables d'infecter également *P. aeruginosa* et *E. coli*

[Jensen-1998]. Cependant, même si certains virus affichent un spectre d'hôte de très large envergure, il n'a pas été *a priori* décrit de bactériophages capables d'infecter à la fois des bactéries Gram positif et Gram négatif, dont l'organisation membranaire est très différente.

Un autre point important concerne le caractère relatif du spectre d'hôte : les données refléteront d'autant plus la réalité que le bactériophage aura été testé sur un nombre conséquent de souches, les plus diverses possible sur le plan génotypique. La variabilité existant au sein d'une espèce bactérienne est donc une donnée importante : le nombre de bactériophages requis pour couvrir une espèce bactérienne faiblement diversifiée sera plus faible que s'il s'agit de couvrir une espèce extrêmement variée. Une des variables explicatives est représentée par la structure ciblée par le bactériophage lors de sa fixation à la bactérie et le caractère conservé/essentiel ou bien très variable de cette protéine membranaire au sein de l'espèce bactérienne.

C – Cocktails, prêt-à-porter et sur-mesure

Dans l'approche thérapeutique humaine, l'utilisation d'une association de plusieurs bactériophages différents semble la plus rationnelle. Cette association en cocktail est justifiée par deux raisons : a) augmenter le spectre global de couverture du mélange en sommant les spectres individuels des différents bactériophages, que l'on souhaite les plus divers possibles ; b) minimiser la probabilité d'apparition d'une souche résistante au cocktail : il est plus difficile pour une souche de résister simultanément à plusieurs assaillants qu'à un seul. Ce dernier point impose néanmoins que les bactériophages du cocktail possèdent des spectres d'hôtes redondants (la bactérie est ciblée par plusieurs phages différents) et que le mécanisme de résistance à l'œuvre pour un phage soit incapable de bloquer les autres phages actifs sur la souche [Chan-2013].

Si l'utilisation de cocktails est logique, la façon d'aborder le traitement des patients (et donc la conception des cocktails) est quant à elle envisageable de deux manières différentes : une approche sur-mesure (personnalisée) ou prêt-à-porter (pour le plus grand nombre).

Dans l'approche sur-mesure, il s'agit d'apporter le ou les bactériophages les plus actifs sur l'agent pathogène qui doit, par définition, être connu et isolé. La largeur du spectre du ou des bactériophages importe peu dès lors que ceux-ci couvrent le pathogène causal. Le caractère personnalisé impose de choisir le ou les meilleurs candidats au sein d'une collection préétablie (phagothèque), ou du patient lui-même (exploitation de son « phagobioté ») ou encore plus simplement de l'environnement (isolement *de novo*). À ce titre, l'environnement constitue une source inépuisable de bactériophages et est le garant d'une diversité incommensurable rendant improbable l'échec d'isolement d'un bactériophage actif sur les pathogènes humains courants. Cette approche est particulièrement pertinente dans le cadre des infections chroniques et/ou pour lesquelles un délai de prise en charge (nécessaire à l'exécution des tests d'activité bactériophage-bactérie) est possible.

Dans le cas du « prêt-à-porter », il s'agit d'administrer un cocktail préétabli, dont le champ d'action a été déterminé au préalable. La conception d'un cocktail est idéalement basée sur des données épidémiologiques (*E. coli* est la bactérie retrouvée dans plus de 90 % des infections urinaires communautaires par exemple) et sur des données phénotypiques (80 % des souches rencontrées dans ce type d'infection expriment tel phénotype spécifiquement ciblé par tel phage). Il est constitué de façon à obtenir la couverture la plus large possible vis-à-vis des souches statistiquement les plus représentées dans un type d'infection donné. Il s'agit donc d'un cocktail permettant « l'habillage » du plus grand nombre mais susceptible de laisser sur le bas-côté une fraction microbiologique d'autant plus importante que ce cocktail possède un spectre trop étroit.

Ces approches sont non exclusives l'une de l'autre et conceptuellement adaptables à chaque situation clinique. De plus, la réévaluation périodique de la composition de ces cocktails, dans chacune des deux approches présentées et à deux échelles de temps différentes, semble nécessaire afin de garantir une activité antibactérienne optimale : afin de s'adapter aux résistances des souches qui apparaîtront inéluctablement et d'accompagner les modifications écologiques et épidémiologiques bactériennes, la reformulation des cocktails (dans le sens de « mise à jour ») semble nécessaire [Chan-2013].

D – Les bactériophages : avec ou sans antibiotique ?

Bactériophages et antibiotiques sont loin d'être antagonistes, au contraire. Dans un premier temps, faute de données cliniques solides, quatre situations pratiques sont schématiquement envisageables :

- a) L'infection est sévère et ne pose aucun problème de prise en charge thérapeutique par une antibiothérapie conventionnelle : aucune raison ne justifie le remplacement d'un traitement éprouvé (phagothérapie non pertinente) ;
- b) L'infection est sévère ou non mais causée par une bactérie multi-résistante dont la prise en charge par des antibiotiques de référence est impossible, conduisant à l'utilisation d'antibiotiques moins actifs ou non validés : un co-traitement par bactériophages est pertinent. Il existe un nombre croissant de publications qui font état d'un effet synergique fort entre ces deux thérapeutiques, notamment en cas de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (situation fréquente en cas de résistance). Par un mécanisme mal élucidé, l'utilisation synchrone d'antibiotique majore le pouvoir lytique des bactériophages avec notamment une augmentation de la quantité de virions libérés [Comeau-2007, Huff-2004, Kamal-2015, Ryan-2012] ;
- c) L'infection est causée par un germe responsable d'une infection bénigne et chronique pour laquelle le traitement antibiotique n'apparaît pas pertinent ou peu efficace (problème de diffusion, résistance, colonisation chronique) : le traitement peut être envisagé exclusivement par la phagothérapie. Il s'agit typiquement des infections cutanées (furunculose, pied diabétique, folliculite, impétigo peu étendu, etc.) ou de la sphère ORL (otites chroniques par exemple) ;
- d) Il n'y a pas d'infection à proprement parler mais une situation de colonisation par un pathogène (à même de provoquer secondairement une infection). On peut typiquement inclure la colonisation urinaire (à l'origine des cystites chroniques), les colonisations bronchiques (mucoviscidose et dilatation de bronches, en dehors des décompensations), les colonisations à germes multi-résistants (digestives dans le cadre des entérobactéries ou cutanéomuqueuses dans le cadre des souches de *S. aureus* résistant à la méticilline), les colonisations oropharyngées des patients sous ventilation mécanique (cf. page 34). Le propos est ici de supprimer ou limiter le réservoir bactérien, de réaliser une épargne antibiotique et d'exercer une action essentiellement prophylactique.

E – *Des propriétés pharmacodynamiques rêvées, une pharmacocinétique complexe*

Si on les considère comme des macromolécules thérapeutiques, les bactériophages sont les seuls à pouvoir augmenter leur concentration sur le lieu d'une infection. D'autre part, du fait de leur dépendance vis-à-vis d'un hôte bactérien, dont la concentration conditionne l'amplification virale globale, les bactériophages ne répondent aucunement aux modélisations pharmacocinétiques traditionnelles éprouvées depuis des décennies (le cas des antibiotiques). Et les modèles, lorsqu'ils sont robustes, sont fondamentaux pour adapter un traitement dans une situation donnée : connaissant la demi-vie d'une molécule X, la concentration Y requise pour obtenir l'effet thérapeutique, l'élimination rénale et le poids du patient Z, à quelle fréquence et quelle dose dois-je administrer ?

Contrairement aux antibiotiques, des paramètres quantitativement et qualitativement différents doivent être implémentés dans les modélisations dans le cas de la phagothérapie : notamment le taux d'adsorption des virus sur les bactéries hôtes, le nombre de virions libérés, la période de latence, la quantité de bactéries initiale et leur taux de croissance par exemple. De même, la densité bactérienne minimale doit être connue pour assurer un amorçage de la multiplication/transmission virale : par analogie on sait que certaines maladies virales humaines introduites dans une zone peu peuplée auront une probabilité de transmission interindividuelle plus faible que si elles sont introduites dans une grande mégapole, avec comme conséquence une extinction précoce de l'épidémie par défaut de relais. La chose se complexifie encore lorsqu'on prend en compte l'évolution dynamique du nombre de bactéries au cours du temps (les cellules non infectées continuent à croître) et les phénomènes de résistance [Skurnik-2006].

On perçoit facilement cette complexité lorsqu'on décide de réaliser la préparation courante d'un lysat bactérien au laboratoire où il s'agit d'infecter une culture bactérienne liquide avec un bactériophage que l'on veut amplifier (en général avec le rendement le plus élevé possible). Quel est le ratio bactéries/bactériophages susceptible d'apporter le meilleur résultat ? De quelle quantité de bactéries partir ? Ainsi, l'utilisation d'une grande quantité de bactériophages sera à même d'anéantir rapidement la population bactérienne mais sans qu'il soit possible pour les virus d'effectuer une seconde vague d'infection (et donc d'amplification) faute d'hôte

disponible. En revanche, si pour un même inoculum bactérien initial, la quantité de bactériophages est plus faible (ratio virus/bactérie < 1), seule une proportion de la population bactérienne sera infectée et la part restante à même de continuer à croître, constituant une matière première attaquable pour les virions libérés (seconde vague d'infection), etc. La quantité de virus finale sera différente dans ces deux situations, dépendante également d'autres paramètres (constantes virales et croissance bactérienne, taux d'émergence de souches résistantes au bactériophage). Ainsi, une forte posologie de bactériophages peut ne pas forcément être la plus efficace en termes de bactéries lysées totales.

Cette pharmacocinétique si particulière n'est que peu abordée dans les études expérimentales animales, typiquement en raison de sa complexité (détermination des constantes virales *in vivo*, inoculum bactérien, constante d'élimination virale spontanée, etc.). Il s'agit cependant d'une approche fondamentalement importante et qui faute d'être prise en compte, explique sans doute un certain nombre d'échecs thérapeutiques en matière de phagothérapie [Payne-2001]. La modélisation théorique multiparamétrique de cette pharmacocinétique complexe est néanmoins réalisable sur le papier, en prenant en compte l'ensemble des variables impliquées [Payne-2001], donnant même une excellente corrélation avec ce qui est observé *in vitro* [Cairns-2009]. En revanche, d'autres auteurs n'ont pu valider leur modélisation lorsque celle-ci était confrontée aux données obtenues lors d'expérimentations *in vivo* [Weld-2004] soulignant, si besoin était, la complexification supplémentaire apportée par les mises en situations réelles.

Il apparaît en tout cas absolument nécessaire d'élargir ce champ de recherche afin de préciser au mieux, pour un ou plusieurs bactériophages donnés, dans un type d'infection donné, quand et combien administrer de bactériophages pour permettre un traitement optimal, ou à défaut mettre en lumière les erreurs à ne pas commettre.

F – *Les problèmes posés par la réglementation actuelle*

Alors que les bactériophages représentent un trésor de diversité et par là même une source intarissable d'agents antibactériens dans laquelle il suffirait de puiser pour

couvrir un nombre croissant de souches problématiques isolées quotidiennement en clinique, la législation actuelle rend impossible ce type d'approche.

1. Les différents régimes d'enregistrement d'une substance douée de propriétés thérapeutiques

La réglementation européenne actuelle reconnaît 3 types de régimes sous lesquels enregistrer les drogues thérapeutiques (directive européenne 2001/83/EC et amendements ultérieurs). Ces régimes régissent par exemple les processus de production, de contrôle et de mise sur le marché :

- a) Les médicaments « simples » (*Medicinal products*) : il s'agit des médicaments sous leurs formes courantes (paracétamol, anti-hypertenseurs, anti-épileptiques, antibiotiques, ...)
- b) Les médicaments biologiques ou biomédicaments (*Biological medicinal products*) : il s'agit de médicaments dont la substance active est « biologique », « produite par ou extraite d'une source biologique ». Les vaccins, sérums, immunoglobulines, les facteurs de croissance, les facteurs de la coagulation obtenus par génie génétique, les hormones (insuline, hormone de croissance, ...) en sont des exemples.
- c) Les médicaments pour thérapies avancées (*Advanced therapy medicinal product, ATMP*) : il s'agit des produits regroupant les traitements utilisés pour la thérapie génique (le plus souvent des vecteurs viraux), la thérapie cellulaire (cellules souches par exemple), la thérapie tissulaire (valve cardiaque par exemple).

De façon évidente, les bactériophages n'entrent pas dans la première de ces catégories mais sont éligibles, sans entrer dans le détail des définitions précises, aux deux dernières. La problématique actuelle, pour les autorités régulatrices, est de permettre d'accueillir les bactériophages dans la catégorie la plus adaptée (en la modifiant) ou bien d'en créer une nouvelle, solution vraisemblablement plus pertinente.

2. Les conséquences pratiques

Les bactériophages ont actuellement un statut particulier, car encadrés imparfaitement par une législation qui n'a pas été établie pour eux. À ce titre, ils doivent se plier à un parcours administrativo-réglementaire complexe dont les passages sont parfois guidés par un excès de prudence, certes souhaitable mais essentiellement motivé par l'absence de connaissances antérieures et de base réglementaire dédiée. Il n'en demeure pas moins qu'il est actuellement illégal d'utiliser un bactériophage en thérapeutique s'il n'a pas été soumis à ce processus d'approbation.

De plus, considérant qu'il s'agit d'un médicament, ce qui a été démontré pour un bactériophage doit être redémontré pour son camarade (quand bien même seuls quelques nucléotides de différences existent entre leurs génomes), notamment en termes de toxicité, de pureté et d'efficacité (ce qui demande actuellement au minimum une à deux années de tests et procédures). Une des conséquences tangibles est qu'aucun bactériophage présent dans les différentes banques à l'échelle internationale, quand bien même caractérisé, ne peut être utilisé en pratique clinique actuellement, même s'il s'agit de l'appliquer sur un bout d'orteil. Nous sommes donc très loin de la phagothérapie réactive et personnalisée, que seul un assouplissement du cadre législatif pourra rendre accessible.

L'autre conséquence de ces réglementations, notamment concernant les standards requis pour la production (couverts par les règles communes des biomédicaments et ATMP¹⁰), est une augmentation prohibitive des coûts. Peu d'entreprises possèdent industriellement parlant les infrastructures nécessaires pour pouvoir produire des bactériophages selon ces normes (normes GMP, *good manufacturing practices*) et encore moins l'autorisation de production (au titre d'établissement pharmaceutique). Pour illustrer ce problème, la production d'un cocktail de bactériophages comportant 5 virus coûte approximativement entre 2 et 2,5 millions d'euros et nécessite environ 1 an actuellement. Gardons enfin en mémoire que l'ensemble de ces obligations ne sont pas celles nécessaires à l'obtention d'une AMM¹¹, mais celles d'emblée requises

¹⁰ ATMP : *Advanced therapy medicinal products*, voir page précédente.

¹¹ AMM : Autorisation de mise sur le marché. Il s'agit d'une autorisation légale délivrée par les autorités régulatrices permettant la commercialisation d'un médicament. Elle est notamment obtenue à l'issue d'un essai clinique de phase III (évaluant l'efficacité de la molécule en question contre le traitement de référence ou placebo, sur un grand nombre de patients).

pour la réalisation d'une étude clinique de phase II (étude d'efficacité/tolérance sur un faible nombre de patients).

II – La toxicité des bactériophages : mythes et légendes

Sur le plan pharmacologique, la toxicité est une notion très polymorphe, regroupant l'ensemble des effets dangereux et non souhaitables (ou non tolérables) qu'une drogue peut avoir, sur un certain nombre de paramètres. Les principaux aspects toxicologiques seront abordés dans ce chapitre (notamment l'immunogénicité directe et indirecte). Seront volontairement écartées de ce champ certaines considérations écologiques microbiennes, souvent mises en avant par les détracteurs de la phagothérapie, car bien qu'elles soient fondées et intéressantes, elles ne disposent pas à l'heure actuelle de données suffisantes pour porter le débat à un niveau autre que celui des supputations et hypothèses. Il s'agit notamment des conséquences que pourrait avoir l'introduction d'un ou plusieurs bactériophages sur le microbiote d'un patient, de l'implication de la transduction généralisée des bactériophages lytiques dans le transfert de gènes d'antibiorésistances ou de facteur de virulence, de l'impact écologique de tels traitements en cas d'utilisation à large échelle, etc. Ces interrogations fondamentales auxquelles il faudra impérativement répondre dans le futur ne doivent pas enterrer la phagothérapie avant même sa validation chez l'homme, de la même façon que la survenue de colites graves à *Clostridium difficile* induites par la prise d'antibiotiques à large spectre ou la présence de concentration importante de fluoroquinolones dans les eaux résiduaires et de surfaces n'est pas suffisante pour bannir l'utilisation des antibiotiques.

A – *La toxicité physico-chimique, le caractère mutagène et reprotoxique*

L'accumulation d'expériences et le recul des pays utilisant les bactériophages en thérapeutique depuis plus de 80 ans permettent sans ambiguïté d'affirmer que la toxicité physico-chimique est nulle : dès lors qu'ils sont véhiculés par un solvant non toxique, les bactériophages ne sont pas en mesure d'induire de lésions au niveau des tissus exposés, que ce soit par un mécanisme physique ou chimique. Concernant leurs effets reprotoxiques et mutagènes sur les cellules eucaryotes, les connaissances

biologiques actuelles ne laissent pas envisager ce risque puisqu'il s'agit de virus incapables d'infecter les cellules eucaryotes.

B – Immunogénicité directe : l'effet de la particule virale

La mise en contact d'un virus avec notre corps (que ce soit par voie cutanée, orale, respiratoire ou intraveineuse) est à même de provoquer une réaction immunitaire, potentiellement néfaste. Ces réactions peuvent être aiguës, mettant en jeu l'immunité innée (cytokines de l'inflammation aiguë, recrutement local de cellules pro-inflammatoires) ou bien retardées avec mise en place d'une réponse immunitaire reposant notamment sur l'expansion clonale de lymphocytes spécifiques et la synthèse d'anticorps. Les bactériophages sont cependant des particules qui nous environnent en permanence et possèdent un statut commensal dans notre organisme : ils sont des habitants normaux de notre tube digestif et de nos muqueuses, nous en buvons et mangeons quotidiennement [*Letarov-2009, Mendez-2004*].

1. Réponse immune innée et inflammation aiguë

En Pologne, l'Institut d'Immunologie et de Thérapeutique Expérimentale (Institut Ludwik Hirszfeld) a accueilli et colligé un nombre important de patients présentant une infection à germe multi-résistant (de l'infection urinaire à l'infection osseuse en passant par les infections respiratoires). Ces patients (n=157 sur 3 ans, de 2008 à 2010) ont été traités par phagothérapie pendant plusieurs semaines et ont fait l'objet d'un suivi régulier. La voie d'administration était variable, dépendante de la pathologie à traiter (orale, intra-rectale, intra-vaginale, cutanée ou respiratoire via aérosol). Une évaluation biologique de différents paramètres (numération-formule sanguine, bilan hépatique, fonction rénale et CRP¹²) a été réalisée précocement (5 à 8 jours) ou tardivement (9 à 32 jours) après le début du traitement et comparée à l'état basal. Aucune variation cliniquement pertinente n'a été observée chez ces patients [*Miedzybrodzki-2012*].

Dans un essai de phase I conduit par Nestlé, contrôlé et randomisé contre placebo visant à évaluer l'effet de la prise orale du bactériophage T4 (3 prises par jour

¹² CRP (protéine C réactive) : il s'agit d'un marqueur biologique de l'inflammation utilisé en routine en médecine clinique. Sa synthèse hépatique est essentiellement sous la dépendance de l'interleukine 6.

pendant 2 jours), aucun des volontaires sains (n=15) n'a présenté d'effets indésirables, ni d'élévation des marqueurs de cytolysse hépatique ni même développé d'anticorps dirigés contre le bactériophage testé lorsqu'analysé à la fin de la période d'observation [Bruttin-2005].

Dans une autre étude, la même équipe a évalué cette fois l'effet d'un cocktail commercialisé par la société russe Microgen® (indiquée dans le traitement des « diarrhées à *E. coli* ») chez 15 volontaires sains adultes et enfants Bangladais. Une élévation des marqueurs de cytolysse hépatique a été observée *de novo* chez 2 enfants (mais très probablement liée à une origine musculaire devant un taux ALAT normal¹³) et chez un adulte de façon fugace. Une augmentation du taux de polynucléaires éosinophiles était également constatée chez certains sujets mais le plus probablement en rapport avec une prévalence importante des parasitoses digestives dans cette population. L'analyse du microbiote intestinal (ARN 16S) ne montrait pas de perturbation significative des différentes populations bactériennes par rapport aux sujets ayant reçu le placebo [McCallin-2013].

Concernant les études réalisées *in vitro*, les données concernant l'activation de l'immunité innée lors de l'administration de bactériophages sont rassurantes. Miernikiewicz *et al.* [Miernikiewicz-2013] ont étudié le potentiel pro-inflammatoire aigu du bactériophage T4 administré par voie intra-péritonéale (T4 entier ou ses protéines majeures de capsid) sur la production de cytokines de la phase aiguë ainsi que la genèse d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'étude a été réalisée dans un modèle murin (*in vivo*) et également *ex vivo* sur cellules dendritiques murines et sur leucocytes humains. L'administration du bactériophage T4 et ses protéines majeures de capsides ne modifiaient pas la production de cytokines de la phase aiguë ni celle de ROS.

De même, dans notre laboratoire, l'effet pro-inflammatoire éventuel de 6 différents bactériophages non apparentés à T4, administrés par voie intra-nasale (isolément ou en cocktail) chez des souris anesthésiées (permettant l'inoculation pulmonaire) a été évalué. Dans ce modèle, l'antigène atteint directement l'alvéole pulmonaire, dont on connaît la particulière réactivité liée au grand nombre de cellules inflammatoires

¹³ Les enzymes hépatiques dosées en pratique clinique pour rechercher une cytolysse hépatiques sont deux amino-transférases (ASAT et ALAT). L'ASAT n'est cependant pas exclusivement présente dans le foie et beaucoup plus représentée dans le muscle.

résidentes¹⁴. Les résultats préliminaires montrent qu'aucune des cytokines testées (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF α , IFN γ , KC, MIP-1 α , IL-4, IL-10, IL-13), dosées sur broyat pulmonaire 24 heures après l'exposition, ne présentaient d'augmentation par rapport au contrôle (PBS), dès lors que la préparation virale était correctement purifiée (notamment exempte d'endotoxine).

2. Réponse immune adaptative et anticorps

L'autre versant du problème concerne la mise en jeu de l'immunité adaptative avec réponse humorale amenant à la production d'anticorps dirigés contre les bactériophages. Le problème est alors essentiellement celui de la conséquence de ces anticorps sur la fonctionnalité du bactériophage en cas de ré-administration de celui-ci (anticorps neutralisants¹⁵) et la prévalence de la séropositivité pour un bactériophage donné dans la population générale (pré-immunisation).

De longue date, on sait que l'administration de certains bactériophages est à même de générer la formation d'anticorps spécifiques. Historiquement, le bactériophage ϕ X174 (un *microviridae* infectant *E. coli*) a été utilisé à partir des années 1960 chez l'homme, en injection intraveineuse, pendant plus de 30 ans, pour induire une réponse immunitaire et la quantifier en dosant la présence d'anticorps spécifiques, notamment chez les patients présentant un déficit de l'immunité cellulaire T dépendante [Ochs-1992, Pyun-1989, Rubinstein-2000]. On signalera par ailleurs qu'aucun effet secondaire sérieux n'a été rapporté pendant plus de 30 ans d'utilisation alors que les patients recevaient par voie intraveineuse (dans le cadre de protocoles d'immunisation courants) des doses de 2.10^9 particules virales (PFU) par kg de poids corporel, générant des concentrations virales plasmatiques de l'ordre de 5.10^7 PFU/mL dans les suites de l'injection (3 injections au total, espacées de 6 semaines, étaient réalisées). Les patients immunocompétents développaient tous un schéma de réponse normale avec synthèse d'immunoglobulines de type IgM puis IgG de forte affinité. Ces anticorps possédaient un pouvoir neutralisant envers le bactériophage ϕ X174 [Ochs-1992, Pyun-1989, Rubinstein-2000].

¹⁴ Chez l'homme comme chez la souris, plus de 90% des cellules présentes dans un liquide de lavage broncho-alvéolaire sont des macrophages spécifiques du poumon : les macrophages alvéolaires.

¹⁵ En immuno-virologie, un anticorps est qualifié de neutralisant lorsqu'il bloque le pouvoir infectieux du virus (dans le cas présent, l'anticorps neutralisant bloque la capacité du bactériophage à infecter une bactérie hôte).

Une étude importante portant sur la capacité du bactériophage T4 et ses protéines majeures de capsidite à induire une réponse humorale s'est également intéressée à la prévalence des anticorps anti-T4 dans une population naïve (absence d'exposition d'origine humaine au bactériophage T4). Cette étude a permis d'apporter les éléments suivants [Dabrowska-2014] : a) chez 50 volontaires sains naïfs, la prévalence de la séropositivité vis-à-vis du phage T4 (présence d'anticorps spontanée) atteignait 82 % ; b) l'injection intra-péritonéale des protéines majeures de capsidites purifiées chez la souris s'accompagnait d'une réponse humorale variable selon la protéine considérée. Indépendamment de leur titre, seuls certains anticorps (ciblant certains épitopes de capsidite) étaient neutralisants ; c) lorsque le bactériophage T4 était administré dans un modèle d'infection à *E. coli* chez des souris pré-immunisées contre ce bactériophage (présentant donc des anticorps anti-T4), la survie était compromise par rapport aux souris non pré-immunisées, de façon variable selon l'antigène impliqué dans la pré-immunisation.

Sous réserve du faible nombre de bactériophages étudiés, on peut néanmoins considérer que notre système immunitaire est en mesure de repérer certains bactériophages et de monter une réponse immune aboutissant à la production d'anticorps spécifiques à des niveaux variables, dont certains ont un pouvoir neutralisant. En revanche, l'administration de bactériophages ne semble pas déclencher une réponse inflammatoire aiguë cliniquement significative, même lorsqu'administré par voie intraveineuse.

C – L'immunogénicité indirecte : l'effet de la lyse bactérienne

Dans ce type de toxicité, l'immunogénicité est provoquée par la lyse bactérienne. Depuis des décennies, on sait que des composants bactériens extrêmement conservés entre espèces, notamment membranaires, sont de puissants motifs antigéniques, susceptibles d'être exposés plus largement lors de la lyse. Chez les bactéries Gram positif, il s'agit des acides lipoteichoïques et du peptidoglycane principalement, chez les Gram négatif du lipopolysaccharide (notamment sa fraction lipidique : le lipide A ou endotoxine). D'autres composants peuvent entrer en ligne de compte tel que l'ADN bactérien ou des exotoxines. Ainsi, l'endotoxine a été de longue date prouvée

comme constituant un élément clé dans la physiopathologie du choc septique [Nau-2005].

Alors que la lyse provoquée par les antibiotiques augmente les concentrations d'endotoxine, se pose la question de l'effet de la lyse induite par les bactériophages. Tous les antibiotiques ne se valent pas sur ce point. Si les conséquences de ce phénomène sur la majoration de l'inflammation ont été clairement établies *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, son implication clinique chez l'homme n'est pour l'instant pas certaine, quand bien même certaines études cliniques tendent à montrer l'effet positif de l'utilisation d'un antibiotique peu libérateur d'endotoxine comparée à un antibiotique fortement libérateur d'endotoxine [Nau-2005]. Quoiqu'il en soit, ces situations concernent essentiellement les infections sévères avec inoculum bactérien important et choc septique¹⁶ tel que pris en charge dans les services de réanimation.

La question est au moins aussi importante si on considère ce problème en cas de traitement par les bactériophages. En effet, pour les plus rapides d'entre eux, la lyse peut être extrêmement rapide, en moins de 10 minutes, aboutissant à une libération potentiellement massive de composés membranaires toxiques. En s'intéressant à ce problème, Mastuda *et al.* [Matsuda-2005] ont évalué dans un modèle murin de péritonite à *E. coli* traitée par le bactériophage T4, la survie et la quantité d'endotoxine libérée à différent temps post-traitement. En plus du groupe de souris témoins ne recevant pas d'antibiotique et de celui traité par le bactériophage T4 (bactériophage lytique), les auteurs ont également traité les animaux en utilisant le bactériophage T4 rendu déficient pour la lyse (conduisant à une accumulation intracellulaire des virions au sein des bactéries qui ne sont plus fonctionnelles) et un antibiotique classique de la famille des céphalosporines.

De façon intéressante, les animaux présentaient une mortalité différente selon ces modalités thérapeutiques : les animaux traités par le bactériophage déficient pour la lyse présentaient la meilleure survie (80 %), puis venaient les animaux traités par le bactériophage sauvage (50 %) et enfin ceux traités par l'antibiotique (30 %). Ces résultats paradoxaux étaient d'autant plus intrigants que le compte bactérien intrapéritonéal au cours du temps montrait une décroissance strictement identique dans

¹⁶ Le choc septique est une défaillance circulatoire aiguë causée par les conséquences générales d'une infection sévère. Il s'accompagne entre autres, d'une hypotension artérielle nécessitant le recours à des drogues vasopressives et est associé à une mortalité importante.

ces 3 groupes. Enfin, les quantités d'endotoxines les plus faibles étaient retrouvées chez les animaux traités par le phage déficient pour la lyse.

III – Les preuves expérimentales chez l'animal et chez l'homme

Un nombre important d'articles de revue existe sur le sujet et il serait imprudent d'avoir la prétention de les résumer tous, tant la littérature a été prolifique depuis la découverte des bactériophages et leur application clinique. Je propose donc au lecteur une sélection la plus représentative possible des principaux travaux réalisés sur ce point.

A – Les données expérimentales chez l'animal

Les principales et/ou les plus récentes d'entre elles sont listées dans les différents tableaux suivants. Le **Tableau 6** reprend uniquement les modèles traitant d'infections pulmonaires, le **Tableau 7** s'intéresse uniquement aux modèles infectieux relatifs aux brûlures (et greffe cutanée) et le **Tableau 8** est un échantillonnage de différents autres modèles.

B – Les données cliniques chez l'homme

Chez l'homme, l'expérience accumulée est immense mais la méthodologie manque hélas de rigueur comparée aux standards actuels pour la plupart des essais historiques (absence de randomisation, absence de placebo, essais non réalisés en aveugle, biais multiples, critères de jugement mal définis, etc.). Une grande partie des travaux cliniques historiques ont été effectués par la Pologne, la Russie et la Géorgie, pour la plupart publiés dans des revues nationales avec les difficultés de diffusion scientifique inhérentes à la langue non anglaise. Revisités quelques 50 ans plus tard, même si encore une fois non réalisés en respectant les standards actuels de la recherche clinique, ces travaux méritent considération. Les succès sont soit francs, soit modestes ou nuls. Cependant l'ensemble des études s'accordent sur un point : aucune toxicité cliniquement pertinente n'est notée (abstraction faite des effets

indésirables, parfois graves, constatés lors des injections intraveineuses de préparations non purifiées).

La revue détaillée de S. Abedon *et al.*, retraçant historiquement l'utilisation thérapeutique des bactériophages chez l'homme, peut être avantageusement consultée [Abedon-2011b].

Nous aborderons un exemple historique, car bien que non spectaculaire en termes de résultats, il n'en demeure pas moins illustratif de la réalité de l'époque : le maniement d'un traitement efficace sans en connaître le fonctionnement exact ni même les risques, aboutissant sans nul doute à minimiser grandement ses effets positifs. Nous verrons ensuite des exemples plus récents.

À partir de 1932, dans un hôpital new yorkais, une équipe médicale décide de colliger prospectivement une série de cas présentant une bactériémie prouvée (par hémoculture) à *Staphylococcus aureus* et pour laquelle un traitement par bactériophage est alors délivré par voie intraveineuse [MacNeal-1936a, MacNeal-1936b]. À cette époque, aucun antibiotique n'existait : les sulfamides ne seront utilisés en routine que quelques années plus tard et la pénicilline 10 ans plus tard. La mortalité spontanée de ce type d'infection était alors extrêmement élevée, supérieure à 80 % [Skinner-1941] (elle reste malheureusement autour de 15 à 45 % de nos jours sous traitement [Lowy-1998]).

Les causes de ces bactériémies étaient extrêmement variables, allant du furoncle de l'aile du nez, à l'éthmoïdite antérieure aiguë¹⁷ de l'enfant en passant par l'ostéomyélite¹⁸, l'abcès rénal, la mastoïdite¹⁹ ou la pneumonie par exemple. L'âge des patients s'étalait entre 2 et 80 ans, avec un regroupement essentiellement autour de la tranche 10-40 ans.

Cent patients ont ainsi été pris en charge avec l'administration intraveineuse de différentes préparations de bactériophages. Ces préparations, assurément stériles,

¹⁷ Il s'agit d'une infection du sinus ethmoïdal qui, de par sa proximité anatomique avec l'encéphale et l'œil, fait courir le risque de complications visuelles et méningo-encéphaliques

¹⁸ Il s'agit d'une infection osseuse touchant le plus généralement les os longs, provoquée par *S. aureus* dans l'immense majorité des cas, apporté par voie hématogène.

¹⁹ Il s'agit d'une infection de la mastoïde (portion de l'os temporal palpable derrière l'oreille), complication la plus courante des otites moyennes aiguës de l'enfant.

n'étaient néanmoins que de simples lysats bactériens²⁰ filtrés non purifiés, contenant entre autres substances toxiques une proportion très élevée de composés bactériens hautement immunogènes (en particulier les acides lipoteichoïques communs aux cocci Gram positif), que l'on sait de nos jours comme étant largement impliqués dans la physiopathologie du choc septique.

Les résultats, peu spectaculaires à première vue, font état d'une mortalité de 75 % chez ces patients traités par phagothérapie intraveineuse. Cependant, si l'on considère 1) l'administration intraveineuse d'un traitement chargé d'endotoxine bactérienne ; 2) les posologies de bactériophages très vraisemblablement infra-thérapeutiques car souvent limitées par la survenue de réactions qualifiées de « sérieuses » dans les suites de l'injection ; 3) l'absence de preuve initiale concernant l'efficacité de la préparation de bactériophage vis-à-vis de la souche pathogène en cause ; on peut en tout cas s'étonner d'une mortalité non supérieure à celle qui est observée en l'absence de traitement (>80 %, voire vraisemblablement plus si l'on se replace dans les standards thérapeutiques de l'époque).

Et si on s'attarde sur les cas « sauvés », il s'agit de patients présentant des infections considérées de nos jours comme engageant le pronostic vital à court ou moyen terme en l'absence de traitement, telles qu'ostéomyélites, cellulite de la face²¹, abcès rénal, empyème pleural²², dont la guérison spontanée n'apparaît pas actuellement probable.

²⁰ Un lysat bactérien, dans le domaine de la biologie des bactériophages, est une culture bactérienne partiellement ou totalement lysée par l'ajout volontaire d'un bactériophage actif sur la bactérie cultivée. Un lysat est principalement réalisé dans une optique de production virale.

²¹ Il s'agit d'une infection du derme et de l'hypoderme, le plus souvent d'origine streptococcique ou staphylococcique.

²² Il s'agit d'une collection de pus dans la cavité pleurale.

Bactérie	Animal	Infection / traitement	Principaux résultats (effets du traitement par bactériophages)	Réf.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (bioluminescence).	[Alemayehu-2012]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (bioluminescence et compte), augmentation de la survie, moindre inflammation.	[Debarbieux-2010]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (compte), augmentation de survie. Efficacité curative et préventive.	[Morello-2011]
<i>Escherichia coli</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (bioluminescence et compte), augmentation de la survie, moindre inflammation.	[Dufour-2015]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vison	IN / Aér. ou IN	Réduction de la charge bactérienne (compte), augmentation de la survie, absence de toxicité avec doses répétées.	[Cao-2015]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Souris	IN / IP	Souris neutropéniques. Réduction de la charge bactérienne (compte), réduction de la mortalité, moindre inflammation.	[Takemura-Uchiyama-2014]
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	IT / IT, eau, IO	Pas d'effet sur la mortalité et sur les lésions histologiques macroscopiques.	[Tsonos-2014]
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Souris	IT / IN ou IP	Réduction de la charge bactérienne (compte), moindre inflammation.	[Carmody-2010]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	IN / IP	Réduction de la charge bactérienne (compte).	[Chhibber-2008]
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	IPulm / IM	Réduction de la mortalité, réduction des lésions macroscopiques.	[Huff-2004]
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	Infection spontanée / eau et Aér.	Réduction de mortalité dans un essai grandeur nature en élevage (batterie de 5 000-10 000 poulets).	[Oliveira-2010]
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	IT / IT	Réduction de mortalité, réduction de la charge bactérienne, réduction de morbidité (perte de poids).	[Lau-2010]

Légendes. IN : intranasal, Aér. : aérosol, IP : intrapéritonéal, IT : intratrachéal, IPulm : intrapulmonaire, IO : intraoesophagien, IM : intramusculaire, eau : bactériophages délivrés via l'eau de boisson, APEC (*avian pathogenic E. coli*) : souches responsables de colibacillose aviaire.

Tableau 6. Principales publications traitant de l'utilisation des bactériophages dans des modèles d'infection pulmonaire.

Bactérie	Animal	Infection / traitement	Principaux résultats (effets du traitement par bactériophages)	Réf.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	SC* / IP	Réduction de mortalité, réduction de la charge bactérienne aux sites métastatiques.	[Kumari -2009b]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	SC* / IP	Réduction de mortalité, diminution de l'inflammation.	[Kumari -2010a]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	Cut. / Cut.	Réduction de mortalité.	[Kumari -2010b]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	SC* / IP	Pas de différence finale sur la mortalité (simple retard).	[Kumari -2009a]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cochon d'Inde	Cut / Cut	Evaluation de la prise d'autogreffes cutanées avec infection locale : meilleur prise des greffons en présence de bactériophages.	[Soothill -1994]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	SC* / IP, IM, SC	Réduction de la mortalité (surtout si injection des bactériophages par voie IP).	[McVay -2007]

Légendes. SC : sous-cutané, IP : intrapéritonéal, Cut. : application cutanée locale, IM : intramusculaire. * : il ne s'agit pas à proprement parler d'un modèle d'infection de brûlure physiologique car l'agent infectieux est injecté en sous-cutané, sous la zone brûlée (et non déposé sur la brûlure).

Tableau 7. Principales publications traitant de l'utilisation des bactériophages dans des modèles de brûlures et greffes cutanées.

Bactérie	Animal	Infection / traitement	Modèle / Principaux résultats (effets du traitement par bactériophages)	Réf.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	IP / IP	<u>Péritonite-bactériémie</u> / Réduction de la mortalité.	[Gu-2012]
<i>Vibrio cholerae</i>	Lapin	IG / IG	<u>Choléra</u> / Diminution de l'excrétion fécale. Pas d'effet préventif.	[Jaiswal-2013]
<i>Clostridium perfringens</i>	Poulet	IG / IG	<u>Entérite nécrosante</u> / Gain de poids, réduction de mortalité, réduction des lésions.	[Miller-2010]
<i>Salmonella enteritidis</i>	Poulet	IG / PO	<u>Colonisation digestive</u> / Réduction de la colonisation digestive, diminution de la transmission entre animaux infectés et contacts.	[Lim-2012]
<i>Enterococcus faecium</i>	Souris	IP / IP	<u>Péritonite-bactériémie</u> / Réduction de la mortalité, réduction du compte bactérien.	[Biswas-2002]
<i>Campylobacter coli</i> et <i>jenuni</i>	Poulet	IG / IG, PO	<u>Colonisation digestive</u> / Réduction de la colonisation digestive.	[Carvalho-2010]
<i>Escherichia coli</i> (O157:H7)	Bovin	PO / PO	<u>Colonisation digestive</u> / Pas d'effet <i>in vivo</i> contrairement aux évaluations <i>in vitro</i> .	[Rivas-2010]

Légendes. IP : intrapéritonéal, IG : intra-gastrique (gavage), PO : *per os*, via l'alimentation ou l'eau.

Tableau 8. Principales publications traitant de l'utilisation des bactériophages dans différents modèles infectieux.

Concernant les études cliniques récentes utilisant des bactériophages à visée anti-infectieuse et conduites selon les standards minimums (double aveugle, randomisé, contrôlé contre placebo), elles sont à notre connaissance au nombre de deux :

- a) L'étude de Wright *et al.* [Wright-2009], concernant l'efficacité thérapeutique des bactériophages dans les otites chroniques à *P. aeruginosa* multi-résistant. Le critère de jugement principal était clinique (évaluation des lésions par le médecin avec un score composite et évaluation par le patient de ses symptômes avec également un autre score). Le critère de jugement secondaire était le compte bactérien. Vingt-quatre patients ont été inclus (les patients présentant une infection à *P. aeruginosa* résistant au cocktail de 6 bactériophages étaient exclus). Le cocktail était administré localement par voie intra-auriculaire une

unique fois à J0 avec un suivi à J7, J21 et J42. L'étude était positive sur les critères de jugement principal et secondaire avec cependant un effet de faible amplitude ;

- b) L'étude de la société Nestlé (NCT00937274) portant sur le traitement des diarrhées de l'enfant à *E. coli* (souches ETEC et EPEC) au Bangladesh et comparant solution de réhydratation orale (traitement de référence) avec traitement par cocktail de bactériophage T4 commercial (société Microgen®) ou un autre cocktail. L'étude, terminée depuis plus d'un an, n'a pas révélé ses résultats pour l'instant.

On notera également l'existence de l'essai Phagoburn (NCT02116010) qui a débuté ses premières inclusions il y a quelques semaines : cet essai multicentrique (France, Belgique, Suisse) évaluera l'effet de deux cocktails de bactériophages ciblant *E. coli* ou *P. aeruginosa* sur les complications infectieuses des plaies de patients brûlés, comparé à la sulfadiazine argentine (traitement de référence).

IV – Les avantages et les inconvénients de la phagothérapie

L'utilisation des bactériophages à visée thérapeutique présente assurément plus d'avantages que d'inconvénients, ce que nous nous proposons de résumer dans le **Tableau 9**. Pour être utilisé en thérapeutique, un bactériophage devra être défini et « labellisé » comme tel, répondant alors à un cahier des charges précis tel que proposé par Pirnay *et al.* [Pirnay-2015]. Celui-ci exclut par exemple les bactériophages tempérés dont on connaît la propension à véhiculer différentes toxines, fameuses pour leur pathogénicité (toxine cholérique, shigatoxine, leucocidine de Pantan-Valentine, ...), ou les préparations impures ou insuffisamment caractérisées.

Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Spectre d'hôte étroit	<ul style="list-style-type: none"> ● Impact nul sur les bactéries non ciblées (microbiote intestinal) ● Limitation du nombre de souches susceptibles de développer une résistance à un bactériophage donné 	<ul style="list-style-type: none"> ● Pour les approches probabilistes : impose l'utilisation de cocktails de bactériophages pour augmenter la couverture antibactérienne
Grande diversité	<ul style="list-style-type: none"> ● Probabilité d'isoler un bactériophage actif contre n'importe quelle souche pathogène très élevée (échec improbable) 	—
Mécanisme d'action	<ul style="list-style-type: none"> ● Activité bactéricide rapide ● Activité lytique indépendante de la résistance aux antibiotiques ● Activité anti-biofilm de certains bactériophages (capables de dépolymériser les polysaccharides composant les biofilms) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Comme les antibiotiques, relargage d'endotoxines (et autres) lors de la lyse
Nature virale (virus de bactéries)	<ul style="list-style-type: none"> ● Excellente diffusion du fait de la faible taille de la particule virale ● Incapacité à infecter les cellules eucaryotes ● Réplicatif : augmentation de la concentration sur le lieu de l'infection ● Présents naturellement dans l'environnement, il n'est pas nécessaire de les fabriquer ● Isolement rapide de nouveaux bactériophages possible (en quelques heures ou jours) 	<ul style="list-style-type: none"> ● Mise en jeu possible d'une immunité humorale avec production d'anticorps neutralisants ● Stabilité variable dans le temps, influencée par les conditions de stockage (pH, température, UV, ...) ● Capacité potentielle à induire du transfert génique par transduction généralisée (facteur de virulence, résistance aux antibiotiques)

Tableau 9. Synthèse des avantages et inconvénients de l'utilisation thérapeutique des bactériophages.

Section 4 – Les autres applications des bactériophages : un champ ouvert

En dehors de la phagothérapie, les bactériophages ont joué historiquement des rôles fondamentaux dans les grandes découvertes en biologie moléculaire (cf. historique, page 64). Encore actuellement, leur rôle en pathologie infectieuse et bio-ingénierie est florissant. Quelques exemples archétypaux sont présentés ci-dessous.

I – L'utilisation des bactériophages dans l'agro-alimentaire

Un premier exemple est représenté par la lutte contre les pathogènes alimentaires, notamment *Listeria monocytogenes*, contaminant des produits laitiers, de la viande et du poisson.



Figure 14. Exemple de deux cocktails commerciaux de bactériophages anti-listéria. Ces préparations sont utilisées en routine dans l'industrie agro-alimentaire pour réduire le risque de listériose véhiculé par les aliments à risque.

Depuis 2007, un cocktail de bactériophages anti-listeria est disponible, avec agréments conjoints des autorités sanitaires américaines (FDA²³), canadiennes (EPA²⁴) et européennes plus tardivement (EFSA²⁵). Ces produits (ListShield™,

²³ Food and Drug Administration

²⁴ Environmental Protection Agency

²⁵ European Food Safety Agency

société Intralytix et Listex P100™, société EBI Food Safety) sont actuellement implémentés par les grands groupes agro-alimentaires dans les processus de production et conditionnement des aliments à risques, réduisant ou supprimant ainsi le risque de contaminations listériennes (**Figure 14**). Sur le même principe la société Intralytix fabrique également le produit EcoShield autorisé aux États-Unis et au Canada, ciblant *E. coli* O157:H7 responsable de colites hémorragiques graves.

Le deuxième exemple montre que la lutte anti-infectieuse ne s'arrête pas aux bactéries pathogènes pour l'homme. La société OmniLytics commercialise au Canada (agrément EPA pour l'utilisation en serre et en champ ouvert en 2012) le « bio-pesticide » AgriPhage-CMM ciblant le chancre des tomates, causé par la bactérie phytopathogène *Clavibacter michiganensis* et qui n'est autre qu'une solution de bactériophage à pulvériser.

II – L'utilisation des bactériophages comme outil d'étude des interactions moléculaires à haut débit : le *phage display*

Décrit par Smith en 1985 [Smith-1985], le *phage display* est une méthode employée largement dans l'étude des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN. On utilise principalement le bactériophage filamentueux M13, dont la protéine majeure ou mineure de capsid est fusionnée avec un peptide. Il est ainsi possible de créer une librairie importante de bactériophages différents, exprimant chacun à leur surface, aléatoirement, une des différentes protéines présente dans un génome bactérien. L'interaction de la protéine fusionnée peut ensuite être testée avec différents ligands connus immobilisés sur une plaque (protéine ou acide nucléique). Seuls les phages dont l'interaction présente une affinité suffisante sont conservés après des étapes de lavage. Après amplification du bactériophage source de l'interaction, le séquençage de son génome permet de connaître la protéine exprimée.

III – Des bactériophages modifiés comme détecteur de pathogènes

La détection rapide et sensible d'agents pathogènes dans des matrices alimentaires complexes est un véritable défi. Les méthodes de biologie moléculaire, bien que très sensibles, sont parfois prises en défaut par la complexité des échantillons à analyser avec présence d'inhibiteurs et les étapes nécessaires de purification des acides

nucléiques. De plus, ces techniques ne différencient pas les bactéries mortes des bactéries vivantes. Quant aux méthodes microbiologiques classiques, elles sont lentes, imposant une phase de culture et retardent la délivrance sur le marché des lots de production, dont des produits frais, par définition à durée de vie limitée. Ces contraintes peuvent être facilement contournées par l'utilisation des bactériophages (assurant spécificité et sensibilité), capables de s'amplifier au contact des bactéries ciblées (uniquement si elles sont vivantes) et peu affectés par la complexité physico-chimique des produits à analyser. Les bactériophages utilisés à cette fin de détection ont été modifiés pour porter dans leur génome un gène rapporteur qui sera exprimé par la bactérie ciblée (généralisant ainsi un marqueur fluorescent, luminescent ou coloré) puis détecté [Lu-2013]. Ainsi, la société *Sample6* commercialise un test diagnostique autorisé par les autorités réglementaires, basé sur ce principe, permettant la détection de *Listeria monocytogenes* en un temps record (6 heures comparé à 48 heures).

IV – Des bactériophages en tant que vecteur de régulation bactérienne

Les progrès de la biologie synthétique autorisent de plus en plus facilement la manipulation des bactériophages à façon, autorisant des schémas d'interférence bactérienne inimaginables il y a 15 ans [Citorik-2014]. Ainsi, il est par exemple maintenant envisageable d'utiliser des bactériophages « optimisés », qui en plus d'aboutir à une lyse classique de la bactérie, sont capables de faire produire par celle-ci, avant sa lyse, une enzyme additionnelle permettant la dégradation des polysaccharides composant le biofilm bactérien [Lu-2007]. Il est également possible de transmettre à la bactérie des protéines régulatrices permettant de modifier les voies métaboliques de celle-ci, pour inhiber la formation de biofilm par exemple [Lu-2009].

Deuxième Partie

—

Travail expérimental et résultats

Objectifs du travail

L'élaboration de ce travail a essentiellement été guidée par des préoccupations cliniques. *E. coli* est un des pathogènes les plus fréquemment rencontré en pathologie infectieuse humaine et également l'un des mieux armés en matière d'antibiorésistance. Nous avons donc ciblé notre réflexion sur ce pathogène et plus particulièrement lorsqu'il est impliqué dans le champ des infections pulmonaires chez les patients sous ventilation mécanique, un domaine insuffisamment étudié.

Le premier chapitre de ce travail expérimental est centré sur l'isolement de bactériophages et leurs caractérisations en termes de spectre d'hôte. Le propos était d'estimer la faisabilité et l'efficacité d'une prise en charge *in vitro* face à l'importante diversité des souches d'*E. coli*. Nous avons donc isolé puis testé divers bactériophages contre différentes collections de souches cliniques d'origine respiratoire, obtenues chez des patients sous ventilation mécanique, afin d'en déterminer l'efficacité, notamment en termes de spectre d'hôte.

L'objectif du second chapitre était de prouver expérimentalement la faisabilité de la prise en charge d'une pneumonie générée par des souches pathogènes d'*E. coli* en utilisant des bactériophages. Nous avons notamment utilisé l'outil de bioluminescence permettant de suivre au cours du temps le développement de l'infection au niveau pulmonaire pour comparer l'effet d'une antibiothérapie et du traitement par bactériophage. Nous avons également évalué l'effet de l'adaptation *in vitro* d'un bactériophage peu efficace *in vivo* pour en améliorer l'activité.

Enfin, le troisième et dernier chapitre illustre une des richesses des bactériophages en se focalisant sur un virus singulier isolé au cours de ce travail de thèse : la spécificité du spectre d'hôte de ce bactériophage lui permet d'infecter uniquement les souches appartenant au sérotype O25b. Ce sérotype, particulièrement inquiétant par sa pathogénicité, son antibiorésistance et sa diffusion mondiale, est l'une des menaces les plus importantes sur le plan de l'épidémiologie des souches d'*E. coli* avec un fort impact en pathologie clinique. Nous avons déterminé la spécificité de ce bactériophage, caractérisé ses propriétés cinétiques et démontré son activité thérapeutique potentielle.

Matériel et méthodes

I – Souches bactériennes, milieux et conditions de croissance

A – Souches 536, PDP302 et LM33

La souche 536 est une souche UPEC de phylogroupe B2, de sérotype O6, de *sequence type* 127 (ST127), responsable de pyélonéphrite, extrêmement pathogène car exprimant plusieurs facteurs de virulence. Sa pathogénicité chez l'animal en fait une souche modèle, largement utilisée et décrite dans la littérature [Brzuszkiewicz-2006]. Cette souche a été fournie par l'unité Inserm U1137 dirigée par Erick Denamur. Elle présente un phénotype de résistance aux antibiotiques quasi sauvage puisqu'elle est uniquement résistante à la streptomycine.

La souche PDP302 est une souche d'*E. coli* isolée d'un patient hospitalisé dans le service de réanimation de l'hôpital Louis Mourier, responsable d'une pneumonie acquise sous ventilation mécanique (PAVM). Il s'agit d'une souche partageant le même ST que la souche 536 (ST127), exprimant également un nombre important de facteurs de virulence (*papC*, *hlyC*, *sfa*, *iroN*, *cnf1*).

La souche LM33, séquencée au cours de ce travail, est une souche d'*E. coli* de phylogroupe B2, de sérotype O25b:H4, ST131, responsable d'une PAVM chez un patient hospitalisé dans le service de réanimation de l'hôpital Louis Mourier. Elle présente un phénotype de résistance classique pour les souches de ce ST avec sécrétion d'une β -lactamase à spectre élargi codée par le gène *blaSHV-12*, présent en deux copies, à la fois sur un plasmide et sur le chromosome bactérien. Le plasmide comporte par ailleurs une pénicillinase de type *blaTEM-1c* et le chromosome bactérien une céphalosporinase de type *blaDHA-7*. La souche présente également une résistance aux aminosides (kanamycine, gentamicine, tobramycine sauf amikacine), une résistance à l'acide nalidixique, au cotrimoxazole (sulfamide) et au chloramphénicol.

B – *Souches d'origine respiratoire isolées de patients sous ventilation mécanique : projet ColoColi, collections ECoPAVM I, II et III*

Les souches d'*E. coli* responsables de PAVM ont été collectées prospectivement à partir d'avril 2012, dans différents services de réanimation français, dans le cadre du projet ColoColi (épidémiologie-physiopathologie de la colonisation et des infections pulmonaires à *E. coli* chez les patients de réanimation sous ventilation mécanique). Ce projet, porté par Jean-Damien Ricard, J. Messika, B. La Combe (service de réanimation médico-chirurgicale), C. Branger et T. Billard (service de microbiologie) au CHU Louis Mourier (Colombes) ainsi qu'Erick Denamur et son équipe de l'unité Inserm U1137, a été motivé par le manque flagrant de données physiopathologiques et épidémiologiques concernant les souches d'*E. coli* isolées dans l'arbre respiratoire des patients de réanimation sous ventilation mécanique. La collecte des souches est actuellement terminée et les données en cours de traitement. Toutes les souches retrouvées dans les prélèvements respiratoires de patients sous ventilation mécanique étaient éligibles, quel que soit leur mode de prélèvement et leur rôle (simple colonisation ou souche responsable de PAVM). Treize centres ont participé à la collection des souches, qui ont ensuite été centralisées sur l'hôpital Louis Mourier et l'unité Inserm U1137, où elles ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique (antibiogramme complet) et génotypique (notamment phylogroupe, sérogrupe et facteurs de virulence). Dix facteurs de virulence ont été recherchés par PCR : des gènes impliqués dans le métabolisme du fer tels que sidérophores et transporteurs (*iroN*, *aer*, *fyuA*), des gènes codant pour des facteurs d'adhésion (*sfa*, *papC*, *papG*), des toxines cytolytiques (*hly*, *cnf1*), la formation d'une capsule (*neuC*) et la résistance au pouvoir bactéricide du sérum (*traT*).

Ces souches ont été étudiées en 3 vagues successives, formant 3 sous-collections respectivement appelées dans ce travail ECoPAVM I (21 souches), II (99 souches) et III (196 souches), soit un total de 316 souches.

C – *Autres souches bactériennes*

Dans le travail concernant le bactériophage LM33-P1, les souches utilisées pour l'étude du spectre d'hôte sont issues de différentes collections cliniques présentes dans le laboratoire d'Erick Denamur, déjà décrites dans diverses publications (et

choisies comme représentatives de la diversité sérotypique d'*E. coli*) ainsi que des collections ECoPAVM II et III.

La souche D3-A (H1659 dans la référence ci-après) est une souche O25b-ST131 (isolée sur hémoculture dans le cadre d'une bactériémie à point de départ urinaire), dont la pathogénicité a été préalablement testée chez la souris [Mora-2014].

Les autres souches d'*E. coli* (collection ECOR et AIEC) sont des souches déjà présentes dans le laboratoire de Laurent Debarbieux.

D – *Conditions de croissance*

Sauf précisions contraires, les souches ont été cultivées de façon usuelle à 37 °C sur milieu LB (*lysogeny broth*, peptone 10 g/L, extrait de levures 5 g/L, NaCl 5 g/L) liquide ou gélosé, avec addition éventuelle d'antibiotiques si nécessaire. Dans les expérimentations animales où une quantification bactérienne a été effectuée dans divers organes, les broyats ont été étalés après dilution sur milieu Drigalski avec antibiotique selon le profil de résistance de la souche inoculée à l'animal.

II – **Isolement et purification des bactériophages, observation en microscopie électronique**

La grande majorité des bactériophages présentés ici ont été isolés *de novo* en utilisant la souche 536 et différentes souches responsables de PAVM, à partir d'eaux résiduaire collectées mensuellement auprès de 4 stations de retraitement des eaux gérées par le SIAAP (Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne).

Les bactériophages capables de lyser la souche hôte ont été amplifiés en milieu liquide puis individualisés à partir d'une plage de lyse isolée comme décrit dans [Van Twest-2009]. Des solutions concentrées de grande pureté ont été obtenues après concentration de 0,5 à 1 L de lysat filtré (0,2 µm) par ultrafiltration / lavage en PBS (volume finale de 20 à 40 mL). Deux ultracentrifugations en chlorure de césium ont ensuite été réalisées (une première courte sur 3 gradients de densité et une deuxième isopycniqne de 24 heures), suivie d'une dialyse en tampon TN (Tris-HCl 10 mM,

NaCl 150 mM, pH 7,5) [Boulangier-2009]. Lorsqu'administré chez l'animal par voie intra-péritonéale, les bactériophages ont fait l'objet d'une purification supplémentaire par chromatographie d'affinité afin de réduire les faibles quantités d'endotoxines résiduelles, selon les recommandations du fabricant (EndoTrap blue Endotoxine Removal Kit, Hyglos, Allemagne).

Les observations en microscopie électronique à transmission ont été réalisées à partir de préparations purifiées, après coloration à l'acétate d'uranyl.

III – Séquençage des bactériophages et souches bactériennes, annotation et analyses génomiques

L'extraction d'ADN génomique viral a été effectuée manuellement à partir d'un protocole personnel basé sur une technique classique d'extraction par phénol-chloroforme, après prétraitement du lysat par DNase et RNase (protocole fourni en annexe). Cette technique a l'avantage de permettre des rendements corrects sans contamination par de l'ADN bactérien, tout en partant d'un simple lysat.

L'extraction d'ADN génomique bactérien a été effectuée à l'aide d'une technique automatisée (automate Maxwell 16 et kit DNA Tissue purification, Promega, États-Unis).

Le séquençage a été obtenu en utilisant la technique Illumina (Illumina Inc., États-Unis). Après assemblage des contigs, une annotation automatique a été effectuée en utilisant le serveur RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*, [Overbeek-2014]). Pour l'édition des génomes, le logiciel Artemis a été utilisé (*Wellcome Trust Sanger Institute*). Pour les génomes phagiques, chaque ORF a été vérifiée manuellement et corrigée au besoin. Les représentations graphiques des analyses génomiques comparatives ont été réalisées à l'aide du logiciel EasyFig [Sullivan-2011].

Une annotation plus poussée du génome de la souche LM33 est actuellement en cours au génoscope d'Evry.

IV – Evaluation du spectre d'hôte et efficacité à former des plages de lyses

A – Spectre d'hôte

Le spectre d'hôte a été déterminé par la technique dite des « sur-spots » et par titration (**Figure 15**). Les solutions de bactériophages utilisées, sauf mention contraire, sont des lysats stérilisés par filtration, dilués pour obtenir un titre de 10^7 pfu/mL. La technique des « sur-spots » est effectuée sur milieu gélosé en réalisant un premier dépôt de 5 à 10 μ L de la souche bactérienne (culture liquide en phase exponentielle) sur laquelle, une fois la surface sèche, sont déposés 1 à 2 μ L de la solution du bactériophage à tester. Dans le cas de la méthode de titration, 1 mL de surcouche bactérienne est déposé uniformément sur une boîte de Pétri ronde et l'excédent aspiré. Une fois sèche, la surface permet d'accueillir des dépôts d'un volume fini (4 à 6 μ L) des différentes dilutions sériées (facteur 10) de la préparation de bactériophage à titrer, effectués en triplicat. Dans tous les cas, les résultats sont lus après une incubation de 4 à 12 heures à 37 °C et le titre déduit du nombre de plages de lyse observées.

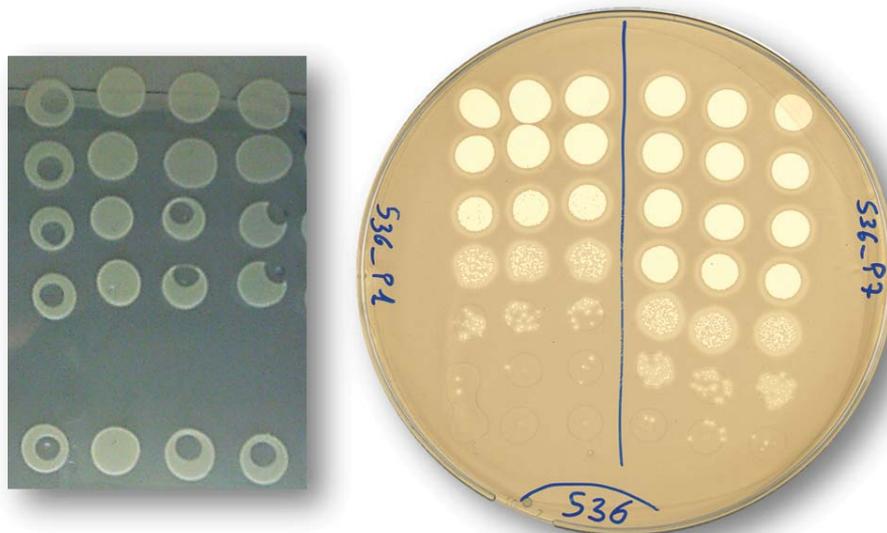


Figure 15. Aspect de la technique des « sur-spots » (à gauche) et de la dilution sériées (à droite). A gauche, un même bactériophage est testé sur 20 souches différentes ; à droite, des dilutions sériées de 2 bactériophages (536-P1 et 536-P7) ont été déposées sur la souche 536.

Dans le cadre de la détermination des spectres d'hôtes, la technique des « sur-spots » (utilisée en dépistage) a été systématiquement confirmée par une titration afin de permettre la mise en évidence de plages de lyse individualisées, seuls témoins de la présence d'un cycle infectieux viral chez la bactérie. En effet, la présence d'une zone d'absence de croissance bactérienne avec la méthode des « sur-spots » peut parfois être en rapport avec un phénomène non lié à un cycle infectieux viral mais dépendant d'autres mécanismes, regroupés sous le terme de *lysis from without* dans la littérature [Abedon-2011a].

Lors des tests à grande échelle (grand nombre de souches et de bactériophages), un robot a été utilisé pour l'automatisation des dépôts (modèle Genesis, Tecan, Suisse), en se basant sur la méthode de titration présentée plus haut. Pour chaque bactériophage, deux concentrations normalisées disposées dans une plaque 96 puits ont été utilisées : 10^7 et 10^5 pfu/mL. Après aspiration, des dépôts de 3 μ L de ces solutions sont effectués par distribution successive sur la surface sur différentes boîtes de Pétri contenant chacune une surcouche de la souche à tester (dépôts respectifs de 10^4 et 10^2 pfu environ). Cette technique permet la visualisation de plages de lyse individualisées aux faibles concentrations et permet de s'affranchir du phénomène de *lysis from without* évoqué plus haut, garantissant l'absence de faux positifs. La transcription des résultats a été effectuée selon la règle décrite dans la **Figure 16**. Par la suite, lors du traitement des données, les résultats ont été binarisés (1 : actif, 0 : inactif, cf. explications **Figure 16**). Dans chaque cas, un témoin positif constitué de la souche hôte primaire du bactériophage a été systématiquement ajouté.

B – *Efficacité à former des plages de lyse : l'évaluation de l'activité d'un bactériophage sur des hôtes secondaires*

L'efficacité à former des plages de lyses (EOP, *efficiency of plaquing*) est obtenue en titrant une solution d'un bactériophage A sur une bactérie X d'intérêt et sur la bactérie Y de référence (l'hôte primaire du bactériophage en général) : $EOP = \text{titre sur X} / \text{titre sur Y}$. Ainsi, une EOP de 0,1 signifie que le titre de la solution contenant le bactériophage A est 10 fois plus faible sur la souche X que sur la souche Y, ou encore que l'efficacité à former des plages de lyse du bactériophage A est 10 fois plus importante sur la souche Y que sur la souche X.

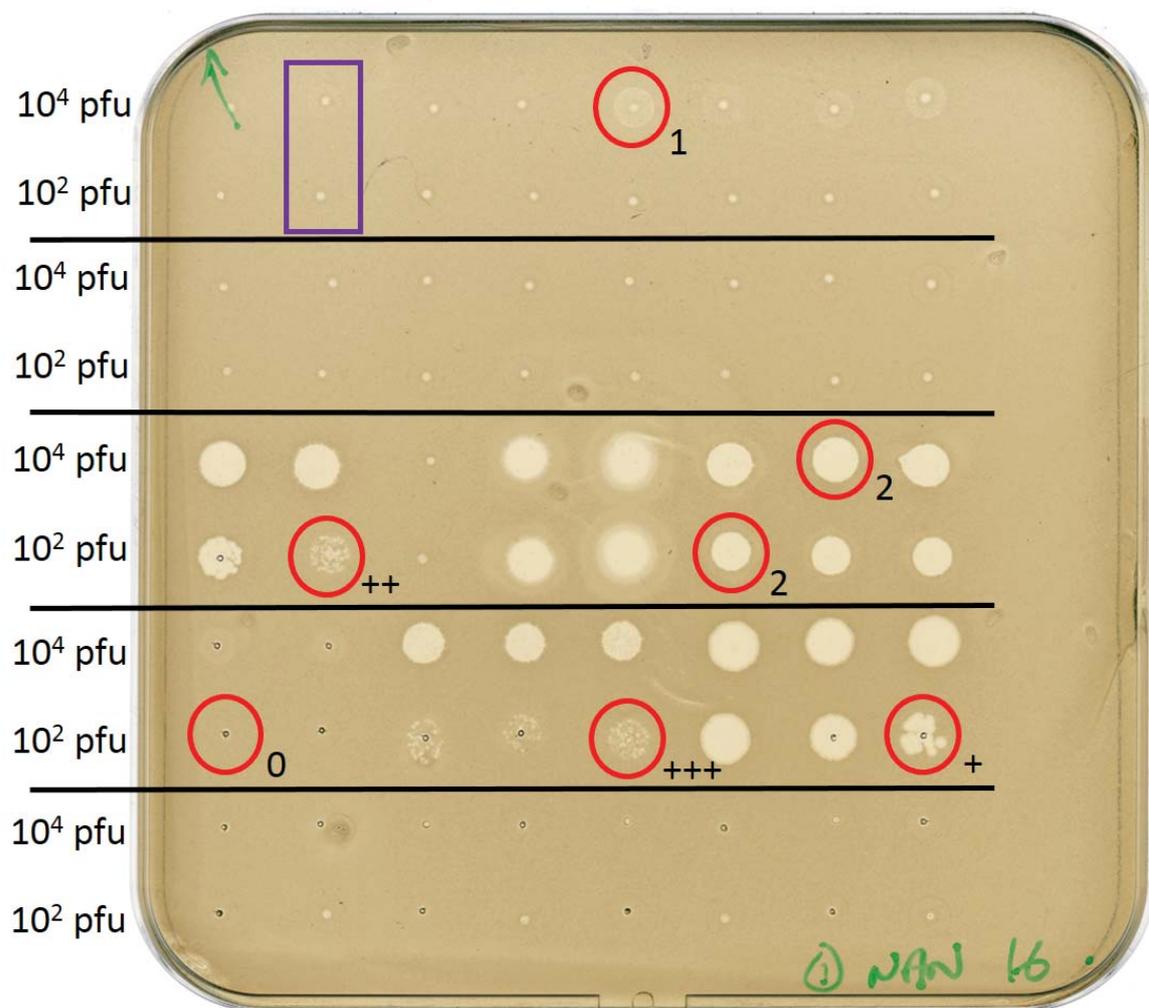


Figure 16. Test semi-automatisé du spectre d'hôte de différents bactériophages : aspect du résultat obtenu et codification utilisée lors de la lecture des résultats. La souche testée est ici la souche NAN16, déposée en surcouche à la surface de la gélose. Le cadre violet désigne un bactériophage donné, testé à deux concentrations différentes (généralisant des dépôts de $\approx 10^4$ et 10^2 pfu). La transcription des résultats a été effectuée selon la codification suivante : 0 = aucun effet sur le tapis bactérien, 1 = effacement incomplet du tapis bactérien en l'absence de plage de lyse individualisable (PLI), 2 = effacement complet du tapis bactérien, + : 1 à 20 PLI, ++ = 21 à 50 PLI, +++ = plus de 50 PLI. Pour l'expression finale des résultats, les données ont fait l'objet d'une binarisation (0 : inactif, 1 : actif) où seuls les bactériophages capables de générer un effacement complet du tapis bactérien ou de former des PLI ont été considérés comme actifs (les bactériophages générant des effacements incomplets du tapis bactérien codés 1 ont été considérés inactifs et donc finalement codés 0).

C – Recherche d'une éventuelle inhibition ou potentialisation des bactériophages entre eux lorsqu'assemblés en cocktail

Les 7 bactériophages les plus actifs (tels que déterminés lors de tests effectués sur la collection ECoPAVMI, cf. résultats) ont été choisis puis titrés isolément et simultanément après leur assemblage en cocktail sur différentes souches. Pour cela,

chacune des 7 solutions de bactériophages a été diluée à iso-concentration à 2.10^7 pfu/mL. Le cocktail a ensuite été établi en réunissant 1 mL de chacun des bactériophages (dilution de chaque virus d'un facteur 7, soit une concentration unitaire de $2,8.10^6$ pfu/mL) puis séquentiellement titré sur les souches hôtes de ces phages (n=7) et également sur d'autres souches de la collection ECoPAVM I (n=13) sensibles à au moins un de ces bactériophages. Les titres obtenus ont été comparés avec ceux fournis par la solution mère avant assemblage en cocktail : le rapport des deux titres obtenus (unitaire / cocktail) constitue un indice grossier à même de mettre en évidence un effet inhibiteur ou potentialisateur : si ce rapport est inférieur au facteur de dilution (< 7), il y a potentialisation, sinon il y a inhibition. En sachant que le cocktail peut contenir un ou plusieurs bactériophages actifs sur la souche testée et qu'en cas de souche non hôte le bactériophage le plus efficace a été choisi comme référence, on s'attend au minimum à un effet neutre : après correction par le facteur de dilution, le nombre de plages de lyse ne doit pas être inférieur en présence du cocktail à celui constaté lors de l'utilisation du bactériophage seul le plus efficace.

Pour plus de simplicité, l'activité du cocktail (A_{co}) par rapport à celle du meilleur bactériophage testé isolément a été exprimée après normalisation à la valeur 1 : si $A_{co} = 1$ l'activité est identique, si $A_{co} > 1$ une potentialisation d'un facteur A_{co} existe, si $A_{co} < 1$ une inhibition d'un facteur A_{co} existe.

V – Cinétique de lyse *in vitro*

Les cinétiques de lyse ont été effectuées par suivi de la turbidité du milieu, en plaque 96 puits, à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaque (Glomax MultiDetection System, Promega, États-Unis) configuré comme suit : lecture de densité optique (DO) à 600 nm toutes les 15 minutes, agitation orbitale intermittente, enceinte thermostatée à 37 °C, pendant 8 à 24 heures. Les conditions de départ étaient standardisées avec utilisation d'une ou plusieurs souches en phase exponentielle de croissance dont la DO a été ajustée à 0,10 par dilution avec du milieu de culture. Chaque condition a été réalisée en tri ou quadruplicat. Le volume total par puits était de 100 μ L, composé de 50 μ L de culture et 50 μ L de solution de bactériophages (dilué en milieu de culture).

Plusieurs multiplicités d'infection (MOI) ont été testées, en général de 10^{-1} à 10^{-3} . Les conditions témoins comportaient 50 μL de culture et 50 μL de milieu ou bien 100 μL de milieu seul (blanc). Pour la comparaison de l'activité de deux bactériophages sur une même souche, les deux solutions de bactériophages ont été mises à iso-concentration (et le titre vérifié) et la cinétique de lyse a été répétée 3 ou 4 fois avec des solutions indépendantes.

VI – Adsorption virale et détermination des paramètres viraux du bactériophage LM33-P1

Les expériences d'adsorption et de cinétique virale ont été effectuées en milieu liquide, sous agitation (100 rpm) à 37 °C avec du milieu LB et la souche LM33 comme décrit par Hyman *et al.* [Hyman-2009].

A – Adsorption virale

À partir de trois répliques, une courbe de corrélation a été extrapolée en utilisant une régression non linéaire (logiciel GraphPad, États-Unis) : une décroissance exponentielle à une phase a été utilisée ($y = (y_0 - Plateau) * e^{-Kx} + Plateau$ où y = phages libres en %, x = temps). La constante d'adsorption est calculée telle que $K_{abs} = \frac{-p}{N}$, où N est la concentration en bactérie à T_0 et p la pente de la droite après linéarisation de la courbe de décroissance exponentielle par une transformation en logarithme népérien. Elle s'exprime en unité de volume par unité de temps (mL/min par exemple) et représente la probabilité d'adsorption d'une particule virale sur une particule bactérienne par unité de volume et par unité de temps.

B – Calcul des paramètres cinétiques viraux

Les mesures expérimentales ont été effectuées à partir des courbes obtenues à l'aide de la technique de « *one step growth* ». L'échantillonnage du milieu réactionnel à différents temps s'est fait parallèlement dans deux conditions : sans et avec traitement par chloroforme. Le chloroforme, solvant des lipides, permet l'accès aux virions intracellulaires par dissolution membranaire et ainsi la mesure du temps d'éclipse (délai d'apparition des premiers virions fonctionnels intracellulaires, fin de la phase de plateau). Le temps de latence est mesuré à partir des échantillons non

traités par chloroforme : seuls les virions produits par la lyse bactérienne viro-induite sont pris en compte. La réaction est réalisée à faible MOI (0,1).

À partir de trois réplicas, une courbe de corrélation a été extrapolée en utilisant une régression non linéaire (logiciel GraphPad) : une modélisation de type dose-réponse a été utilisée pour les cinétiques virales ($y = P_{bas} + \frac{P_{haut} - P_{bas}}{1 + 10^{((\text{Log}EC_{50} - x) * \text{Pente})}}$ où $y = \text{Log}(\text{pfu}/\text{cellule infectée})$, $x = \text{temps}$, P_{bas} et P_{haut} = valeur du plateau bas et haut de la courbe, EC_{50} = temps à 50% de P_{haut}). Les paramètres cinétiques (temps de latence, éclipse et nombre de virions relargués) ont été dérivés de ces régressions. La quantité de virus libérés par cellule infectée a été calculée comme étant le nombre de particules virales en fin de cycle (plateau haut) divisé par le nombre de particules virales en début de cycle (plateau bas). Les particules virales non adsorbées ont été soustraites dans tous les cas.

VII – Confirmation du rôle du LPS comme récepteur et déterminant de l'interaction entre le bactériophage LM33-P1 et les souches O25b

A – Epreuve de compétition avec extraits de LPS

1. Extraction du lipopolysaccharide bactérien (LPS)

Du LPS a été purifié de différentes souches de sérotype connu par une extraction par phénol chaud/eau/diéthyl éther [Davis-2012, Westphal-1965], suivi d'une dialyse prolongée contre de l'eau stérile pyrolysée. La quantité de bactéries utilisée au départ était identique pour toutes les souches (10^{10} cfu) et, basée sur l'aspect de l'électrophorèse, une quantité grossièrement similaire de LPS a été obtenue en fin d'extraction. La pureté de ces extraits de LPS a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose avec coloration par le bromure d'éthidium (absence de résidu d'acide nucléique) et par SDS-PAGE 12 % coloré au bleu de Coomassie (absence de résidu protéique). Pour chaque extrait, 10 μL de LPS ont été mis à migrer sur SDS-PAGE 10 % et révélés par coloration argentique (Silver SNAP Stain Kit II, Pierce, États-Unis) afin de visualiser l'aspect classique généré par la répétition des unités polysaccharidiques de taille variable.

2. Test d'inhibition de la formation des plages de lyse par les extraits de LPS

Les tests ont été réalisés comme suit : à partir d'une solution purifiée de bactériophages en tampon TN (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5), 3 solutions de concentration virale décroissante ont été préparées (10^6 , 10^5 et 10^4 pfu/mL, en tampon TN, solutions stock). Chacune de ces solutions stock (SS) a ensuite été utilisée pour préparer les tubes finaux contenant les bactériophages sans LPS (100 μ L de SS + 100 μ L d'eau pyrolysée stérile) et les bactériophages avec LPS (100 μ L de SS + 100 μ L d'extrait de LPS). Des tubes supplémentaires contenant les bactériophages avec des concentrations décroissantes de LPS ont également été préparés (de l'eau a été ajoutée pour atteindre un volume final identique).

Dix μ L de ces préparations finales (avec et sans LPS) ont ensuite été déposés en triplicat sur milieu gélosé préalablement recouvert d'une surcouche de la bactérie à tester (**Figure 17**). Les boîtes ont été incubées 4 à 6 heures à 37 °C avant lecture et comptage du nombre de plage de lyse dans chaque condition.

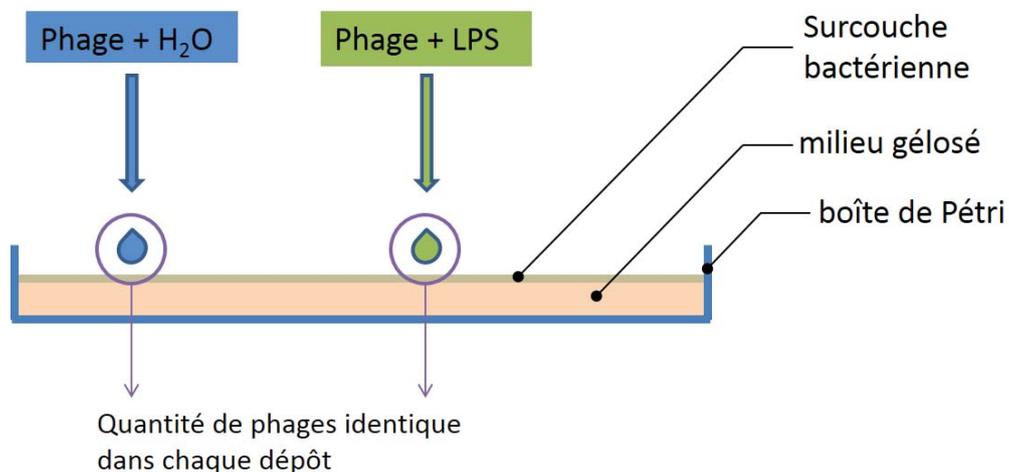


Figure 17. Représentation schématique du test d'inhibition compétitive de l'interaction bactériophage-bactérie par le lipopolysaccharide (LPS).

B – *Inhibition de l'agrégation provoquée par un anticorps spécifique*

Un anticorps (Ac) du commerce, vendu pour le sérogroupage par agrégation des souches d'*E. coli* et spécifique du séro groupe O25 (label *In Vitro Diagnosis*) a été utilisé (Statens Serum Institut, Danemark). Les tests ont été effectués à partir d'une culture de la souche LM33 en phase stationnaire et d'une solution du bactériophage LM33-P1 purifiée. Quatre conditions ont été évaluées, avec les mélanges suivants :

- 1) LM33 (5 µL) + NaCl 0,9 % (5 µL) + TN (2 µL),
- 2) LM33 (5 µL) + Ac (5 µL, NaCl 0,9%) + TN (2 µL),
- 3) LM33 (5 µL) pré-incubé 10' à 20 °C avec LM33-P1 à MOI 50 (en TN, 2 µL) + Ac (5 µL, NaCl 0,9 %),
- 4) LM33 (5 µL) pré-incubé 10' à 20 °C avec LM33-P1 à MOI 50 (en TN, 2 µL) + NaCl 0,9 %.

Une fois obtenue, chaque condition était incubée à 37 °C pendant 40 minutes sans agitation avant qu'une goutte de 5 µL soit déposée entre lame et lamelle pour examen microscopique en contraste de phase. Les observations (à l'objectif 40x et 100x) ont été enregistrées et le logiciel ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) utilisé pour obtenir des images binaires en noir et blanc.

VIII – Modèles murins utilisés

A – *Dispositions éthiques communes*

Les animaux utilisés au cours de ce travail ont été hébergés dans les animaleries de l'Institut Pasteur et de la faculté de médecine Xavier-Bichat, conformément aux recommandations européennes et locales de chaque animalerie. Pour l'ensemble des modèles utilisés, les procédures utilisées ont fait l'objet d'une évaluation par un comité d'éthique en expérimentation animale et ont été autorisées par le Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche. Dans les modèles d'infection pulmonaire, un traitement morphinique comportant une injection intrapéritonéale de 50 µg/kg de buprénorphine (Buprecare, AST Farma, Pays-Bas) était réalisé pour limiter la douleur et la dyspnée à H8 et H24 post-infection. Chaque expérience a été conçue avec la préoccupation permanente de limiter le nombre d'animaux utilisés.

B – Modèle d'infection pulmonaire, acquisition du signal de bioluminescence

Ces expériences ont été effectuées à l'Institut Pasteur, telles que décrites dans [Dufour-2015]. L'inoculum infectieux a été préparé à partir d'une culture en phase exponentielle puis centrifugé et lavé à deux reprises avec du PBS. L'ajustement de la concentration bactérienne a été effectué précisément par spectrophotométrie à 600 nm, en se basant sur une calibration préalablement établie. Des souris Balb/cJRj mâles de 8 semaines d'un poids moyen de 25 g (Elevage Janvier, France) ont été infectées par voie intranasale après anesthésie et le traitement délivré 2 à 4 heures plus tard par voie intranasale (bactériophage et contrôle) ou intra-péritonéale (bactériophage, antibiotique et contrôle).

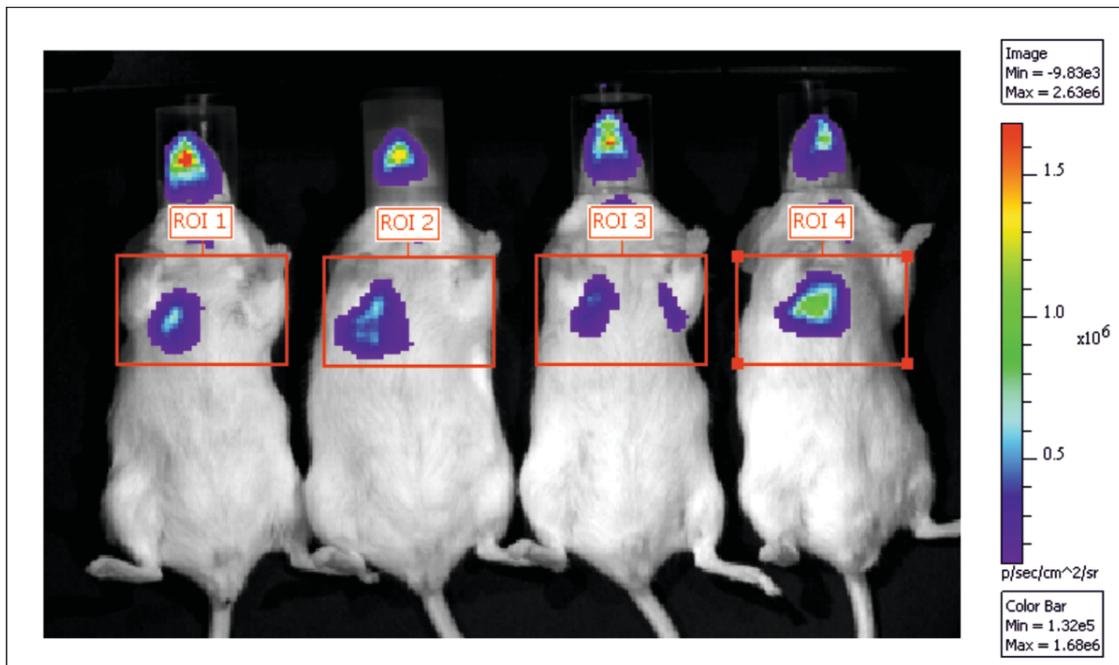


Figure 18. Exemple d'image obtenue après acquisition du signal de bioluminescence. Le signal de bioluminescence (débit de lumière) codé en couleur est superposé à une photographie classique des animaux maintenus immobiles par anesthésie gazeuse. Quatre souris infectées par 536-Lux sont présentées. Les rectangles rouges représentent les fenêtres d'échantillonnage (ROI, *region of interest*) utilisées pour la quantification du signal.

La mortalité était surveillée par tranche de 12 heures.

L'acquisition du signal de bioluminescence à différents temps post-infection a été réalisée avec un détecteur Ivis Spectrum (PerkinElmer, États-Unis) sur des animaux

maintenus sous anesthésie par voie inhalée (isoflurane 2 % avec fraction inspirée en oxygène à 40 %). Le traitement des données de bioluminescence a été effectué comme déjà décrit dans [Debarbieux-2010]. Brièvement, l'analyse s'est déroulée secondairement, sur les données enregistrées, à l'aide du logiciel Living Image (PerkinElmer) : une fenêtre d'échantillonnage identique pour chaque animal, acquisition et expérience était placée sur la face antérieure du thorax des animaux, permettant ainsi d'obtenir le débit instantané de lumière enregistré au niveau thoracique lors de l'acquisition (**Figure 18**). Ce débit de lumière (radiance moyenne) est exprimé en photons émis par seconde et par cm², avec une correction angulaire normalisée par stéradian : p/sec/cm²/sr. Pour chaque animal, le bruit de fond (représenté par le signal obtenu dans les mêmes conditions sur un animal non infecté enregistré au même instant) a été soustrait.

C – Modèle murin d'infection urinaire rétrograde

Les expérimentations utilisant ce modèle ont été effectuées sur le site de Bichat (Inserm U1137), comme décrites dans [Vimont-2012]. Il s'agit d'un modèle de colonisation/infection à bas bruit de l'appareil urinaire (bas et haut) par voie rétrograde ne causant pas de mortalité. Brièvement, des souris CBA/j femelles de 8 semaines d'un poids moyen de 17 g (Elevage Charles River, France) ont reçu une instillation intra-vésicale (50 µL) de l'inoculum infectieux (5.10^7 cfu) par voie urétrale après anesthésie. Vingt-quatre heures plus tard, le traitement était administré (bactériophage ou antibiotique) puis reins et vessie étaient récupérés 24 heures après (soit 48 heures post-infection) pour quantifier bactéries et bactériophages.

D – Modèle murin de septicémie à point de départ sous-cutané

Les expérimentations utilisant ce modèle ont été effectuées sur le site de Bichat (Inserm U1137), comme décrite dans [Johnson-2012]. Brièvement, les animaux (souris OF1 femelles de 4 semaines de 17 g, Elevage Janvier, France) étaient inoculés par voie sous-cutanée dans la région inter-scapulaire (rétro-cervicale) avec 200 µL d'inoculum (1.10^9 cfu). Dans ce modèle, les souches pathogènes sont capables de réaliser une diffusion hématogène avec greffe métastatique dans le foie,

les poumons et la rate. Le traitement a été administré 2 heures après l'infection, par voie intrapéritonéale. Lors du décès des animaux, les cadavres étaient congelés immédiatement et les organes secondairement récupérés sur un groupe homogène d'animaux décédés au cours de la même période de temps ($26,3 \pm 3,7$ heures post-infection dans le travail présenté).

IX – Transformation de la souche 536 pour obtention d'un phénotype bioluminescent, stabilité du plasmide sans pression antibiotique

La souche 536 a été transformée par le plasmide pCM17 (don du Pr James Kaper, Université du Maryland, Faculté de Médecine, Baltimore). Ce plasmide (**Figure 19**) est porteur de l'opéron *luxCDABE* de *Photobacterium luminescens* (en rose) sous contrôle du promoteur *OmpC* (en vert), assurant son expression constitutive.

De plus, il a été décrit comme un plasmide ayant la propriété de rester stable chez *V. cholerae* pendant plusieurs jours en l'absence de pression antibiotique [Morin-2009, Rhee-2011]. Cette stabilité dans le temps (conditionnant le phénotype bioluminescent de la souche), a été vérifiée par repiquage successif d'une culture liquide en l'absence de pression antibiotique, comme décrit dans [Dufour-2015]. S'agissant de l'opéron complet, il n'est pas nécessaire d'apporter le substrat de la luciférase par voie exogène. Ce plasmide porte également le gène de résistance à la kanamycine (en bleu).

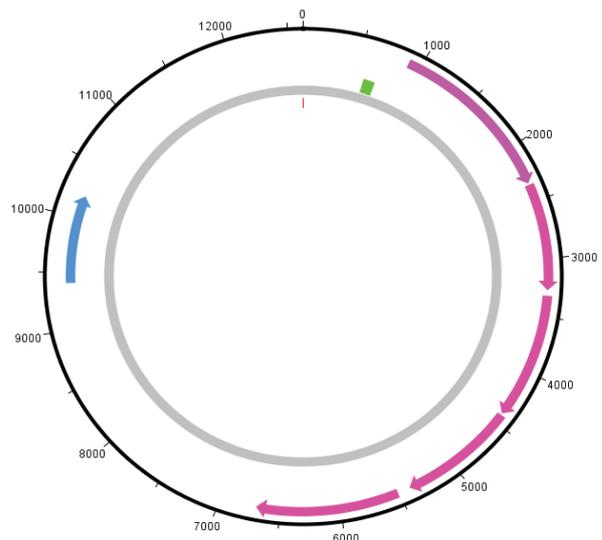


Figure 19. pCM17 permettant l'obtention d'un phénotype bioluminescent chez *E. coli* (se reporter au texte ci-contre).

La transformation de la souche 536 a été effectuée selon un protocole standard [Woodall-2003]. Par convention, la souche transformée est appelée 536-*Lux*.

X – Adaptation du bactériophage 536-P7 à la souche PDP302

L'adaptation du bactériophage 536-P7 à la souche PDP302 a été effectuée par amplification successive du virus sur cette souche, en milieu liquide (50 mL). Une culture en phase exponentielle a été infectée par le virus à une MOI de 10^{-3} et incubée pendant 3 heures à 37 °C. Puis, après centrifugation de la culture lysée, le surnageant a été stérilisé par filtration avant d'être titré sur l'hôte primaire (souche 536) et secondaire (PDP302). Une fraction de ce surnageant a ensuite été utilisée pour infecter une nouvelle culture (n° 2) selon les mêmes modalités, l'ensemble ayant été répété 5 fois. À l'issue de la dernière amplification, des plages de lyses individualisées ont été obtenues et permis un repiquage de 4 clones viraux choisis aléatoirement, dont les cinétiques de lyse sur la souche PDP302 ont ensuite été réalisées. Le clone présentant le profil de lyse le plus efficace a été conservé et dénommé 536-P7-PDP302. En aval, ce bactériophage a fait l'objet des mêmes procédures de purification que celles appliquées aux autres bactériophages utilisés chez l'animal.

XI – Analyses cytologiques et immunologiques du liquide de lavage broncho-alvéolaire murin

Les lavages broncho-alvéolaires (LBA) ont été réalisés sur des animaux euthanasiés à l'aide d'un cathéter en polyuréthane flexible de 18 Gauge (Insyte Autoguard BC, BD Bioscience, États-Unis) inséré après une petite incision à la face antérieure de la trachée dans sa portion haute. Du PBS froid (4 fois 0,5 mL) avec inhibiteur de protéase (*Complete protease inhibitor tablets*, Roche, Suisse) a été utilisé pour procéder au lavage. Les échantillons ont ensuite été centrifugés (700 G, 10 min, 4 °C) et les surnageants conservés pour les analyses immuno-biochimiques. Le culot cellulaire a été resuspendu dans un tampon de lyse sélectif pour éliminer les hématies (ACK lysing buffer, Lonza, Suisse) puis lavé deux fois en PBS. Le nombre total de cellules nucléées a été compté à l'aide d'un compteur cellulaire photographique (Cellometer K2, Nexcelom, États-Unis). L'examen cytologique a été effectué après cyto-centrifugation sur lame et coloration (type May-Grunwald-Giemsa). Un compte différentiel des éléments a été effectué sur au minimum 500 cellules. La proportion de phagocytes (polynucléaires neutrophiles, monocytes-macrophages) avec bactéries

intracellulaires a été déterminée comme le rapport de phagocytes contenant une ou plusieurs bactéries dans leur cytoplasme sur le nombre total de phagocytes.

Une analyse quantitative (en duplicat ou triplicat) des protéines totales, de l'activité LDH (lactate déshydrogénase) et du taux de cytokine KC (CXCL-1) a été effectuée en utilisant respectivement la méthode de Bradford (Quick Start Protein Assay, Biorad, États-Unis), le test CytoTox96 (Promega, États-Unis) et une technique ELISA (DuoSet Mouse KC, R&D system, États-Unis) selon les recommandations du fabricant.

XII – Expressions des résultats et analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism version 5.00 (Graph-Pad Software, États-Unis). La normalité de la distribution de l'ensemble des variables quantitatives a été vérifiée en utilisant le test de Kolmogorov-Smirnov et les résultats exprimés en « moyenne \pm écart type ». En cas de distribution non gaussienne, les résultats sont exprimés en « médiane (25^e ; 75^e percentile) ». Les tests statistiques (test de Student ou Mann-Whitney) ont été choisis en conséquence. Lorsqu'une analyse de plusieurs groupes était nécessaire, une analyse de variance à un facteur a été utilisée (One-Way ANOVA ou Kruskal-Wallis selon la distribution). Les courbes de survie ont été analysées en utilisant le test du Log-rank. Pour les variables qualitatives, les comparaisons ont été faites à l'aide du test exact de Fisher. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Chapitre 1 – Isolement et caractérisation du spectre d’hôte de bactériophages ciblant les souches d’*E. coli* impliquées dans les PAVM

Disposant d’une large collection de souches cliniques caractérisées provenant de patients sous ventilation mécanique, nous souhaitons répondre à plusieurs questions :

- L’isolement de bactériophages ciblant ces souches pathogènes est-il réalisable facilement, notamment concernant le degré de couverture escompté ? Autrement formulé, l’extraordinaire diversité d’*E. coli* est-elle à même de constituer un obstacle pour l’obtention de bactériophages à large spectre ?
- Quelle est l’efficacité globale des bactériophages isolés ?
- Existe-t-il des caractéristiques bactériennes permettant de prédire la réponse à un bactériophage ?

Section 1 – Isolement et tests successifs de bactériophages d’intérêt

La première phase de ce travail a consisté à isoler différents bactériophages afin de disposer d’une collection débutante pour répondre aux questions précédentes. Puis, guidée par les tests effectués sur les souches collectées prospectivement, cette collection a été implémentée au fur et à mesure.

I – Collection ECoPAVM I

L’isolement initial des bactériophages a été effectué en utilisant 6 souches de la première collection, choisies aléatoirement (collection ECoPAVM I, n = 21) et la souche 536. Le choix de la souche 536 a été guidé par 3 raisons : a) il s’agit d’une souche archétypale du phylogroupe B2, appartenant aux ExPEC, tout comme le sont la majorité des souches impliquées dans les PAVM ; b) c’est une souche pathogène chez la souris (et chez l’homme), contenant de nombreux facteurs de virulence ; c) il s’agit d’une souche séquencée, largement décrite et utilisée dans la littérature.

Cinquante-et-un bactériophages ont été isolés et 41 ont été retenus après élimination des doublons basés sur 3 critères : les profils obtenus en cinétique de lyse, l’analyse

des morphologies des plages de lyse et les tests croisés sur les autres souches de la collection.

En associant les 8 phages ayant le plus large spectre d'hôte, 86 % des souches de la collection (n = 21) étaient ainsi lysées, avec un biais constitué par le fait que 6 souches de la collection étaient obligatoirement lysées puisque hôtes des bactériophages isolés (sur-représentation des souches sensibles). La souche 536 a permis d'isoler deux bactériophages notables par leur spectre d'hôte, d'emblée important : 536-P1 et 536-P3.

II – Collection ECoPAVM II

Cette collection comporte 99 souches supplémentaires, acquises et testées dans un second temps. Les 41 bactériophages précédents ainsi que 10 autres bactériophages précédemment isolés au laboratoire ont été testés sur cette collection.

Ces 10 bactériophages supplémentaires ont été isolés en utilisant des souches pathogènes d'*E. coli* telle que la souche 55989 (EAEC O104:H4), la souche LF82 (AIEC, O83:H1, isolée d'un patient présentant une maladie de Crohn) ou la souche AL505 (ExPEC, O1:K1:H7, isolée d'un patient ayant développé une pyélonéphrite).

Ces tests ont été effectués à l'aide d'un robot (cf. matériel et méthode, page 120) en utilisant deux concentrations différentes de bactériophages.

A – Spectre d'hôte des bactériophages

Les bactériophages possédant les spectres les plus larges étaient capables de lyser chacun environ 14 à 19 % des souches. Parmi ces virus, on notait la présence des bactériophages 536-P1, -P3 et -P7 mais aussi la présence de LF82-P2, un virus non isolé en utilisant une souche responsable de PAVM mais une souche AIEC. Quatre bactériophages n'étaient aucunement actifs sur la collection ECoPAVM II (**Figure 21**), indiquant leur caractère hautement spécialisé, n'infectant que leur hôte initial.

La distribution de l'activité des différents virus testés n'apparaissait pas gaussienne, avec un continuum entre spectre large et spectre étroit (**Figure 20 et 21**).

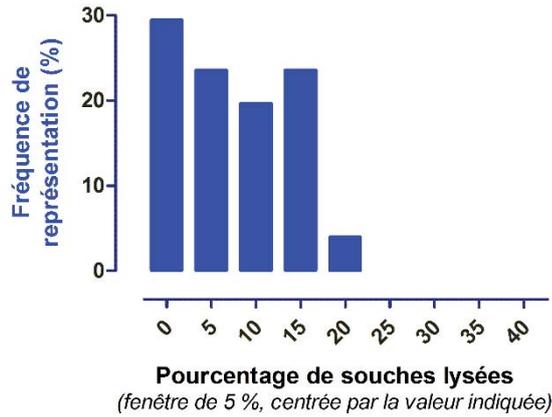


Figure 20. Distribution en fréquence de l'activité des bactériophages sur la collection ECoPAVM II. Interprétation : la catégorie des virus lysant entre 2,5 et 7,5 % des souches était représentée à hauteur de 24 %, celle lysant 17,5 à 22,5 % dans moins de 5 % des cas.

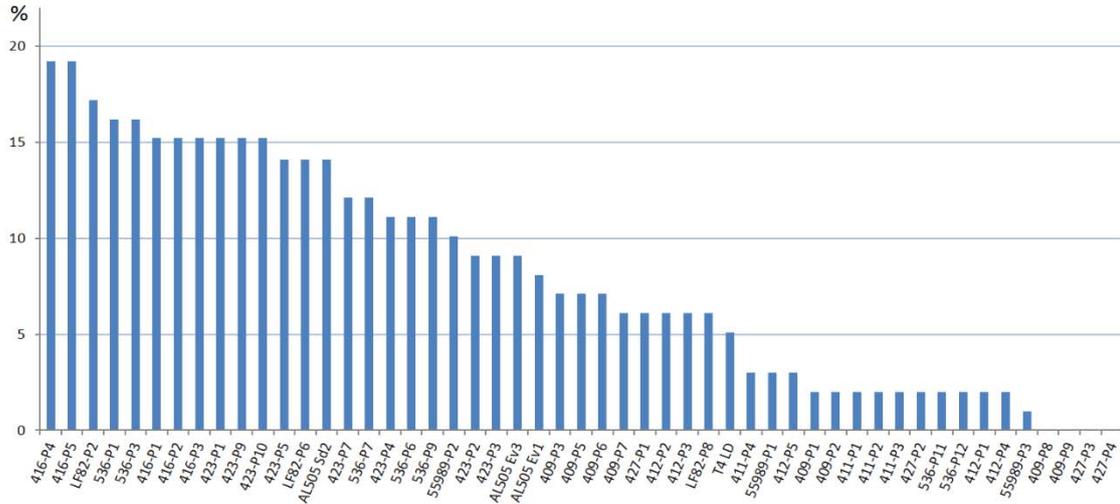


Figure 21. Pourcentage de souches lysées par chacun des bactériophages testés. Les bactériophages (n=51) sont disposés en abscisse, classés selon leurs spectres d'hôte (du plus large à gauche vers le moins large à droite). On peut voir par exemple que le bactériophage 416-P4 est actif sur 19 % des souches testées.

B – Sensibilité des souches

Là également, la sensibilité des bactéries aux bactériophages apparaissait comme un phénomène continu et non binaire, n'autorisant pas une dichotomisation exclusive entre souches très sensibles et très résistantes. Soixante-cinq pourcent des souches testées étaient couvertes par au moins un bactériophage et trente-cinq souches étaient totalement résistantes aux bactériophages testés (**Figure 22**).

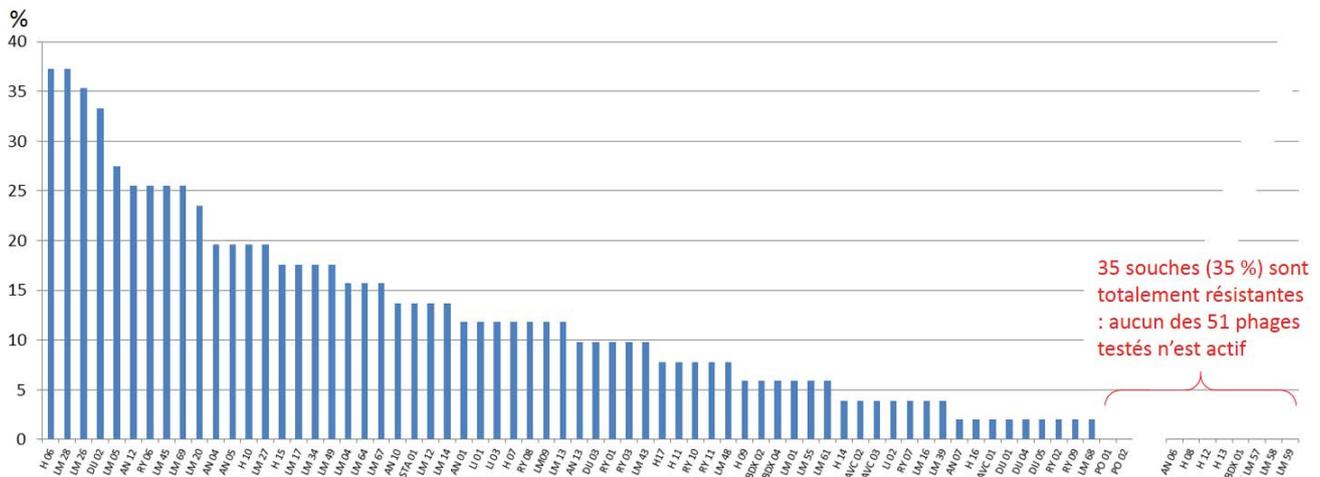


Figure 22. Pourcentage de bactériophages actifs pour une souche donnée. Les souches (n=99) sont disposées en abscisse, classées de la plus fréquemment lysée (à gauche) à la plus résistante (à droite).

Une étude comparative des caractéristiques phénotypiques des souches pan-résistantes aux bactériophages *versus* souches sensibles à au moins un bactériophage a été réalisée. Aucun lien significatif n'existait entre la résistance des souches aux virus et leur niveau d'antibiorésistance, de même que leur contenu en facteur de virulence. Seule une asymétrie de répartition était notée dans les phylogroupes respectifs : le phylogroupe D était significativement plus représenté parmi les souches pan-résistantes ($p < 0,01$), cf. **Figure 23**. Cette constatation pouvait éventuellement être expliquée par le fait que les souches hôtes ayant servi à l'isolement des bactériophages testés contre cette collection étaient essentiellement des souches de phylogroupe B2 (n=6) et plus rarement B1 (n=1), A (n=2) ou D (n=1).

Dans la suite de ces résultats, de nouveaux bactériophages ont été isolés contre ces souches résistantes, en utilisant notamment des souches de phylogroupe D.

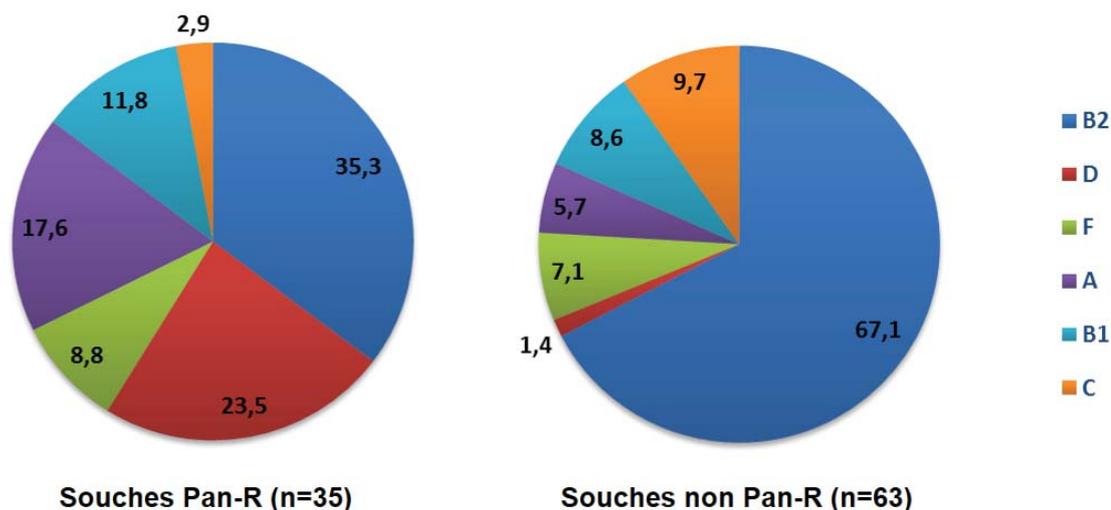


Figure 23. Répartition des phylogroupes (%) au sein des 35 souches pan-résistantes aux bactériophages testés (Pan-R) et des souches restantes (non Pan-R).

III – Collection ECoPAVM III

Cette 3^e collection, comportant 196 nouvelles souches, a été testée en modifiant encore la composition des bactériophages afin de l’optimiser : ont été retirés les bactériophages les moins efficaces (n=3) et ajoutés ceux isolés secondairement à partir des souches pan-résistantes décrites plus haut (n=14). D’autres virus ciblant notamment des souches AIEC impliquées dans la maladie de Crohn ont également été ajoutés (n=8). Ainsi, 71 bactériophages ont été testés selon la même méthodologie que précédemment.

A – *Spectre d’hôte des bactériophages*

Par comparaison avec le précédent test (collection ECoPAVM II), on constate une plus grande efficacité du groupe de tête arbitrairement limité aux 10 phages les plus efficaces : ceux-ci étaient ici globalement actifs sur plus de 30 % des souches, comparés à seulement 15 % environ sur la collection précédente (**Figure 24 et 25**).

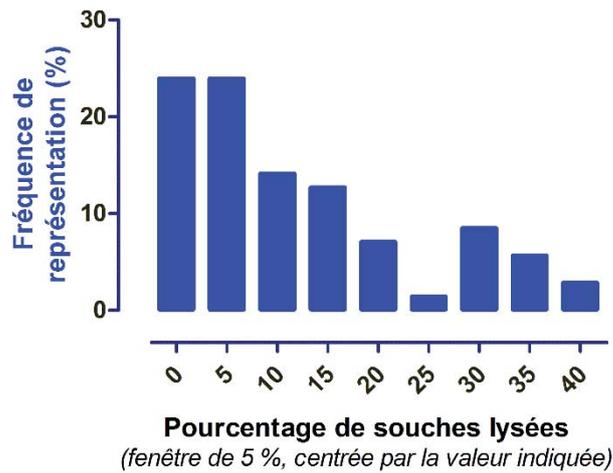


Figure 24. Distribution en fréquence de l’activité des bactériophages sur la collection ECoPAVM III. Interprétation : la catégorie des virus lysant entre 32,5 et 37,5 % des souches était représentée à hauteur de 5 %.

Si on s’intéresse aux bactériophages les moins actifs, arbitrairement définis comme tels s’ils lysent $\leq 5\%$ des souches testées, on constate que sur les 18 bactériophages concernés par cette définition lors du test ECoPAVM II, 13 de ces virus (72 %) sont retrouvés dans la liste de queue du test ECoPAVM III.

Lorsqu’on se focalise sur les résultats obtenus avec les bactériophages secondairement isolés à l’issu du test ECoPAVM II, on constate des résultats mitigés : 7 bactériophages parmi les 14 isolés sont retrouvés parmi les virus les

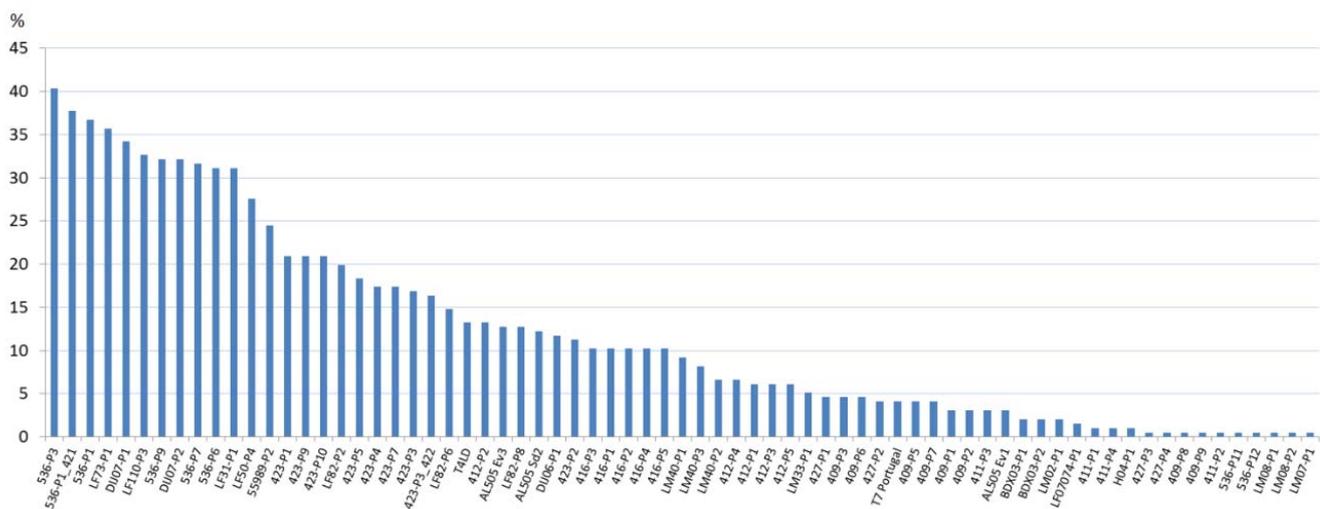


Figure 25. Pourcentage de souches lysées par chacun des bactériophages testés. Les bactériophages (n=71) sont disposés en abscisse, classés selon leurs spectres d’hôte (du plus large à gauche vers le moins large à droite). On peut voir par exemple que le bactériophage 536-P3 est actif sur 40 % des souches testées.

moins actifs (lysant $\leq 5\%$ des souches) alors que 2 bactériophages (DIJ07-P1 et DIJ07-P2) sont retrouvés dans le groupe des virus les plus actifs. De façon intéressante, ces deux bactériophages, isolés grâce à une souche de phylogroupe D, ne couvraient pas plus de souches de ce phylogroupe que la moyenne des autres bactériophages.

B – *Sensibilité des souches*

Le même type de résultats que celui retrouvé avec la collection ECoPAVM II a été observé (une représentation graphique n'est pas fournie car rendue non lisible par le nombre important de souches testées ; la **Figure 29**, page 143, peut néanmoins être consultée pour avoir une idée des résultats). La sensibilité des souches présentait également une distribution régulière, allant progressivement de la grande sensibilité (une souche est lysée par 41 des 71 bactériophages) à la pan-résistance. Sur les 196 souches testées, 162 (83 %) étaient sensibles à au moins un des 71 bactériophages testés et 34 (17 %) étaient résistantes à tous les bactériophages.

IV – **Recherche d'un effet lié au service émetteur concernant la sensibilité aux bactériophages des souches collectées**

Treize services de réanimation répartis sur le territoire français ont fourni les différentes souches des collections testées plus haut. Une des questions posées était de savoir si l'écologie locale de ces services et des patients qui y sont hospitalisés pouvait constituer des facteurs susceptibles d'influencer le phénotype de sensibilités aux bactériophages des isolats récupérés. Sur ces 13 services, 5 ont été retirés de l'analyse car ayant fourni un nombre de souche inférieur à 10. L'analyse a porté sur les résultats obtenus à partir des collections ECoPAVM II et III.

On constatait une certaine homogénéité entre les centres (**Figure 26**) avec une médiane de 5 (1,0 ; 12,0) bactériophages actifs par souche sur la totalité des centres. Aucune différence significative n'était retrouvée entre les centres ($p = 0,15$).

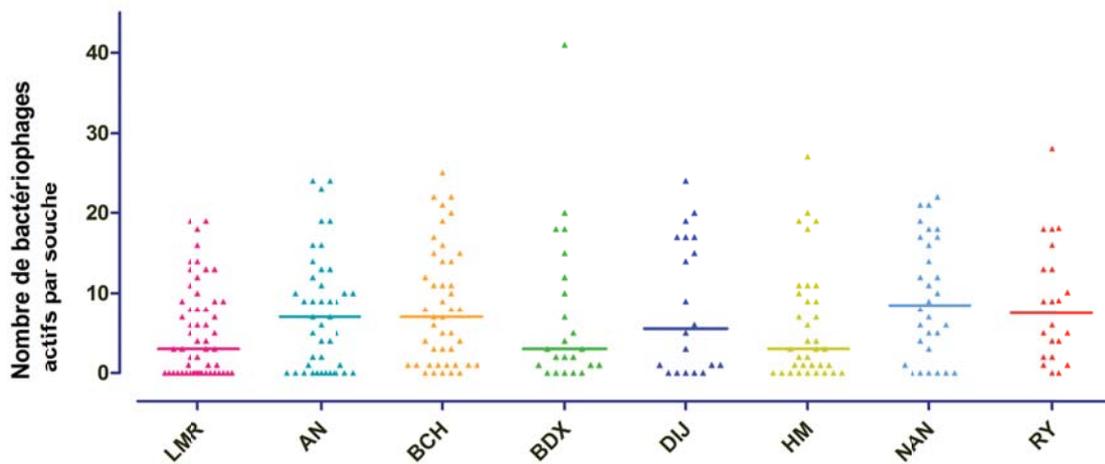


Figure 26. Répartition des souches (n=272) selon leur sensibilité aux bactériophages et leur provenance. Chaque triangle est une souche dont la position en ordonnée est déterminée par le nombre de fois où elle est lysée par un bactériophage. La barre horizontale représente la médiane. LMR : CHU Louis Mourier (Colombes), AN : CHU d’Angers, BCH : CHU Bichat (Paris), BDX : CHU de Bordeaux, DIJ : CHU de Dijon, HM : CHU Henri-Mondor (Créteil), NAN : CHU de Nantes, RY : centre hospitalier départemental de La Roche-sur-Yon.

Le nombre de souches pan-résistantes aux bactériophages était en moyenne de 21 ± 8 % sur l’ensemble des centres, avec une répartition par centre présentée sur la **Figure 27**.

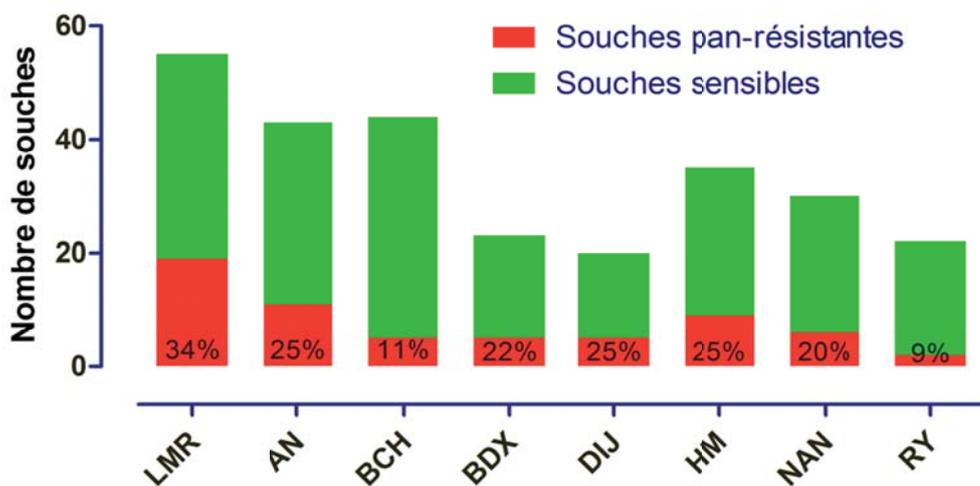


Figure 27. Nombre de souches fournies par chaque centre et proportion de souches pan-résistantes. Le nombre total de souches (rouge + vert) est divisé en souches pan-résistantes (la proportion est indiquée) et en souches sensibles à au moins un bactériophage.

Section 2 – Évaluation de l'efficacité des bactériophages isolés

I – Évaluation de l'efficacité à former des plages de lyses sur les souches sensibles (EOP)

De façon rétrospective (depuis le début du travail de thèse), toutes les EOP calculées impliquant un bactériophage (faisant partie de la collection isolée dans ce travail) et une souche issue des collections ECoPAVM ont été récupérées (cahiers de laboratoire, fichiers divers, etc.). Cent vingt-quatre déterminations non redondantes d'EOP ont ainsi été récupérées, impliquant au total 34 bactériophages différents et 29 hôtes secondaires. La répartition des valeurs d'EOP, présentée **Figure 28**, montrait une distribution globalement losangique avec une médiane à 0,8 (0,2 ; 1,8). Soixante-dix-neuf pourcent des valeurs d'EOP se situaient entre 0,1 et 10.

Ces résultats indiquent que la grande majorité des bactériophages isolés présente, sur des souches autres que celles ayant permis leur isolement, une activité d'un niveau très proche de celle exercée sur les souches hôtes. Le risque d'avoir un bactériophage peu efficace (défini arbitrairement comme présentant une $EOP < 0,1$) est seulement de 15 %.

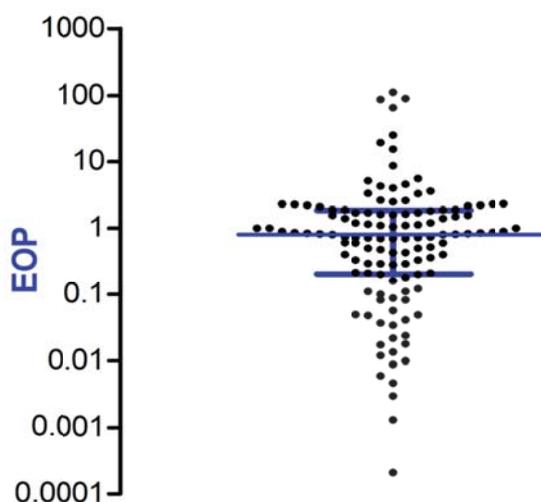


Figure 28. Répartition de 124 EOP de différents bactériophages ciblant des souches d'*E. coli* issus des collections ECoPAVM. La barre centrale représente la médiane accompagnée au-dessus et en-dessous des valeurs des 25^e et 75^e percentiles. Ordonnée en échelle logarithmique.

II – Recherche de la combinaison de bactériophages offrant le meilleur spectre d'hôte

Le nombre de bactéries lysées par un bactériophage est un paramètre important pour déterminer les meilleurs candidats mais il ne préjuge pas du spectre d'hôte de ces candidats. Autrement dit, dans une optique thérapeutique, la combinaison de 5 bactériophages donnés présentant un très large spectre d'hôte mais un très fort degré de redondance (chevauchement) n'est pas garant d'une couverture optimale. On préférera l'association de bactériophages possédant des spectres individuels éventuellement plus étroits mais ne présentant pas de redondance marquée, garantissant au final une couverture plus large de la diversité bactérienne.

À partir des résultats obtenus lors des tests effectués sur la collection ECoPAVM III, nous avons déterminé la combinaison de bactériophages permettant l'obtention de la couverture bactérienne la plus large possible, tout en cherchant à restreindre au maximum le nombre de virus nécessaire. Pour ce faire, les bactériophages ont tout d'abord été classés en ordonnée (**Figure 29**) selon leur efficacité (nombre de souches lysées), du plus efficace (en haut) vers le moins efficace (en bas). À partir de ce premier classement inamovible, les souches ont été classées successivement et conditionnellement : pour un bactériophage donné, les bactéries sont regroupées selon leur sensibilité à ce bactériophage, sur une même ligne (exemple de la 1^{re} ligne du haut). Puis le même tri est opéré avec la seconde ligne mais sans que celui-ci ne puisse modifier le classement préalablement établi à la première ligne en termes de répartition sensible/résistant (des permutations peuvent néanmoins intervenir au sein des groupes sensibles ou résistants), et ainsi de suite. Ce système permet de mettre en évidence les couvertures de chaque bactériophage par regroupement des souches selon leur profil de sensibilité/résistance.

Ainsi, lorsqu'on analyse les 3 premières lignes (les 3 bactériophages les plus actifs), on constate une redondance de spectre puisque les bactéries couvertes sont les mêmes à quelques unités près. La 4^e ligne met par contre en évidence un bactériophage capable de couvrir un nombre important de souches non prises en charge par les 3 premiers bactériophages, et ainsi de suite.

L'illustration du gain de couverture obtenu par l'implémentation successive de bactériophages (et ses limites) au sein d'un cocktail est donnée dans le **Tableau 10**.

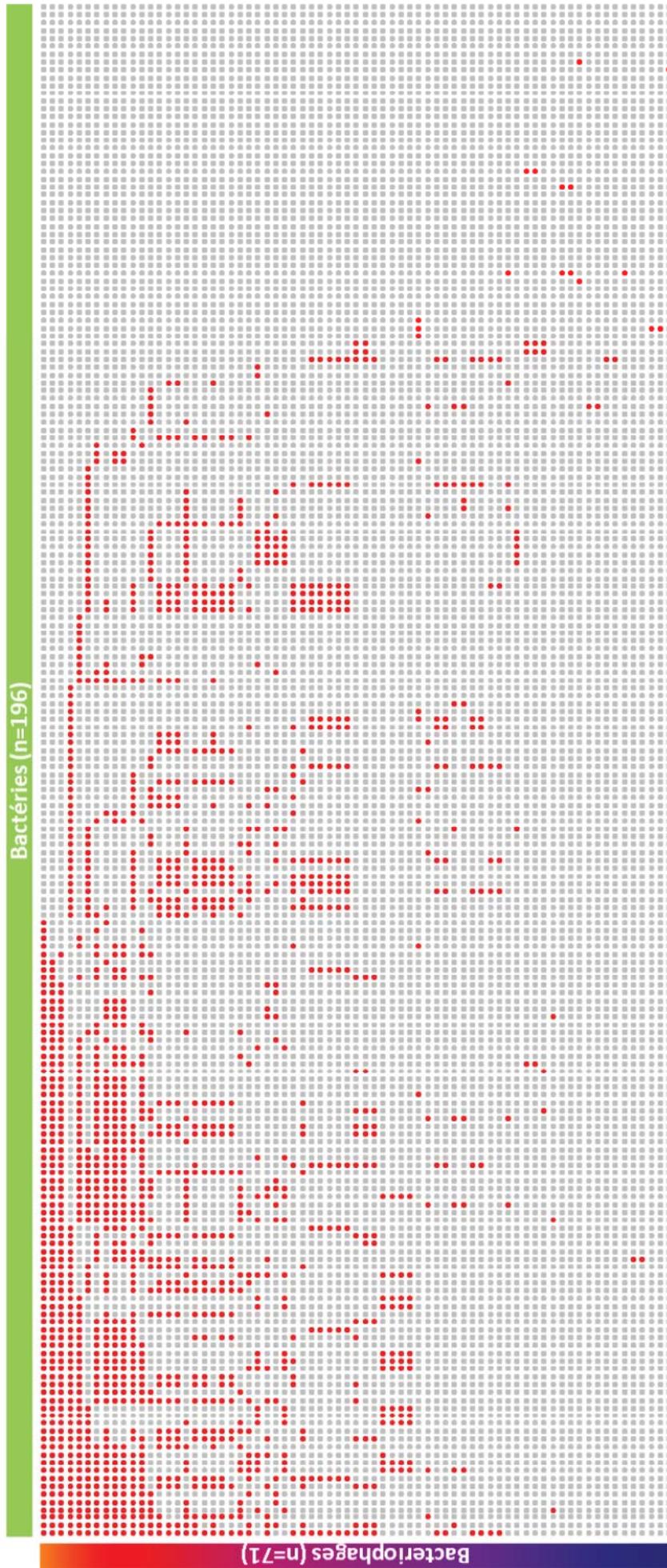


Figure 29. Représentation graphique des résultats obtenus en testant 71 bactériophages contre la collection ECoPVM III (196 souches). Chaque point représente le test d'un bactériophage contre une bactérie. Ce point est rouge si la bactérie est lysée par le bactériophage. Les bactériophages sont disposés en abscisse, classés du plus actif en haut vers le moins actif en bas. Les différentes souches sont disposées en ordonnée suivant un classement conditionnel (cf. explication dans le texte).

Par cette méthode, il a été ainsi possible de définir une combinaison de 5 bactériophages assurant une couverture de 72 % de la collection.

	Bactériophage	Classement ECoPAVM III	Nombre de souches lysées par bactériophage	Couverture cumulée	
				absolue (n)	relative (%)
1	536-P3	1 ^{er}	78	79	40,3
2	LF73-P1	4 ^e	69	109	55,6
3	DIJ07-P1	6 ^e	67	118	60,2
4	LF110-P3	7 ^e	64	137	69,9
5	55989-P2	13 ^e	47	142	72,4
6	LM40-P1	36 ^e	17	145	73,9
7	LM33-P1	43 ^e	9	148	75,5

Tableau 10. Représentation des conséquences de l'ajout successif des bactériophages les plus actifs (tels que définis dans le texte) sur la couverture cumulée globale des souches de la collection ECoPAVM III. On constate un gain très modeste lors de l'ajout des derniers bactériophages, faisant limiter arbitrairement ce tableau à 7 candidats.

III – Test du cocktail de 5 bactériophages sur la collection ECoPAVM I et II

Afin de valider la couverture obtenue par cette association fixe de 5 bactériophages, nous l'avons testée sur l'ensemble des souches de la collection ECoPAVM I et II, selon les mêmes modalités, à deux concentrations différentes (où chaque bactériophage présente respectivement un titre unitaire de 10^7 et 10^5 pfu/mL au sein du cocktail, correspondant à des dépôts de 10^4 et 10^2 pfu environ).

Ainsi, 80 souches sur les 120 testées ont été lysées par ce cocktail, réalisant une couverture de 66 %. En sommant l'ensemble des résultats obtenus sur les 3 collections (ECoPAVM I, II et III), nous obtenons une couverture globale de 69 %.

IV – Recherche d'une interaction négative ou positive *in vitro* lors de l'association de plusieurs bactériophages en cocktail

Le propos était ici d'analyser si l'utilisation simultanée de plusieurs bactériophages sur une unique cible pouvait être à l'origine d'un phénomène de compétition (inhibition réciproque) ou de potentialisation (synergie).

La méthodologie précise est décrite dans le chapitre matériel et méthodes (page 122). Sept bactériophages ont été assemblés à iso-concentration pour constituer un cocktail qui a été séquentiellement titré sur les souches hôtes de chacun de ces phages (n=7) et également sur les autres souches de la collection ECoPAVM I (n=13) sensibles à au moins un de ces bactériophages. Les titres obtenus ont été comparés avec ceux fournis par la solution mère avant assemblage en cocktail (**Tableau 11**).

L'analyse a concerné un total de 20 souches (les 7 souches hôtes des 7 bactériophages sélectionnés et 13 hôtes secondaires). Pour les hôtes secondaires, si plusieurs bactériophages du cocktail présentaient une activité, celui le plus efficace (basé sur son EOP) a été retenu pour la réalisation des tests.

Les résultats individuels ainsi que l'activité normalisée du cocktail (A_{co}) par rapport au bactériophage le plus efficace sur la souche testée sont résumés dans le **Tableau 11**.

Toutes souches confondues, l'activité du cocktail était de 0,82 (0,50 ; 1,79). La distribution des valeurs d' A_{co} autour de la valeur 1 est présentée sur la **Figure 30**. On constatait des valeurs < 1 dans 60 % des cas mais avec des amplitudes inférieures à un facteur 10 (moyenne : 0,5). En revanche, dans 40 % des cas, l'activité était supérieure à 1 avec une moyenne de 3,0, signalant la synergie d'action des bactériophages lorsque plusieurs d'entre eux sont efficaces sur une souche donnée.

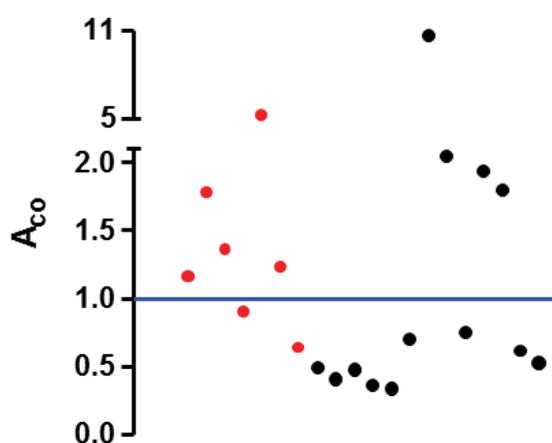


Figure 30. Répartition autour de la valeur 1 de l'activité normalisée du cocktail (A_{co}) par rapport au bactériophage le plus efficace sur la souche testée. Les points rouges représentent les valeurs obtenues avec les souches hôtes des virus composant le cocktail.

Bactérie utilisée pour la titration	Bactériophage testé : seul et en cocktail	Titre mesuré (pfu/mL)	Activité normalisée (A_{co})
416	416-P2	$4,7 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$7,8 \cdot 10^6$	1,16
536	536-P1	$2,8 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$7,0 \cdot 10^6$	1,78
411	411-P1	$1,9 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$3,8 \cdot 10^6$	1,36
423	423-P5	$1,8 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$2,3 \cdot 10^6$	0,90
412	412-P2	$3,3 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$2,4 \cdot 10^7$	5,22
427	427-P4	$2,8 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$4,8 \cdot 10^6$	1,23
409	409-P6	$1,8 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$1,7 \cdot 10^7$	0,64
413	412-P2	$5,3 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$3,8 \cdot 10^6$	0,49
414	536-P1	$7,3 \cdot 10^6$	
	Cocktail	$4,3 \cdot 10^5$	0,41
415	416-P2	$4,3 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$2,9 \cdot 10^6$	0,48
417	416-P2	$9,9 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$5,1 \cdot 10^6$	0,36
419	416-P2	$7,5 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$3,7 \cdot 10^6$	0,34
420	416-P2	$1,3 \cdot 10^8$	
	Cocktail	$1,3 \cdot 10^7$	0,70
421	423-P5	$1,8 \cdot 10^5$	
	Cocktail	$2,8 \cdot 10^5$	10,69
422	423-P5	$4,9 \cdot 10^6$	
	Cocktail	$1,4 \cdot 10^6$	2,05
424	423-P5	$1,2 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$1,3 \cdot 10^6$	0,75
425	423-P5	$5,4 \cdot 10^6$	
	Cocktail	$1,5 \cdot 10^6$	1,94
449	536-P1	$1,7 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$4,3 \cdot 10^6$	1,80
450	536-P1	$3,6 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$3,2 \cdot 10^6$	0,62
451	416-P2	$2,6 \cdot 10^7$	
	Cocktail	$2,0 \cdot 10^6$	0,53

Tableau 11. Résultats des titrations de différents bactériophages lorsque celles-ci sont effectuées seules ou en présence d'autre virus composant un cocktail défini. Un facteur de dilution de 7 existe entre la concentration d'un bactériophage en solution unitaire et sa concentration dans le cocktail. L'activité normalisée est calculée comme le rapport entre le titre du cocktail et le titre de la solution unitaire multiplié par le facteur de dilution. Une valeur de 1 indique une activité identique entre le phage isolé et le cocktail, une valeur > 1 une potentialisation, une valeur < 1 une inhibition. La partie supérieure du tableau (bleue) correspond aux résultats obtenus sur les souches hôtes des 7 bactériophages, la partie inférieure (grisée) sur d'autres souches de la collection ECoPAVM I.

Chapitre 2 – Phagothérapie expérimentale dans le cadre d'un modèle murin de pneumonie à *E. coli*

Au moment où ces travaux ont débuté, aucune publication ne mentionnait l'utilisation de bactériophages ciblant *Escherichia coli* en tant que pathogène pulmonaire chez l'homme. Par ailleurs, aucune étude n'avait étudié comparativement l'effet d'une antibiothérapie et d'un traitement par bactériophage sur le plan de l'évolution de la charge infectieuse pulmonaire par l'intermédiaire de la bioluminescence.

L'objectif était donc ici d'établir l'efficacité d'un traitement par bactériophages dans le cadre de pneumonies causées par deux souches cliniques hypervirulentes d'*E. coli* (la souche 536-*Lux* et la souche PDP302). L'effet d'un traitement antibiotique a été analysé simultanément pour la souche 536, de même que l'apport d'une procédure d'adaptation pour améliorer l'activité d'un bactériophage contre la souche PDP302.

Section 1 – Prérequis avant utilisation de l'outil de bioluminescence

I – Vérification de la stabilité du plasmide sans pression antibiotique

Dans le modèle infectieux utilisé, les animaux infectés avec la souche 536-*Lux* ne reçoivent pas de traitement antibiotique permettant d'exercer le maintien du plasmide porteur de l'opéron *Lux*. Il est donc nécessaire de s'assurer au préalable de la stabilité du phénotype bioluminescent de la souche en l'absence de pression antibiotique. Cette évaluation a été effectuée *in vitro* comme détaillé dans le chapitre Matériel et méthodes (page 130), par repiquage successif avec et sans antibiotique (kanamycine). La quantification du signal lumineux a été réalisée en milieu liquide (débit de lumière, **Figure 31**) et en milieu solide après étalement (proportion de colonies présentant un phénotype bioluminescent, **Figure 32**).

On constate une parfaite stabilité du phénotype bioluminescent jusqu'au 7^e jour inclus, c'est-à-dire une fenêtre suffisante pour mener à bien le protocole expérimental chez l'animal.

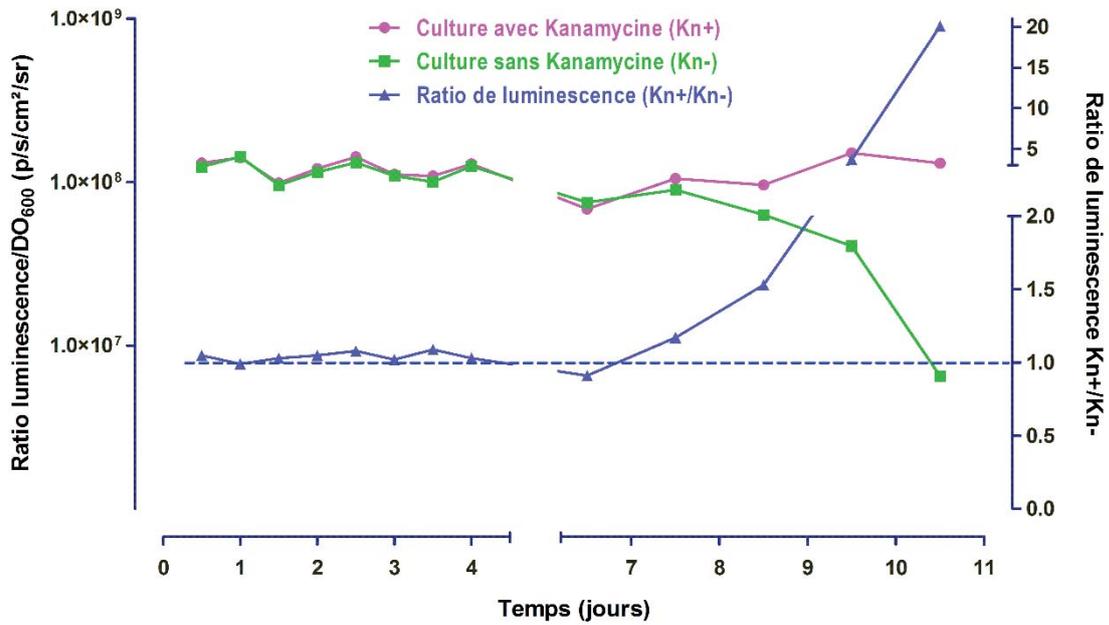


Figure 31. Évolution de la quantité de lumière produite par les cultures liquides de la souche 536-*Lux* avec et sans kanamycine, au cours du temps. L'ordonnée à gauche représente le débit de lumière normalisé et l'ordonnée à droite le ratio de ce signal dans les deux conditions.

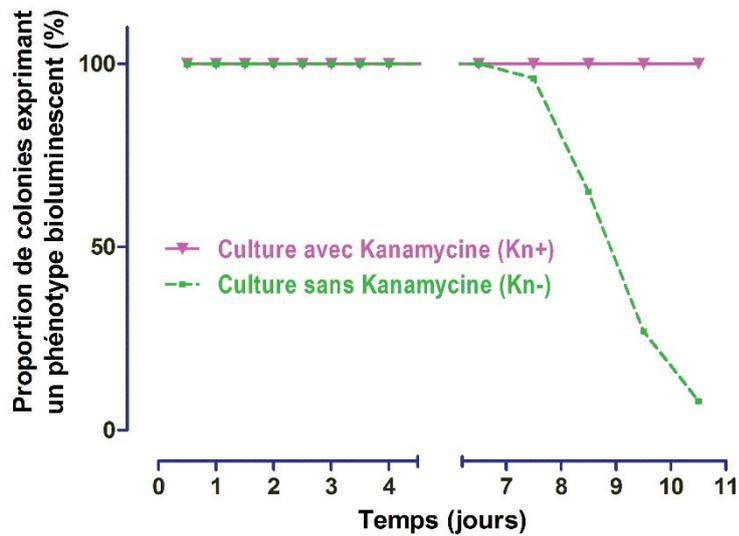


Figure 32. Pourcentage de colonies exprimant un phénotype bioluminescent au cours du temps, selon la présence ou non d'une pression antibiotique.

II – Vérification de l'absence d'impact sur la croissance et la pathogénicité de la souche

La production de lumière par la luciférase bactérienne codée par le plasmide pCM17 est un processus énergie-dépendant, dont l'approvisionnement est assuré par la bactérie. Nous avons vérifié que le port du plasmide n'occasionnait pas de défaut de croissance par rapport à la souche sauvage en suivant la densité optique à 600 nm sur 24 heures (cinétique automatisée en microplaque) : aucun défaut de croissance n'a été constaté. La pathogénicité quant à elle s'est révélée identique à celle rapportée dans la littérature.

Section 2 – Modèle murin de pneumonie utilisant la souche 536

I – Le bactériophage 536-P1

Le bactériophage utilisé est le 1^{er} bactériophage isolé grâce à la souche 536 et porte le nom de 536-P1. Il s'agit d'un *Myoviridae* (**Figure 33**) de 149,4 Kb dont le génome code pour 258 ORFs avec un contenu moyen en GC de 38,9 %. 536-P1 est retrouvé à 99 % identique sur 90 % de son génome au bactériophage phAPEC8. De façon intéressante, phAPEC8 est un virus lytique, dont l'hôte est une souche d'*E. coli* responsable de colibacillose aviaire (souche CH2, pathovar APEC) [Tsonos-2012].

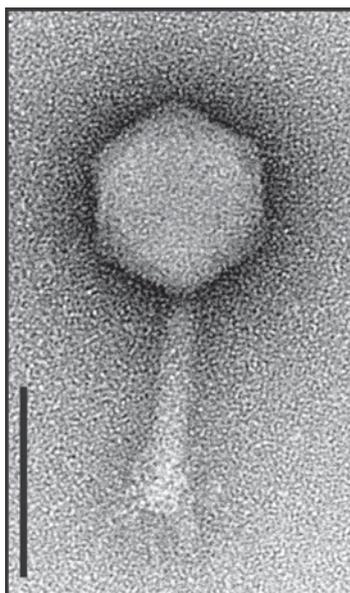


Figure 33. Le bactériophage 536-P1. La barre représente 100 nm.

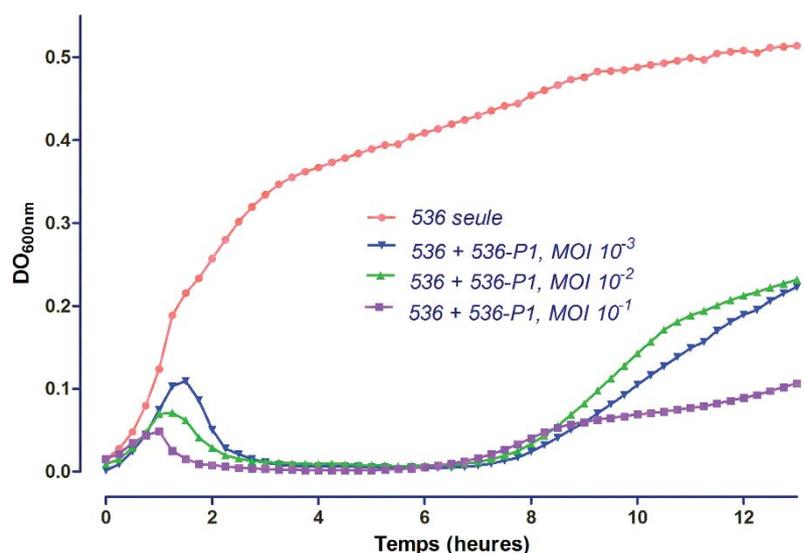


Figure 34. Cinétique de lyse de la souche 536 par le bactériophage 536-P1 à différentes multiplicités d'infection (MOI).

En cinétique de lyse *in vitro*, il s'agit d'un bactériophage qui conserve une bonne efficacité même à basse multiplicité d'infection (MOI 10^{-3}) avec une période de non croissance bactérienne atteignant quasiment 8 heures (**Figure 34**).

II – Protocole expérimental, déroulement chronologique

Le protocole est sommairement rappelé dans la **Figure 35** et détaillé page 128. L'ensemble des procédures d'infection, de traitement et d'imagerie ont été réalisées sous anesthésie. Deux inoculum différents ont été successivement utilisés (1.10^7 puis 4.10^7 cfu). Le traitement antibiotique a été évalué uniquement dans le cas de l'inoculum produisant la plus forte morbi-mortalité (4.10^7 cfu).

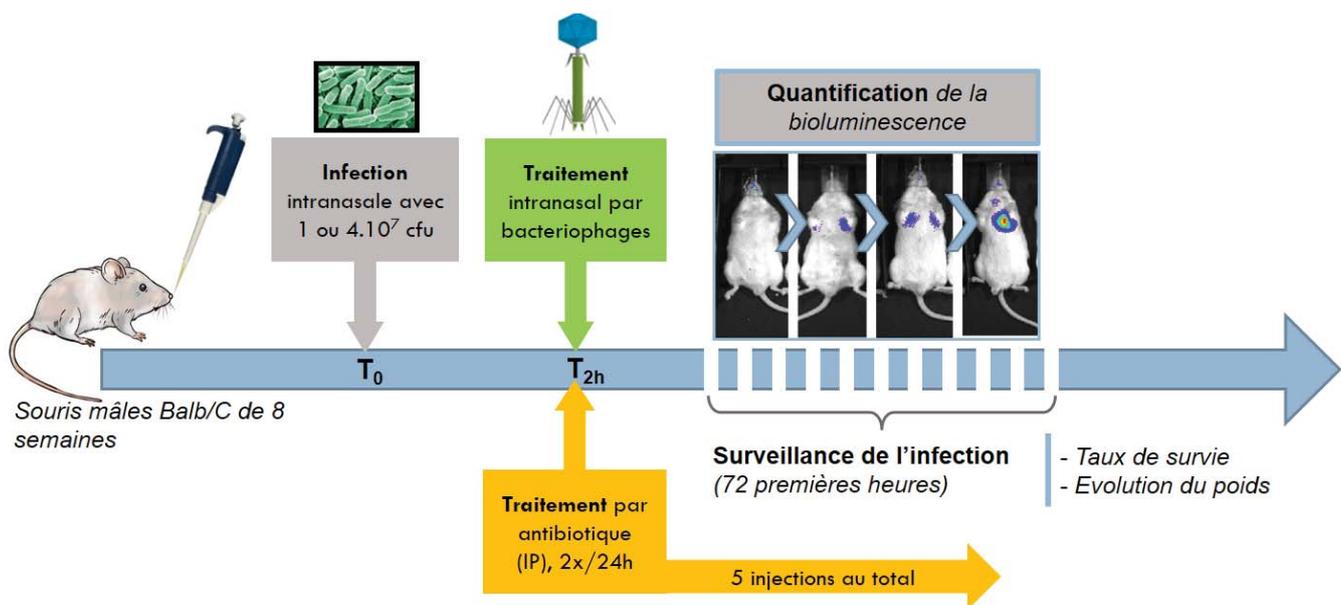


Figure 35. Protocole général utilisé pour le modèle de pneumonie. Le signal de bioluminescence est enregistré toutes les 2 heures à partir du moment où le traitement est débuté jusqu'à 8 heures post-infection puis à 24 et 48 heures post-infection. IP : intrapéritonéal, cfu : *colony-forming unit*.

III – Données obtenues avec un inoculum de 1.10^7 cfu

A – Évolution du signal de bioluminescence au cours du temps

Deux heures après l'infection, le signal a été enregistré juste avant de procéder au traitement des animaux et un regroupement homogène du signal était constaté, témoignant d'un inoculum bactérien comparable dans les deux groupes (**Figure 36**).

Dès 6 heures post-infection (c'est-à-dire 4 heures après le début du traitement), les souris traitées par le bactériophage 536-P1 (à MOI 3 ou 0,3) présentaient un signal significativement plus faible que les souris ayant reçu du PBS. Les premières souris à présenter un signal inférieur à 10^2 p/sec/cm²/sr apparaissaient 8 heures après l'infection et appartenaient au groupe traité par le bactériophage, alors qu'un tel niveau de signal n'était atteint qu'à 48 heures chez les souris contrôle (survivantes).

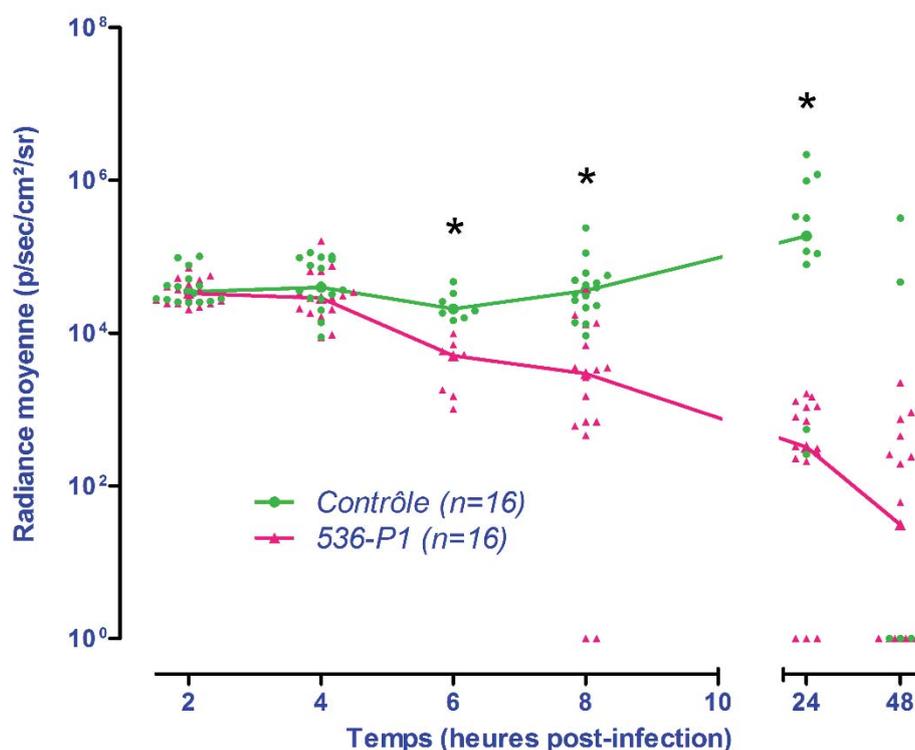


Figure 36. Evolution au cours du temps du signal de bioluminescence quantifié au niveau de l'aire thoracique, issu de 2 expériences indépendantes. Chaque point représente la valeur du signal émis par un animal infecté par 1.10^7 cfu de 536-Lux. L'évolution de la valeur médiane du signal pour chaque groupe est représentée par une ligne (celle-ci n'est pas indiquée pour le groupe contrôle à 48 heures compte tenu du nombre de souris survivantes trop faible pour être représentatif). * : $p < 0,05$ entre les deux groupes. N.B. : du fait d'un problème technique sur le système d'anesthésie à 6 heures post infection au cours d'une des expériences, le nombre de points enregistrés est réduit.

B – Mortalité et morbidité

L'inoculum de 1.10^7 cfu était responsable d'une mortalité de 75 % chez les souris non traitées (**Figure 37**). Elle était nulle chez les souris ayant reçu le traitement par le bactériophage 536-P1, quelle que soit la multiplicité d'infection employée (0,3 ou 3).

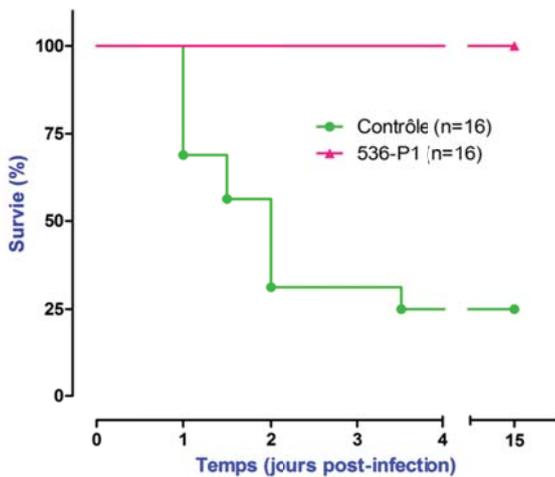


Figure 37. Survie des souris infectées avec 1.10^7 cfu de la souche 536-Lux selon les modalités thérapeutiques décrites en légende.

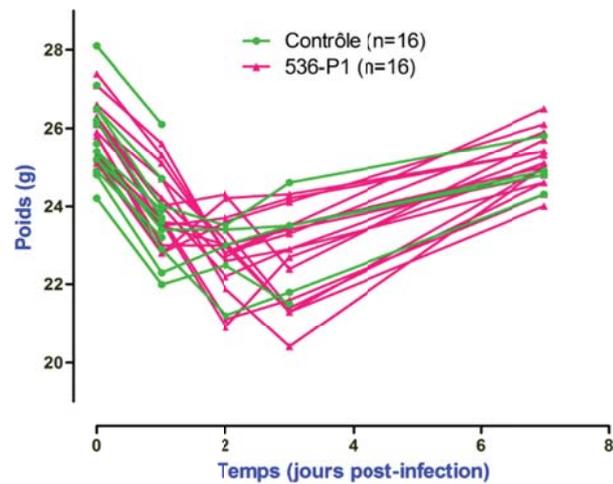


Figure 38. Evolution du poids suite à l'infection par 1.10^7 cfu de 536-Lux. L'évolution individuelle du poids de chaque animal est représentée. L'interruption d'une ligne correspond au décès de l'animal.

La morbidité a été évaluée de façon objective par une pesée régulière des animaux (**Figure 38**). Le jour de l'infection, le poids ne différait pas entre le groupe traité et le groupe contrôle (respectivement $25,9 \pm 0,7$ et $25,8 \pm 0,9$ g). La perte de poids maximum était constatée à J3 et ne différait pas non plus entre les deux groupes (respectivement -12,6 % et -11 %). Les animaux survivants présentaient par la suite une reprise de poids rapide avec compensation totale à J7 (respectivement $25,1 \pm 0,6$ et $24,9 \pm 0,6$ g).

C – Compte bactérien et viral, inflammation et cytologie

Deux autres expériences indépendantes mettant en œuvre un total de 42 animaux supplémentaires ont été réalisées pour : 1) analyser le compte bactérien et viral dans les poumons ; 2) évaluer la réponse inflammatoire pulmonaire et l'aspect cytologique

du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA). Le même protocole a été utilisé concernant les modalités d'infection et de traitement, avec un inoculum infectieux de 1.10^7 cfu et un traitement par 536-P1 à une MOI de 10.

1. Évolution du compte bactérien et de la charge virale pulmonaire

Après infection, les animaux (n=20, 4 souris par condition et temps) ont été euthanasiés à 2, 6 et 16 heures post-infection (PI) pour prélèvement des poumons et numérations sur homogénats (**Tableau 12**). Chez les animaux non traités, on constatait une baisse initiale du compte bactérien à H6 puis une ré-ascension à H16 témoignant d'une infection évolutive, corroborant les données de bioluminescence. Les animaux traités présentaient tous un titre infectieux plus faible que leurs congénères non traités, atteignant une différence supérieure à 2 unités Log_{10} à H16. Aucun bactériophage n'était retrouvé dans le groupe contrôle témoignant de l'absence de bactériophages endogènes actifs sur la souche 536-*Lux* (qui auraient pu être à l'origine d'une réduction spontanée du titre bactérien). Entre H6 et H16 PI, on observait une augmentation du titre de 536-P1 d'un facteur supérieur à 1 unité Log_{10} , témoin direct de la lyse bactérienne observée entre ces deux temps. Néanmoins, cette amplification virale n'était pas encore suffisante à H16 pour faire baisser la charge bactérienne à un niveau inférieur à celui constaté à H6.

2. Paramètres inflammatoires et cytologie du liquide de LBA

Après infection, les souris (n=16, 4 animaux par condition et temps) ont été euthanasiées à 6 et 16 heures post-infection. Un lavage broncho-alvéolaire a été réalisé dans les suites immédiates par 4 injections-aspirations successives de 500 μL de PBS froid. Un groupe d'animaux non infectés (n=6) a été utilisé comme témoin pour les observations cytologiques et la normalisation de l'activité LDH (lactate déshydrogénase, cf. ci-dessous). Le volume récupéré de fluide alvéolaire était homogène entre animaux ($1,70 \pm 0,06$ mL), autorisant la poursuite des analyses.

		2 heures PI (avant traitement)	6 heures PI		16 heures PI	
			Contrôle (PBS)	536-P1	Contrôle (PBS)	536-P1
Compte bactérien						
(cfu/g)	Médiane	1,0.10 ⁸	8,3.10 ⁶	4,3.10 ⁵ *	4,8.10 ⁸	2,4.10 ⁶ *
	IQ	(4,5.10 ⁷ ; 1,6.10 ⁸)	(5,2.10 ⁶ ; 1,0.10 ⁷)	(2,0.10 ⁵ ; 1,3.10 ⁶)	(2,1.10 ⁸ ; 5,5.10 ⁸)	(2,1.10 ⁵ ; 1,8.10 ⁷)
Compte viral						
(pfu/g)	Médiane	–	0	8,8.10 ⁸	0	1,1.10 ¹⁰ §
	IQ			(2,6.10 ⁸ ; 1,4.10 ⁹)		(2,5.10 ⁹ ; 1,5.10 ¹⁰)

Tableau 12. Évolution du compte bactérien et viral au niveau pulmonaire dans les suites de l'infection. Les données présentées sont les médianes avec leurs interquartiles (IQ : 25^e ; 75^e percentiles), exprimées en cfu ou pfu/g d'organe broyé. Les souris (n=20, 4 par conditions et temps) ont été infectées avec 1.10⁷ cfu de la souche 536-Lux et ont reçu 2 heures après l'infection un traitement par 536-P1 (MOI 10) ou du PBS. * : p < 0,05 lors de la comparaison intergroupe au même temps, § : p < 0,05 lors de la comparaison entre deux temps (H6 vs H16), PI : post-infection.

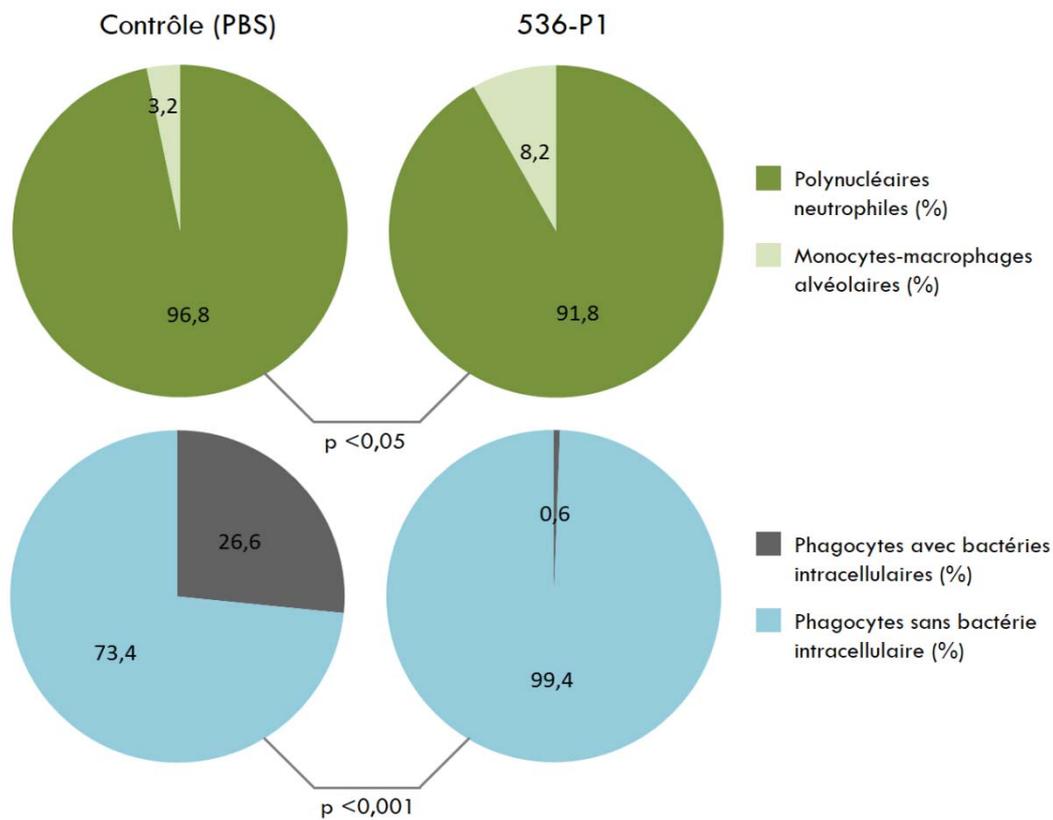


Figure 39. Analyse des observations microscopiques des liquides de LBA pratiqués 16 heures post-infection. En haut : proportion relative moyenne des polynucléaires neutrophiles et des monocytes-macrophages dans les LBA de souris contrôle (gauche) ou traitées par le bactériophage 536-P1 (droite). Les autres cellules (polynucléaires éosinophiles et lymphocytes) ont été retirées de l'analyse car < 3% sur l'ensemble des lames examinées. En bas : proportion moyenne de cellules phagocytaires (monocytes, macrophages, polynucléaires neutrophiles) contenant une ou plusieurs bactéries intracellulaires en l'absence de traitement (gauche) ou lors de l'administration du bactériophage 536-P1 (droite). Analyses effectuées sur au moins 500 cellules pour chaque animal.

L'inflammation a été analysée en étudiant des paramètres classiques validés [Matute-Bello-2011] : la mesure de la concentration leucocytaire avec compte différentiel (monocytes-macrophage et polynucléaires neutrophiles), la concentration en protéines totales (marqueur de perméabilité vasculaire), l'activité d'une enzyme intracellulaire ubiquitaire (marqueur de lyse cellulaire) et la concentration de la chemokine KC/CXCL1 (analogue murin de l'interleukine 8 chez l'homme, impliquée dans le recrutement des polynucléaires neutrophiles).

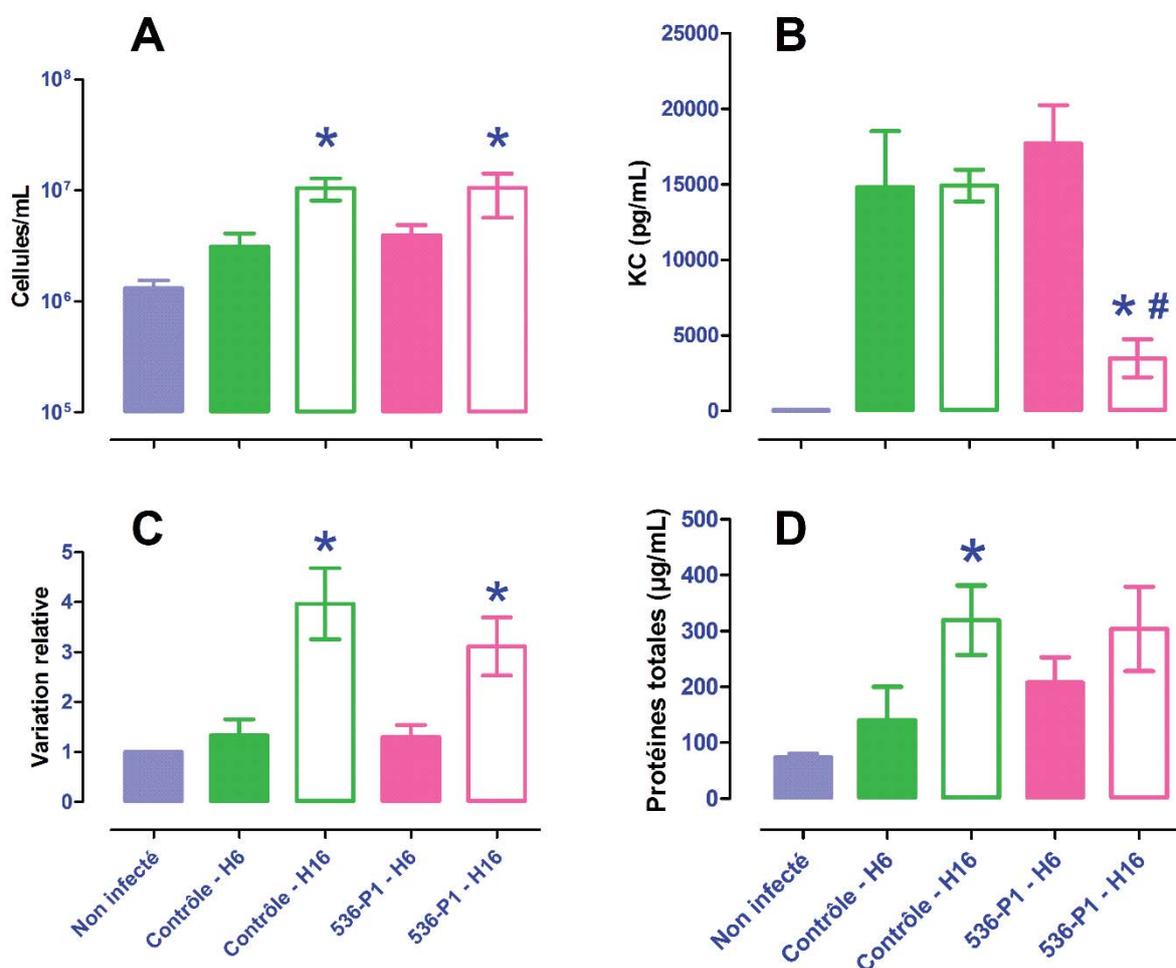


Figure 40. Analyses de différents paramètres inflammatoires 6 et 16 heures après infection, avec et sans traitement. Quatre animaux par groupe et par temps ont été utilisés. Concentrations exprimées par mL de LBA. **A** : compte leucocytaire dans le liquide de LBA (médiane et interquartile). **B** : concentration de la chemokine KC/CXCL1 (moyenne et écart type). **C** : évaluation de la cytotoxicité cellulaire par l'activité LDH (lactate déshydrogénase), comparée à la situation non infectée pour laquelle la valeur 1 est assignée (moyenne et écart type). **D** : protéines totales (moyenne et écart type). * : différence significative entre histogrammes de même couleur (comparaison H6-H16, même groupe), # : différence significative entre histogrammes de même remplissage (comparaison contrôle-PBS, même temps).

Dès 6 heures post-infection, la formule leucocytaire du liquide de LBA était totalement modifiée par rapport à la normalité (situation non infectée) avec une inversion complète du ratio polynucléaires/macrophages, témoignant de l'afflux massif de polynucléaires neutrophiles à partir du compartiment vasculaire : souris non infectées = 4,2/95,8 %, souris infectées = 92,7/7,3 %. Un exemple d'observation est fourni plus loin (**Figure 41**).

A 16 heures post-infection, les observations microscopiques ont révélé deux données pertinentes (**Figure 39 et 41**) :

- Alors que le compte leucocytaire n'était pas différent entre les deux groupes (**Figure 40**), la proportion de polynucléaires neutrophiles apparaissait plus faible dans les liquides de LBA des animaux traités par le bactériophage 536-P1 comparé aux contrôles ($91,8 \pm 4,8$ % et $96,8 \pm 1,8$ % respectivement, $p < 0,05$). Ces proportions étaient identiques dans les deux groupes à 6 heures post-infection.
- La présence de bactéries intracellulaires au sein des cellules phagocytaires était quasi nulle chez les animaux ayant reçu le traitement par le bactériophage ($0,6 \pm 0,2$ %) alors qu'elle était observée dans $26,6 \pm 6,8$ % des phagocytes chez les animaux non traités (**Figure 39**).

Le taux de protéines totales dans le liquide de LBA n'était pas différent entre les deux groupes à H6 comme à H16 mais une augmentation au cours du temps était observée, témoignant d'une situation lésionnelle persistante à H16 (**Figure 40, D**).

L'activité LDH n'était pas non plus différente entre les deux groupes même si celle-ci tendait à être plus faible chez les animaux traités par 536-P1 ($p = 0,11$; **Figure 40, C**).

Enfin, la concentration de la cytokine KC était significativement plus faible à H16 chez les animaux traités par rapport aux animaux contrôle (3487 ± 1264 vs 14927 ± 1044 pg/mL respectivement ; **Figure 40, B**), ce qui était en accord avec les observations cytologiques montrant une diminution de la proportion de polynucléaires neutrophiles.

Non infecté

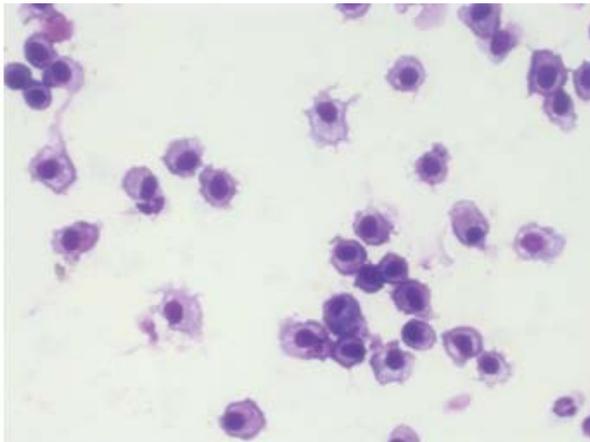
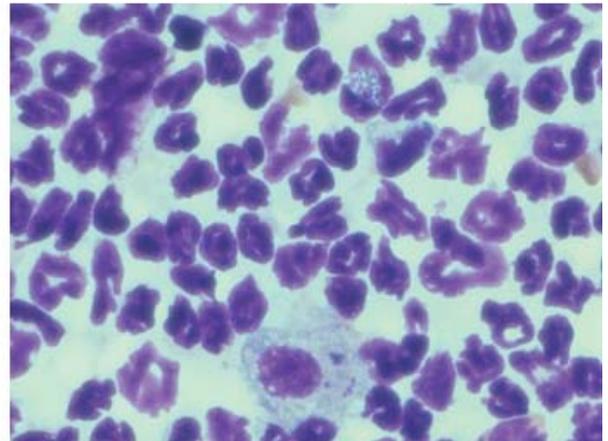
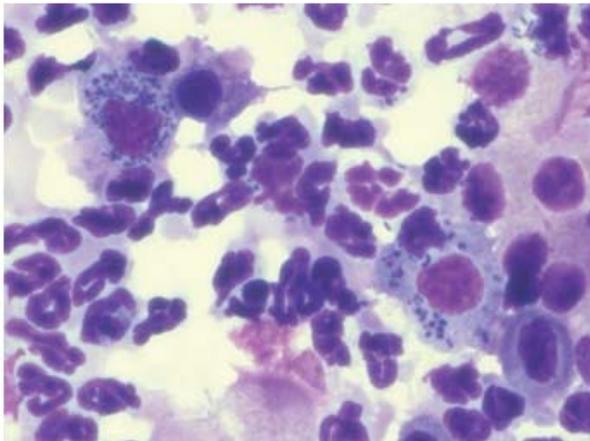


Figure 41. Examens cytologiques des liquides de lavage broncho-alvéolaire. Exemples d'observation chez un animal non infecté (ci-contre, objectif x40) et chez des animaux infectés (ci-dessous, objectif x100) traités ou non par le bactériophage 536-P1. Coloration de type May-Grünwald Giemsa. A H16 post-infection, on distingue encore des bactéries intracellulaires phagocytées chez les animaux contrôle alors qu'elles sont exceptionnelles chez les animaux traités.

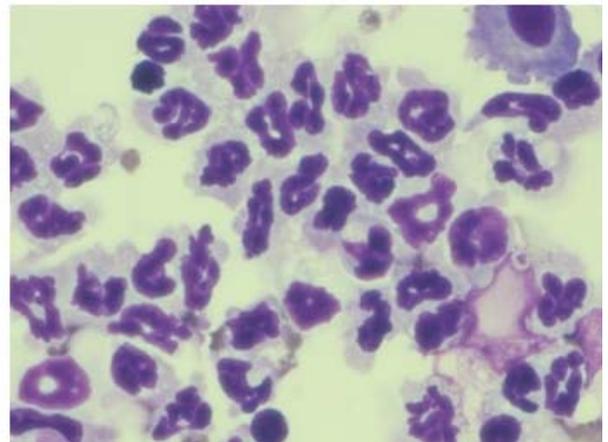
Contrôle

536-P1

**H6
PI**



**H16
PI**



IV – Données obtenues avec un inoculum de 4.10^7 cfu

Dans ce jeu de données expérimentales, un bras thérapeutique par antibiotique (ceftriaxone) a été ajouté et l'inoculum a été multiplié par un facteur 4 par rapport aux expériences précédentes. Le but était de se placer dans des conditions plus drastiques en termes de morbi-mortalité, de façon à tester l'efficacité du bactériophage 536-P1 comparativement à celle de la ceftriaxone dans les conditions les plus compétitives. Le traitement par 536-P1 a été donné à une MOI de 3.

La ceftriaxone (céphalosporine de 3^e génération) a été utilisée à la dose de 50 mg/kg (200 μ L, solvant : sérum physiologique) toutes les 12 heures (5 injections au total) par voie intrapéritonéale. Parallèlement, les autres animaux (contrôles et traités par 536-P1) recevaient 200 μ L de sérum physiologique. Afin d'établir une comparaison juste, la ceftriaxone a été choisie comme comparateur (traitement de référence) car il s'agit d'un antibiotique possédant des caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques de référence : la demi-vie de la molécule autorise une injection toutes les 12 heures, la molécule est hautement active sur la souche 536 (concentration minimale inhibitrice < 0,03 mg/L) et présente une excellente diffusion tissulaire pulmonaire [Martin-1992]. Nous avons volontairement utilisé des posologies élevées de cet antibiotique afin de ne pas induire de biais d'efficacité et ainsi favoriser le traitement par le bactériophage.

A – *Evolution du signal de bioluminescence au cours du temps*

Le même schéma évolutif que celui décrit précédemment a été retrouvé. Lorsque comparée à celle obtenue avec la ceftriaxone, la cinétique de décroissance du signal de bioluminescence des animaux traités par 536-P1 était strictement superposable (**Figure 42**).

B – *Mortalité et morbidité*

L'inoculum de 4.10^7 cfu était responsable d'une mortalité plus rapide que celle observée avec l'inoculum précédent et atteignant 100 % chez les souris non traitées. Elle était nulle chez les souris ayant reçu le traitement par le bactériophage 536-P1 ou l'antibiothérapie (**Figure 43**).

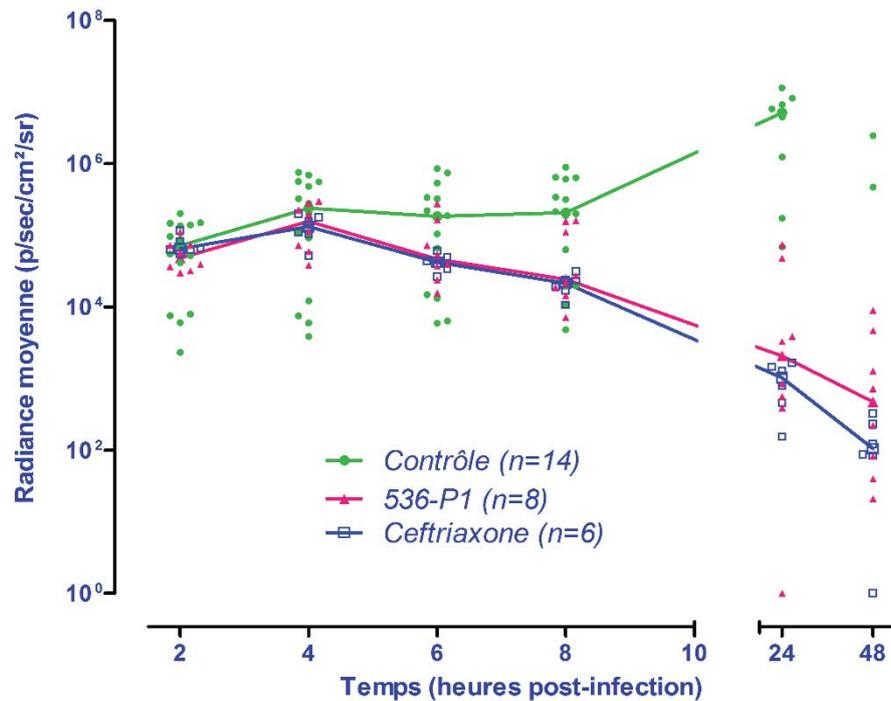


Figure 42. Evolution au cours du temps du signal de bioluminescence quantifié au niveau de l'aire thoracique, issu de 2 expériences indépendantes. Chaque point représente la valeur du signal émis par un animal infecté avec 4.10^7 cfu de 536-Lux. L'évolution de la valeur médiane du signal pour chaque groupe est représentée par une ligne (celle-ci n'est pas indiquée pour le groupe contrôle à 48 heures compte tenu du nombre de souris survivantes trop faible pour être représentatif).

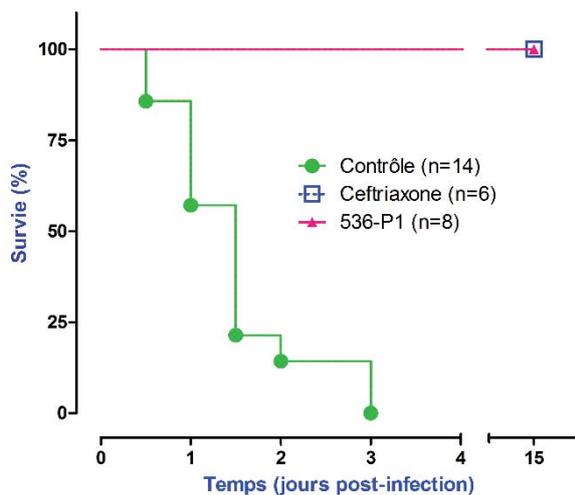


Figure 43. Survie des souris infectées avec 4.10^7 cfu de la souche 536-Lux selon les modalités thérapeutiques décrites en légende.

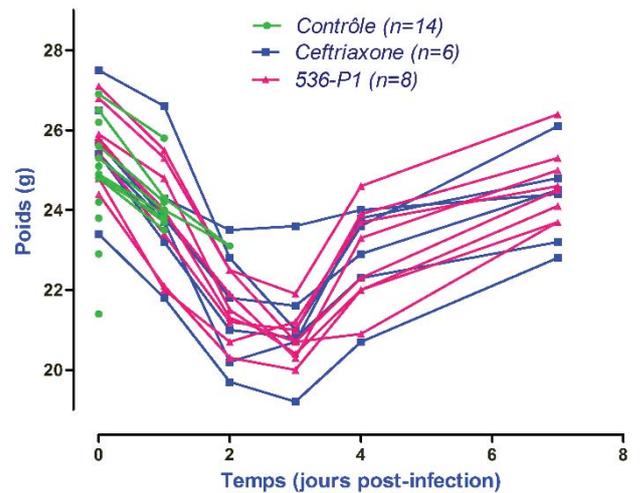


Figure 44. Évolution du poids dans les suites de l'infection par 4.10^7 cfu de 536-Lux. L'évolution individuelle du poids de chaque animal est représentée. L'interruption d'une ligne correspond au décès de l'animal.

L'évolution du poids a été surveillée et la perte de poids maximale également observée à J3 (**Figure 44**). Cependant, comparée au jeu de données obtenues avec un inoculum 4 fois inférieur et basé sur les poids des animaux traités uniquement (seuls survivants), cette perte de poids était significativement plus importante que celle enregistrée avec l'inoculum plus faible ($-18,5 \pm 0,8 \%$, $p < 0,001$). Elle n'était pas différente entre les animaux traités par la ceftriaxone ou le bactériophage.

Section 3 – Modèle de pneumonie utilisant la souche PDP302

I – Souche, bactériophages et adaptation

La souche clinique PDP302, responsable de PAVM chez un patient de réanimation, a été choisie pour deux raisons : il s'agit d'une souche virulente pathogène chez la souris et nous disposons d'un bactériophage actif *in vitro* sur cette souche. Le même protocole expérimental que celui précédemment décrit a été utilisé. L'inoculum a été de $1,5 \cdot 10^7$ cfu de la souche PDP302.

Le bactériophage 536-P7 a été utilisé comme agent thérapeutique, à une MOI de 10. Il s'agit également d'un *Myoviridae* (**Figure 45**), isolé avec la souche 536, dont le plus proche homologue (98 % d'identité sur 93 % du génome) est le bactériophage phi92 [Kwiatkowski-1983]. L'EOP de ce bactériophage sur la souche PDP302 est de 1.

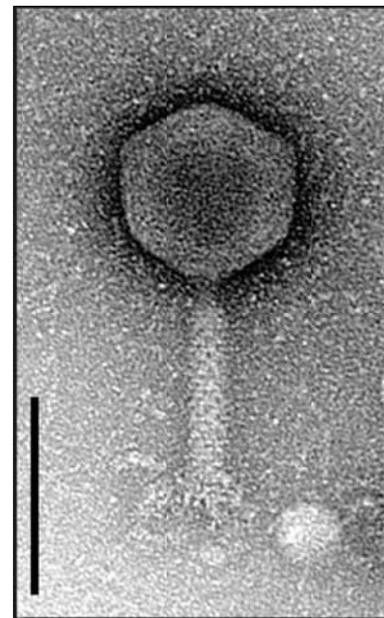


Figure 45. Le bactériophage 536-P7. La barre noire représente 100 nm.

Pour améliorer son activité *in vivo*, 536-P7 a fait l'objet d'une adaptation *in vitro* sur la souche PDP302. Le virus issu de cette adaptation (536-P7-PDP302) a ensuite été utilisé dans le modèle animal pour juger des effets *in vivo*, à la même dose (MOI de 10).

II – Mortalité

En l'absence de traitement, la survie était de 11 %. Elle n'était pas significativement différente lors du traitement par le bactériophage 536-P7 (20 %), signant une activité *in vivo* insuffisante pour conduire à un changement de mortalité (**Figure 46**).

En revanche, l'administration du bactériophage adapté 536-P7-PDP302 s'accompagnait d'une restauration de la survie, atteignant 75 % ($p = 0,005$).

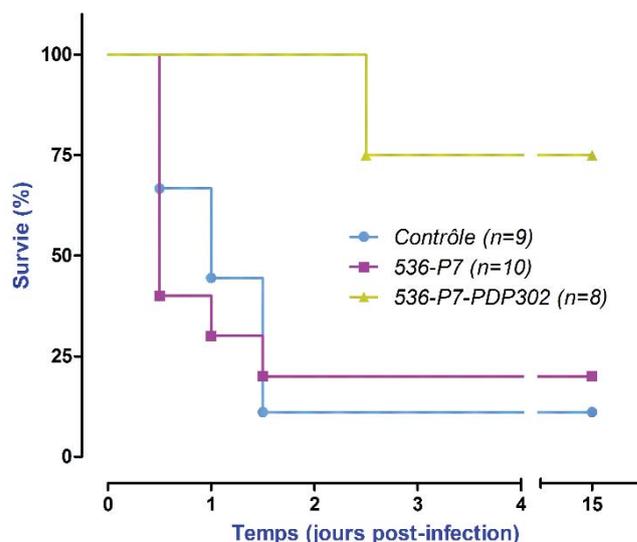


Figure 46. Survie des souris infectées avec $1,5 \cdot 10^7$ cfu de la souche PDP302 selon les modalités thérapeutiques décrites en légende.

III – Modification de l'activité *in vitro*

Nous avons comparé l'efficacité du bactériophage adapté (536-P7-PDP302) et son ancêtre (536-P7) lors d'une cinétique de lyse de la souche PDP302. Ces cinétiques ont été répétées 4 fois indépendamment. Un des paramètres critiques de cette approche étant d'obtenir des solutions de bactériophages à iso-concentration (pour ne pas induire de déséquilibre entre bactériophage natif et adapté), le titre de chaque solution a été vérifié : la différence moyenne (536-P7 – 536-P7-PDP302) était de $+0,06 \pm 0,17$ pfu/mL (unité Log_{10}) et la moyenne des différences absolues de $0,11 \pm 0,13$ pfu/mL, témoignant de l'absence d'excès du bactériophage adapté dans les conditions expérimentales.

Sur les 4 expériences indépendantes, les courbes générées en présence du bactériophage adapté était systématiquement en dessous de celle du bactériophage natif, témoignant d'une activité lytique supérieure (**Figure 47**). En analysant les aires sous les courbes de 0 à 6 heures des 4 répliques, celles générées par le bactériophage adapté tendait à être plus faible que celles générées par le bactériophage natif (respectivement $0,76 \pm 0,11$ et $1,10 \pm 0,09$ DO/heure, $p = 0,056$).

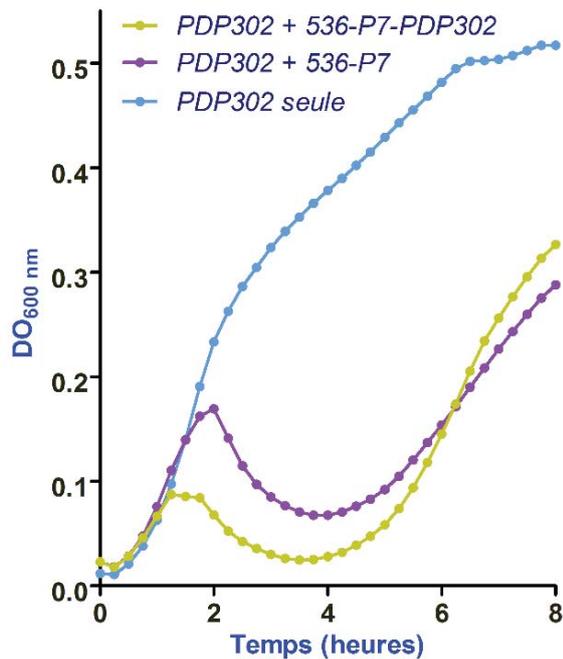


Figure 47. Cinétique de lyse du bactériophage 536-P7 (natif) et 536-P7-PDP302 (adapté) sur la souche PDP302. Exemple de courbes obtenues avec une multiplicité d'infection de 10^{-2} . Chaque point représente la moyenne de 3 réplicats (les écart-types ne sont pas figurés pour plus de lisibilité).

A contrario, l'efficacité à former des plages de lyse (EOP) du bactériophage adapté sur la souche PDP302 était de 1, sans amélioration par rapport au clone ancestral. De même, la morphologie des plages de lyse de 536-P7-PDP302 n'était pas modifiée, que ce soit lorsqu'évaluée sur la souche 536 ou sur la souche PDP302.

IV – Support génétique de cette adaptation

Le génome des bactériophages 536-P7 natif et adapté a été séquencé et leur séquences comparées. Une seule zone divergente a été identifiée (sur un génome de 148,4 Kb). Il s'agit d'une région intergénique placée entre un gène codant pour une protéine comportant un domaine conservé retrouvé dans les enzymes interagissant avec les acides nucléiques (type nucléase ou polymérase) et un gène de fonction inconnue.

L'observation attentive des séquences natives et adaptées a permis de repérer la duplication d'une courte séquence composée de nucléotides répétés inversés. Cette

séquence s'est placée en amont, aboutissant au remplacement de la séquence native, impliquant un événement de délétion simultané (**Figure 48**).

Les conséquences de cette duplication et le rôle de cette séquence répétée-inversée sont traités dans la partie discussion (page 196).

```

536-P7 natif      TGCTGTAGTCATAAATCCTCCAAAATAAAGGGGCTTTCGCCCTTTTTATTA
5' *****!!!!!!*!!!!!!***** 3'
536-P7-PDP302    TGCTGTAGTCATAAAAAGGGGCTTTCGCCCGGGGCTTTCGCCCTTTTTATTA
  
```

Figure 48. Extrait de l'alignement du génome du bactériophage 536-P7 natif et 536-P7-PDP302 au niveau de la zone divergente. Les brins anti-sens (servant de matrice à l'ARN polymérase) sont représentés, le codon stop du gène est figuré en rouge. La zone de non homologie est la conséquence du remplacement de la séquence normale par une duplication d'une séquence répétée inversée (encadrée en bleu).

Chapitre 3 - Étude d'un bactériophage au spectre exclusif : LM33-P1

À l'issue du test de la collection ECoPAVM II, la souche LM33 faisait partie des 35 souches à n'être couverte par aucun des bactériophages testés. De façon intéressante, cette souche est d'un sérotype particulier, le sérotype O25b:H4, appartenant au ST131 et de phylogroupe B2. Elle appartient ainsi au complexe clonal O25b-ST131, problématique par sa dispersion mondiale, son caractère pathogène et son antibiorésistance (cf. page 61). LM33 est par ailleurs une souche qui a été responsable d'une PAVM chez un patient ayant été hospitalisé dans le service de réanimation médico-chirurgicale du CHU Louis Mourier (Colombes).

J'ai donc décidé d'isoler des bactériophages en utilisant cette souche. Parmi les 4 candidats isolés, un a retenu mon attention dans la mesure où il était capable d'infecter toutes les souches O25b préalablement résistantes aux bactériophages de la collection ECoPAVM II et uniquement les souches de sérotype O25b : il s'agissait du bactériophage LM33-P1.

Dans un premier temps, nous avons confirmé la spécificité de ce bactériophage vis-à-vis du sérotype O25b sur un plus grand nombre de souches, puis établi que cette spécificité était dépendante d'une interaction bactériophage-bactérie impliquant le lipopolysaccharide bactérien, support du sérotype O25b. Nous avons ensuite caractérisé ce bactériophage sur le plan virologique et génomique. Enfin, nous avons testé l'efficacité de ce bactériophage *in vivo* dans différents modèles infectieux pour étudier son potentiel thérapeutique.

Section 1 – LM33-P1 : un bactériophage spécifique des souches O25b

La spécificité de spectre a été confirmée sur des souches issues de multiples collections cliniques (cf. matériel et méthodes, page 117), représentatives de la diversité des *E. coli* pathogènes chez l'homme. Le dépistage de la sensibilité s'est fait en utilisant la technique des sur-spots (cf. page 120). En cas de résultat positif, celle-ci a été confirmée par titration avec détermination de l'EOP.

I – Diversité des souches testées

Un total de 270 souches a été testé pour leur sensibilité au bactériophage LM33-P1.

La répartition des sérogroupes de ces souches est rapportée à la **Figure 49**.

La moitié des souches testée était de sérotype O25b ou O6 (135 souches).

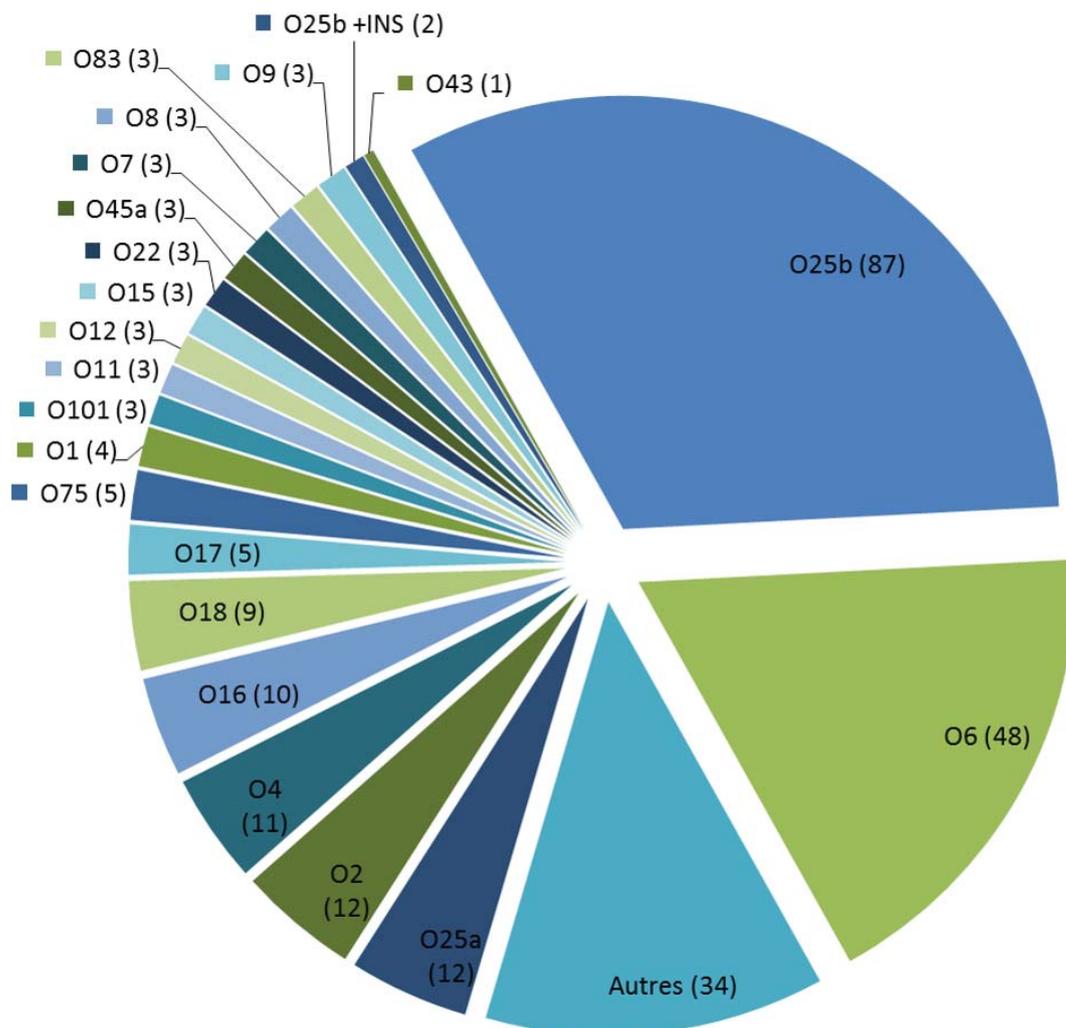


Figure 49. Répartition des souches cliniques testées contre le bactériophage LM33-P1 selon leur sérotype (antigène lipopolysaccharidique O). La taille de chaque secteur est fonction de la proportion (%) du sérotype au sein de la collection testée (n=270) ; le nombre correspondant de souches est indiqué entre parenthèses. O25b + INS : souche de sérotype O25b présentant une insertion intragénique au sein de l'opéron responsable de la biosynthèse du LPS ; Autres : autres sérotypes non précisés.

II – Confirmation de la spécificité O25b

Sur les 270 souches testées, les seules souches lysées par le bactériophage LM33-P1 étaient de séro groupe O25b. Au sein des 87 souches O25b testées, 64 (73,5 %) étaient ainsi lysées par ce bactériophage.

L'efficacité à former des plages de lyse (EOP) a été évaluée sur toutes les souches sensibles et la répartition des valeurs est présentée **Figure 50**. L'EOP médiane était de 0,45 (0,11 ; 1,28).

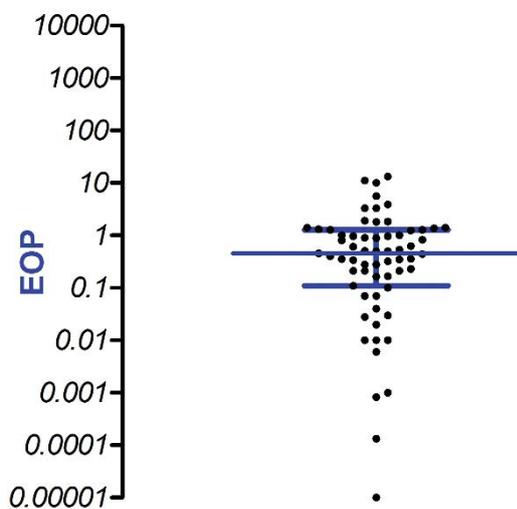


Figure 50. Répartition des 64 valeurs d'efficacité à former des plages de lyse (EOP) du bactériophage LM33-P1. La barre centrale représente la médiane accompagnée au-dessus et en dessous des valeurs des 25^e et 75^e percentiles. Ordonnée en échelle logarithmique.

Section 2 – LM33-P1 et O25b : une spécificité dépendante du LPS

Le séro groupe d'une souche est déterminé par les motifs oligosaccharidiques répétés constituant la portion extracellulaire terminale du lipopolysaccharide bactérien (LPS). Comme il s'agit d'un motif largement exposé à la surface cellulaire, le LPS est fréquemment utilisé comme récepteur par de nombreux bactériophages infectant les bactéries Gram négatif [*Lindberg-1973*].

I – LM33-P1 prévient l'agrégation médiée par un anticorps spécifique anti-O25

Dans cette première approche, nous avons employé un anticorps spécifique commercial utilisé pour le sérogroupage des souches (cf. matériel et méthodes,

page 127) provoquant une agrégation des bacilles exprimant l'antigène O25 (O25a ou O25b). Nous avons observé qu'une pré-incubation de la souche LM33 avec un excès du bactériophage LM33-P1 (MOI de 50) était capable de supprimer quasi totalement l'agrégation provoquée normalement par cet anticorps (**Figure 51**). Le mode d'action supposé est un masquage de la cible antigénique opéré par le bactériophage.

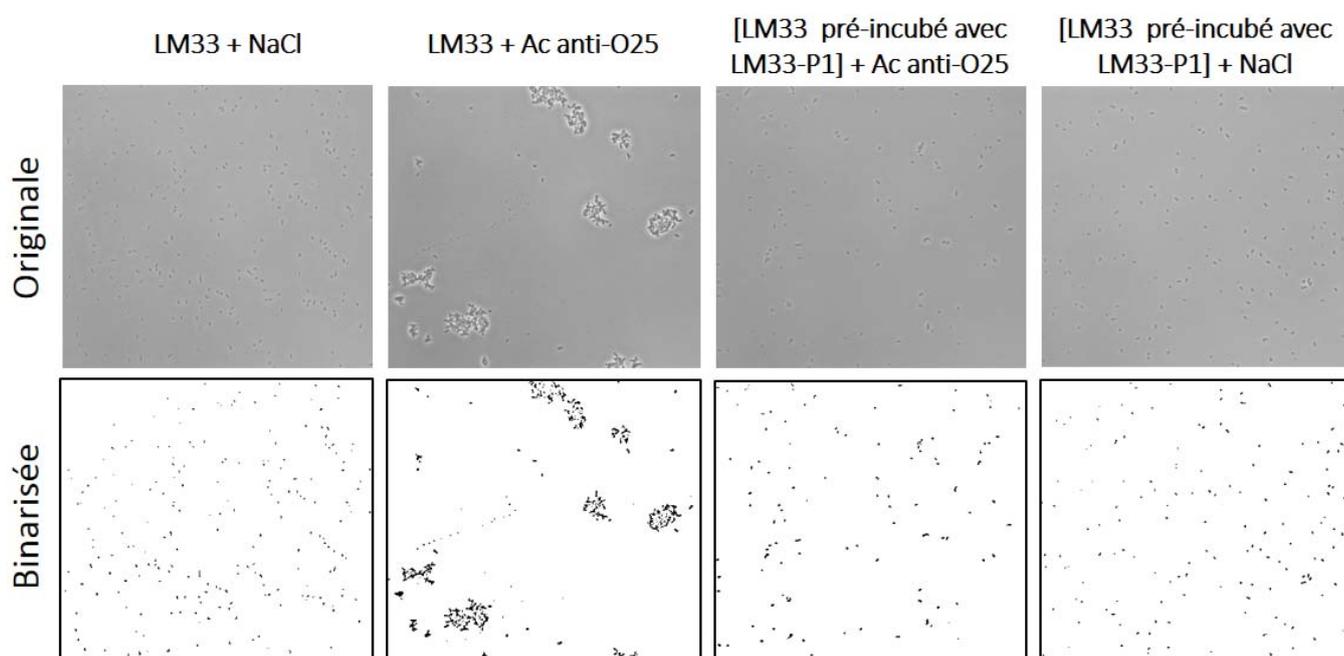


Figure 51. Photographies montrant l'effet du bactériophage LM33-P1 sur l'agrégation de la souche LM33 provoquée par un anticorps anti-O25 (Ac anti-O25). Les photos du haut sont les images originales telles qu'obtenues à l'objectif x40 en contraste de phase. Les photos du bas correspondent aux mêmes images transformées par binarisation noir et blanc pour en améliorer la lisibilité.

II – Le LPS O25b antagonise l'interaction entre LM33-P1 et les bactéries O25b

Dans des tests de compétition avec du LPS (cf. matériel et méthodes, page 125), nous avons observé que du LPS purifié extrait de la souche LM33 (exprimant donc un LPS O25b) était capable d'inhiber partiellement l'interaction entre le bactériophage LM33-P1 et les autres souches O25b testées. Cette inhibition était observée sur 2 paramètres différents :

- L'extrait de LPS était responsable d'une diminution du nombre de plages de lyse lorsqu'appliqué avec le bactériophage sur la couche bactérienne (**Figure 52 et 53**). Cette diminution évaluée sur 15 tests comportant 5 souches O25b (LM33, LM34, LM36, AVC02, AVC03) atteignait un effet moyen de $1,0 \pm 0,23$ unités Log_{10} ($p < 0,001$). Cette inhibition était observée de façon dose dépendante.
- La morphologie des plages de lyse était différente en présence d'extrait de LPS avec une diminution franche de leur diamètre, témoignant du fait qu'une fois libérées par la bactérie lysée, les particules virales semblaient entravées dans leur diffusion et leur capacité à infecter les cellules environnantes (**Figure 53**).

Cette effet inhibiteur du LPS O25b a été également observé lorsque testé avec d'autres souches O25b (cf. **Tableau 13**). Nous avons démontré par ailleurs que cet effet était spécifique de l'interaction LM33-P1 avec les souches O25b car cette inhibition n'était pas observée dans les situations suivantes (**Tableau 13**) :

- du LPS O25b de la souche LM33 n'était pas en mesure de modifier l'interaction d'autres bactériophages ciblant des souches non O25b (**Figure 53 et Tableau 13**) ;
- du LPS extrait de souches O25a, O6 ou O17 n'exerçait aucun effet inhibiteur lorsque testé au cours de l'interaction entre LM33-P1 et LM33.

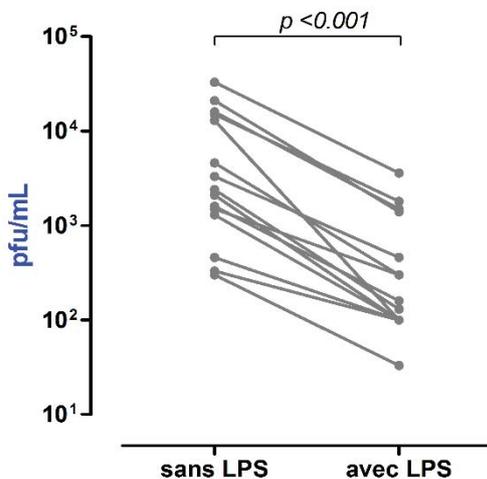


Figure 52. Évaluation quantitative de l'effet du LPS O25b sur la titration du bactériophage LM33-P1. Chaque ligne représente la même solution de bactériophage titrée en présence (virus + LPS) ou absence de LPS (virus + eau) sur différents hôtes O25b.

Interaction virus-bactérie testée		Effet inhibiteur du LPS extrait des souches ci-dessous			
Bactériophage	Bactérie (O-type)	LM33 (O25b)	536 (O6)	LM02 (O17)	ECOR51 (O25a)
LM33-P1	LM33 (O25b)	Oui	Non	Non	Non
" "	LM34 (O25b)	Oui	Non	Non	Non
" "	LM36 (O25b)	Oui	Non	Non	Non
" "	AVC02 (O25b)	Oui	Non	Non	Non
" "	AVC03(O25b)	Oui	Non	Non	Non
536-P1	536 (O6)	Non	Non	-	-
423-P1	H17 (O16)	Non	-	-	-
416-P1	LM49 (O2b)	Non	-	-	-
LF82-P2	LF82 (O83)	Non	-	-	-
LF82-P2	RY09 (O4)	Non	-	-	-

Tableau 13. Résumé des données obtenues lors des tests évaluant l'effet inhibiteur de différents extraits de LPS (précisés dans la partie droite du tableau) sur l'interaction entre différents couples de bactéries et bactériophages (précisés à gauche).

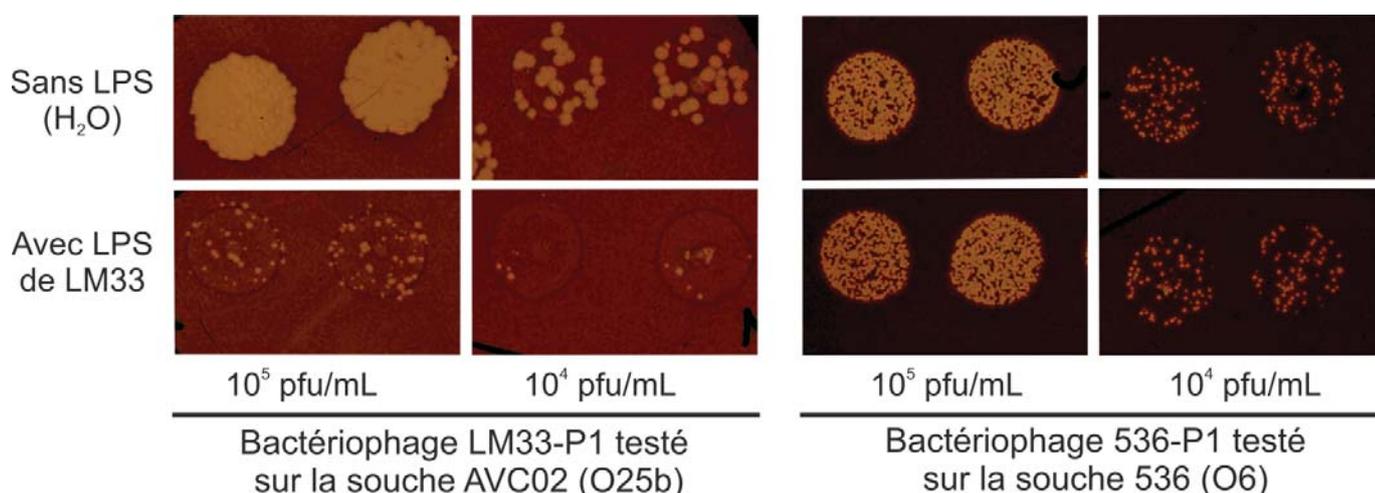


Figure 53. Effet du LPS O25b purifié à partir de la souche LM33 sur l'interaction de la souche AVC02 avec le bactériophage LM33-P1 (gauche) et celle de la souche 536 avec le bactériophage 536-P1 (droite). Pour chaque test, les bactériophages ont été utilisés à deux concentrations différentes (10^5 et 10^4 pfu/mL). Les résultats obtenus avec les autres souches O25b sont similaires.

Nous avons également testé les extraits de LPS mentionnés ci-dessus en milieu liquide au cours de cinétique de lyse de la souche LM33 par le bactériophage LM33-P1.

Nous avons observé que l'extrait de LPS O25b était responsable d'un retard de lyse de façon dose-dépendante (**Figure 54**). Néanmoins, cet effet était observable uniquement à faible multiplicité d'infection (10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}), suggérant que l'effet inhibiteur était de faible ampleur en milieu liquide. Dans l'exemple présenté, le LPS n'exerçait plus d'effet inhibiteur dès lors qu'il était dilué d'un facteur 4.

Par ailleurs, du LPS extrait de souche O6 et O25a n'affectait aucunement ces cinétiques de lyse.

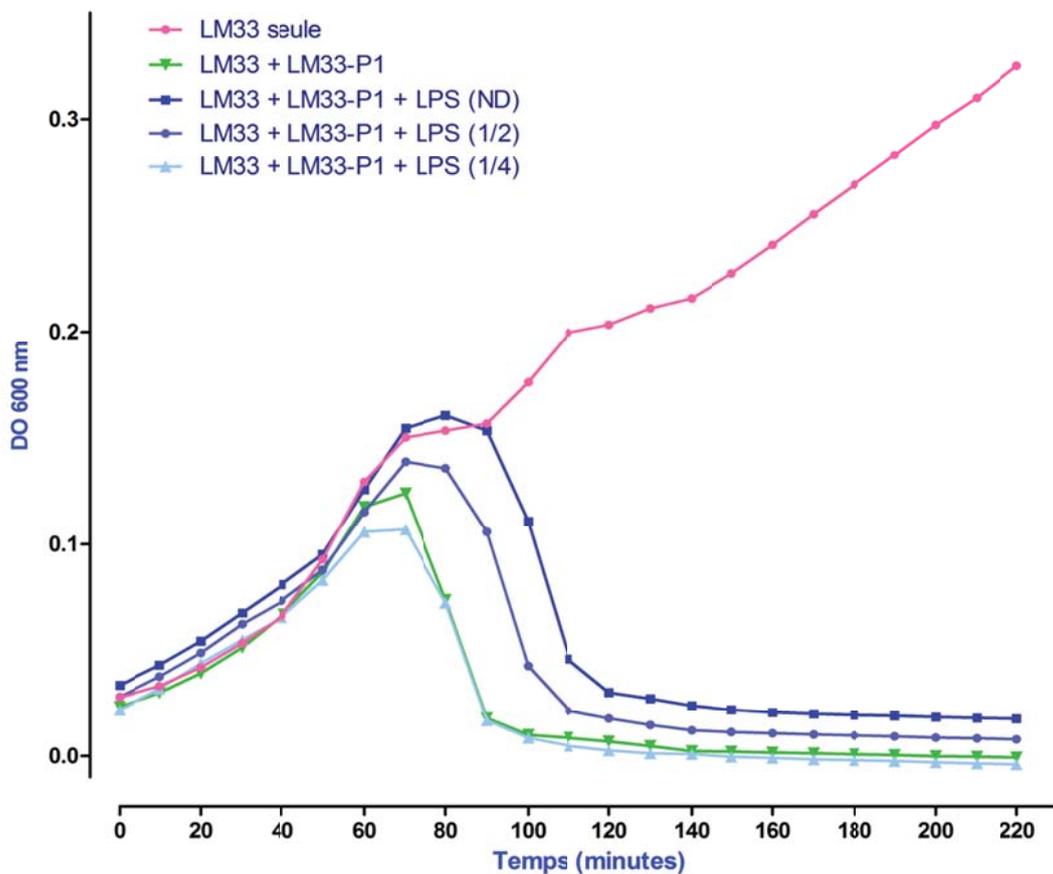


Figure 54. Cinétique de lyse de la souche LM33 par le bactériophage LM33-P1 avec et sans extrait de LPS O25b, à MOI 10^{-6} . Le LPS a été utilisé soit pur (ND, non dilué) soit dilué d'un facteur 2 (1/2) ou 4 (1/4).

Section 3 – Caractéristiques virologiques du bactériophage LM33-P1

I – Caractéristiques générales

Le bactériophage LM33-P1 est un bactériophage réalisant des plages de lyse de grosse taille (> 2 mm après 4 heures d'incubation), dont le diamètre augmente rapidement avec le temps (+30 % à H7, **Figure 55**).

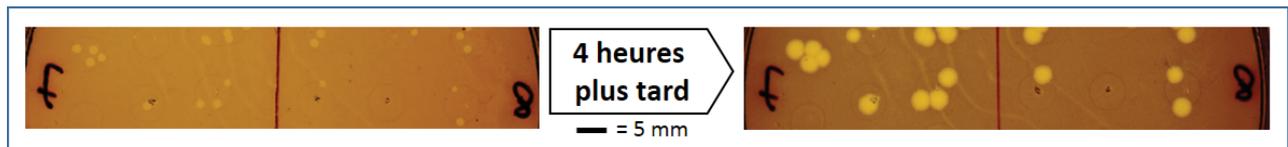


Figure 55. Augmentation avec le temps de la taille des plages de lyse du bactériophage LM33-P1 (sur la souche LM33). Les photographies sont celles d'un segment de boîte de Pétri pris après 2 heures (gauche) puis 6 heures (droite) d'incubation à 37 °C.

Ce bactériophage génère également la présence d'un halo autour des plages de lyse, témoignant d'une activité enzymatique diffusible susceptible de modifier la densité/qualité du biofilm bactérien, perceptible à l'œil nu (**Figure 56**).

Les observations en microscopie électronique ont révélé une morphologie typique des *Podoviridae*.



Figure 56. Illustration de la présence d'un halo autour des zones de lyse bactérienne. Sur un milieu de culture gélosé, 3 dépôts de 10 μ L d'une solution de LM33-P1 à 5.10^3 pfu/mL ont été effectués sur une surcouche de la bactérie LM33. Acquisition à H21 d'une incubation à 37 °C puis à H36 mettant en évidence la formation d'un halo circonférentiel. Ce phénomène, consistant en général en une modification qualitative et/ou quantitative du biofilm, est provoqué par la présence d'une enzyme virale diffusible, typiquement une dépolymérase ciblant les exopolysaccharides bactériens.

II – Adsorption du virus sur son hôte

L'adsorption des particules virales a été déterminée comme précisé page 124. L'adsorption de LM33-P1 s'est révélée très rapide avec plus de 90 % de la population virale fixée à la surface bactérienne à 3,5 minutes d'interaction (**Figure 57**). La constante d'adsorption déduite de la régression était de $1,2 \cdot 10^{-8}$ mL/min.

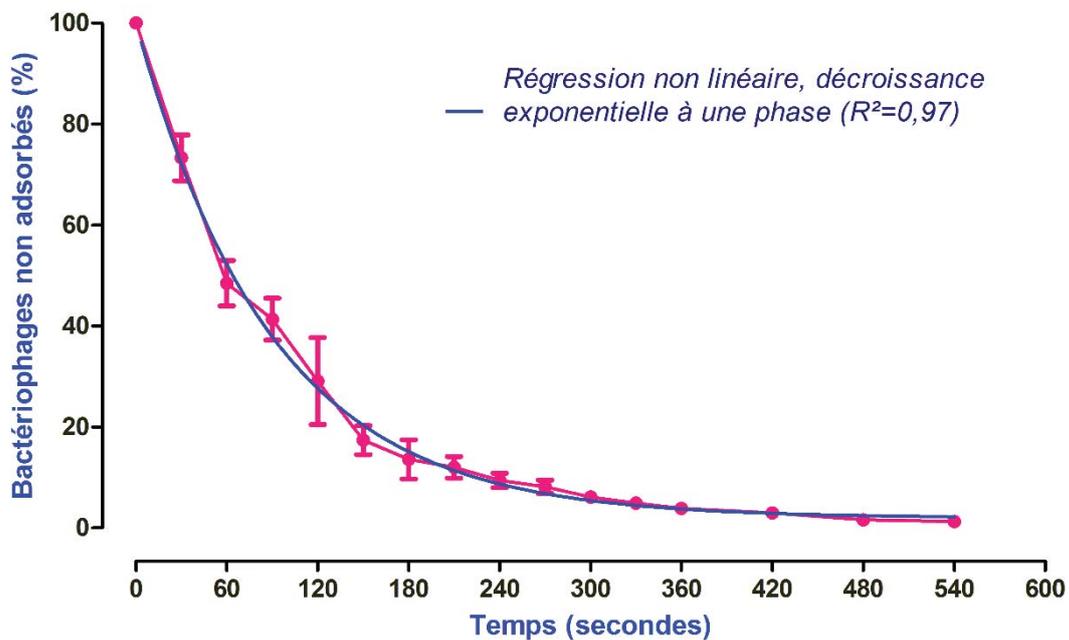


Figure 57. Courbe d'adsorption du bactériophage LM33-P1 sur son hôte (LM33) en milieu LB, à 37 °C, sous agitation (100 rpm). Les points représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes avec l'écart type associé.

III – Latence, éclipse et nombre de virions libérés

Ces paramètres ont été mesurés expérimentalement à partir de l'expérience classique dite de « *one step growth* » (**Figure 58**) permettant d'évaluer au cours du temps le nombre de particules virales totales (libres et liées, échantillonnage sans traitement par chloroforme) et le nombre de particules virales libres ou intracellulaires (échantillonnage avec traitement par chloroforme). Ces expériences ont été réalisées

en milieu liquide (LB), à 37 °C, sous agitation (100 rpm) selon les modalités décrites page 124.

Après le début de la réaction (mise en contact du virus et de la bactérie), les premières particules virales intracellulaires sont détectables après 7 minutes (temps d'éclipse) puis relargués dans le milieu extracellulaire après la lyse viro-induite à partir de la 9^e minute (temps de latence). Le nombre de virions libérés est évalué à 317 (intervalle de confiance à 95 % : 289 à 345)

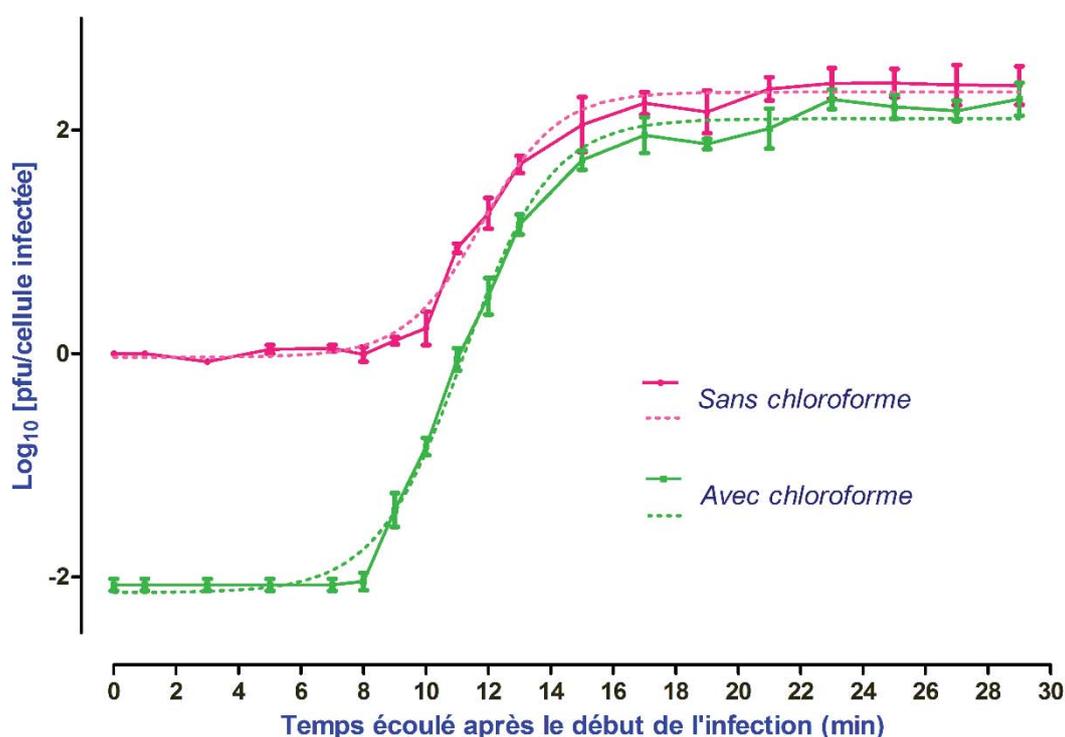


Figure 58. Courbes de croissance dites de « *one step growth* » permettant le calcul du temps d'éclipse, de latence et du nombre de virions libérés par cellule infectée. Les courbes en trait continu représentent les moyennes de trois expériences indépendantes avec les écarts-types associés lorsque les échantillons sont traités avec ou sans chloroforme. Les courbes en traits pointillés représentent les régressions non linéaires correspondantes (modélisation de type dose réponse à pente variable, $R^2 = 0,99$ et $0,97$ respectivement).

IV – Cinétique de lyse de la souche LM33 par le bactériophage LM33-P1

Lorsque la cinétique de lyse de la souche LM33 par le bactériophage LM33-P1 a été étudiée, on constatait une inhibition de la croissance bactérienne totale pour les fortes MOI (100, 10, 1 et 0,1) et ce pendant une période d'environ 6 heures. Aux MOI inférieures, un début de croissance bactérienne était noté, mais LM33-P1 était capable, de façon dose dépendante, de lyser et bloquer durablement la croissance des souches pendant la même durée. A MOI 10^{-7} et 10^{-8} , la quantité de bactériophages était trop faible pour entraver fortement la croissance bactérienne, générant seulement une diminution de la pente de croissance.

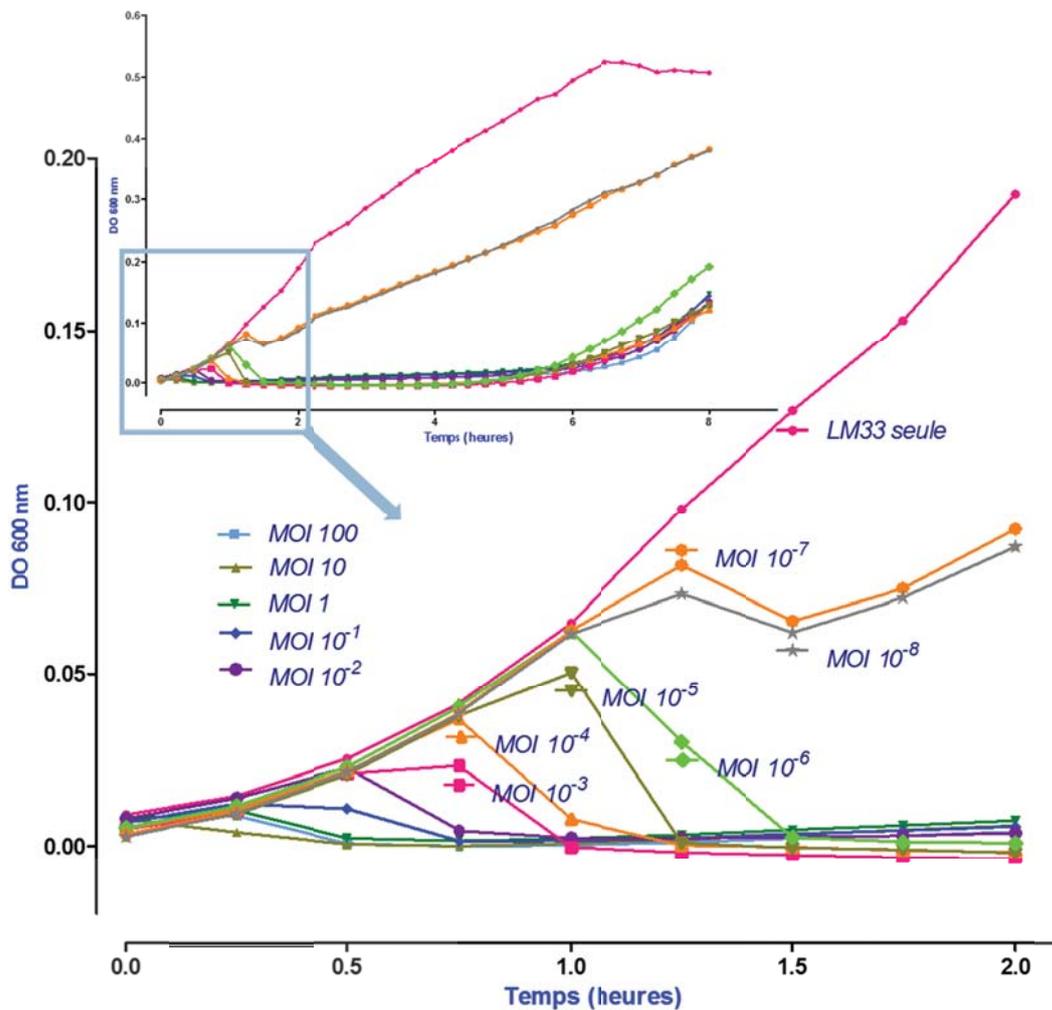


Figure 59. Cinétique de lyse à 37 °C de la souche LM33 en présence du bactériophage LM33-P1 à différentes multiplicités d'infection (MOI). En haut : cinétique des 8 premières heures. En bas : agrandissement focalisé sur les 2 premières heures. La densité optique du milieu (DO 600 nm) est suivie toutes les 15 minutes. Pour des questions de lisibilité, seule est indiquée la valeur moyenne de 4 réplicas.

Section 4 – Analyse génomique du bactériophage LM33-P1

La taille du génome du bactériophage LM33-P1 est de 38 979 pb avec un pourcentage de GC de 50,7 % et code pour 49 ORFs. Ce virus appartient à la famille des bactériophages T7-like et est un bactériophage lytique car dépourvu d'enzymes impliquées dans la lysogénisation telles qu'intégrases ou recombinaisons. Il code ses propres ARN et ADN polymérases.

Son plus proche homologue est un autre *Podoviridae* appelé PE3-1 (coliphage, NC_024379.1) avec lequel il partage 94 % d'identité sur 88 % de son génome (E-value 0). Trois autres bactériophages apparaissent également hautement proches (identité ≥ 92 % sur une couverture ≥ 88 %) : les coliphages K1-F ([Scholl-2005], NC_007456) et le coliphage EcoDS1 (NC_011042), ainsi qu'un bactériophage infectant *Cronobacter* nommé Dev2 ([Kajsik-2014], NC_023558).

L'alignement du génome de ces 4 homologues et du bactériophage T7 (représentant de la famille) avec celui du bactériophage LM33-P1 est présenté **Figure 60**. Hormis la présence de plusieurs délétions et insertions de faibles tailles localisées essentiellement dans la première moitié du génome entre LM33-P1 et ses 4 proches homologues, nous remarquons une région d'absence d'homologie au niveau d'une ORF (colorée en bleue, en fin de génome). On note néanmoins une petite zone d'homologie entre ces différents virus dans la portion initiale de ce gène (650 premiers nucléotides).

Ce gène (gp17 chez T7, K1-F, Dev2, EcoDS1 et gp18 chez PE3-1) est localisé dans la région génomique codant pour les composants structuraux et code précisément pour la fibre de queue de ces virus. La région conservée code pour la partie N-terminale de la fibre de queue (IPR005604, base InterPro) impliquée dans sa connexion avec la plateforme basale. Elle est suivie d'une région hypervariable possédant en général une fonction enzymatique avec activité hydrolase, sauf chez le bactériophage T7.

Ces hydrolases sont connues pour être impliquées dans la dégradation des structures exopolysaccharidiques, comme par exemple l'endosialidase du bactériophage K1F capable de dépolymériser la capsule K1 d'*E. coli*. Dans le cas de LM33-P1, comme dans celui d'EcoDS1 ou du phage K11 infectant *Klebsiella*, la séquence en acides aminés de cette zone variable est détectée comme possédant un domaine appartenant à

la superfamille des pectates lysases (IPR011050), enzymes impliquées dans la dépolymérisation des pectines en galacturonates.

Par prédiction de structure (Phyre², [Kelley-2015]), la protéine homologue la plus proche retrouvée est l'endopolygalacturonase d'*Erwinia carotovora* (100 % des acides aminés de la région variable soumis ont été prédits avec un indice de confiance > 90 % pour la structure tertiaire et de 94,1 % pour la protéine homologue), confirmant la nature enzymatique de cette région.

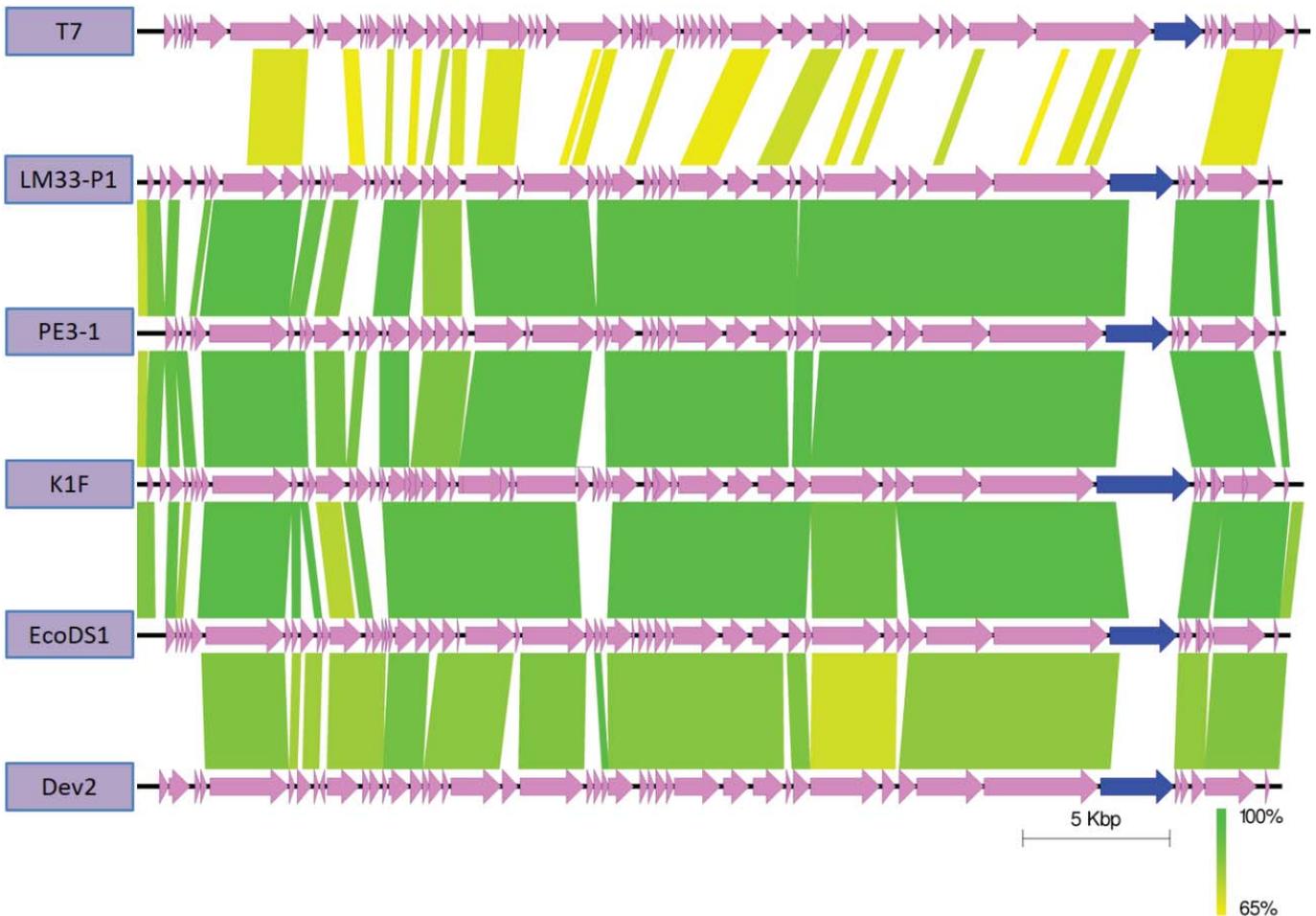


Figure 60. Alignements comparatifs des génomes de différents bactériophages. Le degré d'homologie (Blastn) est codé en couleur. Les flèches correspondent aux différents gènes et leur sens de transcription. Les flèches bleues représentent le gène codant pour la fibre de queue de ces bactériophages. Seules sont représentées les homologies ayant une E-value $\leq 10^{-3}$, d'une longueur ≥ 230 nucléotides.

Section 5 – LM33-P1 : un bactériophage également efficace *in vivo*

L'activité *in vitro* d'un bactériophage n'est pas obligatoirement corrélée à son activité *in vivo* [Henry-2013]. Aussi, nous avons vérifié si LM33-P1 était capable d'infecter sa cible lorsqu'administré dans différentes situations infectieuses.

Trois modèles infectieux murins ont été utilisés : un modèle de septicémie à point de départ sous-cutané, un modèle d'infection / colonisation urinaire et le modèle de pneumonie déjà présenté (cf. page 128). Dans ces trois modèles, un groupe d'animaux a été consacré à l'évaluation d'une antibiothérapie comportant l'administration d'une β -lactamine, choisie comme la plus efficace sur la souche utilisée (imipénème-cilastatine pour la souche LM33-P1 et cefotaxime pour la souche D3-A).

L'antibiothérapie a volontairement comporté une unique injection, au même temps que l'injection du bactériophage. L'objectif était de comparer ces deux stratégies lorsqu'elles sont employées sans optimisation pharmacocinétique l'une et l'autre : quel est l'effet *in vivo* de l'administration d'une unique dose d'antibiotique comparée à une unique dose de bactériophage, sachant que l'un et l'autre sont des traitements capables d'une activité bactéricide *in vitro* mais que leur administration n'est pas optimisée pharmacologiquement ? Point important, l'antibiothérapie et le bactériophage n'étant pas administrés selon une modalité optimale sur le plan pharmacocinétique et s'agissant de plus de l'utilisation de β -lactamines dont le mode d'action est temps-dépendant, il est hors de propos de vouloir démontrer la supériorité de l'un par rapport à l'autre.

I – Modèle de septicémie à point de départ sous-cutané

Dans ce modèle, les souris ont été infectées par voie sous-cutanée au niveau de la région inter-scapulaire avec un inoculum important (1.10^9 cfu), responsable d'une mortalité de 100 %. Nous avons utilisé la souche D3-A (cf. page 117), sensible au bactériophage LM33-P1 avec une EOP de 1. Elle ne présente aucune résistance aux antibiotiques testés en routine en microbiologie hospitalière (phénotype sauvage, notamment concernant les β -lactamines, les aminosides et les fluoroquinolones). Le traitement a comporté l'administration de LM33-P1 (MOI 60, 1 ou 2 administrations) ou de céfotaxime (100 mg/kg, une unique injection) à H2 post-

infection, par voie intra-péritonéale. Lorsque deux administrations du bactériophage LM33-P1 étaient réalisées, celles-ci étaient effectuées à H2 puis à H12 post-infection. Quatre animaux par condition ont été utilisés.

Lorsque les animaux recevaient le traitement par le bactériophage LM33-P1, on constatait une baisse du compte bactérien dans les organes cibles de la septicémie, dans des proportions non inférieures à celle observée avec le céfotaxime (**Figure 61**). Sous réserve des faibles effectifs étudiés, les comptes bactériens les plus bas, à l'échelle individuelle, étaient obtenus chez les animaux ayant reçu le bactériophage LM33-P1.

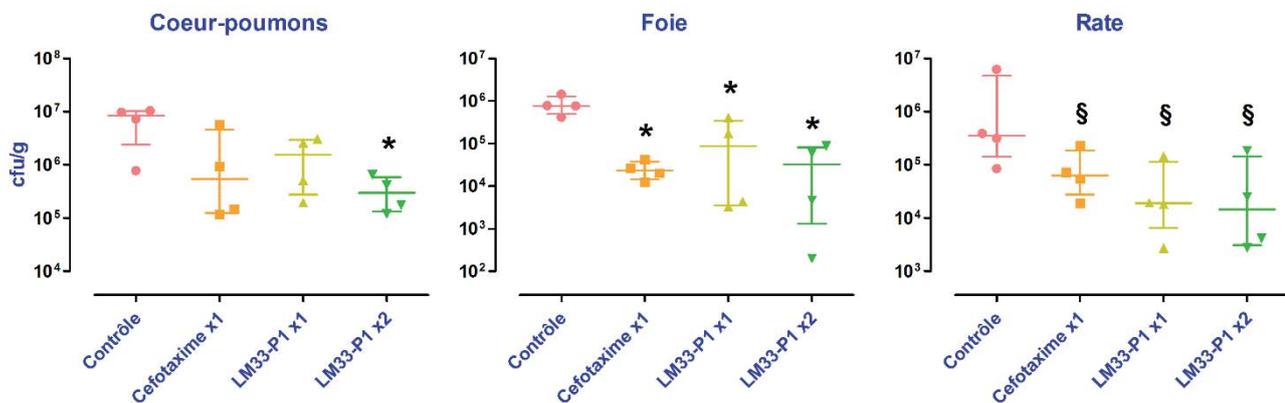


Figure 61. Compte bactérien dans 3 sites métastatiques selon les différentes modalités thérapeutiques détaillées dans le texte. Les données représentées sont les valeurs individuelles avec la médiane (barre centrale) accompagnée du 25^e et 75^e percentile, l'ensemble exprimé en cfu par gramme d'organe. * : $p < 0,05$ comparé à la condition contrôle, § : $p = 0,057$ comparé à la condition contrôle.

Le compte du bactériophage LM33-P1 a également été analysé dans les mêmes organes. Aucune plage de lyse n'était observée chez les animaux contrôle et traités par céfotaxime. Chez les animaux traités par LM33-P1, on observait des concentrations entre 10⁹ et 10¹⁰ pfu/g d'organe en cas d'injection unique à H2 post-infection. Ces concentrations étaient 5 à 7 fois supérieures en cas d'administration d'une deuxième dose à H12 post-infection. Les concentrations virales étaient globalement identiques au sein des différents organes analysés, témoignant d'une bonne diffusion systémique après l'injection intra-péritonéale (**Figure 62**).

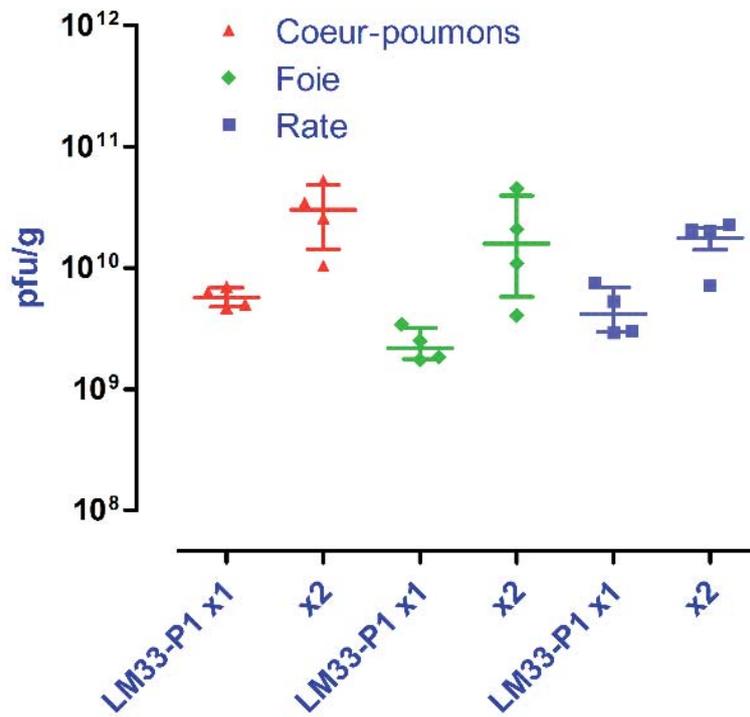


Figure 62. Compte viral dans les différents organes, selon l'administration d'une dose du bactériophage LM33-P1 (x1 à H2 post-infection) ou de 2 doses (x2, à H2 et H12 post-infection). Valeurs individuelles et médianes avec interquartiles (25^e et 75^e percentiles).

II – Modèle d'infection-colonisation urinaire rétrograde

Dans ce modèle, décrit page 129, les souris développent une colonisation des reins et de la vessie avec infection à bas bruit si la souche administrée est pathogène. La souche LM33 a été utilisée pour l'infection. Dans les résultats présentés ici, le compte bactérien a été effectué 48 heures après le début de l'infection et 24 heures après le traitement (dose unique). Là encore il s'agissait de comparer deux modalités thérapeutiques non optimisées sur le plan pharmacocinétique mais à posologie efficace, pour juger de l'efficacité *in vivo* du traitement par bactériophages. Au niveau de la vessie, les comptes bactériens mesurés chez les animaux traités par antibiotique (imipénème-cilastatine) et par le bactériophage LM33-P1 n'apparaissent pas différents de ceux des animaux non traités (**Figure 63**). Au niveau rénal, les animaux traités par l'antibiotique et le bactériophage présentaient un compte inférieur aux animaux contrôle. Le compte bactérien était inférieur lors du traitement par LM33-P1 comparé au traitement par imipénème : respectivement $8,8 \cdot 10^2$ ($3,5 \cdot 10^2$; $5,4 \cdot 10^3$) et $2,3 \cdot 10^4$ ($1,8 \cdot 10^3$; $3,8 \cdot 10^4$) cfu/g, $p = 0,01$, **Figure 63**).

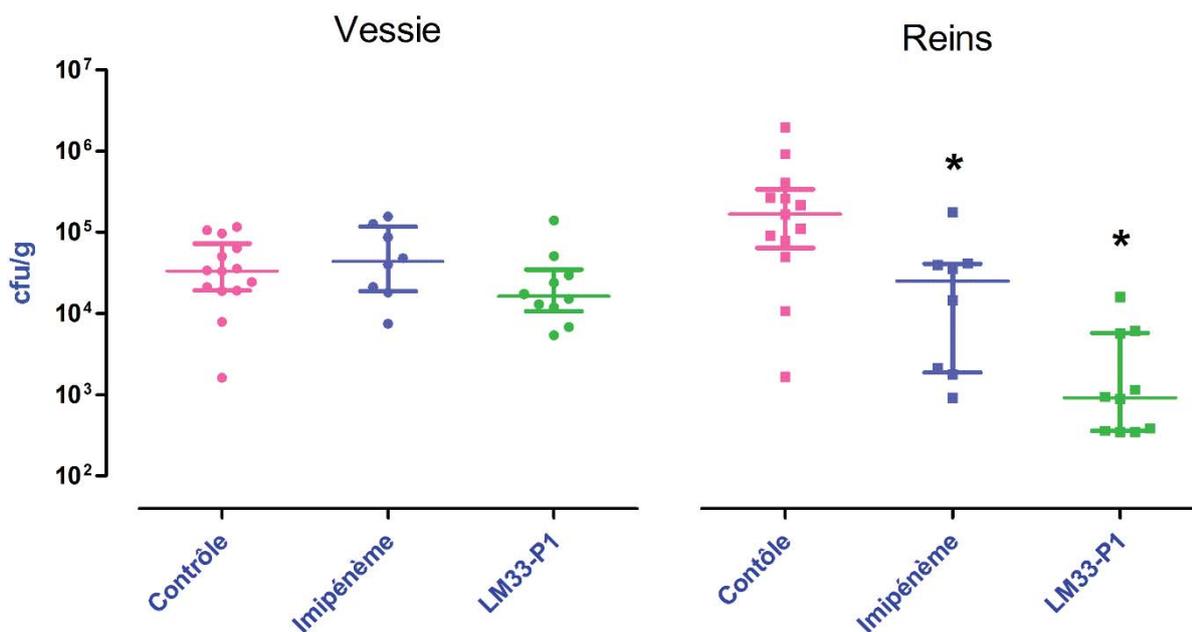


Figure 63. Compte bactérien dans la vessie et les reins 48 heures après une infection par 5.10^7 cfu de la souche LM33 par voie intra-urétrale. Le traitement, administré 24 heures après l'infection par voie intra-péritonéale en une unique injection, a comporté l'injection de sérum physiologique (contrôle, n=14), d'Imipénème-cilastatine (100 mg/kg, n=8) ou du bactériophage LM33-P1 (MOI 200, n=10). Les valeurs individuelles sont présentées ainsi que la médiane (barre centrale) et les interquartiles (25^e et 75^e percentiles) correspondant. * : $p < 0,05$ par rapport au groupe contrôle.

Au niveau viral, le nombre de particules par gramme d'organe était plus important au niveau rénal qu'au niveau de la vessie (**Figure 64**). Ce résultat est le plus vraisemblablement à mettre sur le compte de la vascularisation rénale supérieure à celle de la vessie et de la non activité du bactériophage au niveau vésical (l'absence d'amplification virale *in situ* étant corrélée à l'absence de lyse bactérienne). Ce point sera discuté plus loin.

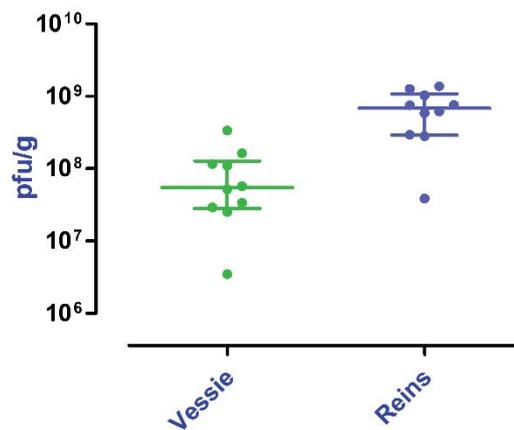


Figure 64. Compte viral dans la vessie et les reins, 24 heures après administration du traitement par LM33-P1 par voie intra-péritonéale.

III – Modèle de pneumonie

Le modèle d'infection pulmonaire décrit précédemment a été utilisé, avec la souche LM33. La mortalité n'a pas pu constituer ici un critère de jugement car la souche LM33, moins pathogène que la souche 536, s'est montrée incapable d'induire une mortalité chez les souris infectées, même à fort inoculum.

Les souris ont été infectées avec 1.10^8 cfu puis traitées 4 heures plus tard selon trois modalités : l'administration d'Imipénème-cilastatine (100 mg/kg, une dose IP), l'administration du bactériophage LM33-P1 par voie intra-nasale (MOI 50) ou par voie intra-péritonéale (MOI 500). Les animaux ont été sacrifiés 17 heures après l'infection pour prélèvement des poumons puis compte bactérien et viral.

A H17 post-infection, l'aspect macroscopique des poumons retrouvait des lésions de pneumonies constituée de zones congestives et hémorragiques, quelques soit les modalités thérapeutiques administrées.

Comparé aux animaux non traités, les souris ayant reçu le traitement par le bactériophage LM33-P1 présentait un compte bactérien plus bas, d'un facteur 1 000 environ (**Figure 65**). Le traitement antibiotique, après une unique injection, n'était pas en mesure de diminuer le compte bactérien par rapport aux animaux non traités.

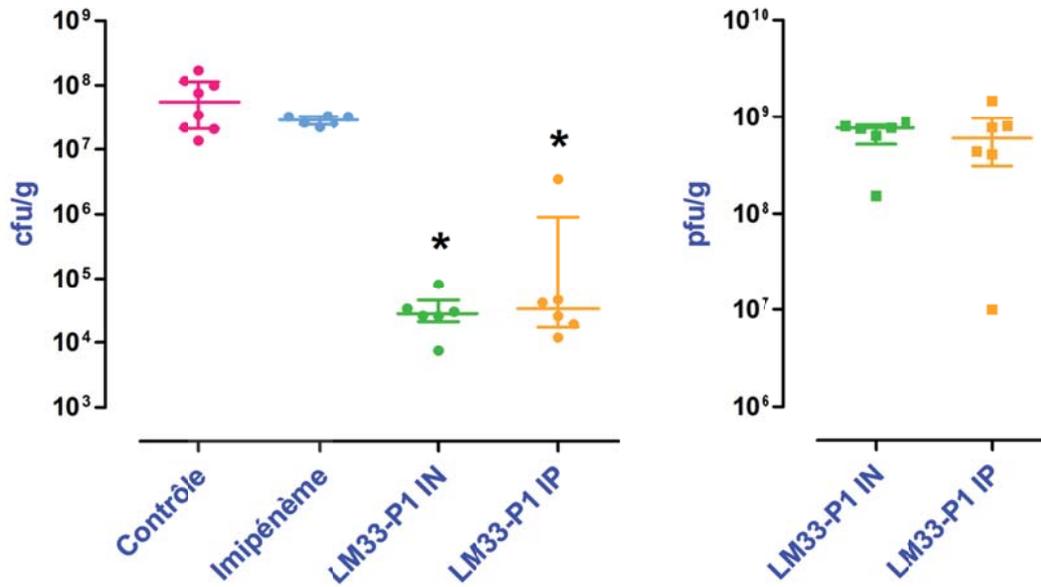


Figure 65. Compte bactérien (gauche) et viral (droite) au niveau pulmonaire, 17 heures après une infection par 1.10^8 cfu de la souche LM33 par voie intra-nasale. Le traitement, administré 4 heures après l'infection, a comporté soit l'injection de PBS (contrôle, n=8), d'Imipénème-cilastatine (100 mg/kg, n=6), du bactériophage LM33-P1 par voie intra-nasale (LM33-P1 IN, MOI 50, n=6) ou intra-péritonéale (LM33-P1 IP, MOI 500, n=6). Les valeurs individuelles sont présentées ainsi que la médiane (barre centrale) et les interquartiles (25^e et 75^e percentiles). * : $p < 0,001$ par rapport au groupe contrôle.

Concernant les différentes modalités d'administration du bactériophage LM33-P1, on constatait des concentrations identiques de virus dans les poumons, que le bactériophage ait été administré par voie intra-nasale ou intra-péritonéale. Et ceci alors même qu'il existait un facteur 10 entre la dose injectée par voie IP (MOI 500) et par voie IN (MOI 50). Ces données sont à mettre en parallèle avec le compte bactérien observé dans les poumons, strictement comparable lors de ces deux modalités thérapeutiques (**Figure 65**).

Troisième partie

—

Discussion et perspectives

Synthèse des principaux résultats

Au cours de ce travail, nous avons montré en premier lieu que conceptuellement, l'isolement de bactériophages efficaces ciblant les souches pathogènes d'*E. coli* impliquées dans les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique était quelque chose de réalisable sur un plan pratique. La diversité des souches cliniques n'était pas un obstacle insurmontable puisque l'association de seulement 5 bactériophages était en mesure de générer, sur un effectif d'environ 300 souches, une couverture atteignant 70 % environ. Nous avons également montré, sous réserve d'une non exhaustivité, que l'association en cocktail n'était pas une source d'inhibition réciproque susceptible de diminuer l'efficacité des virus ainsi associés mais que, au contraire, la potentialisation recherchée était présente.

Dans la seconde partie, nous avons prouvé expérimentalement qu'il était envisageable de traiter exclusivement une pneumonie induite par des souches virulentes d'*E. coli* à l'aide de bactériophages, avec une survie totale face à une infection létale. En évaluant la cinétique de décroissance de l'inoculum bactérien au cours du temps, nous avons observé que celle-ci était identique lors du traitement par bactériophages ou par antibiotique. Par ailleurs, l'adaptation *in vitro* d'un bactériophage s'est révélée efficace pour augmenter *in vivo* son activité et modifier ainsi la survie des animaux traités.

Enfin, nous nous sommes focalisés sur un bactériophage singulier, LM33-P1, qui se distingue par un spectre étroit, n'infectant que les souches de sérotype O25b, via une interaction dépendante du LPS. Ce *Podoviridae* présente des caractéristiques virologiques remarquables par la rapidité de son cycle infectieux et la quantité de virus relargués. Il s'agit enfin d'un virus présentant une action large au sein du sérotype O25b puisque 73 % des souches testées étaient lysées par ce bactériophage avec une EOP médiane de 0,45. Par ailleurs efficace *in vivo*, ce virus présente un réel potentiel thérapeutique contre un sérotype d'intérêt, particulièrement important au plan épidémiologique et pathologique chez l'homme.

Discussion

La discussion ci-dessous est articulée en trois sections, reprenant respectivement chacune des trois parties développées au cours du travail expérimental.

Section 1 – Spectres d’hôtes et efficacité des bactériophages

I – Une spécialisation bien réelle

Nous avons constaté que les bactériophages a priori les moins performants en termes de couverture, lors d’une première évaluation, conservaient ce défaut lors des évaluations ultérieures. Autrement dit, si un bactériophage présente un spectre très étroit lors d’un premier test, il paraît improbable que cette situation soit inversée lors d’un second test comportant d’autres souches. De même, les bactériophages les plus actifs ont toujours conservé cette qualité d’un test à l’autre. On peut donc conclure en première approximation que si un nombre suffisant de souches représentatives de la diversité de la population à tester est présent, les spectres obtenus sont a priori fiables et peu susceptibles d’être modifiés par l’ajout d’un nombre supplémentaire de souches. Ce nombre de souches suffisant est difficilement évaluable avec précision, mais 50 à 100 souches semblent constituer une base minimale de départ correcte.

Lorsqu’un bactériophage est seulement capable d’infecter un nombre très restreint de souches, deux hypothèses peuvent expliquer cette étroitesse de spectre :

- Sur le versant viral, il peut s’agir d’un bactériophage hautement spécialisé, dont l’équipement (notamment la ou les protéines assurant l’interaction physique avec la bactérie) ne permet de cibler qu’un nombre très restreint de récepteurs, exprimés exclusivement chez un nombre limité de bactéries.
- Sur le versant bactérien, il peut s’agir du résultat d’une évolution ayant abouti à l’accumulation successive de plusieurs mécanismes de résistances. Une telle souche ne peut alors être ciblée que par des bactériophages qui possèdent en réponse l’ensemble des mécanismes de contournement de ces résistances.

Cette dernière hypothèse imposerait donc que les souches hôtes des bactériophages les moins actifs soient également les souches les plus difficilement ciblées par les autres bactériophages testés. Or, en étudiant cet aspect particulier sur le test effectué à partir de la collection ECoPAVM III, nous n’avons pas observé de corrélation entre

le nombre de souches lysées par un bactériophage et le nombre de fois où l'hôte de ce bactériophage est lysé par les autres virus (**Figure 66**). Autrement formulé, la souche hôte ayant permis l'isolement d'un bactériophage capable de lyser seulement une souche (en plus de sa souche hôte) peut être de façon non prédictible soit rarement soit fréquemment lysée par les autres bactériophages. L'inverse est également vrai : par exemple, la souche LF73 ayant permis l'isolement du bactériophage LF73-P1 est lysée par seulement 3 autres bactériophages de la collection (n=71) alors que LF73-P1 est capable de lyser 76 souches (sur 196).

Seule l'hypothèse d'une très forte spécialisation de ces bactériophages actifs sur un nombre restreint de souches semble donc prépondérante, renforçant le caractère unique de certains de ces virus.

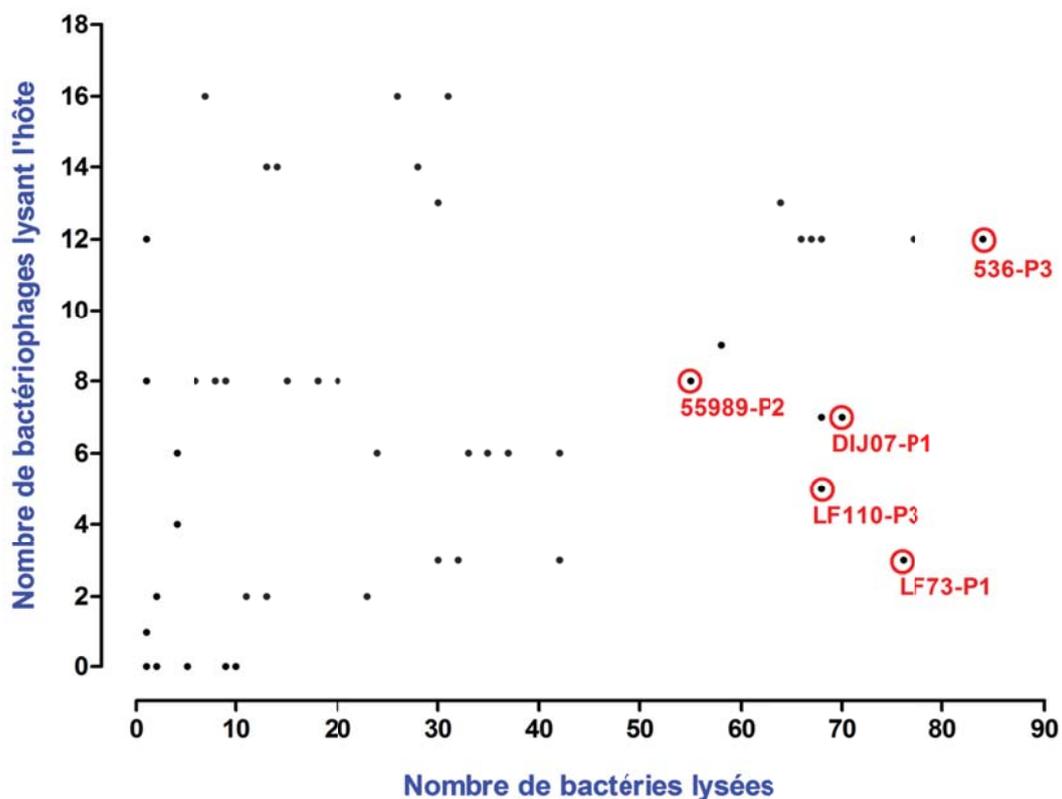


Figure 66. Analyse de la corrélation entre le nombre de bactéries lysées par un bactériophage et le nombre de bactériophages capables de lyser l'hôte de ce virus. Chaque point est un bactériophage. Sa position en abscisse est déterminée par le nombre de souches qu'il est capable de lyser, sa position en ordonnée est déterminée par le nombre de fois où l'hôte ayant permis son isolement est lysé par d'autres bactériophages. Les 5 bactériophages composant le cocktail sont signalés en rouge.

II – Une activité préservée au-delà de l'hôte primaire

En étudiant l'efficacité des bactériophages isolés, nous avons confirmé l'absence d'obstacle à même d'invalider leur utilisation pour cibler d'autres souches que leur hôte primaire : l'efficacité à former des plages de lyse (EOP) était suffisante et l'activité des bactériophages lorsqu'assemblés en cocktail était conservée. Notamment, on ne relevait pas d'inhibition réciproque franche dans le cocktail testé, mais une synergie bien présente. L'inhibition réciproque, décrite initialement par Delbruck en 1945 [Delbruck-1945] survient lorsque la co-infection d'une bactérie par deux bactériophages est responsable de la libération d'une quantité de virions inférieure à celle observée en cas d'infection unique. Néanmoins cette inhibition, générée au niveau intracellulaire par la compétition entre deux virus tentant chacun de détourner la machinerie cellulaire de l'hôte à leur profit, est un phénomène rare. Il est prévenu la plupart du temps par le phénomène d'exclusion réciproque : une cellule ne peut donner lieu à un cycle infectieux viral que lorsqu'elle est infectée par un unique bactériophage (l'infection est abortive si deux bactériophages pénètrent simultanément). Bien que non décrits, d'autres mécanismes d'inhibition réciproque peuvent théoriquement exister comme la compétition de plusieurs bactériophages pour le même récepteur bactérien ou l'interaction physique des bactériophages entre eux aboutissant à une diminution de l'infectivité. Ces mécanismes ne semblent en tout cas pas jouer un rôle prépondérant.

La synergie, en revanche, est un mécanisme bien décrit et défini comme l'amélioration des propriétés bactéricides d'un virus A en cas de co-infection d'une bactérie par un virus B. Cette synergie peut théoriquement s'établir à trois niveaux : le taux d'adsorption, le nombre de virions relargués et l'amélioration des constantes de temps (temps de latence). Néanmoins, comme le laisse prédire le principe d'exclusion réciproque, seules ont été prouvées et décrites dans la littérature les synergies reposant sur l'amélioration des paramètres d'adsorption [Schmerer-2014]. Dans ces travaux, un bactériophage A possède une enzyme capable de dépolymériser la capsule polysaccharidique bactérienne [Azeredo-2008, Hughes-1998, Sutherland-1995], facilitant ainsi l'infection par d'autres bactériophages [Bull-2010, Schmerer-2014].

III – La quête des meilleurs bactériophages : chercher là-bas pour cibler ici ?

Un point intéressant concerne la qualité des bactériophages les plus actifs, que l'on limitera ici aux 5 premiers : 536-P3, LF73-P1, DIJ07-P1, LF110-P3 et 55898-P2. Sur ces 5 bactériophages, un seul (DIJ07-P1) a été isolé à l'aide d'une souche provenant des voies respiratoires d'un patient sous ventilation mécanique. Le bactériophage 536-P1 a été isolé grâce à la souche clinique uropathogène 536, les bactériophages LF73-P1 et LF110-P3 avec des souches AIEC (souches responsables de pathologies digestives, impliquées dans la maladie de Crohn) et enfin le bactériophage 55989-P2 avec la souche EAEC O104:H4 55989.

C'est donc grâce à la présence de bactériophages isolés *via* des souches non respiratoires que repose l'essentiel de la couverture générée par ce cocktail. Cette observation, devant être confirmée à plus grande échelle, souligne le fait qu'on ne peut a priori circonscrire la spécialisation des bactériophages à l'échelle des pathovars ciblés (c'est-à-dire qu'un bactériophage isolé à partir d'une souche AIEC peut être un bon candidat pour cibler une souche responsable de pathologie extra-digestive, et réciproquement). L'implication d'une telle constatation peut recevoir différentes explications :

- les souches d'origine digestives ayant permis l'isolement de 4 des 5 bactériophages composant le cocktail possèdent des déterminants communs avec certaines souches respiratoires ;
- les souches dont l'origine est respiratoire sont potentiellement des souches digestives à haut potentiel « extra-digestif », autorisant leur survie et adaptation dans l'appareil respiratoire et éventuellement l'expression d'un caractère pathogène ;
- il s'agit du fruit du hasard, ce qui compte tenu du faible nombre de souches concernées, n'apparaît pas comme quelque chose d'improbable.

Le séquençage du génome des bactériophages 55989-P2 et 536-P1 nous indique qu'ils appartiennent à deux genres de virus très différents. Mais les 3 autres n'ayant pas été encore séquencés, nous ne pouvons pas conclure sur la diversité génétique de ces 5 virus.

Quoiqu'il en soit, on constate que tous les bactériophages ne se valent pas et que certains se distinguent clairement par des spectres d'hôtes larges et complémentaires.

On soulignera le fait qu'aucun effort particulier n'a été déployé dans l'isolement et la recherche de bactériophages actifs et à large spectre puisque seulement deux sessions d'isolement ont été réalisées (en addition de celle réalisée initialement), utilisant à chaque fois un faible nombre de souches. En recherchant de tels candidats avec plus de détermination, il y a peu de doutes qu'une couverture supérieure à 70 % puisse être obtenue sur notre collection de souches cliniques.

IV – Une activité par-delà les frontières...

Un autre point intéressant est l'absence d'effet centre important concernant l'activité des bactériophages, laissant a priori augurer d'un niveau de couverture proche d'un centre à l'autre.

On connaît l'influence de l'écologie locale d'un service et plus généralement celle des patients qui y sont habituellement admis sur le type de germes et d'antibiorésistance présents dans les infections nosocomiales [*Ginn-2012, Lax-2015, Lopez-Ferraz-2014*]. S'agissant de l'origine des souches testées, on peut raisonnablement faire l'hypothèse que ces services très divers (réanimations médicales, chirurgicales, mixtes, universitaires ou non) présentent des différences locales d'écologie microbienne.

Nous n'avons cependant pas réalisé actuellement d'analyse visant à appuyer ce point à l'aide de l'ensemble des données liées aux souches isolées (antibiogramme, facteur de virulence, sérotype, etc.). Néanmoins, les données du phylogroupe, tout en confirmant l'implication majeure du phylogroupe B2 (60 % en moyenne), montrent une certaine variation, notamment concernant les phylogroupes minoritaires (**Figure 67**), confirmant la non homogénéité des populations bactériennes d'un centre à l'autre.

En première analyse, la couverture globale des bactériophages ne semble donc pas influencée par l'écologie locale. Ce résultat, attendu, est entre autres en rapport avec l'absence de lien entre antibiorésistance et résistance aux bactériophages, dont les mécanismes sont différents.

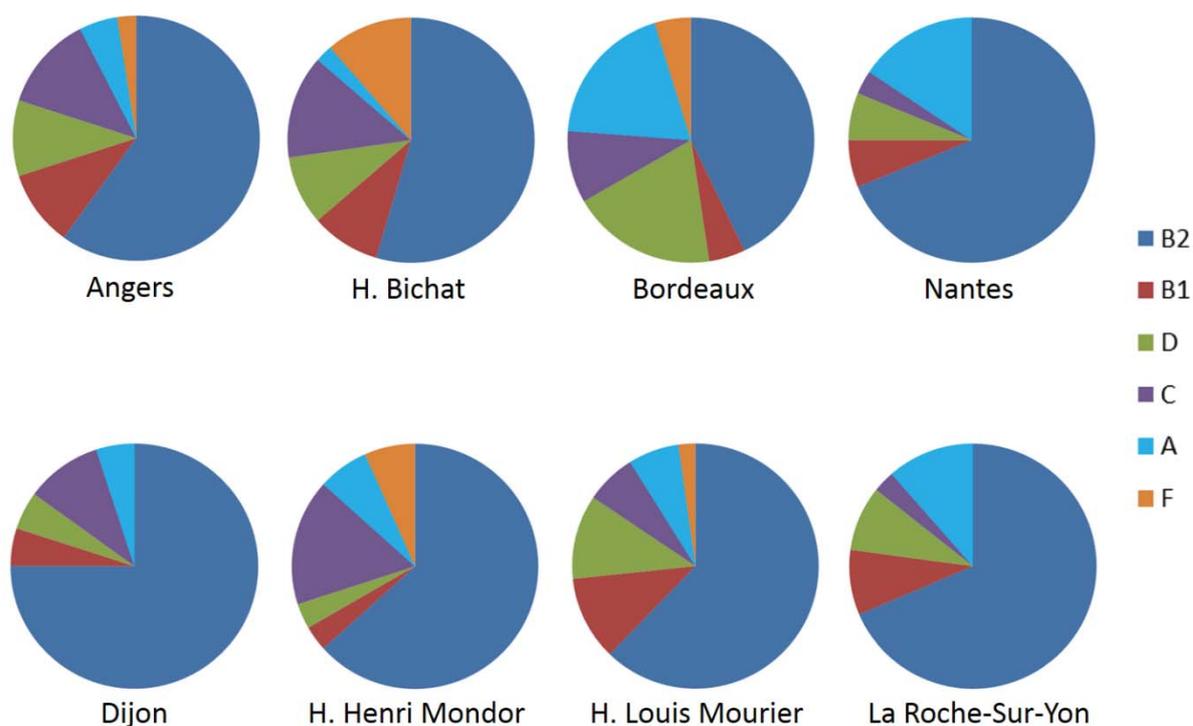


Figure 67. Répartition des différents phylogroupes selon la provenance des souches. Seuls les centres ayant fourni plus de 20 souches sont représentés. Analyse effectuée sur un total de 275 souches.

Section 2 – Infection pulmonaire et phagothérapie

Au cours de la seconde partie, nous avons démontré la faisabilité d'une prise en charge thérapeutique d'une pneumonie par les bactériophages.

I – L'outil de bioluminescence : une technologie robuste

L'outil de bioluminescence est un outil extrêmement performant possédant de nombreux avantages :

- Les mêmes animaux sont suivis au cours du temps, ce qui autorise une approche individualisée, permettant une diminution des variations interindividuelles.
- Le suivi des mêmes animaux au cours du temps permet d'éviter les sacrifices itératifs à différents temps, nécessaires dans les approches classiques pour assurer une évaluation cinétique. De plus, les animaux utilisés pour l'évaluation cinétique sont les mêmes que ceux permettant d'établir la mortalité expérimentale. Il en

résulte une diminution du nombre d'animaux nécessaires, d'un facteur évalué à au moins 4.

- Le système utilisé ici, comportant l'opéron *Lux* complet de *Photobacterium luminescens*, génère un signal lumineux continu et autonome, ce qui permet de s'affranchir de la nécessité d'injection d'un substrat tel la luciférine et donc d'un facteur variable supplémentaire (diffusion de la luciférine sur le lieu de l'infection, variation interindividuelle, délai injection / acquisition, ...).

L'évolution de l'inoculum bactérien a été approchée essentiellement de façon indirecte, *via* la quantification du signal de bioluminescence. À ce titre, avec un recul de plus de 10 ans, nous pouvons affirmer que l'outil de bioluminescence est suffisamment robuste pour autoriser une corrélation entre quantité de lumière et quantité de bactéries présentes dans les organes, rendant redondante l'évaluation directe du compte bactérien dans ceux-ci. Dans la plupart des publications ayant évalué cette corrélation celle-ci est supérieure à 90 % [Andreu-2011, Francis-2000, Francis-2001, Henken-2010, Rocchetta-2001].

II – Les limites des modèles infectieux pulmonaires

La principale critique qui peut être formulée concerne la précocité du traitement mis en place, seulement 2 heures après l'infection. Les questions liées sont les suivantes : le traitement conserve-t-il ses vertus thérapeutiques si délivré plus tardivement et n'est-il pas trop précoce, ne laissant pas le temps à l'infection de se développer ? Nous n'avons pas de réponse expérimentale directe à ces questions mais plusieurs éléments de réflexion :

- Les souris traitées par le bactériophage ont développé une pneumonie, alors même qu'elles survivront. Le signal de bioluminescence témoigne d'une activité bactérienne bien présente et les prélèvements pulmonaires effectués à H16 montraient macroscopiquement des lésions lobaires (aspect de parenchyme pulmonaire hépatisé). Par ailleurs, le signal de bioluminescence ne devient pas inférieur chez les animaux traités par le bactériophage avant 6 heures d'infection évolutive. De plus, la morbidité enregistrée chez les animaux traités, sous la forme d'une perte de poids, est identique à celle observée chez les animaux non traités. Ces constatations sont là pour attester de la présence réelle d'une pathologie

infectieuse pulmonaire, même chez les animaux ayant reçu le traitement par bactériophages, éliminant ainsi la possibilité d'une infection traitée trop tôt, avant même son développement. La survie est néanmoins obtenue, d'une part en limitant l'atteinte pulmonaire et d'autre part en limitant aussi vraisemblablement la diffusion septicémique de l'infection et ses conséquences générales.

- Le développement de la pneumonie est extrêmement rapide, quand bien même un traitement est apporté 2 heures après l'infection. Six heures après l'infection, même chez les animaux traités, les analyses cytologiques retrouvent déjà une cellularité composée de polynucléaires neutrophiles, témoin franc d'une agression alvéolaire.

- Lorsqu'on analyse les données de la littérature concernant les modèles murins de pneumonie servant à valider tel ou tel type d'antibiothérapie, on constate que celle-ci est administrée dans des délais similaires (entre 1 et 6 heures après l'infection) [*Bedos-1998, Docobo-Perez-2012, Dominguez-Herrera-2013, Harris-2013, Jacqueline-2013, Pichardo-2005, Sauve-1996, Teneback-2013, Wang-2005*]. Ce délai, pour assurer une survie de 100 %, doit nécessairement être court avant que n'apparaissent des lésions irréversibles au niveau pulmonaire et une diffusion septicémique de l'infection, qu'aucun traitement, quel qu'il soit, ne pourra être en mesure de réparer. Dans les travaux ayant tenté un traitement plus tardif, que ce soit lors d'un traitement par antibiotique [*Wang-2005*] ou par bactériophages [*Debarbieux-2010*], la survie a été logiquement diminuée.

- Enfin, le modèle d'infection utilisé, même si parfaitement capable de mimer une pneumonie, reste un modèle artificiel qui est limité dans son adéquation avec la situation clinique réelle. L'inoculum est important (1 à 4.10^7 cfu), constitué d'une souche très virulente, délivré en 1 fois. Rapporté au poids de l'animal (25 g) et transposé à un homme de 70 kg, cela équivaldrait à infecter un sujet humain en lui administrant 1.10^{11} cfu en une fois. Il s'agit par ailleurs d'un inoculum capable d'induire une létalité totale et ceci particulièrement rapidement (80 % de la mortalité est observée en 36 heures pour l'inoculum le plus élevé). La précocité d'introduction d'un traitement apparaît dans ce contexte nécessaire pour obtenir une survie maximale.

III – Antibiotique et bactériophage : une cinétique de décroissance bactérienne comparable ?

Nous avons observé une décroissance similaire du signal de bioluminescence, aussi bien lors du traitement par antibiotique que lors du traitement par le bactériophage 536-P1. *In vitro*, la cinétique n'a jamais été comparée entre un bactériophage et un antibiotique à notre connaissance. Ces comparaisons resteraient cependant artificielles car les résultats conditionnés par de multiples paramètres propres à chaque agent thérapeutique, par définition impossibles à égaliser dans les deux camps compte tenu de leur nature différente : quelle concentration d'antibiotique utiliser ?, quel multiple de la CMI²⁶ ?, quel inoculum bactérien ?, quelle multiplicité d'infection pour le bactériophage ?, etc. Néanmoins, d'un point de vue mécanistique et théorique, les bactériophages semblent plus rapides que les β -lactamines dans leur mode d'action : en imaginant une infection de chaque bactérie par au moins un bactériophage (condition atteinte à partir d'une MOI > 1) et compte tenu de la durée moyenne d'un cycle infectieux, on peut estimer que la quasi-totalité des cellules bactériennes sont lysées au bout de 15 à 20 minutes. Les β -lactamines, même avec des concentrations élevées, n'arrivent pas à atteindre une telle activité [Lopez-Cerero-2010, Norcia-1999, Sous-1985, Westh-1991].

Dans notre modèle infectieux pulmonaire, la posologie utilisée de bactériophage n'a pas été optimisée. Il est vraisemblable qu'en administrant une quantité de bactériophage 10 ou 100 fois supérieure, nous aurions constaté une baisse plus rapide du signal de bioluminescence (éventuellement supérieure à celle obtenue avec l'antibiotique).

Très peu d'études se sont intéressées à la comparaison de ces deux modalités thérapeutiques et un vaste champ de recherche est à développer dans ce domaine.

²⁶ Concentration minimale inhibitrice : il s'agit de la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle il n'y a pas de croissance visible de la souche bactérienne étudiée, les conditions de culture étant standardisées.

IV – L'efficacité d'un traitement délivré par voie locale : vers l'aérosol-phagothérapie ?

Le traitement, administré par voie intra-nasale dans notre modèle, permet d'obtenir des concentrations importantes du bactériophage sur le site infectieux.

Dans le cadre d'une approche clinique, la délivrance de l'agent thérapeutique par cette voie, *via* aérosol, constitue une approche actuellement en cours de réévaluation avec les antibiotiques, notamment dans le cadre du traitement des PAVM. Cette technique permet d'obtenir de fortes concentrations tissulaires pulmonaires associées à une faible diffusion systémique. Grâce à l'avènement de nouvelles techniques d'aérosolisation (nébuliseurs ultrasoniques ou à plaques vibrantes) il est actuellement possible d'obtenir des particules de diamètre aérodynamique médian inférieur à 5 µm, autorisant l'atteinte du poumon profond et la diminution de la fraction déposée en extra-pulmonaire (sonde d'intubation, circuit du respirateur, arbres bronchiques, ...) [Dhand-2004, O'Riordan-1994]. Dans un modèle animal de porcelet ventilé, les concentrations d'antibiotiques atteintes dans le tissu pulmonaire par aérosolisation étaient en moyenne 10 fois supérieures à celles générées par une antibiothérapie administrée par voie intraveineuse [Goldstein-2002a, Goldstein-2002b]. Le traitement par aérosol était accompagné d'une stérilisation accrue des segments pulmonaires cultivés [Goldstein-2002a]. Chez l'homme, le traitement par aérosol (ceftazidime et amikacine) s'est révélé aussi efficace qu'une antibiothérapie identique administrée par voie intraveineuse dans la prise en charge des PAVM à *P. aeruginosa* [Lu-2011], validant cliniquement cette approche.

En matière de phagothérapie, l'idée de procéder à la nébulisation de bactériophages pour une utilisation pulmonaire n'est pas nouvelle et a déjà été étudiée sur un plan essentiellement théorique [Cooper-2014, Golshahi-2008, Sahota-2015, Turgeon-2014] avec également quelques évaluations thérapeutiques positives chez l'animal [Cao-2015, Oliveira-2010]. Chez l'homme, cette approche, déjà utilisée en Pologne [Miedzybrodzki-2012], reste à valider avec deux indications potentiellement prometteuses : la prise en charge des colonisations bronchiques (patients atteints de mucoviscidose ou de dilatations des bronches) et la prise en charge des pneumonies, notamment lorsque celles-ci sont encadrées sur le plan microbiologique tel qu'en réanimation chez les patients sous ventilation mécanique. Cette dernière approche peut se concevoir sur un plan curatif mais également préventif compte tenu de la

physiopathologie particulière de ce type infection (cf. page 34). Nous avons par ailleurs montré, dans un travail publié réalisé *ex vivo* sur des expectorations de patients mucoviscidosiques, que des bactériophages de *P. aeruginosa* étaient parfaitement capables d'exercer leur activité dans ce milieu biologique complexe [Saussereau-2014]. Ces résultats, ajoutés aux preuves expérimentales déjà existantes en matière de traitement des pneumonies à *P. aeruginosa* [Debarbieux-2010, Henry-2015, Morello-2011], renforcent la crédibilité d'une telle approche et également sa transposition potentielle dans le cadre des PAVM où *P. aeruginosa* est un pathogène majeur.

Nous avons à ce titre le projet d'étudier la capacité d'un cocktail de bactériophages à diminuer la colonisation respiratoire et l'incidence des PAVM à *P. aeruginosa* et *E. coli* chez les patients sous ventilation mécanique.

Enfin, il convient de garder à l'esprit une évidence : d'importantes différences existent entre un modèle d'infection pulmonaire par voie intra-nasale chez la souris et la pneumonie acquise sous ventilation mécanique chez un patient de réanimation. Notamment, le contexte du poumon soumis à la ventilation mécanique est particulier, car exposé à un stress physique en pression et en volume, cette organe peut développer une inflammation à minima, le rendant à ce titre très différent d'un poumon sain [Kuipers-2011]. L'effet pro-inflammatoire éventuel de l'administration d'une solution de bactériophages dans ce contexte doit être envisagé, de même que celui potentiellement généré par la lyse rapide des bactéries *in situ*.

V – L'adaptation : un processus évolutif extrêmement puissant

L'adaptation d'un bactériophage à un hôte bactérien est un processus naturel, se réalisant en permanence depuis que bactéries et bactériophages coexistent, autorisant notamment les bactériophages à contourner les mécanismes de résistances développés par les bactéries. Les nombreuses données de la littérature s'intéressant aux interactions bactéries-bactériophages ont mis en évidence plusieurs mécanismes par lesquels les virus sont également capables d'augmenter leur pouvoir infectieux : ceux-ci incluent par exemple l'amélioration des capacités d'adsorption par modification du récepteur [Duplessis-2006, Qimron-2006, Ravin-2002, Uchiyama-

2011], l'augmentation du nombre de particules virales relargués [Nguyen-2014] ou l'amélioration de la résistance aux mécanismes de défenses antivirales en utilisant le système CRISPR-Cas [Bondy-Denomy-2013, Seed-2013].

En laboratoire, l'adaptation peut être réalisée facilement *in vitro* lorsque l'on souhaite améliorer l'action d'un bactériophage sur un hôte bactérien. Un certain degré d'amélioration est empiriquement attendu, notamment lorsque l'on s'intéresse à l'interaction d'un bactériophage avec une souche hôte secondaire, c'est-à-dire une souche qui n'est pas l'hôte initial ayant permis son isolement et sa production. En effet, la procédure d'isolement initiale consiste à exposer une bactérie donnée à une population virale variée contenue dans un échantillon d'eau résiduaire (dans notre cas) : par essence, les virus d'emblée les plus adaptés à cette bactérie (en terme d'adsorption, de vitesse de cycle infectieux, de contournement des systèmes de résistance, ...) seront ceux qui seront amplifiés préférentiellement et isolés par la suite. On considère à ce titre qu'un bactériophage possède, vis-à-vis de l'hôte primaire ayant permis son isolement et son amplification, une activité de base globalement optimale. La chose est différente lorsqu'on soumet ce même bactériophage à un hôte secondaire « nouveau » qu'il est en mesure d'infecter mais avec une marge d'optimisation potentielle. C'est le propos de l'adaptation que de faire émerger et sélectionner ces optimisations.

On soulignera que dans notre cas, l'évolution réalisée n'est pas une coévolution bactérie-bactériophage mais une évolution virale uniquement puisqu'après une phase de lyse bactérienne, la population virale obtenue en fin de passage est confrontée à une culture bactérienne « fraîche » au passage suivant, identique à chaque nouveau cycle.

L'adaptation repose sur l'apparition de virus mutés : dans le cas de l'adaptation du bactériophage 536-P7 à la souche PDP302, la quantité de virions produite à chaque passage était massive, fluctuant entre 4.10^{11} et 1.10^{12} pfu par cycle. La probabilité qu'une mutation apparaisse est dès lors statistiquement importante. Même si la fidélité des ADN polymérases bactériennes et phagiques (pourvues d'une activité exonucléasique 3'-5' permettant la correction d'erreurs) est relativement élevée, évaluée grossièrement entre 10^{-5} à 10^{-7} erreur par paire de bases *in vitro* et 10^{-9} à 10^{-11} *in vivo* [Fijalkowska-2012, Loeb-1982], le nombre de virions produits (avec un génome de $1,4.10^5$ pb) assurent une occurrence suffisante de ces événements

pourtant rares à l'échelle d'un génome. L'apparition d'un phénotype viral conférant un avantage en matière d'infectivité conduira à son amplification préférentielle lors des cycles suivants, pour finalement devenir prédominant au sein de la population virale.

S'agissant d'une adaptation réalisée *in vitro*, il est important de préciser qu'elle ne permet pas de garantir la sélection d'un bactériophage variant présentant systématiquement une plus grande efficacité *in vivo* [Henry-2013].

Dans le cas du bactériophage 536-P7, nous avons montré que l'adaptation était responsable d'une modification du génome dans une région intergénique, via une duplication d'une séquence répétée-inversée (page 162).

En premier lieu, nous avons trouvé que cette séquence répétée-inversée (5'>AAGGGGCTTTCGCCCTT>3') était présente à 5 reprises dans le génome du bactériophage 536-P7, à chaque fois en position intergénique. Une analyse plus large (Blastn) restreinte aux virus a montré que cette séquence était présente chez un grand nombre de bactériophages : en se limitant aux 100 premiers résultats, 95 % des organismes viraux comportant cette séquence (avec une homologie de 92 à 100 %) appartenaient à l'ordre des *Caudovirales*. L'étude en fréquence des nucléotides les plus conservés a permis de dégager une séquence consensus hautement conservée dans ses portions latérales (**Figure 68**).



Figure 68. Représentation en fréquence des nucléotides composant la séquence consensus, à partir des alignements de séquences obtenus par requête Blastn (séquence soumise : séquence répétée-inversée du bactériophage 536-P7, analyse restreinte au taxon « virus », limitée aux 100 premiers résultats). La hauteur des lettres est proportionnelle à la fréquence de représentation du nucléotide, un score de 2 bits correspond à la probabilité de représentation la plus élevée (100 %). Figure réalisée à l'aide du serveur WebLogo [Crooks-2004].

La position intergénique de cette séquence, le plus souvent située juste en aval du codon stop d'un gène, l'existence d'une séquence poly-A en aval ainsi que la structure secondaire adoptée par une telle séquence lorsque transcrite en ARNm évoque en premier lieu un terminateur de transcription, indépendant de cofacteurs [Primrose-2004]. Cette séquence consensus, déjà décrite [Brendel-1985], est dupliquée dans le bactériophage 536-P7-PDP302 à un de ces sites, aboutissant à un changement de la séquence de l'ARNm produit et à la formation d'une structure secondaire différente.

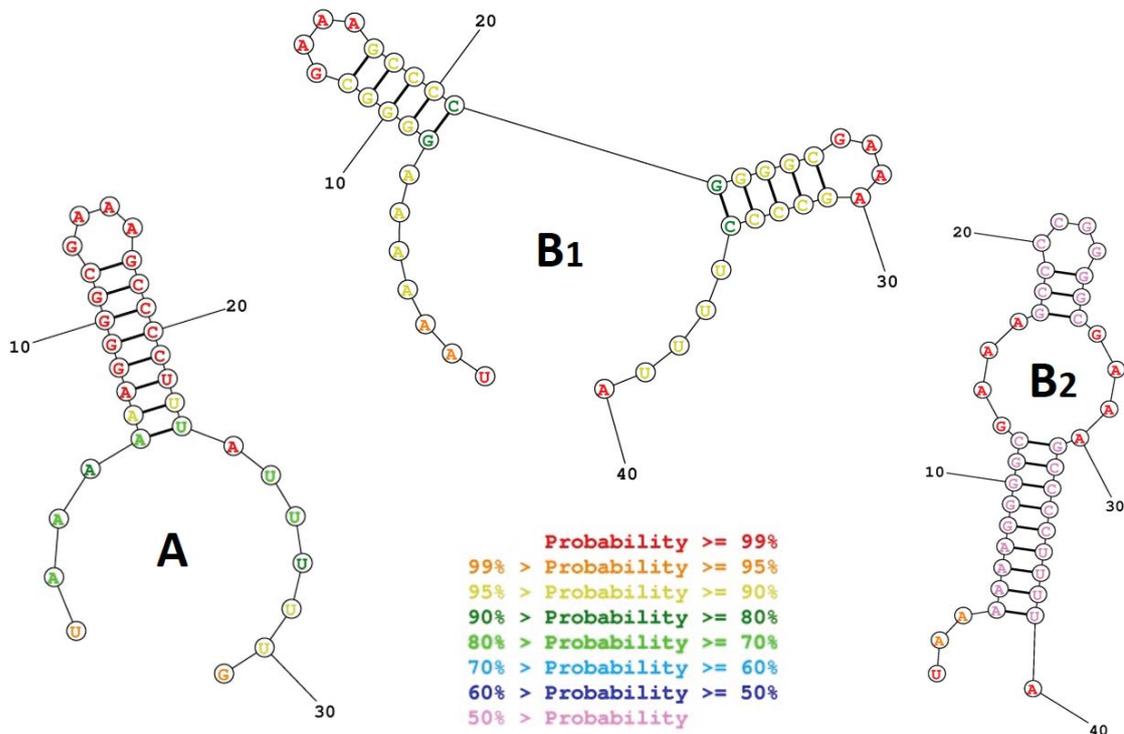


Figure 69. Prédiction des structures secondaires des terminateurs de transcription tels que codés par le bactériophage 536-P7 natif (A) et adapté (B1 et B2). Les nucléotides sont numérotés dans le sens de polymérisation de l'ARN polymérase (5' > 3'), le premier nucléotide est celui présent juste après le codon stop du gène transcrit. Dans le cas du bactériophage natif, la structure secondaire est normale et fonctionnelle (A). Dans le cas du bactériophage 536-P7-PDP302, la duplication de la séquence consensus génère deux structures tige-boucles plus courtes avec une queue poly-U conservée (B1). Une seconde structure secondaire de probabilité plus faible est également prédite, sans queue poly-U (B2). Simulation effectuée en utilisant le serveur *RNAstructure* [Reuter-2010].

Alors que la structure secondaire de la portion d'ARNm concernée est typiquement celle d'un terminateur de transcription fonctionnel chez le bactériophage natif, celles prédites chez le bactériophage adapté sont largement différentes (**Figure 69**).

Les conséquences fonctionnelles de ces modifications ne sont pas certaines mais on peut formuler l'hypothèse qu'elles occasionnent un arrêt inconstant ou nul de la transcription du gène associé, permettant une transcription plus intense du ou des gènes situés en aval. De fonction malheureusement inconnue, le gène situé juste en aval est à même de coder pour des protéines exerçant des fonctions clé, capable de modifier la vitesse du cycle viral ou la quantité de particules virales relarguées. À ce titre, Nguyen *et al.* [Nguyen-2014] ont observé, dans le cas du bactériophage T7, que la perte du terminateur de transcription T ϕ chez un mutant était capable de modifier les valeurs clé du cycle infectieux, avec une diminution de la quantité de virus libérés et un allongement du temps de lyse, liées à une augmentation de l'expression des gènes situés en aval.

La conséquence finale globale de ces modifications impliquant un terminateur de transcription est cependant difficilement prévisible sans une analyse au cas par cas car elle est dépendante de la fonction des gènes situés en aval, de leurs interactions et de leurs régulations temporelles à l'aide de promoteurs spécifiques.

Section 3 – LM33-P1 : un bactériophage singulier ?

Le bactériophage LM33-P1 est un bactériophage particulièrement intéressant, illustratif de la richesse que constitue cette classe de virus. L'infinie diversité des bactériophages fait qu'il existe dans le monde des milliers de virus analogues à LM33-P1, distinguables par des propriétés aussi intéressantes concernant leurs spectres d'hôte et leurs paramètres cinétiques. Ce qui apparaît singulier l'est à l'échelle du petit nombre de bactériophages isolés au cours de ce travail mais ne l'est plus autant si l'on considère la diversité virale présente à plus large échelle. La question principale est de pouvoir trouver ces perles rares au sein de bactériophages plus classiques. En l'état actuel des connaissances, seules des procédures d'isolement et de test à haut débit sont à même de pouvoir relever ce défi. Couplées à une

collection représentative parfaitement caractérisée, il est alors envisageable de repérer rapidement des candidats intéressants, car par exemple spécifiques de tel ou tel séro groupe, possédant une enzyme capable de dégrader telle ou telle capsule, etc.

I – Une activité *in vitro*

La détermination des paramètres infectieux (adsorption, latence, nombre de particules virales formées) a révélé des valeurs affichant de bonnes performances. Comparée aux données de la littérature, la constante d'adsorption de LM33-P1 ($1,2 \cdot 10^{-8}$ mL/min) apparaît plus élevée (plus affine) que celles relevées dans la littérature pour les bactériophages modèles, d'un facteur 10 (on note des valeurs se répartissant entre $1 \cdot 10^{-11}$ et $6 \cdot 10^{-9}$ mL/min, lorsqu'évaluée en milieu riche à 35-37 °C, [Bayer-1968, Olkkonen-1989, Puck-1951, Storms-2012]). En termes de nombre de particules virales produites, LM33-P1 se situe plutôt dans la moyenne haute ([De Paepe-2006], tableau 1). En revanche, concernant la durée du cycle infectieux, celle-ci est particulièrement courte avec une lyse cellulaire survenant en moins de 10 minutes avec LM33-P1. Ce temps de latence est généralement supérieur à 15 minutes ([De Paepe-2006], tableau 1), même si le bactériophage T7 (virus modèle dont dérive LM33-P1) présente une valeur figurant parmi les plus basses (13 à 16 minutes selon les publications [Heineman-2007, Nguyen-2014]).

Alors même que le temps de latence est essentiellement déterminé par le génome viral, il s'agit d'un paramètre qui est également dépendant de l'hôte chargé d'effectuer la réplication virale malgré lui et pour un même hôte, de son état métabolique (et donc des conditions de culture) [Hadas-1997]. Dans nos expériences, nous avons utilisé des conditions classiques (milieu LB sans supplémentation, à 37 °C). La souche LM33, hôte du bactériophage LM33-P1, peut cependant être particulièrement efficace pour permettre la réplication du bactériophage.

II – Une activité *in vivo*

Lors des évaluations *in vivo* de l'activité de LM33-P1, nous avons constaté que ce bactériophage conservait son pouvoir bactéricide dans les différents modèles étudiés.

Plusieurs remarques peuvent être faites sur ce plan. En premier lieu, nous n'avons pas utilisé la mortalité comme critère de jugement, pour plusieurs raisons : le modèle d'infection urinaire rétrograde ne se prête pas à ce type d'analyse car par définition n'est pas létal, même avec des souches extrêmement virulentes [Vimont-2012]. Dans le cas du modèle de septicémie à point de départ sous-cutané, il n'a pas été mis en évidence de différence de mortalité entre les différents groupes, le plus probablement du fait d'un inoculum trop élevé (1.10^9 cfu). Enfin, dans le modèle de pneumonie, différentes souches d'*E. coli* ont été testées (n=10) mais aucune ne s'est révélée suffisamment virulente pour induire une infection létale, même avec des inocula très importants (5.10^8 cfu). Nous avons donc considéré uniquement les comptes bactériens au sein des différents organes cibles de l'infection en présence et absence d'un traitement par ce bactériophage.

Nous avons confirmé que lorsque le bactériophage était administré par voie intrapéritonéale, la diffusion était large, permettant une répartition du virus dans les différents organes étudiés, à même de minimiser les conséquences d'une bactériémie. Notamment, dans le modèle pulmonaire, l'injection IP d'une posologie 10 fois supérieure à celle administrée par voie IN permettait d'obtenir des concentrations virales équivalentes dans les poumons en présence d'infection. Cette majoration nécessaire lors de l'administration IP est en rapport avec une diffusion à l'ensemble des organes et notamment une vraisemblable rétention importante par le foie et la rate, observée avec les bactériophages T4 et λ [Geier-1973, Inchley-1969].

De façon surprenante, nous avons observé une efficacité quasi nulle du traitement par imipénème-cilastatine (au niveau du poumon et de la vessie) et par LM33-P1 (au niveau de la vessie). Dans le cas de l'imipénème, cette constatation peut recevoir deux explications principales :

- En premier lieu, seule une unique dose d'antibiotique a été administrée et le compte bactérien effectué respectivement 24 et 13 heures après cette injection selon qu'il s'agissait du modèle d'infection urinaire ou pulmonaire. L'absence d'efficacité peut être expliquée par la pharmacocinétique de la molécule imposant au moins 8 à 12 injections par 24 heures pour assurer des concentrations sanguines optimales et un temps passé au-dessus de la CMI suffisant pour garantir une activité bactéricide [Takata-2004].

- Un second point repose sur le fait que l'imipénème est une molécule rapidement dégradée par une enzyme rénale, la dehydropeptidase I, localisée sur l'épithélium tubulaire. Pour maintenir son activité *in vivo*, l'imipénème est systématiquement associée à un inhibiteur de dehydropeptidase, la cilastatine. La dehydropeptidase rénale de la souris présente une activité catalytique supérieure à son homologue humaine ([FDA-2007], page 210), aboutissant à une dégradation rapide de la molécule, même en présence de cilastatine [Petersen-1991]. Le fait qu'une baisse du compte bactérien soit néanmoins observée au niveau rénal peut être expliqué par la vascularisation importante de l'organe permettant l'apport d'imipénème intègre, alors que la vessie contient essentiellement de l'urine (vectrice de l'antibiotique) issue du processus rénal de filtration / concentration et donc largement exposée à la dehydropeptidase tubulaire. De même, grâce à cette vascularisation, on peut émettre l'hypothèse d'un recrutement plus large de cellules phagocytaires au niveau du parenchyme rénal.

Concernant l'absence d'effet de LM33-P1 sur le compte bactérien vésical, nous n'avons pas d'explication certaine. La présence du bactériophage est attestée dans la vessie, à des concentrations importantes, de l'ordre de 5.10^7 pfu/g. Lorsque l'on s'intéresse à la présence d'une résistance bactérienne acquise au bactériophage LM33-P1, nous avons pu mettre en évidence la présence de clones résistants dans la vessie à 48 heures post-infection (entre 0 et 80 % des clones récupérés selon les animaux). Néanmoins, cette proportion était inférieure à celle observée dans les reins où 80 à 100 % des clones étaient résistants, ne pouvant expliquer *per se* cette absence d'effet. Enfin, l'appareil urinaire des souris est particulier dans la mesure où l'osmolalité urinaire est très élevée si comparée à celle de l'homme (2000 à 3000 mosmol/Kg chez la souris [Coleman-1966], 50 à 1200 mosmol/Kg chez l'homme), avec une concentration en acides aminés et protéines très importante [Coleman-1966] alors qu'elle est quasi nulle chez l'homme. Ces conditions, à même d'influencer l'activité de différents bactériophages [Jonczyk-2011], pourrait expliquer l'incapacité du bactériophage LM33-P1 à diminuer le compte bactérien dans la vessie.

L'intérêt de l'administration incomplète d'un antibiotique au regard de sa pharmacocinétique (n'autorisant donc pas un régime thérapeutique correct) peut être questionnable. Les résultats obtenus sur ce point confirment cependant, si besoin était, qu'une unique dose d'antibiotique n'est pas capable d'exercer une action bactéricide significative soutenue *in vivo*. Le propos était ici de comparer deux modalités thérapeutiques non optimisées sur le plan pharmacocinétique sans vouloir positionner l'un par rapport à l'autre. Les résultats obtenus montrent en tout cas que les bactériophages, même si dépendants d'une pharmacocinétique beaucoup plus complexe, présentent l'avantage d'augmenter leur concentration sur le lieu de l'infection sans nécessité de procéder a priori à des réinjections. Malgré cela, la dose initiale optimale reste un paramètre inconnu et particulièrement critique (cf. page 91) car il s'agit d'obtenir une quantité de virus sur le lieu de l'infection suffisante pour initier un cycle viral le plus rapidement possible et toucher idéalement la totalité de la population bactérienne. Ceci avant d'avoir à faire face à l'éventuelle émergence de souches résistantes au bactériophage et avant que l'inoculum bactérien n'atteigne un volume létal. Il reste à ce titre impératif que des travaux soient mis sur pied afin d'étudier *in vivo* la pharmacocinétique des bactériophages en présence de leur cible, afin de déterminer les voies d'administration et les posologies optimales.

III – Une couverture large mais une proportion non négligeable de souches résistantes

Nous avons observé que le bactériophage LM33-P1 était capable de lyser un peu plus de 70 % des souches de sérotype O25b. La question sous-jacente est de savoir pourquoi les autres souches ne sont pas infectées, afin de comprendre les mécanismes de cette résistance. Dans un travail préliminaire, nous avons étudié l'adsorption de LM33-P1 sur une dizaine de souche O25b non lysées par ce bactériophage : dans 100 % des cas, la résistance était médiée par une absence d'adsorption virale, laissant envisager une absence ou une non accessibilité du récepteur (le LPS O25b). L'absence d'expression constitutive du LPS O25b chez ces souches est peu probable même si elle reste possible dans la mesure où le sérotypage a été effectué par une méthode génotypique, n'analysant pas directement le phénotype. Il en est revanche plus plausible que le LPS de ces souches soit masqué

par une structure exo-polysaccharidique (capsule), réalisant un masquage du récepteur, stratégie habituelle développée par les bacilles Gram négatif pour résister aux bactériophages [Labrie-2010] et/ou mieux échapper à la reconnaissance par le système immunitaire [Jann-1987]. C'est d'ailleurs une observation que nous avons faite sur les clones résistants de la souche LM33 apparaissant après leur évolution avec LM33-P1 : une proportion importante de ces clones présente des modifications phénotypiques responsables d'un aspect mucoïde en culture, totalement absent chez la souche sauvage.

Mais la lutte millénaire existant entre bactéries et bactériophages a permis d'équiper ces derniers en enzymes capables d'exercer une activité de dépolymérisation des capsules bactériennes. Souvent attachées aux fibres de queues des bactériophages, ces dépolymérases, bien décrites pour les capsules d'*E. coli* ou de *K. pneumoniae*, sont essentiellement des endo ou exo-sialidases, assurant la dépolymérisation des acides sialiques capsulaires [Bull-2010, Hughes-1998, Lin-2014, Mushtaq-2005, Schwarzer-2015].

Ainsi, en matière de phagothérapie et appliquée à la situation qui nous intéresse, l'utilisation synergique d'un bactériophage additionnel possédant un tel équipement enzymatique apparaît comme une stratégie pertinente et envisageable [Born-2014, Lin-2014, Schmerer-2014], à même de re-sensibiliser les souches O25b résistantes par ce mécanisme.

Dans le cas du bactériophage LM33-P1, l'étude *in silico* de la portion enzymatique attachée à la fibre de queue a révélé qu'il ne s'agissait pas d'une endosialidase, mais d'une hydrolase de structure plus simple (cf. page 175). Sur le versant bactérien, nous ne savons pas si la souche LM33 possède une capsule même si, indirectement, elle contient dans son génome l'opéron *kps* codant pour les capsules du groupe 2 [Whitfield-2006], avec cependant l'absence du gène *kpsE*.

IV – Un bactériophage hautement valorisable

Les caractéristiques particulières du bactériophage LM33-P1 peuvent laisser envisager une exploitation de ce virus à deux niveaux : une utilisation thérapeutique et une utilisation diagnostique.

L'approche thérapeutique, d'un point de vue théorique, pourrait s'intégrer dans une prise en charge curative mais également préventive, à définir. Le portage des souches O25b-ST131 étant digestif, l'effet d'une « décontamination » digestive par la prise orale du bactériophage serait par exemple intéressant à évaluer chez les patients porteurs sains.

Dans le cadre du diagnostic, la spécificité du bactériophage LM33-P1 peut être mise à profit pour la détection des pathogènes O25b-ST131 dont on connaît épidémiologiquement le profil de résistance élevé aux antibiotiques. L'utilisation, sous forme de protéine recombinante, de la fibre de queue du bactériophage qui assure la reconnaissance du LPS bactérien est à même d'être intégrée à des systèmes diagnostiques automatisés. Cette stratégie est déjà utilisée dans les systèmes automatiques de type VIDAS (Biomérieux, France) permettant la détection des souches d'*E. coli* O157:H7. L'anticorps primaire, classiquement utilisé dans ces tests de type ELISA, est remplacé ici par la fibre de queue d'un bactériophage reconnaissant spécifiquement les souches de sérotype O157 et assurant leur capture. Un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline est ensuite ajouté, suivi de l'addition d'un substrat qui est transformé en une molécule fluorescente. L'intensité de la fluorescence est alors dépendante du nombre de bactéries O157 présentes dans l'échantillon testé [ISHA-2014].

Sans aller jusqu'à ce type de produit présentant une automatisation avancée (et donc un coût), l'utilisation de quelques microlitres d'une solution du bactériophage LM33-P1 sur une souche à tester peut apporter en quelques heures une réponse binaire (sensible / résistante), en lien avec le sérotype O25b/non O25b, avec une sensibilité d'environ 70 % et une spécificité de 100 %. Ce test rapide et très peu onéreux pourrait permettre, en cas de réponse positive, d'avertir précocement le clinicien sur le risque d'antibiorésistance (principalement aux fluoroquinolones et aux β -lactamines par sécrétion de β LSE) et ce 24 à 48 heures avant d'obtenir un antibiogramme. La sensibilité du test pourrait être améliorée à l'aide d'un ou plusieurs bactériophages « helper », capable de couvrir les souches O25b non détectées par LM33-P1.

Perspectives et conclusions

Il est midi : c'est l'heure de la réunion quotidienne avec nos collègues de l'équipe de microbiologie de l'hôpital. C'est là que nous faisons le point sur chaque patient, notamment sur leur évolution et leur prise en charge thérapeutique sur le plan infectieux.

TB, notre microbiologiste, nous présente les premiers résultats dont elle dispose concernant l'examen cytot bactériologique des urines de Madame P, 36 ans, admise en milieu de nuit pour la prise en charge d'un choc septique compliquant une pyélonéphrite. L'analyse par MALDI-TOF de l'uroculture liquide confirme qu'il s'agit d'une souche d'E. coli et le test rapide utilisant la technique PhageTest a révélé qu'il s'agissait d'une souche appartenant au complexe clonal O25b-ST131, une véritable plaie. MP, l'Interne en charge du patient rassure d'emblée TB : la patiente évolue favorablement, et vu ces facteurs de risques, elle a été mise sous traitement large spectre comportant l'association UriPhage et imipénème-cilastatine. Tout en tempérant fortement les propos de MP, lui faisant remarquer qu'elle est toujours sous une posologie confortable de noradrénaline avec des paramètres biologiques qui ne s'améliorent aucunement depuis sa prise en charge, le chef de service évoque la mise en route d'un traitement par Carbatère²⁷ dans l'hypothèse d'une souche sécrétrice de carbapénémase, dans l'attente de l'antibiogramme. SJB, un des médecins de l'équipe de réanimation, fait remarquer que l'utilisation de cette nouvelle pénicilline résistante aux carbapénémases, actuellement en ATU²⁸, est réservée aux formes les plus sévères et lorsqu'il existe une très forte suspicion de carbapénémase. Il ajoute que même si la patiente ne s'améliore pas encore, sa situation est contrôlée et stable. Notre microbiologiste, sans vouloir paraître catégorique, nous explique que le test de sensibilité in vitro de la souche vis-à-vis du cocktail UriPhage n'est pas terminé mais que vu l'aspect des cultures en cours la souche semble être sensible. Nous décidons d'un commun

²⁷ Le Carbatère est la dernière β -lactamine mise sur le marché, dont la structure chimique la rend résistante aux β LSSE et carbapénémases. Sa toxicité hépatique en fait réserver l'utilisation aux infections les plus graves après évaluation de la balance bénéfice-risque.

²⁸ Autorisation Temporaire d'Utilisation : il s'agit d'un régime exceptionnel permettant l'utilisation (prescription, dispensation) d'un médicament ne bénéficiant pas encore d'une autorisation de mise sur le marché, notamment lorsqu'il s'agit de molécules destinées à traiter des maladies graves ou rares en l'absence d'autres traitements appropriés. L'ATU est délivrée par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament.

accord de nous donner quelques heures de recul et de réévaluer la situation en fin d'après-midi avant une décision finale.

*Un des Internes présente ensuite le cas de Monsieur T, pris en charge il y a maintenant 2 semaines pour un choc septique compliquant une péritonite par perforation dans le cadre d'une diverticulose colique. Colonisé rapidement à *P. aeruginosa* après sa mise sous ventilation mécanique, il a développé une pneumopathie acquise sous ventilation mécanique à ce même germe, traitée depuis 24 heures à l'aide d'un cocktail générique de bactériophages administré par aérosol et développé pour cette indication. Les échanges gazeux sont médiocres, mais ont cessé de se dégrader. L'antibiogramme de la souche ne laisse pas une grande place à l'antibiothérapie en dehors de l'utilisation de la classe des aminosides, déjà débutés. TB nous apprend que la souche est couverte par seulement un unique bactériophage du cocktail et qu'elle a préféré mettre en route une galerie de tests à la recherche d'autres phages disponibles dans la phagothèque locale²⁹ : elle sera en mesure de nous donner une préparation dans l'après-midi en cas de besoin.*

*Viens ensuite Monsieur O., 68 ans, admis pour sepsis sévère dans le cadre d'une endocardite de la valve tricuspide à *S. aureus*, compliquant la mise en place d'un pacemaker. Confirmée ce matin par les données échographiques et le résultat des hémocultures, cette endocardite nosocomiale a été prise en charge par un cocktail générique de bactériophage anti-staphylococcique par voie intraveineuse. SJB demande à notre microbiologiste quand sera disponible une préparation dédiée. TB nous annonce l'identification de deux autres candidats dont elle a demandé les préparations thérapeutiques au CNRP³⁰, faute d'en disposer sur place. Elles seront disponibles demain matin. Se pose alors la question du retrait du pacemaker et de ses sondes, classiquement envisagé dans ce type d'infection. SJB rappelle le résultat de 2 études cliniques positives montrant que plus de 80 % des patients ont pu être guéris sans ablation du matériel lorsque traité par des bactériophages. Le chef de service fait alors remarquer à juste titre qu'il s'agissait de préparation de bactériophages du laboratoire Wonder, spécialement sélectionnés pour exercer une activité anti-biofilm et que nous n'avons pas la certitude que les bactériophages*

²⁹ Avec la création du Centre National de Référence en Phagothérapie (CNRP) en 2022, chaque hôpital dispose maintenant d'une copie standardisée d'une collection de bactériophages validés en thérapeutique (efficacité et innocuité), particulièrement sélectionnés pour leurs spectres.

³⁰ Centre National de Référence en Phagothérapie (CNRP), cf. note 29.

administrés actuellement au patient soient aussi efficaces sur ce plan. TB nous propose de regarder en détail l'équipement enzymatique des bactériophages utilisés et de regarder s'il existe des données in vitro sur un potentiel effet anti-biofilm.

*Et puis il y a le jeune M, 22 ans, dans nos murs depuis plus d'un mois mais bientôt sur le départ. Victime d'un accident de la voie publique aux commandes de son deux-roues, avec traumatisme crânien grave et contusion abdominale, il a présenté comme problème persistant une fracture ouverte complexe du tibia gauche et rapidement une ostéite précoce à *S. epidermidis* dont le phénotype de résistance aux antibiotiques nous pose problème. Alors qu'il va être prochainement sevré de sa trachéotomie, ce problème orthopédique reste le seul handicap susceptible d'altérer durablement voir définitivement sa qualité de vie. Alors que SJB, le ton morne, nous annonce la ré-augmentation des paramètres inflammatoires du patient et les signes infectieux locaux non résolutifs, TB proclame fièrement avec sourire, certaine de son effet, que le CNRP, après 2 semaines de recherche, a enfin trouvé 2 bactériophages farouchement actifs contre la souche du jeune M. De notre côté, après 3 semaines de tests, aucun des 5 cocktails disponibles administrés successivement, chose inhabituelle, n'avait en effet montré une activité clinique satisfaisante, comme le laissait présager certains tests in vitro réalisés en matrice complexe. Devant le refus catégorique du patient de toute prise en charge chirurgicale et ses exhortations répétées nous priant de trouver le bon virus, nous commençons à désespérer. Voilà une bonne nouvelle qui va également permettre de calmer, définitivement nous l'espérons, la colère des parents.*

*La réunion se poursuit avec d'autres cas, sans problème infectieux particulier. Nous avons faim. Avant de quitter la salle, LM, la cadre du service, me rappelle de prescrire la décontamination digestive de Mme S., transplantée rénale et colonisée à *K. pneumoniae* β LSE : la préparation de bactériophages validée dans cette indication, jusqu'alors en rupture de stock, est à nouveau disponible.*

La fiction n'est pas réalité... mais peut préfigurer certains éléments du futur.

La phagothérapie n'est pas une arme thérapeutique universelle. Elle doit faire l'objet d'une évaluation approfondie et rigoureuse, unique condition à même d'établir son champ d'activité le plus efficace et présentant le meilleur rapport bénéfice/risque. Il

s'agit néanmoins à ce jour de l'arme thérapeutique la plus prometteuse de par le polymorphisme de ses agents antibactériens. Ce polymorphisme est une richesse, la promesse d'une variété inépuisable, mais elle a un prix : dans certains cas, il faudra chercher, trouver, choisir, tester et optimiser les candidats. Par rapport aux antibiotiques, la phagothérapie demandera un changement complet des habitudes de prescriptions, une collaboration étroite avec les laboratoires de microbiologie et souvent une adaptation au cas par cas.

À l'heure actuelle, alors qu'une certaine inaction politique prévaut, des patients en impasse thérapeutique se voient refuser des traitements potentiellement salvateurs. Alors que le tourisme médical vers les pays utilisant quotidiennement les bactériophages se multiplie, le moindre essai thérapeutique de phase I ne peut actuellement s'envisager sans un budget de 1,5 à 2 millions d'euros. Apporter les preuves d'une efficacité thérapeutique chez l'homme coûte donc très cher, principalement par les coûts de production, dont les normes apparaissent trop sévères et non adaptées. Non investi par les grandes compagnies pharmaceutiques susceptibles de financer de tels projets, la phagothérapie est actuellement une espèce solitaire, certes en devenir, à fort potentiel, que tout le monde rêve de voir grandir mais que personne n'alimente.

Les choses changent cependant, mais lentement. *La patience vient à bout de tout* dit-on. C'est vrai, de tout, même des patients. N'attendons pas trop, car il s'agit d'être prêt lorsque l'antibiothérapie, dont nous commençons aujourd'hui à entrevoir les limites, deviendra une thérapie potentiellement inefficace pour des infections banales.

Références bibliographiques

A

- Aarestrup F. M., Wegener H. C. and Collignon P. (2008).** *Resistance in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies.* Expert Rev Anti Infect Ther **6**(5): 733-750. PMID: 18847409.
- Abedon S. T. (2011a).** *Lysis from without.* Bacteriophage **1**(1): 46-49. PMID: 21687534.
- Abedon S. T., Kuhl S. J., Blasdel B. G. and Kutter E. M. (2011b).** *Phage treatment of human infections.* Bacteriophage **1**(2): 66-85. PMID: 22334863.
- Achtman M., Kennedy N. and Skurray R. (1977).** *Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: role of traT protein in surface exclusion.* Proc Natl Acad Sci U S A **74**(11): 5104-5108. PMID: 337311.
- Ackermann H. W. (2009).** *Phage classification and characterization.* Methods Mol Biol **501**: 127-140. PMID: 19066817.
- Alemayehu D., Casey P. G., McAuliffe O., Guinane C. M., et al. (2012).** *Bacteriophages phiMR299-2 and phiNH-4 can eliminate Pseudomonas aeruginosa in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells.* MBio **3**(2): e00029-00012. PMID: 22396480.
- Andreu N., Zelmer A. and Wiles S. (2011).** *Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease.* FEMS Microbiol Rev **35**(2): 360-394. PMID: 20955395.
- Asai T. and Shingu K. (2001).** *Leakage of fluid around high-volume, low-pressure cuffs apparatus A comparison of four tracheal tubes.* Anaesthesia **56**(1): 38-42. PMID: 11167433.
- Avershina E., Storro O., Oien T., Johnsen R., et al. (2014).** *Major faecal microbiota shifts in composition and diversity with age in a geographically restricted cohort of mothers and their children.* FEMS Microbiol Ecol **87**(1): 280-290. PMID: 24112053.
- Azeredo J. and Sutherland I. W. (2008).** *The use of phages for the removal of infectious biofilms.* Curr Pharm Biotechnol **9**(4): 261-266. PMID: 18691087.

B

- Banerjee R. and Johnson J. R. (2014).** *A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of Escherichia coli sequence type 131.* Antimicrob Agents Chemother **58**(9): 4997-5004. PMID: 24867985.
- Bayer M. E. (1968).** *Adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of Escherichia coli.* J Virol **2**(4): 346-356. PMID: 4911849.
- Bedos J. P., Rieux V., Bauchet J., Muffat-Joly M., et al. (1998).** *Efficacy of trovafloxacin against penicillin-susceptible and multiresistant strains of Streptococcus pneumoniae in a mouse pneumonia model.* Antimicrob Agents Chemother **42**(4): 862-867. PMID: 9559797.
- Berendonk T. U., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., et al. (2015).** *Tackling antibiotic resistance: the environmental framework.* Nat Rev Microbiol **13**(5): 310-317. PMID: 25817583.

Berthelot P., Grattard F., Mahul P., Pain P., et al. (2001). *Prospective study of nosocomial colonization and infection due to Pseudomonas aeruginosa in mechanically ventilated patients.* Intensive Care Med **27**(3): 503-512. PMID: 11355118.

Bhaya D., Davison M. and Barrangou R. (2011). *CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation.* Annu Rev Genet **45**: 273-297. PMID: 22060043.

Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., et al. (2002). *Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant Enterococcus faecium.* Infect Immun **70**(1): 204-210. PMID: 11748184.

Blanco J., Mora A., Mamani R., Lopez C., et al. (2011). *National survey of Escherichia coli causing extraintestinal infections reveals the spread of drug-resistant clonal groups O25b:H4-B2-ST131, O15:H1-D-ST393 and CGA-D-ST69 with high virulence gene content in Spain.* J Antimicrob Chemother **66**(9): 2011-2021. PMID: 21669946.

Blot S. I., Poelaert J. and Kollef M. (2014). *How to avoid microaspiration? A key element for the prevention of ventilator-associated pneumonia in intubated ICU patients.* BMC Infect Dis **14**: 119. PMID: 25430629.

BMR-RAISIN (2014). *Bactérie Multi-résistante - Réseau Alerte Investigation Surveillance des Infections Nosocomiales, Surveillance des bactéries multirésistantes dans les établissements de santé français. Données 2012.* INVS.

Bondy-Denomy J., Pawluk A., Maxwell K. L. and Davidson A. R. (2013). *Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system.* Nature. **493**(7432): 429-432. Epub 2012 Dec 16. PMID: 23242138.

Bonten M. J., Gaillard C. A., de Leeuw P. W. and Stobberingh E. E. (1997). *Role of colonization of the upper intestinal tract in the pathogenesis of ventilator-associated pneumonia.* Clin Infect Dis **24**(3): 309-319. PMID: 9114178.

Born Y., Fieseler L., Klumpp J., Eugster M. R., et al. (2014). *The tail-associated depolymerase of Erwinia amylovora phage LI mediates host cell adsorption and enzymatic capsule removal, which can enhance infection by other phage.* Environ Microbiol **16**(7): 2168-2180. PMID: 23944160.

Boulanger P. (2009). *Purification of bacteriophages and SDS-PAGE analysis of phage structural proteins from ghost particles.* Methods Mol Biol **502**: 227-238. PMID: 19082559.

Breitbart M., Salamon P., Andresen B., Mahaffy J. M., et al. (2002). *Genomic analysis of uncultured marine viral communities.* Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14250-14255. PMID: 12384570.

Brendel V. (1985). *Mapping of transcription terminators of bacteriophages phi X174 and G4 by sequence analysis.* J Virol **53**(1): 340-342. PMID: 3155555.

Bruttin A. and Brussow H. (2005). *Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy.* Antimicrob Agents Chemother **49**(7): 2874-2878. PMID: 15980363.

Brzuszkiewicz E., Bruggemann H., Liesegang H., Emmerth M., et al. (2006). *How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic*

Escherichia coli strains. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(34): 12879-12884. Epub 2006 Aug 15. PMID: 16912116.

Bull J. J., Vimr E. R. and Molineux I. J. (2010). *A tale of tails: Sialidase is key to success in a model of phage therapy against K1-capsulated Escherichia coli.* Virology **398**(1): 79-86. PMID: 20006993.

C

Cairns B. J., Timms A. R., Jansen V. A., Connerton I. F., et al. (2009). *Quantitative models of in vitro bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy.* PLoS Pathog **5**(1): e1000253. PMID: 19119417.

Cao Z., Zhang J., Niu Y. D., Cui N., et al. (2015). *Isolation and characterization of a "phiKMV-like" bacteriophage and its therapeutic effect on mink hemorrhagic pneumonia.* PLoS One **10**(1): e0116571. PMID: 25615639.

Caprioli A., Morabito S., Brugere H. and Oswald E. (2005). *Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission.* Vet Res **36**(3): 289-311. PMID: 15845227.

Cardenosa Cendrero J. A., Sole-Violan J., Bordes Benitez A., Noguera Catalan J., et al. (1999). *Role of different routes of tracheal colonization in the development of pneumonia in patients receiving mechanical ventilation.* Chest **116**(2): 462-470. PMID: 10453877.

Carmody L. A., Gill J. J., Summer E. J., Sajjan U. S., et al. (2010). *Efficacy of bacteriophage therapy in a model of Burkholderia cenocepacia pulmonary infection.* J Infect Dis **201**(2): 264-271. PMID: 20001604.

Carron M., Freo U., BaHammam A. S., Dellweg D., et al. (2013). *Complications of non-invasive ventilation techniques: a comprehensive qualitative review of randomized trials.* Br J Anaesth **110**(6): 896-914. PMID: 23562934.

Carvalho C. M., Gannon B. W., Halfhide D. E., Santos S. B., et al. (2010). *The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of Campylobacter coli and Campylobacter jejuni in chickens.* BMC Microbiol **10**: 232. PMID: 20809975.

Chan B. K., Abedon S. T. and Loc-Carrillo C. (2013). *Phage cocktails and the future of phage therapy.* Future Microbiol **8**(6): 769-783. PMID: 23701332.

Chang D. E., Smalley D. J., Tucker D. L., Leatham M. P., et al. (2004). *Carbon nutrition of Escherichia coli in the mouse intestine.* Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7427-7432. PMID: 15123798.

Chastre J. and Fagon J. Y. (2002). *Ventilator-associated pneumonia.* Am J Respir Crit Care Med **165**(7): 867-903. PMID: 11934711.

Chhibber S., Kaur S. and Kumari S. (2008). *Therapeutic potential of bacteriophage in treating Klebsiella pneumoniae B5055-mediated lobar pneumonia in mice.* J Med Microbiol **57**(Pt 12): 1508-1513. PMID: 19018021.

Chibani-Chennoufi S., Bruttin A., Dillmann M. L. and Brussow H. (2004). *Phage-host interaction: an ecological perspective.* J Bacteriol **186**(12): 3677-3686. PMID: 15175280.

Citorik R. J., Mimee M. and Lu T. K. (2014). *Bacteriophage-based synthetic biology for the study of infectious diseases.* Curr Opin Microbiol **19**: 59-69. PMID: 24997401.

Clermont O., Christenson J. K., Denamur E. and Gordon D. M. (2013). *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups.* Environ Microbiol Rep. **5**(1): 58-65. Epub 2012 Dec 24. PMID: 23757131.

Clermont O., Gordon D. and Denamur E. (2015). *A guide to the various phylogenetic classification schemes for Escherichia coli and the correspondence among schemes.* Microbiology PMID: 25714816.

Clermont O., Johnson J. R., Menard M. and Denamur E. (2007). *Determination of Escherichia coli O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia.* Diagn Microbiol Infect Dis **57**(2): 129-136. PMID: 17020797.

Clermont O., Olier M., Hoede C., Diancourt L., et al. (2011). *Animal and human pathogenic Escherichia coli strains share common genetic backgrounds.* Infect Genet Evol **11**(3): 654-662. PMID: 21324381.

Coleman D., Kaliss N., Dagg C., Russel E., et al. (1966). *Biology of the Laboratory Mouse, The Jackson Laboratory.*

Combes A., Luyt C. E. and Trouillet J. L. (2006). *Impact of antibiotic-resistant bacteria on the outcome of ventilator-associated pneumonia.* Semin Respir Crit Care Med. **27**(1): 23-28. PMID: 16508878.

Comeau A. M., Tetart F., Trojet S. N., Prere M. F., et al. (2007). *Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth.* PLoS One **2**(8): e799. PMID: 17726529.

Cooper C. J., Denyer S. P. and Maillard J. Y. (2014). *Stability and purity of a bacteriophage cocktail preparation for nebulizer delivery.* Lett Appl Microbiol **58**(2): 118-122. PMID: 24111661.

Coque T. M., Novais A., Carattoli A., Poirel L., et al. (2008). *Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15.* Emerg Infect Dis. **14**(2): 195-200. PMID: 18258110.

Crooks G. E., Hon G., Chandonia J. M. and Brenner S. E. (2004). *WebLogo: a sequence logo generator.* Genome Res **14**(6): 1188-1190. PMID: 15173120.

Croxen M. A. and Finlay B. B. (2010). *Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity.* Nat Rev Microbiol **8**(1): 26-38. PMID: 19966814.

CTINILS (Mai 2007). *Comité technique des infections nosocomiales et des infections liées au soins - Définition des infections associées aux soins.*

CUB-Réa (2010). *Collège des Utilisateurs des Bases de Données en Réanimation (CUB-Réa) - Rapport annuel.*

D

d'Herelle F. (1917). *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.* Compte rendus de l'académie des sciences de Paris **165**: 373-375.

Dabrowska K., Miernikiewicz P., Piotrowicz A., Hodyra K., et al. (2014). *Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface.* J Virol **88**(21): 12551-12557. PMID: 25142581.

Darfeuille-Michaud A. (2002). *Adherent-invasive Escherichia coli: a putative new E. coli pathotype associated with Crohn's disease.* Int J Med Microbiol **292**(3-4): 185-193. PMID: 12398209.

Davis M. R., Jr. and Goldberg J. B. (2012). *Purification and visualization of lipopolysaccharide from Gram-negative bacteria by hot aqueous-phenol extraction.* J Vis Exp. **(63)**(pii): 3916. PMID: 22688346.

De Paepe M. and Taddei F. (2006). *Viruses' life history: towards a mechanistic basis of a trade-off between survival and reproduction among phages.* PLoS Biol **4**(7): e193. PMID: 16756387.

Debarbieux L., Leduc D., Maura D., Morello E., et al. (2010). *Bacteriophages can treat and prevent Pseudomonas aeruginosa lung infections.* J Infect Dis **201**(7): 1096-1104. PMID: 20196657.

Delbruck M. (1945). *Interference between bacterial viruses; the mutual exclusion effect and the depressor effect.* J Bacteriol **50**: 151-170. PMID: 20989332.

Deveau H., Barrangou R., Garneau J. E., Labonte J., et al. (2008). *Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus.* J Bacteriol **190**(4): 1390-1400. PMID: 18065545.

Dhand R. (2004). *Basic techniques for aerosol delivery during mechanical ventilation.* Respir Care **49**(6): 611-622. PMID: 15165296.

Didier C., Streicher M. P., Chognot D., Campagni R., et al. (2012). *Late-onset neonatal infections: incidences and pathogens in the era of antenatal antibiotics.* Eur J Pediatr **171**(4): 681-687. PMID: 22134805.

Docobo-Perez F., Nordmann P., Dominguez-Herrera J., Lopez-Rojas R., et al. (2012). *Efficacies of colistin and tigecycline in mice with experimental pneumonia due to NDM-1-producing strains of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli.* Int J Antimicrob Agents **39**(3): 251-254. PMID: 22154856.

Dominguez-Herrera J., Velasco C., Docobo-Perez F., Rodriguez-Martinez J. M., et al. (2013). *Impact of qnrA1, qnrB1 and qnrS1 on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by Escherichia coli with or without the GyrA mutation Ser83Leu.* J Antimicrob Chemother **68**(7): 1609-1615. PMID: 23493313.

Drakulovic M. B., Bauer T. T., Torres A., Gonzalez J., et al. (2001). *Initial bacterial colonization in patients admitted to a respiratory intensive care unit: bacteriological pattern and risk factors.* Respiration **68**(1): 58-66. PMID: 11223732.

Dufour N., Debarbieux L., Fromentin M. and Ricard J. D. (2015). *Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli Pneumonia With Bacteriophages.* Crit Care Med **43**(6): e190-198. PMID: 25803649.

Duplessis M., Levesque C. M. and Moineau S. (2006). *Characterization of Streptococcus thermophilus host range phage mutants.* Appl Environ Microbiol. **72**(4): 3036-3041. PMID: 16598014.

Dy R. L., Przybilski R., Semeijn K., Salmond G. P., et al. (2014). *A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism.* Nucleic Acids Res **42**(7): 4590-4605. PMID: 24465005.

E

Escobar-Paramo P., Grenet K., Le Menac'h A., Rode L., et al. (2004). *Large-scale population structure of human commensal Escherichia coli isolates.* Appl Environ Microbiol **70**(9): 5698-5700. PMID: 15345464.

EuroCDC. (2013). *European Centre for Disease Prevention and Control - Antimicrobial resistance interactive database (EARS-Net).* Retrieved june, 2015, 2015, from http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/table_reports.aspx.

Ewig S., Torres A., El-Ebiary M., Fabregas N., et al. (1999). *Bacterial colonization patterns in mechanically ventilated patients with traumatic and medical head injury. Incidence, risk factors, and association with ventilator-associated pneumonia.* Am J Respir Crit Care Med **159**(1): 188-198. PMID: 9872838.

F

Faruque S. M., Islam M. J., Ahmad Q. S., Faruque A. S., et al. (2005a). *Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics: Role of host-mediated amplification of phage.* Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 6119-6124. PMID: 15829587.

Faruque S. M., Naser I. B., Islam M. J., Faruque A. S., et al. (2005b). *Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages.* Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1702-1707. PMID: 15653771.

FDA (2007). *Food and Drug Administration - Center of drug evaluation and research - Pharmacology/Toxicology review and evaluation of Doripenem.* http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022106s000_ClinPharmR_P3.pdf consulté le: 07/3/2015.

Fijalkowska I. J., Schaaper R. M. and Jonczyk P. (2012). *DNA replication fidelity in Escherichia coli: a multi-DNA polymerase affair.* FEMS Microbiol Rev **36**(6): 1105-1121. PMID: 22404288.

Fineran P. C., Gerritzen M. J., Suarez-Diez M., Kunne T., et al. (2014). *Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation.* Proc Natl Acad Sci U S A **111**(16): E1629-1638. PMID: 24711427.

Forde A. and Fitzgerald G. F. (2003). *Molecular organization of exopolysaccharide (EPS) encoding genes on the lactococcal bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658.* Plasmid **49**(2): 130-142. PMID: 12726766.

Fourrier F., Duvivier B., Boutigny H., Roussel-Delvallez M., et al. (1998). *Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients.* Crit Care Med **26**(2): 301-308. PMID: 9468169.

Francis K. P., Joh D., Bellinger-Kawahara C., Hawkinson M. J., et al. (2000). *Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct.* Infect Immun **68**(6): 3594-3600. PMID: 10816517.

Francis K. P., Yu J., Bellinger-Kawahara C., Joh D., et al. (2001). *Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon.* Infect Immun **69**(5): 3350-3358. PMID: 11292758.

Fuchs L., Chronaki C. E., Park S., Novack V., et al. (2012). *ICU admission characteristics and mortality rates among elderly and very elderly patients.* Intensive Care Med **38**(10): 1654-1661. PMID: 22797350.

Fuhrman J. A. (1999). *Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects.* Nature **399**(6736): 541-548. PMID: 10376593.

G

Gehr P., Bachofen M. and Weibel E. R. (1978). *The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity.* Respir Physiol **32**(2): 121-140. PMID: 644146.

Geier M. R., Trigg M. E. and Merrill C. R. (1973). *Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice.* Nature **246**(5430): 221-223. PMID: 4586796.

George D. L., Falk P. S., Wunderink R. G., Leeper K. V., Jr., et al. (1998). *Epidemiology of ventilator-acquired pneumonia based on protected bronchoscopic sampling.* Am J Respir Crit Care Med **158**(6): 1839-1847. PMID: 9847276.

Ginn A. N., Wiklendt A. M., Gidding H. F., George N., et al. (2012). *The ecology of antibiotic use in the ICU: homogeneous prescribing of cefepime but not tazocin selects for antibiotic resistant infection.* PLoS One **7**(6): e38719. PMID: 22761698.

Girou E., Schortgen F., Delclaux C., Brun-Buisson C., et al. (2000). *Association of noninvasive ventilation with nosocomial infections and survival in critically ill patients.* JAMA **284**(18): 2361-2367. PMID: 11066187.

Goldfarb T., Sberro H., Weinstock E., Cohen O., et al. (2015). *BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes.* EMBO J **34**(2): 169-183. PMID: 25452498.

Goldstein I., Wallet F., Nicolas-Robin A., Ferrari F., et al. (2002a). *Lung deposition and efficiency of nebulized amikacin during *Escherichia coli* pneumonia in ventilated piglets.* Am J Respir Crit Care Med **166**(10): 1375-1381. PMID: 12406838.

Goldstein I., Wallet F., Robert J., Becquemin M. H., et al. (2002b). Lung tissue concentrations of nebulized amikacin during mechanical ventilation in piglets with healthy lungs. Am J Respir Crit Care Med **165**(2): 171-175. PMID: 11790649.

Golshahi L., Seed K. D., Dennis J. J. and Finlay W. H. (2008). Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of *Burkholderia cepacia* complex. J Aerosol Med Pulm Drug Deliv **21**(4): 351-360. PMID: 18800880.

Gu J., Liu X., Li Y., Han W., et al. (2012). A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential. PLoS One **7**(3): e31698. PMID: 22396736.

H

Hadas H., Einav M., Fishov I. and Zaritsky A. (1997). Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*. Microbiology **143** (Pt 1): 179-185. PMID: 9025292.

Hankin M. (1896). L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du choléra. Ann Inst Pasteur **10**: 511-523.

Harley J. P., Prescott L. M., Klein D. A., Sherwood L. M., et al. (2010). Microbiologie, De Boeck Supérieur.

Harris G., Kuo Lee R., Lam C. K., Kanzaki G., et al. (2013). A mouse model of *Acinetobacter baumannii*-associated pneumonia using a clinically isolated hypervirulent strain. Antimicrob Agents Chemother **57**(8): 3601-3613. PMID: 23689726.

Hatfull G. F. and Hendrix R. W. (2011). Bacteriophages and their genomes. Curr Opin Virol **1**(4): 298-303. PMID: 22034588.

Heineman R. H. and Bull J. J. (2007). Testing optimality with experimental evolution: lysis time in a bacteriophage. Evolution **61**(7): 1695-1709. PMID: 17598749.

Henderson I. R., Owen P. and Nataro J. P. (1999). Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. Mol Microbiol **33**(5): 919-932. PMID: 10476027.

Hendrix R. W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. Theor Popul Biol **61**(4): 471-480. PMID: 12167366.

Henken S., Bohling J., Ogunniyi A. D., Paton J. C., et al. (2010). Evaluation of biophotonic imaging to estimate bacterial burden in mice infected with highly virulent compared to less virulent *Streptococcus pneumoniae* serotypes. Antimicrob Agents Chemother **54**(8): 3155-3160. PMID: 20530224.

Henry M., Bobay L. M., Chevallereau A., Sausseureau E., et al. (2015). The search for therapeutic bacteriophages uncovers one new subfamily and two new genera of pseudomonas-infecting myoviridae. PLoS One. **10**(1): e0117163. PMID: 25629728.

Henry M., Lavigne R. and Debarbieux L. (2013). Predicting in vivo efficacy to guide the choice of therapeutic bacteriophages to treat pulmonary infections. Antimicrob Agents Chemother PMID: 24041900.

Hillman K. M., Riordan T., O'Farrell S. M. and Tabaqchali S. (1982). *Colonization of the gastric contents in critically ill patients.* Crit Care Med **10**(7): 444-447. PMID: 6979462.

Hooton T. M. (2012). *Clinical practice. Uncomplicated urinary tract infection.* N Engl J Med **366**(11): 1028-1037. PMID: 22417256.

Horvath P. and Barrangou R. (2010). *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea.* Science **327**(5962): 167-170. PMID: 20056882.

Hudault S., Guignot J. and Servin A. L. (2001). *Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection.* Gut **49**(1): 47-55. PMID: 11413110.

Huff W. E., Huff G. R., Rath N. C., Balog J. M., et al. (2004). *Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers.* Poult Sci **83**(12): 1944-1947. PMID: 15615004.

Hughes K. A., Sutherland I. W., Clark J. and Jones M. V. (1998). *Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases--novel tools for study of bacterial biofilms.* J Appl Microbiol **85**(3): 583-590. PMID: 9750288.

Hulo C., de Castro E., Masson P., Bougueleret L., et al. (2011). *ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity.* Nucleic Acids Res **39**(Database issue): D576-582. PMID: 20947564.

Hyman P. and Abedon S. T. (2009). *Practical methods for determining phage growth parameters.* Methods Mol Biol. **501**:175-202.(doi): 10.1007/1978-1001-60327-60164-60326_60318. PMID: 19066822.

I

Ibanez J., Penafiel A., Raurich J. M., Marse P., et al. (1992). *Gastroesophageal reflux in intubated patients receiving enteral nutrition: effect of supine and semirecumbent positions.* JPEN J Parenter Enteral Nutr **16**(5): 419-422. PMID: 1433774.

Inchley C. J. (1969). *The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage.* Clin Exp Immunol **5**(1): 173-187. PMID: 5370053.

ISHA (2014). *Institut Scientifique d'Hygiène et d'Analyse - Certificat de validation AFNOR du test VIDAS Up E. coli O157 including H7 (VIDAS ECPT - Ref. 30122).*

J

Jacqueline C., Roquilly A., Desessard C., Bouteille D., et al. (2013). *Efficacy of ceftolozane in a murine model of Pseudomonas aeruginosa acute pneumonia: in vivo antimicrobial activity and impact on host inflammatory response.* J Antimicrob Chemother **68**(1): 177-183. PMID: 22941899.

Jaiswal A., Koley H., Ghosh A., Palit A., et al. (2013). *Efficacy of cocktail phage therapy in treating Vibrio cholerae infection in rabbit model.* Microbes Infect **15**(2): 152-156. PMID: 23159467.

Jann K. and Jann B. (1987). *Polysaccharide antigens of Escherichia coli.* Rev Infect Dis **9 Suppl 5**: S517-526. PMID: 2446369.

Jensen E. C., Schrader H. S., Rieland B., Thompson T. L., et al. (1998). *Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of Sphaerotilus natans, Escherichia coli, and Pseudomonas aeruginosa.* Appl Environ Microbiol **64**(2): 575-580. PMID: 9464396.

Johanson W. G., Pierce A. K. and Sanford J. P. (1969). *Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli.* N Engl J Med. **281**(21): 1137-1140. PMID: 4899868.

Johnson J. R., Porter S. B., Zhanel G., Kuskowski M. A., et al. (2012). *Virulence of Escherichia coli clinical isolates in a murine sepsis model in relation to sequence type ST131 status, fluoroquinolone resistance, and virulence genotype.* Infect Immun. **80**(4): 1554-1562. Epub 2012 Feb 6. PMID: 22311928.

Jonczyk E., Klak M., Miedzybrodzki R. and Gorski A. (2011). *The influence of external factors on bacteriophages--review.* Folia Microbiol (Praha) **56**(3): 191-200. PMID: 21625877.

K

Kajsik M., Oslanecova L., Szemes T., Hyblova M., et al. (2014). *Characterization and genome sequence of Dev2, a new T7-like bacteriophage infecting Cronobacter turicensis.* Arch Virol **159**(11): 3013-3019. PMID: 25023334.

Kalanuria A. A., Zai W. and Mirski M. (2014). *Ventilator-associated pneumonia in the ICU.* Crit Care **18**(2): 208. PMID: 25029020.

Kamal F. and Dennis J. J. (2015). *Burkholderia cepacia complex Phage-Antibiotic Synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity.* Appl Environ Microbiol **81**(3): 1132-1138. PMID: 25452284.

Kaper J. B., Nataro J. P. and Mobley H. L. (2004). *Pathogenic Escherichia coli.* Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-140. PMID: 15040260.

Karginov F. V. and Hannon G. J. (2010). *The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea.* Mol Cell **37**(1): 7-19. PMID: 20129051.

Kelley L. A., Mezulis S., Yates C. M., Wass M. N., et al. (2015). *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.* Nat Protoc **10**(6): 845-858. PMID: 25950237.

Knust J., Ochs M., Gundersen H. J. and Nyengaard J. R. (2009). *Stereological estimates of alveolar number and size and capillary length and surface area in mice lungs.* Anat Rec (Hoboken) **292**(1): 113-122. PMID: 19115381.

Koebnik R. (1999). *Structural and functional roles of the surface-exposed loops of the beta-barrel membrane protein OmpA from Escherichia coli.* J Bacteriol **181**(12): 3688-3694. PMID: 10368142.

Kuhn P., Dheu C., Bolender C., Chognot D., et al. (2010). *Incidence and distribution of pathogens in early-onset neonatal sepsis in the era of antenatal antibiotics.* Paediatr Perinat Epidemiol **24**(5): 479-487. PMID: 20670228.

Kuipers M. T., van der Poll T., Schultz M. J. and Wieland C. W. (2011). *Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury.* Crit Care **15**(6): 235. PMID: 22216838.

Kumari S. (2009a). *Bacteriophage treatment of burn wound infection caused by Pseudomonas aeruginosa PAO in BALB/c mice.* Am J Biomed Sci **1**(4): 385-394. doi: 10.5099/aj090400385

Kumari S., Harjai K. and Chhibber S. (2009b). *Efficacy of bacteriophage treatment in murine burn wound infection induced by klebsiella pneumoniae.* J Microbiol Biotechnol **19**(6): 622-628. PMID: 19597322.

Kumari S., Harjai K. and Chhibber S. (2010a). *Evidence to support the therapeutic potential of bacteriophage Kpn5 in burn wound infection caused by Klebsiella pneumoniae in BALB/c mice.* J Microbiol Biotechnol **20**(5): 935-941. PMID: 20519918.

Kumari S., Harjai K. and Chhibber S. (2010b). *Topical treatment of Klebsiella pneumoniae B5055 induced burn wound infection in mice using natural products.* J Infect Dev Ctries **4**(6): 367-377. PMID: 20601788.

Kwan T., Liu J., DuBow M., Gros P., et al. (2005). *The complete genomes and proteomes of 27 Staphylococcus aureus bacteriophages.* Proc Natl Acad Sci U S A **102**(14): 5174-5179. PMID: 15788529.

Kwan T., Liu J., Dubow M., Gros P., et al. (2006). *Comparative genomic analysis of 18 Pseudomonas aeruginosa bacteriophages.* J Bacteriol **188**(3): 1184-1187. PMID: 16428425.

Kwiatkowski B., Boschek B., Thiele H. and Stirm S. (1983). *Substrate specificity of two bacteriophage-associated endo-N-acetylneuraminidases.* J Virol. **45**(1): 367-374. PMID: 6401818.

L

La Combe B. (2014). *Epidémiologie et physiopathologie de la colonisation et des infections pulmonaires à Escherichia coli : premiers résultats de l'étude multicentrique COLOCOLI (congrès de la Société de Réanimation de Langue Française, 2014).* 2014, from http://www.srlf.org/mediatheque/congres/resumes/viewPresentation.phtml?about=rc%2f2014%2fsrlf2014%2fabstract%2f20130926-160152-6209%2f_container&SearchEventInput=lacombe&eventCommunication=&communicationClass=abstract&Intervenant=0&SearchIntervenant=&cp=1&rp=1.

Labrie S. J., Samson J. E. and Moineau S. (2010). *Bacteriophage resistance mechanisms.* Nat Rev Microbiol **8**(5): 317-327. PMID: 20348932.

Lau G. L., Siew C. C., Tan W. S., Hair-Bejo M., et al. (2010). *Efficacy of a bacteriophage isolated from chickens as a therapeutic agent for colibacillosis in broiler chickens.* Poult Sci **89**(12): 2589-2596. PMID: 21076096.

Laupland K. B. (2013). *Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies.* Clin Microbiol Infect **19**(6): 492-500. PMID: 23398633.

Lax S. and Gilbert J. A. (2015). *Hospital-associated microbiota and implications for nosocomial infections.* Trends Mol Med **21**(7): 427-432. PMID: 25907678.

- Letarov A. and Kulikov E. (2009).** *The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities.* J Appl Microbiol **107**(1): 1-13. Epub 2009 Feb 23. PMID: 19239553.
- Lim T. H., Kim M. S., Lee D. H., Lee Y. N., et al. (2012).** *Use of bacteriophage for biological control of Salmonella Enteritidis infection in chicken.* Res Vet Sci **93**(3): 1173-1178. PMID: 22795674.
- Lin T. L., Hsieh P. F., Huang Y. T., Lee W. C., et al. (2014).** *Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of Klebsiella pneumoniae: implication in typing and treatment.* J Infect Dis **210**(11): 1734-1744. PMID: 25001459.
- Lindberg A. A. (1973).** *Bacteriophage receptors.* Annu Rev Microbiol **27**: 205-241. PMID: 4584686.
- Lizy C., Swinnen W., Labeau S., Poelaert J., et al. (2014).** *Cuff pressure of endotracheal tubes after changes in body position in critically ill patients treated with mechanical ventilation.* Am J Crit Care **23**(1): e1-8. PMID: 24382623.
- Loeb L. A. and Kunkel T. A. (1982).** *Fidelity of DNA synthesis.* Annu Rev Biochem **51**: 429-457. PMID: 6214209.
- Lopez-Cerero L., Picon E., Morillo C., Hernandez J. R., et al. (2010).** *Comparative assessment of inoculum effects on the antimicrobial activity of amoxicillin-clavulanate and piperacillin-tazobactam with extended-spectrum beta-lactamase-producing and extended-spectrum beta-lactamase-non-producing Escherichia coli isolates.* Clin Microbiol Infect **16**(2): 132-136. PMID: 19614715.
- Lopez-Ferraz C., Ramirez P., Gordon M., Marti V., et al. (2014).** *Impact of microbial ecology on accuracy of surveillance cultures to predict multidrug resistant microorganisms causing ventilator-associated pneumonia.* J Infect **69**(4): 333-340. PMID: 24880029.
- Los M. and Wegrzyn G. (2012).** *Pseudolysogeny.* Adv Virus Res **82**: 339-349. PMID: 22420857.
- Lowy F. D. (1998).** *Staphylococcus aureus infections.* N Engl J Med **339**(8): 520-532. PMID: 9709046.
- Lu M. J. and Henning U. (1994).** *Superinfection exclusion by T-even-type coliphages.* Trends Microbiol **2**(4): 137-139. PMID: 8012757.
- Lu Q., Yang J., Liu Z., Gutierrez C., et al. (2011).** *Nebulized ceftazidime and amikacin in ventilator-associated pneumonia caused by Pseudomonas aeruginosa.* Am J Respir Crit Care Med **184**(1): 106-115. PMID: 21474643.
- Lu T. K., Bowers J. and Koeris M. S. (2013).** *Advancing bacteriophage-based microbial diagnostics with synthetic biology.* Trends Biotechnol **31**(6): 325-327. PMID: 23608522.
- Lu T. K. and Collins J. J. (2007).** *Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage.* Proc Natl Acad Sci U S A **104**(27): 11197-11202. PMID: 17592147.
- Lu T. K. and Collins J. J. (2009).** *Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy.* Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4629-4634. PMID: 19255432.

M

MacNeal W. J. and Frisbee F. C. (1936a). *Bacteriophage service to patients with Staphylococcus septicemia.* The American Journal of the Medical Sciences **191**(2): 170-178.

MacNeal W. J. and Frisbee F. C. (1936b). *One hundred patients with Staphylococcus septicemia receiving bacteriophage service.* The American Journal of the Medical Sciences **191**(2): 179-195.

Mahul P., Auboyer C., Jospe R., Ros A., et al. (1992). *Prevention of nosocomial pneumonia in intubated patients: respective role of mechanical subglottic secretions drainage and stress ulcer prophylaxis.* Intensive Care Med **18**(1): 20-25. PMID: 1578042.

Manges A. R., Harel J., Masson L., Edens T. J., et al. (2015). *Multilocus sequence typing and virulence gene profiles associated with Escherichia coli from human and animal sources.* Foodborne Pathog Dis **12**(4): 302-310. PMID: 25774654.

Martin C., Ragni J., Lokiec F., Guillen J. C., et al. (1992). *Pharmacokinetics and tissue penetration of a single dose of ceftriaxone (1,000 milligrams intravenously) for antibiotic prophylaxis in thoracic surgery.* Antimicrob Agents Chemother **36**(12): 2804-2807. PMID: 1482149.

Matsuda T., Freeman T. A., Hilbert D. W., Duff M., et al. (2005). *Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model.* Surgery. **137**(6): 639-646. PMID: 15933632.

Matute-Bello G., Downey G., Moore B. B., Groshong S. D., et al. (2011). *An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals.* Am J Respir Cell Mol Biol **44**(5): 725-738. PMID: 21531958.

McCallin S., Alam Sarker S., Barretto C., Sultana S., et al. (2013). *Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy human subjects.* Virology **443**(2): 187-196. PMID: 23755967.

McVay C. S., Velasquez M. and Fralick J. A. (2007). *Phage therapy of Pseudomonas aeruginosa infection in a mouse burn wound model.* Antimicrob Agents Chemother **51**(6): 1934-1938. PMID: 17387151.

Melsen W. G., Rovers M. M., Groenwold R. H., Bergmans D. C., et al. (2013). *Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies.* Lancet Infect Dis. **13**(8): 665-671. Epub 2013 Apr 25. PMID: 23622939.

Mendez J., Audicana A., Cancer M., Isern A., et al. (2004). *Assessment of drinking water quality using indicator bacteria and bacteriophages.* J Water Health. **2**(3): 201-214. PMID: 15497816.

Messika J., Magdoud F., Clermont O., Margetis D., et al. (2012). *Pathophysiology of Escherichia coli ventilator-associated pneumonia: implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains.* Intensive Care Med **38**(12): 2007-2016. PMID: 23052953.

Meyer J. R., Dobias D. T., Weitz J. S., Barrick J. E., et al. (2012). *Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda.* Science **335**(6067): 428-432. PMID: 22282803.

Miedzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Fortuna W., et al. (2012). *Clinical aspects of phage therapy.* Adv Virus Res **83**: 73-121. PMID: 22748809.

Miernikiewicz P., Dabrowska K., Piotrowicz A., Owczarek B., et al. (2013). *T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production.* PLoS One, **8**(8): e71036. eCollection 2013. PMID: 23976975.

Miller R. W., Skinner E. J., Sulakvelidze A., Mathis G. F., et al. (2010). *Bacteriophage therapy for control of necrotic enteritis of broiler chickens experimentally infected with Clostridium perfringens.* Avian Dis **54**(1): 33-40. PMID: 20408396.

Minonishi T., Kinoshita H., Hirayama M., Kawahito S., et al. (2013). *The supine-to-prone position change induces modification of endotracheal tube cuff pressure accompanied by tube displacement.* J Clin Anesth **25**(1): 28-31. PMID: 23391343.

Mora A., Dahbi G., Lopez C., Mamani R., et al. (2014). *Virulence patterns in a murine sepsis model of ST131 Escherichia coli clinical isolates belonging to serotypes O25b:H4 and O16:H5 are associated to specific virotypes.* PLoS One, **9**(1): e87025. eCollection 2014. PMID: 24498015.

Morello E., Sausseureau E., Maura D., Huerre M., et al. (2011). *Pulmonary bacteriophage therapy on Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention.* PLoS One **6**(2): e16963. PMID: 21347240.

Morin C. E. and Kaper J. B. (2009). *Use of stabilized luciferase-expressing plasmids to examine in vivo-induced promoters in the Vibrio cholerae vaccine strain CVD 103-HgR.* FEMS Immunol Med Microbiol **57**(1): 69-79. PMID: 19678844.

Morris Hooke A., Sordelli D. O., Cerquetti M. C. and Vogt A. J. (1985). *Quantitative determination of bacterial replication in vivo.* Infect Immun **49**(2): 424-427. PMID: 3926651.

Muscudere J., Rewa O., McKechnie K., Jiang X., et al. (2011). *Subglottic secretion drainage for the prevention of ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis.* Crit Care Med **39**(8): 1985-1991. PMID: 21478738.

Mushtaq N., Redpath M. B., Luzio J. P. and Taylor P. W. (2005). *Treatment of experimental Escherichia coli infection with recombinant bacteriophage-derived capsule depolymerase.* J Antimicrob Chemother **56**(1): 160-165. PMID: 15914489.

N

Nau R. and Eiffert H. (2005). *Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host: a promising approach to improve outcome in life-threatening infections.* FEMS Immunol Med Microbiol **44**(1): 1-16. PMID: 15780573.

NCBI. (2015). *National Center for Biotechnology Information* Retrieved 1er juin 2015, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Negrone A., Costanzo M., Vitali R., Superti F., et al. (2012). *Characterization of adherent-invasive Escherichia coli isolated from pediatric patients with inflammatory bowel disease.* Inflamm Bowel Dis **18**(5): 913-924. PMID: 21994005.

Nguyen H. M. and Kang C. (2014). *Lysis delay and burst shrinkage of coliphage T7 by deletion of terminator Tphi reversed by deletion of early genes.* J Virol **88**(4): 2107-2115. PMID: 24335287.

Nicolas-Chanoine M. H., Bertrand X. and Madec J. Y. (2014). *Escherichia coli ST131, an Intriguing Clonal Group.* Clin Microbiol Rev. **27**(3): 543-574. PMID: 24982321.

Nicolas-Chanoine M. H., Blanco J., Leflon-Guibout V., Demarty R., et al. (2008). *Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15.* J Antimicrob Chemother. **61**(2): 273-281. Epub 2007 Dec 2011. PMID: 18077311.

Norcia L. J., Silvia A. M. and Hayashi S. F. (1999). *Studies on time-kill kinetics of different classes of antibiotics against veterinary pathogenic bacteria including Pasteurella, Actinobacillus and Escherichia coli.* J Antibiot (Tokyo) **52**(1): 52-60. PMID: 10092198.

O

O'Riordan T. G., Palmer L. B. and Smaldone G. C. (1994). *Aerosol deposition in mechanically ventilated patients. Optimizing nebulizer delivery.* Am J Respir Crit Care Med **149**(1): 214-219. PMID: 8111585.

Ochs H. D., Buckley R. H., Kobayashi R. H., Kobayashi A. L., et al. (1992). *Antibody responses to bacteriophage phi X174 in patients with adenosine deaminase deficiency.* Blood **80**(5): 1163-1171. PMID: 1387561.

Ohnishi M., Kurokawa K. and Hayashi T. (2001). *Diversification of Escherichia coli genomes: are bacteriophages the major contributors?* Trends Microbiol **9**(10): 481-485. PMID: 11597449.

Okhuysen P. C. and Dupont H. L. (2010). *Enterohaggative Escherichia coli (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance.* J Infect Dis **202**(4): 503-505. PMID: 20594108.

Oliveira A., Sereno R. and Azeredo J. (2010). *In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses.* Vet Microbiol **146**(3-4): 303-308. PMID: 20605377.

Olkkonen V. M. and Bamford D. H. (1989). *Quantitation of the adsorption and penetration stages of bacteriophage phi 6 infection.* Virology **171**(1): 229-238. PMID: 2741342.

ONERBA (2012). *Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques - Rapport d'activité 2011-2012.*

Orskov F. and Orskov I. (1992). *Escherichia coli serotyping and disease in man and animals.* Can J Microbiol **38**(7): 699-704. PMID: 1382824.

Overbeek R., Olson R., Pusch G. D., Olsen G. J., et al. (2014). *The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST).* Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D206-214. PMID: 24293654.

P

- Papazian L., Forel J. M., Gacouin A., Penot-Ragon C., et al. (2010).** *Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome.* N Engl J Med **363**(12): 1107-1116. PMID: 20843245.
- Paterson D. L. and Bonomo R. A. (2005).** *Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.* Clin Microbiol Rev **18**(4): 657-686. PMID: 16223952.
- Paul J. H. and Sullivan M. B. (2005).** *Marine phage genomics: what have we learned?* Curr Opin Biotechnol **16**(3): 299-307. PMID: 15961031.
- Payne R. J. and Jansen V. A. (2001).** *Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process.* J Theor Biol **208**(1): 37-48. PMID: 11162051.
- Pedulla M. L., Ford M. E., Houtz J. M., Karthikeyan T., et al. (2003).** *Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes.* Cell **113**(2): 171-182. PMID: 12705866.
- Peirano G., Bradford P. A., Kazmierczak K. M., Badal R. E., et al. (2014).** *Global incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131.* Emerg Infect Dis **20**(11): 1928-1931. PMID: 25340464.
- Penders J., Thijs C., Vink C., Stelma F. F., et al. (2006).** *Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy.* Pediatrics **118**(2): 511-521. PMID: 16882802.
- Petersen P. J., Jacobus N. V., Weiss W. J. and Testa R. T. (1991).** *In vitro and in vivo activities of LJC10,627, a new carbapenem with stability to dehydropeptidase I.* Antimicrob Agents Chemother **35**(1): 203-207. PMID: 1901698.
- Picard B., Garcia J. S., Gouriou S., Duriez P., et al. (1999).** *The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection.* Infect Immun **67**(2): 546-553. PMID: 9916057.
- Pichardo C., Rodriguez-Martinez J. M., Pachon-Ibanez M. E., Conejo C., et al. (2005).** *Efficacy of cefepime and imipenem in experimental murine pneumonia caused by porin-deficient *Klebsiella pneumoniae* producing CMY-2 beta-Lactamase.* Antimicrob Agents Chemother **49**(8): 3311-3316. PMID: 16048941.
- Pietila M. K., Demina T. A., Atanasova N. S., Oksanen H. M., et al. (2014).** *Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts.* Trends Microbiol **22**(6): 334-344. PMID: 24647075.
- Pirnay J. P., Blasdel B. G., Bretaudeau L., Buckling A., et al. (2015).** *Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products.* Pharm Res **32**(7): 2173-2179. PMID: 25585954.
- Pitout J. D. and Laupland K. B. (2008).** *Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern.* Lancet Infect Dis **8**(3): 159-166. PMID: 18291338.
- Polk H. C., Jr. and Miles A. A. (1971).** *Enhancement of bacterial infection by ferric iron: kinetics, mechanisms, and surgical significance.* Surgery **70**(1): 71-77. PMID: 4933442.

Pouillot F., Chomton M., Blois H., Courroux C., et al. (2012). *Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 Escherichia coli strain producing CTX-M-15.* Antimicrob Agents Chemother **56**(7): 3568-3575. PMID: 22491690.

Primrose S., Twyman R. and Old R. W. (2004). *Principes de génie génétique. Principes de génie génétique.* De Boeck: 71.

Puck T. T., Garen A. and Cline J. (1951). *The mechanism of virus attachment to host cells. I. The role of ions in the primary reaction.* J Exp Med **93**(1): 65-88. PMID: 14803632.

Pyun K. H., Ochs H. D., Wedgwood R. J., Yang X. Q., et al. (1989). *Human antibody responses to bacteriophage phi X 174: sequential induction of IgM and IgG subclass antibody.* Clin Immunol Immunopathol **51**(2): 252-263. PMID: 2522846.

Q

Qimron U., Marintcheva B., Tabor S. and Richardson C. C. (2006). *Genomewide screens for Escherichia coli genes affecting growth of T7 bacteriophage.* Proc Natl Acad Sci U S A **103**(50): 19039-19044. PMID: 17135349.

R

Rakonjac J., Bennett N. J., Spagnuolo J., Gagic D., et al. (2011). *Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications.* Curr Issues Mol Biol **13**(2): 51-76. PMID: 21502666.

Rang C. U., Licht T. R., Midtvedt T., Conway P. L., et al. (1999). *Estimation of growth rates of Escherichia coli BJ4 in streptomycin-treated and previously germfree mice by in situ rRNA hybridization.* Clin Diagn Lab Immunol **6**(3): 434-436. PMID: 10225851.

Rastegar Lari A., Gold F., Borderon J. C., Laugier J., et al. (1990). *Implantation and in vivo antagonistic effects of antibiotic-susceptible Escherichia coli strains administered to premature newborns.* Biol Neonate **58**(2): 73-78. PMID: 2223912.

Ravin V., Raisanen L. and Alatossava T. (2002). *A conserved C-terminal region in Gp71 of the small isometric-head phage LL-H and ORF474 of the prolate-head phage JCL1032 is implicated in specificity of adsorption of phage to its host, Lactobacillus delbrueckii.* J Bacteriol. **184**(9): 2455-2459. PMID: 11948159.

Réa-RAISIN (2015). *Réseau Alerte Investigation Surveillance des Infections Nosocomiales - Surveillance des infections nosocomiales en réanimation adulte, France - Rapport 2013.* INVS.

Rello J., Sonora R., Jubert P., Artigas A., et al. (1996). *Pneumonia in intubated patients: role of respiratory airway care.* Am J Respir Crit Care Med **154**(1): 111-115. PMID: 8680665.

Reuter J. S. and Mathews D. H. (2010). *RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis.* BMC Bioinformatics **11**: 129. PMID: 20230624.

Rhee K. J., Cheng H., Harris A., Morin C., et al. (2011). *Determination of spatial and temporal colonization of enteropathogenic E. coli and enterohemorrhagic E. coli in mice using bioluminescent in vivo imaging.* Gut Microbes **2**(1): 34-41. PMID: 21637016.

Ricard J. D., Conti G., Boucherie M., Hormann C., et al. (2012). *A European survey of nosocomial infection control and hospital-acquired pneumonia prevention practices.* J Infect **65**(4): 285-291. PMID: 22771420.

Richards M. J., Edwards J. R., Culver D. H. and Gaynes R. P. (1999). *Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System.* Crit Care Med. **27**(5): 887-892. PMID: 10362409.

Riley L. W. (2014). *Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic Escherichia coli.* Clin Microbiol Infect **20**(5): 380-390. PMID: 24766445.

Rivas L., Coffey B., McAuliffe O., McDonnell M. J., et al. (2010). *In vivo and ex vivo evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of Escherichia coli O157:H7.* Appl Environ Microbiol **76**(21): 7210-7216. PMID: 20851992.

Rocchetta H. L., Boylan C. J., Foley J. W., Iversen P. W., et al. (2001). *Validation of a noninvasive, real-time imaging technology using bioluminescent Escherichia coli in the neutropenic mouse thigh model of infection.* Antimicrob Agents Chemother **45**(1): 129-137. PMID: 11120955.

Rocha L. A., Marques Ribas R., da Costa Darini A. L. and Gontijo Filho P. P. (2013). *Relationship between nasal colonization and ventilator-associated pneumonia and the role of the environment in transmission of Staphylococcus aureus in intensive care units.* Am J Infect Control **41**(12): 1236-1240. PMID: 23890377.

Rogers B. A., Sidjabat H. E. and Paterson D. L. (2011). *Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain.* J Antimicrob Chemother. **66**(1): 1-14. Epub 2010 Nov 16. PMID: 21081548.

Rohwer F. (2003). *Global phage diversity.* Cell **113**(2): 141. PMID: 12705861.

Rottier W. C., Ammerlaan H. S. and Bonten M. J. (2012). *Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and patient outcome: a meta-analysis.* J Antimicrob Chemother **67**(6): 1311-1320. PMID: 22396430.

Rubinstein A., Mizrachi Y., Bernstein L., Shliozberg J., et al. (2000). *Progressive specific immune attrition after primary, secondary and tertiary immunizations with bacteriophage phi X174 in asymptomatic HIV-1 infected patients.* AIDS **14**(4): F55-62. PMID: 10770533.

Russo T. A. and Johnson J. R. (2000). *Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC.* J Infect Dis. **181**(5): 1753-1754. Epub 2000 May 1715. PMID: 10823778.

Ryan E. M., Alkawareek M. Y., Donnelly R. F. and Gilmore B. F. (2012). *Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of Escherichia coli biofilms in vitro.* FEMS Immunol Med Microbiol **65**(2): 395-398. PMID: 22524448.

S

Sahota J. S., Smith C. M., Radhakrishnan P., Winstanley C., et al. (2015). *Bacteriophage Delivery by Nebulization and Efficacy Against Phenotypically Diverse Pseudomonas aeruginosa from Cystic Fibrosis Patients.* J Aerosol Med Pulm Drug Deliv PMID: 25714328.

Sanger F., Air G. M., Barrell B. G., Brown N. L., et al. (1977). *Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA.* Nature **265**(5596): 687-695. PMID: 870828.

Saussereau E., Vachier I., Chiron R., Godbert B., et al. (2014). *Effectiveness of bacteriophages in the sputum of cystic fibrosis patients.* Clin Microbiol Infect. **20**(12): O983-990. Epub 2014 Jul 26. PMID: 24920209.

Sauve C., Azoulay-Dupuis E., Moine P., Darras-Joly C., et al. (1996). *Efficacies of cefotaxime and ceftriaxone in a mouse model of pneumonia induced by two penicillin- and cephalosporin-resistant strains of Streptococcus pneumoniae.* Antimicrob Agents Chemother **40**(12): 2829-2834. PMID: 9124850.

Schamberger G. P., Phillips R. L., Jacobs J. L. and Diez-Gonzalez F. (2004). *Reduction of Escherichia coli O157:H7 populations in cattle by addition of colicin E7-producing E. coli to feed.* Appl Environ Microbiol **70**(10): 6053-6060. PMID: 15466550.

Schmerer M., Molineux I. J. and Bull J. J. (2014). *Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails.* PeerJ **2**: e590. PMID: 25279269.

Scholl D. and Merrill C. (2005). *The genome of bacteriophage K1F, a T7-like phage that has acquired the ability to replicate on K1 strains of Escherichia coli.* J Bacteriol **187**(24): 8499-8503. PMID: 16321955.

Schwaber M. J. and Carmeli Y. (2007). *Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis.* J Antimicrob Chemother **60**(5): 913-920. PMID: 17848376.

Schwarzer D., Browning C., Stummeyer K., Oberbeck A., et al. (2015). *Structure and biochemical characterization of bacteriophage phi92 endosialidase.* Virology **477**: 133-143. PMID: 25475852.

Seed K. D., Lazinski D. W., Calderwood S. B. and Camilli A. (2013). *A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity.* Nature. **494**(7438): 489-491. PMID: 23446421.

Seegobin R. D. and van Hasselt G. L. (1986). *Aspiration beyond endotracheal cuffs.* Can Anaesth Soc J **33**(3 Pt 1): 273-279. PMID: 3719428.

Skinner D. and Keefer C. (1941). *Significance of bacteremia caused by staphylococcus aureus. A study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals.* Arch Intern Med **68**(5): 851-875.

Skurnik M. and Strauch E. (2006). *Phage therapy: facts and fiction.* Int J Med Microbiol **296**(1): 5-14. PMID: 16423684.

Smith G. P. (1985). *Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.* Science **228**(4705): 1315-1317. PMID: 4001944.

Snider G. L. (1989). *Historical perspective on mechanical ventilation: from simple life support system to ethical dilemma.* Am Rev Respir Dis **140**(2 Pt 2): S2-7. PMID: 2669585.

Society of Critical Care Medicine (2005). *Critical Care Units: A Descriptive Analysis,* Society of Critical Care Medicine.

Soothill J. S. (1994). *Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by Pseudomonas aeruginosa.* Burns **20**(3): 209-211. PMID: 8054131.

Sous H. and Hirsch I. (1985). *Bactericidal activity of phenoxymethylpenicillin in an in-vitro model simulating tissue kinetics.* J Antimicrob Chemother **15 Suppl A**: 233-239. PMID: 3920182.

Stoll B. J., Hansen N. I., Sanchez P. J., Faix R. G., et al. (2011). *Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and E. coli disease continues.* Pediatrics **127**(5): 817-826. PMID: 21518717.

Stordeur P. and Mainil J. (2002). *La colibacillose aviaire.* Annales de Médecine Vétérinaire **146**: 11-18.

Storms Z. J., Smith L., Sauvageau D. and Cooper D. G. (2012). *Modeling bacteriophage attachment using adsorption efficiency.* Biochemical Engineering Journal **64**: 22-29.

Sullivan M. J., Petty N. K. and Beatson S. A. (2011). *Easyfig: a genome comparison visualizer.* Bioinformatics **27**(7): 1009-1010. PMID: 21278367.

Sutherland I. W. (1995). *Polysaccharide lyases.* FEMS Microbiol Rev **16**(4): 323-347. PMID: 7654407.

Suttle C. A. (1994). *The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities.* Microb Ecol **28**(2): 237-243. PMID: 24186450.

T

Takata T., Aizawa K., Shimizu A., Sakakibara S., et al. (2004). *Optimization of dose and dose regimen of biapenem based on pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis.* J Infect Chemother **10**(2): 76-85. PMID: 15160299.

Takemura-Uchiyama I., Uchiyama J., Osanai M., Morimoto N., et al. (2014). *Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by Staphylococcus aureus in mice.* Microbes Infect **16**(6): 512-517. PMID: 24631574.

Teneback C. C., Scanlon T. C., Wargo M. J., Bement J. L., et al. (2013). *Bioengineered lysozyme reduces bacterial burden and inflammation in a murine model of mucoid Pseudomonas aeruginosa lung infection.* Antimicrob Agents Chemother **57**(11): 5559-5564. PMID: 23979752.

Terezakis E., Needleman I., Kumar N., Moles D., et al. (2011). *The impact of hospitalization on oral health: a systematic review.* J Clin Periodontol **38**(7): 628-636. PMID: 21470276.

Torres A., el-Ebiary M., Gonzalez J., Ferrer M., et al. (1993). *Gastric and pharyngeal flora in nosocomial pneumonia acquired during mechanical ventilation.* Am Rev Respir Dis **148**(2): 352-357. PMID: 8342898.

Touchon M., Hoede C., Tenaillon O., Barbe V., et al. (2009). *Organised genome dynamics in the Escherichia coli species results in highly diverse adaptive paths.* PLoS Genet **5**(1): e1000344. PMID: 19165319.

Trautmann M., Lepper P. M. and Haller M. (2005). *Ecology of Pseudomonas aeruginosa in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organism.* Am J Infect Control **33**(5 Suppl 1): S41-49. PMID: 15940115.

Trouillet J. L., Chastre J., Vuagnat A., Joly-Guillou M. L., et al. (1998). *Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria.* Am J Respir Crit Care Med **157**(2): 531-539. PMID: 9476869.

Tsonos J., Adriaenssens E. M., Klumpp J., Hernalsteens J. P., et al. (2012). *Complete genome sequence of the novel Escherichia coli phage phAPEC8.* J Virol **86**(23): 13117-13118. PMID: 23118449.

Tsonos J., Oosterik L. H., Tuntufye H. N., Klumpp J., et al. (2014). *A cocktail of in vitro efficient phages is not a guarantee for in vivo therapeutic results against avian colibacillosis.* Vet Microbiol **171**(3-4): 470-479. PMID: 24269008.

Turgeon N., Toulouse M. J., Martel B., Moineau S., et al. (2014). *Comparison of five bacteriophages as models for viral aerosol studies.* Appl Environ Microbiol **80**(14): 4242-4250. PMID: 24795379.

Twort F. (1915). *An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses.* Lancet **2**: 1241-1243.

U

Uchiyama J., Takemura I., Satoh M., Kato S., et al. (2011). *Improved adsorption of an Enterococcus faecalis bacteriophage PhiEF24C with a spontaneous point mutation.* PLoS One **6**(10): e26648. Epub 2011 Oct 25. PMID: 22046321.

V

van Cleef B. A., Graveland H., Haenen A. P., van de Giessen A. W., et al. (2011). *Persistence of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in field workers after short-term occupational exposure to pigs and veal calves.* J Clin Microbiol **49**(3): 1030-1033. PMID: 21227986.

van Duin J. and Tsareva N. (2006). *Single-stranded RNA phages.* The bacteriophages (second ed.). R. Calendar, Oxford University Press: 175-196.

van Elsas J. D., Semenov A. V., Costa R. and Trevors J. T. (2011). *Survival of Escherichia coli in the environment: fundamental and public health aspects.* ISME J **5**(2): 173-183. PMID: 20574458.

Van Twest R. and Kropinski A. M. (2009). *Bacteriophage enrichment from water and soil.* Methods Mol Biol **501:15-21**. PMID: 19066806.

Vimont S., Boyd A., Bleibtreu A., Bens M., et al. (2012). *The CTX-M-15-producing Escherichia coli clone O25b: H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities.* PLoS One **7(9)**: e46547. PMID: 23029548.

Vincent C., Boerlin P., Daignault D., Dozois C. M., et al. (2010). *Food reservoir for Escherichia coli causing urinary tract infections.* Emerg Infect Dis **16(1)**: 88-95. PMID: 20031048.

Vincent J. L., Bihari D. J., Suter P. M., Bruining H. A., et al. (1995). *The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee.* Jama **274(8)**: 639-644. PMID: 7637145.

W

Walk S. T., Alm E. W., Calhoun L. M., Mladonicky J. M., et al. (2007). *Genetic diversity and population structure of Escherichia coli isolated from freshwater beaches.* Environ Microbiol **9(9)**: 2274-2288. PMID: 17686024.

Walkinshaw M. D., Taylor P., Sturrock S. S., Atanasiu C., et al. (2002). *Structure of Ocr from bacteriophage T7, a protein that mimics B-form DNA.* Mol Cell **9(1)**: 187-194. PMID: 11804597.

Wang E., Bergeron Y. and Bergeron M. G. (2005). *Ceftriaxone pharmacokinetics in interleukin-10-treated murine pneumococcal pneumonia.* J Antimicrob Chemother **55(5)**: 721-726. PMID: 15772139.

Wanner A., Salathe M. and O'Riordan T. G. (1996). *Mucociliary clearance in the airways.* Am J Respir Crit Care Med **154(6 Pt 1)**: 1868-1902. PMID: 8970383.

Weinbauer M. G. (2004). *Ecology of prokaryotic viruses.* FEMS Microbiol Rev **28(2)**: 127-181. PMID: 15109783.

Weld R. J., Butts C. and Heinemann J. A. (2004). *Models of phage growth and their applicability to phage therapy.* J Theor Biol **227(1)**: 1-11. PMID: 14969703.

Westh H., Frimodt-Moller N. and Gutschik E. (1991). *Bactericidal effect of penicillin, ampicillin, and amoxicillin alone and in combination with tobramycin against Enterococcus faecalis as determined by kill-kinetic studies.* Infection **19(3)**: 170-173. PMID: 1909688.

Westphal O. and Jann K. (1965). *Extraction with phenol-water and further applications of the procedure.* Methods in carbohydrate chemistry **5**: 83-91.

Whitfield C. (2006). *Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli.* Annu Rev Biochem **75**: 39-68. PMID: 16756484.

WHO (2008). *World Health Organization - The 10 leading causes of death by broad income group.* Retrieved June, 2013, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>.

WHO and UNICEF (2009). *World Health Organization and United Nations International Children's Fund - Diarrhoea: why children are still dying and what can be done.*

Wilkinson M. and Woodhead M. A. (2004). *Guidelines for community-acquired pneumonia in the ICU.* Curr Opin Crit Care **10**(1): 59-64. PMID: 15166851.

Wilson D. R. and Finlay B. B. (1998). *Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology.* Can J Microbiol **44**(4): 313-329. PMID: 9674105.

Wommack K. E. and Colwell R. R. (2000). *Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems.* Microbiol Mol Biol Rev **64**(1): 69-114. PMID: 10704475.

Woodall C. A. (2003). *Electroporation of E. coli.* Methods Mol Biol **235**: 55-69. PMID: 12904645.

Wright A., Hawkins C. H., Anggard E. E. and Harper D. R. (2009). *A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy.* Clin Otolaryngol **34**(4): 349-357. PMID: 19673983.

Y

Yarmolinsky M. B. and Sternberg N. (1998). *Bacteriophage P1. The bacteriophages.* R. Calendar. **1**: 291-438.

Young P. J., Rollinson M., Downward G. and Henderson S. (1997). *Leakage of fluid past the tracheal tube cuff in a benchtop model.* Br J Anaesth **78**(5): 557-562. PMID: 9175972.

Z

Zilberberg M. D. and Epstein S. K. (1998). *Acute lung injury in the medical ICU: comorbid conditions, age, etiology, and hospital outcome.* Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 1): 1159-1164. PMID: 9563734.

Zolfaghari P. S. and Wyncoll D. L. (2011). *The tracheal tube: gateway to ventilator-associated pneumonia.* Crit Care **15**(5): 310. PMID: 21996487.

Annexes

Protocole d'extraction d'ADN génomique phagique

- > à partir d'un lysat filtré, avec prétraitement par DNase et RNase
- > protéolyse par PK/SDS
- > extraction manuelle par PCI avec tube Phase Lock Gel

Matériel et réactifs nécessaires

- Volume de lysat nécessaire : 6 mL (de concentration souhaitable $> 10^8$ pfu/mL),
- $MgCl_2$ 1 M,
- EDTA 0.5 M,
- Tampon TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.5),
- Acétate de sodium 3 M, pH 5.2 (pour 50 mL : 20.421 g d'acétate de Na tri- H_2O + \approx 40 mL d'eau + ajustement pH avec acide acétique pur),
- DNase I (Sigma –réf. D4527-, 2000 U/mL),
- RNase A (500 μ g/mL),
- Proteinase K (20 mg/mL),
- SDS 10 %,
- PCI pour extraction ADN (Phénol:Chloroforme:Alcool Isoamylique, 25:24:1, saturé par Tris 10 mM - pH8 - EDTA 1 mM ; Sigma 77617-100ML),
- Bain marie à 37 °C et 56 °C,
- Tubes « Phase Lock Gel Light 15 mL » (constructeur 5 PRIME, référence 2302840).

1- Prétraitement du lysat par DNase et RNase

- Déposer 6 mL de lysat filtré à 0,22 μ m dans un tube de 15 mL,
- Ajouter 75 μ L de $MgCl_2$ 1 M (concentration finale \approx 10 mM, cofacteur DNase/RNase),
- Ajouter ensuite 60 μ L de DNase à 2000 U/mL (120 U) et 480 μ L de RNase à 500 μ g/mL (240 μ g). Vortexer,
- Incuber l'ensemble à 37 °C pendant 30 minutes,
- Stopper l'activité DNase/RNase avec l'ajout de 240 μ L d'EDTA 0.5 M (concentration finale \approx 20 mM).

2- Protéolyse par protéinase K et SDS

- Ajouter à chaque échantillon 30 μ L de PK à 20 mg/mL (concentration finale \approx 100 μ g/mL) et 300 μ L de SDS 10% (concentration finale \approx 0.5%),
- Incuber 30 minutes à 55°C.

3- Extraction de l'ADN par Phénol/Chloroforme

- Centrifuger à vide le nombre nécessaire de tube Phase Lock Gel (PLG) à 1500 g pendant 2 minutes à RT (descente du gel séparateur). On peut utiliser les

paramètres suivants sur la centrifugeuse BR4i : 2900 rpm en utilisant le rotor Sw40. Dans tous les cas, utiliser un rotor oscillant plutôt qu'un rotor à angle fixe pour améliorer la séparation,

- Transférer 6000 µL du lysat obtenu à l'issue de l'étape 2 dans un tube PLG et ajouter un volume identique de PCI. Agiter vigoureusement,
- Centrifuger à 1500 g pendant 5 minutes pour séparer les 3 phases,
- Récupérer le surnageant par retournement dans un nouveau tube PLG et ajouter un volume identique de PCI. Centrifuger à nouveau 5 minutes à 1500 g.
- *Optionnel (mais fortement conseillé) : répéter une dernière séparation dans un nouveau tube en ajoutant à la phase aqueuse un volume égal de chloroforme seul (CI, 24 :1) pour éviter toute contamination par le phénol.*

4- Précipitation de l'ADN

- Transférer la phase aqueuse dans 1 tube Falcon 50 mL standard (\approx 5600 µL par tube). Ajouter ensuite 620 µL d'acétate de Na 3M pH 5.2 et 12400 µL d'éthanol absolue,
- Homogénéiser lentement et laisser précipiter à -20°C pendant au moins 30 minutes,
- Centrifuger à 15 000 g pendant 20 minutes à 4°C sur la centrifugeuse Sorval nouvelle génération (2^{ème} étage) avec le rotor SLA-600 TC (utiliser exclusivement des tubes « Falcon » de 50 mL de marque Corning avec le label « CentriStar™ » qui peuvent supporter jusqu'à 17 000 g, ou analogue),
- Éliminer le surnageant par retournement et laver le culot avec 3000 µL d'éthanol 70 %
- Laisser l'éthanol s'éliminer par évaporation sans déshydrater le culot. Solubiliser ensuite l'ADN dans 250 à 500 µL de TE selon le volume visuel du culot,
- Les concentrations d'ADN obtenues sont typiquement de 50 à 300 ng/µL.

Article 1, publié dans la revue
« *Clinical Microbiology and Infection* »

Effectiveness of bacteriophages in the sputum of cystic fibrosis patients

E. Saussereau^{1,2}, I. Vachier³, R. Chiron³, B. Godbert⁴, I. Sermet⁵, N. Dufour^{1,6,7}, J.-P. Pirnay⁸, D. De Vos⁸, F. Carrié⁹, N. Molinari¹⁰ and L. Debarbieux^{1*}

1) Department of Microbiology, Institut Pasteur, Molecular Biology of the Gene in Extremophiles Unit, 2) Cellule Pasteur UPMC, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 3) Pneumology Department, CHRU Montpellier, Montpellier, 4) Service de Pneumologie, Hôpitaux de Brabois, Centre Hospitalier Universitaire de Nancy, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 5) INSERM, U 845, Faculté de Médecine Necker Enfants-Malades, Université Paris Descartes, Paris, 6) Sorbonne Paris Cité, Cellule Pasteur, Université Paris Diderot, 7) INSERM, U1137, Faculté de Médecine Xavier Bichat, Paris, France, 8) Laboratory for Molecular and Cellular Technology, Queen Astrid Military Hospital, Brussels, Belgium, 9) PHAGESPOIRS and Centre Hospitalier, Béziers and 10) UMR 729 MISTEA, DIM CHU de Montpellier, France

Abstract

Bacteriophages have been shown to be effective for treating acute infections of the respiratory tract caused by antibiotic-resistant bacteria in animal models, but no evidence has yet been presented of their activity against pathogens in complex biological samples from chronically infected patients. We assessed the efficacy of a cocktail of ten bacteriophages infecting *Pseudomonas aeruginosa* following its addition to 58 sputum samples from cystic fibrosis (CF) patients collected at three different hospitals. Ten samples that did not contain *P. aeruginosa* were not analysed further. In the remaining 48 samples, the addition of bacteriophages led to a significant decrease in the levels of *P. aeruginosa* strains, as shown by comparison with controls, taking two variables (time and bacteriophages) into account ($p = 0.024$). In 45.8% of these samples, this decrease was accompanied by an increase in the number of bacteriophages. We also tested each of the ten bacteriophages individually against 20 colonies from each of these 48 samples and detected bacteriophage-susceptible bacteria in 64.6% of the samples. An analysis of the clinical data revealed no correlation between patient age, sex, duration of *P. aeruginosa* colonization, antibiotic treatment, FEV1 (forced expiratory volume in the first second) and the efficacy of bacteriophages. The demonstration that bacteriophages infect their bacterial hosts in the sputum environment, regardless of the clinical characteristics of the patients, represents a major step towards the development of bacteriophage therapy to treat chronic lung infections.

Keywords: Chronic infection, phage therapy, *Pseudomonas aeruginosa*, pulmonary infection

Original Submission: 13 February 2014; **Revised Submission:** 2 June 2014; **Accepted:** 5 June 2014

Editor: D. Raoult

Article published online: 11 June 2014

Clin Microbiol Infect 2014; **20**: 0983–0990

10.1111/1469-0691.12712

Corresponding author: L. Debarbieux, Department of Microbiology, Institut Pasteur, Molecular Biology of the Gene in Extremophiles Unit, F-75015 Paris, France
E-mail: laurent.debarbieux@pasteur.fr

Introduction

Despite improvements in patient management, infection control policies, early detection and eradication therapies that have increased the mean life expectancy of cystic fibrosis (CF) patients to about 37 years, most of these patients eventually

succumb to chronic pulmonary bacterial infections [1–4]. The most prominent pathogen in CF patients, the gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, is becoming increasingly resistant to antibiotics [5], leading to a gradual decrease in the clinical benefits of antibiotic treatment over time.

In the environment, microbial communities are controlled by various mechanisms, including the antagonistic action of their specific viruses, through the combined activity of temperate and virulent bacteriophages [6–10]. Bacteriophages were used in medicine (phage therapy), back in the early 20th century, before the discovery of the first antibiotics [11,12]. With the current alarming increase in the frequency of infections caused by antibiotic-resistant pathogens and the lack

of new antibiotics, phage therapy is returning to the spotlight. There is recent support from experimental data and experience accumulated over 80 years in some European countries (Georgia, Russia and Poland) for the use of virulent bacteriophages for treating lung infections [13–20]. As a further step towards applications of bacteriophages in human medicine, we evaluated their potential to infect bacteria in the challenging environment of the lungs, by performing an *ex vivo* study on sputum samples from 58 chronically infected CF patients.

Methods

Study design

We carried out a multicentre cross-sectional study on sputum samples from 58 CF patients recruited from CF centres in Montpellier ($n = 23$), Nancy ($n = 20$) and the Necker Hospital in Paris ($n = 15$). This study was approved by the regional ethics committee (Nîmes, registered under number 2011-A01197-34) and declared to ClinicalTrials.gov (no. NCT01818206).

Bacteria and bacteriophage strains

We used the *P. aeruginosa* PAK strain to amplify bacteriophages PAK_P1, PAK_P2, PAK_P3, PAK_P4 and PAK_P5; the CHA strain to amplify P3_CHA[20] and CHA_P1[19]; the

PAO1 strain for PhiKZ and LUZ19; and the Aa245 strain for LBL3. Bacteriophages PhiKZ, LUZ19 and LBL3 were kindly provided by R. Lavigne, KU Leuven, Belgium. The four indicative strains (PAK, CHA, PAO1 and Aa245) were cultured at 37°C in LB medium, with shaking, and bacteriophage lysates were prepared and purified as described elsewhere [20]. The cocktail of these 10 bacteriophages was freshly prepared from bacteriophage solutions, each of which had been titrated on the corresponding host the day before sample processing and on the day of processing. Bacteriophage titration was performed by serial dilutions spotted in triplicate on bacterial lawns. This cocktail was assembled from bacteriophages available in our laboratory without any prior knowledge of their efficacy on a large collection of CF *P. aeruginosa* strains.

New bacteriophages infecting colony #4 from sputum sample 04 were isolated as described elsewhere [18].

Sputum sample processing

Four aliquots of sputum samples were used to evaluate the count of bacteria and bacteriophages before and after addition of the bacteriophage cocktail over 6 h (see Fig. 1 and Data S1). Bacteria were selected on cetrимide agar and bacteriophage counts were obtained using the four indicative strains.

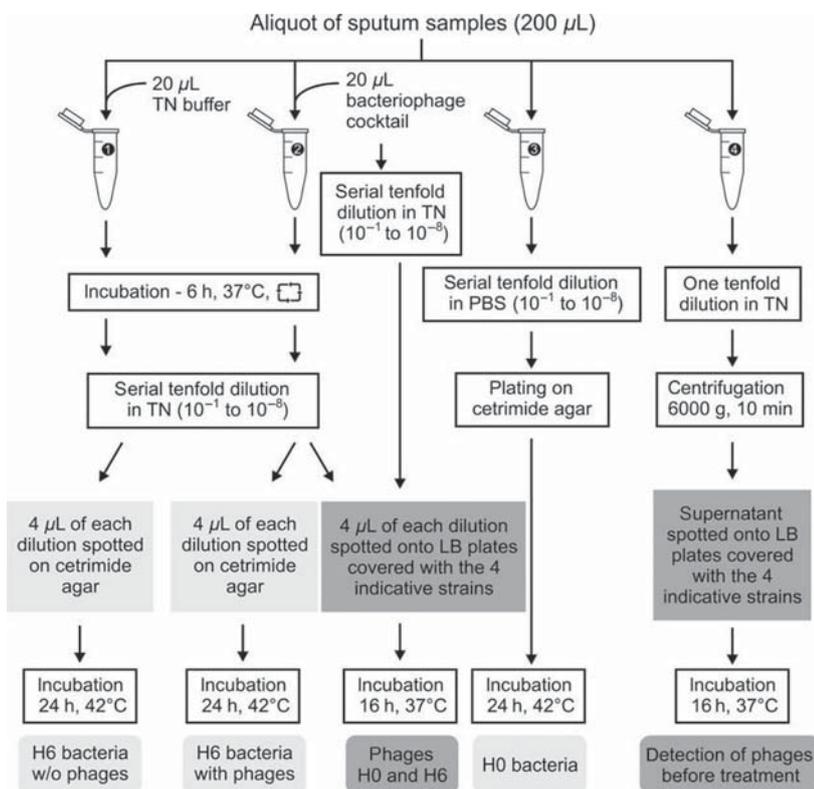


FIG. 1. Schematic diagram of the processing of sputum samples.

The reproducibility and accuracy of our counting procedure leading to the definition of threshold values are described in detail in Data S1.

Test of the sensitivity of individual colonies to each bacteriophage of the cocktail

We randomly selected 20 colonies (representative of the proportions of mucoid/non-mucoid and small/large colonies) from the cetrimide plates. The 15 μ L of each colony grown in broth were spotted on an LB plate, dried under a laminar flow hood and subsequently a 0.5- μ L drop of each bacteriophage suspension (1×10^8 pfu/mL) was spotted on top of the dried bacterial drops. Isolated plaques, confluent plaques or entirely clear areas were considered to indicate that the bacteria were susceptible to the phage tested, whereas the absence of plaques indicated full resistance (Data S1).

Molecular genotyping of *P. aeruginosa* strains

Five colonies from sputum samples 03, 04 and 33 were chosen for the molecular analysis (see Supplementary Excel file, genotyping tab). The 16S RNA gene was amplified as previously described [21], with a standard PCR kit (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA), from a single colony. The clonality of these 15 isolates was assessed by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction (REP-PCR) adapted to a semi-automated format (DiversiLab™ system, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and fingerprinting profiles were analysed with web-based DiversiLab™ software v.3.4 (bioMérieux).

Data analysis

The primary criterion assessed was the change in counts for *P. aeruginosa* strains during the period of incubation in the presence of bacteriophages. We calculated that, to detect a 50% decrease in bacterial counts with a standardized effect size of 0.5, we would need to analyse $n = 44$ paired observations, with an alpha risk of 0.05 and a beta risk of 0.10 (the standardized effect size to estimate the number of subjects is defined as the difference of the mean before and after divided by the standard deviation). Thus, taking missing data into account, we needed to enroll 55–60 consecutive patients in this study. The secondary criteria taken into account were the change in bacteriophage counts during the incubation period and the susceptibility of the 20 individual colonies tested per sample to each bacteriophage. Samples were then classified into five groups, defined as: negative, for samples in which no increase in bacteriophage counts was observed; group A, for samples in which bacterial counts decreased and bacteriophage-susceptible bacteria were present; group B, for samples displaying a decrease in bacterial counts and an absence of susceptible colonies; group C, for samples displaying no

decrease in bacterial counts and the presence of susceptible colonies; and group D for samples displaying no decrease in bacterial counts and an absence of susceptible colonies (Fig. 3).

Statistical analysis

Descriptive data are summarized as means \pm standard deviation (SD) or medians with interquartile ranges, according to the normality of the distribution, which was assessed with the Shapiro–Wilk test. We used Kruskal–Wallis tests or ANOVA tests for comparisons of quantitative variables. Categorical data are expressed as numbers and percentages, and were compared in chi-squared tests. Univariate and multivariate analyses were carried out with linear mixed-effect models for repeated measures. Variables were selected for inclusion in the multivariate model if they had p-values below 0.20 in univariate analysis, and a stepwise procedure was used to select the final variables included in the multivariate model. A p-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant. Data were analysed with R.2.15.2 software.

Results

Characteristics of the patients and treatment of the samples

The characteristics of the 58 CF patients enrolled in this study are reported in Table 1. Each of the 58 sputum samples collected was split into four aliquots. We added a cocktail of ten bacteriophages infecting *P. aeruginosa* to one of these aliquots and buffer alone to a second aliquot; the other two aliquots were used for subsequent analysis (Fig. 1; Methods). Bacterial counts were obtained on selective medium and bacteriophage counts were obtained on agar plates overlaid with four different indicative *P. aeruginosa* strains (Methods). Ten sputum samples (20.8%) contained no *P. aeruginosa* strains capable of growing on the selective medium and were not

TABLE 1. Principal characteristics of the CF patients enrolled in this study

Variable	Enrolled	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -positive ^a
Patients	58 ^b	48
Sex (female/male)	26/32	23/25
CFTR genotype	n (%)	n (%)
dF508/dF508	26 (45)	23 (48)
dF508/other	20 (34)	16 (33)
other/other	12 (21)	9 (19)
Age, yr (mean \pm SD)	26 \pm 10	27 \pm 10
Baseline FEV1 (% predicted, mean \pm SD)	52 \pm 20	52 \pm 19

^a*Pseudomonas aeruginosa* colonization was first recorded between years 1983 and 2011 (at least 3 months before inclusion), with the majority, 31 patients, between years 1990 and 2000 and with only four patients in year 2011.

^bTwenty-three patients from Montpellier, 15 from Paris (Necker Hospital) and 20 from Nancy.

analysed further (see Supplementary Excel file, bacteria numeration tab).

Analysis of the microbiological data (bacteria and bacteriophages)

In CF patients, *P. aeruginosa* populations displayed several phenotypes that could affect susceptibility to bacteriophages [22,23]. We then expected bacteria to grow when samples were incubated in the absence of bacteriophages, while significant growth attenuation was predicted in the presence of bacteriophages. A statistical analysis was performed on the 48 samples, in which bacterial counts (ranging from 33% to 6090% increase in the absence and from 18 to 98% reduction in the presence of bacteriophages) were compared in a mixed linear model with two parameters: time (0 h and 6 h) and bacteriophages (presence vs. absence). This analysis confirmed that the total number of bacteria increased during the incubation period in the absence of bacteriophages ($p < 0.001$). However, despite this growth, the addition of bacteriophages significantly decreased the number of bacteria present ($p 0.024$).

The secondary criterion considered was the difference between the number of bacteriophages added and the number recovered at the end of the incubation period. As bacteriophage counts can only increase if the bacteriophages infect bacterial hosts, any increase over the threshold level indicates that some of the bacteria in the sample were infected (Fig. 2, Methods; see Supplementary Excel file, threshold evaluation and phage numeration tabs). The results obtained for the four indicative strains were combined, and only seven samples

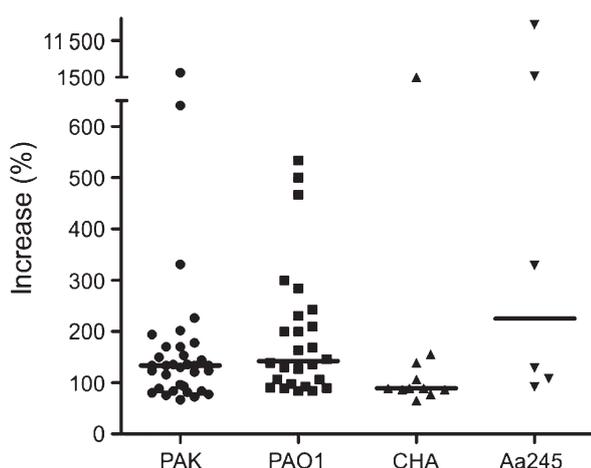


FIG. 2. Increase of bacteriophage counts following 6 h incubation. Individual data (% of increase between 0 and 6 h) are indicated for the 41 samples that have an increased value above the threshold from spot tests performed on each of the four indicative strains (PAK, PAO1, CHA and Aa245). The lines represent median values.

(14.6%) (Fig. 3; see Supplementary Excel file, analyses tab) displayed no increase in the number of bacteriophages over the threshold level (these seven samples were assigned to the negative group). The other 41 samples displayed an increase in bacteriophage numbers. We analysed these 41 samples by considering two additional criteria: (i) the decrease in bacterial counts and (ii) the susceptibility of 20 individual colonies to at least one of the ten bacteriophages (Methods; see Supplementary Excel file, susceptibility to phages tab). This led to the definition of four groups (Fig. 3, Methods): group A, which included 17 samples (35.4%), group B, which contained five samples (10.4%), group C, which contained nine samples (18.8%) and group D, which contained ten samples (20.8%) (see Methods and Supplementary Excel file, analyses tab including the results obtained for each indicative strain).

We used a dichotomous scoring system, no lysis vs. lysis (Methods), to analyse the susceptibility of 20 individual colonies from each sputum sample to each of ten bacteriophages (over 8900 tests). Bacteriophages PAK_P5, LBL3, PAK_P3 and PAK_P4 were the most efficient, infecting 170, 156, 151 and 149 colonies, respectively, whereas bacteriophages CHA_P1 and PhiKZ were the least efficient, infecting only 23 and 32 colonies, respectively, of a total of 892 (Table 2; see Supplementary Excel file, susceptibility to phage tab). The ten bacteriophages were able to infect up to 313 individual colonies, corresponding to a coverage of 35.1%, a low value, which could reflect the lack of initial selection for ability to infect *P. aeruginosa* strains from CF patients.

We also carried out a molecular analysis of five colonies isolated from each of three samples, one from group A, one from group B and one from group D. 16S RNA sequences confirmed that these 15 colonies belonged to *P. aeruginosa*. Genotyping confirmed that each set of five colonies belonged to the same group, suggesting that each of the corresponding patients was infected by one major genotype (Fig. 4). For the five colonies selected from the group D sample, all of which were resistant to all ten bacteriophages, we selected a single colony for the isolation of new bacteriophages from environmental sources. Three of these new bacteriophages, chosen at random, infected all five colonies from the group D sample, demonstrating that these colonies were not resistant to bacteriophage infection *per se*.

The presence of bacteriophages in the sputum samples before processing was assessed by checking for plaques following spotting of the sample on the four indicative strains (see Supplementary Excel file, prophages tab). Only a few plaques were observed from 11 samples, corresponding to no more than 2×10^3 pfu/mL in each sample. Prophages were also detected during the testing of individual colonies for susceptibility to bacteriophages, in the form of tiny homoge-

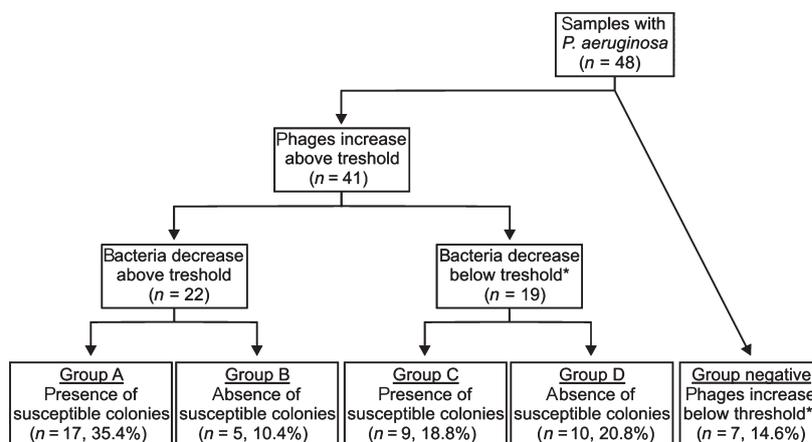


FIG. 3. Diagram of the analysis of microbiological data. The 48 samples containing *P. aeruginosa* strains were classified into five groups according to counts of bacteriophages, counts of bacteria and susceptibility to individual colonies. *, including bacteria increase; **, including bacteriophages decrease. Amongst the seven samples of the negative group, one displayed an increase in bacteria counts, two a decrease and four a non-significant variation. Four samples out seven contained at least one colony susceptible to bacteriophages.

TABLE 2. Susceptibility of CF isolates to individual bacteriophages

Number of CF isolates	Resistant	Sensitive	Total
PAK-P1	813	79	892
PAK-P2	796	96	892
PAK-P3	741	151	892
PAK-P4	743	149	892
PAK-P5	722	170	892
P3-CHA	767	125	892
CHA-P1	869	23	892
PhiKZ	860	32	892
Luz19	797	95	892
LBL3	736	156	892
Total for the cocktail	7844	1076	8920

neous plaques covering the entire surface of the indicative strain spot. In total, 29 colonies from eight sputum samples presented such a phenotype (see Supplementary Excel file, prophages tab). The presence of these bacteriophages and prophages at such a low level did not prevent the determination of bacteriophage counts and colony sensitivity.

Correlation between patient characteristics and microbiological data

We investigated the correlation between group (negative, A, B, C or D) and clinical data (see Supplementary Excel file, clinical data tab), by performing a statistical analysis with several parameters (age, sex, FEV1, last antibiotic treatment and duration of colonization; Table 3). We found no link between these five groups, defined on the basis of microbiological data, and the clinical parameters tested (all p-values above 0.05).

Discussion

In the face of the growing threat posed by antibiotic-resistant strains and the particular microenvironment of the lungs of CF patients, the development of effective treatments is a major challenge. Mucus, pathogens (bacteria, fungi and viruses),

FIG. 4. Molecular typing of 15 *P. aeruginosa* colonies isolated from three sputum samples. Dendrogram, REP-PCR patterns and similarity matrix (colour-coded, based on percentage similarity) are represented for five randomly chosen colonies from samples 03, 04 and 33.

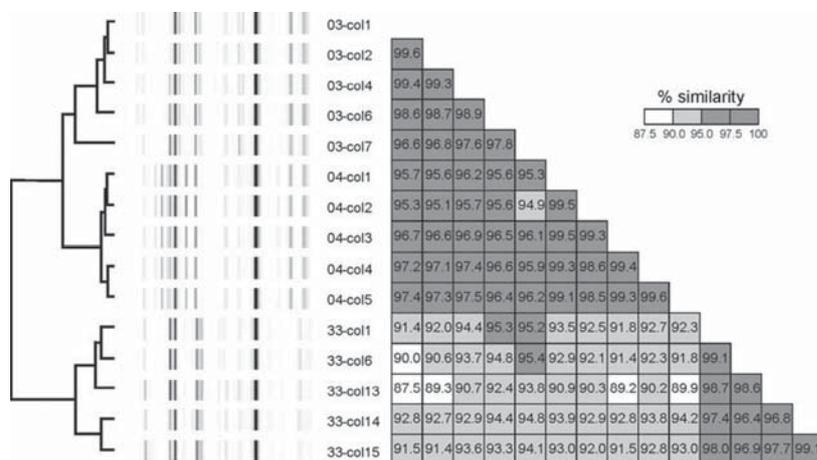


TABLE 3. Correlation between clinical and microbiological data for 48 patients

Variable	Negative group (n = 7)	Group A (n = 17)	Group B (n = 5)	Group C (n = 9)	Group D (n = 10)	p-value ^a	p-value ^b
Sex							
F	2 (28.57)	8 (47.06)	2 (40.00)	7 (77.78)	4 (40.00)	0.3571	0.3332
M	5 (71.43)	9 (52.9)	3 (60.00)	2 (22.22)	6 (60.00)		
Age	37.43 ± 18.24	24.53 ± 9.08	27.40 ± 6.35	28.78 ± 7.15	21.90 ± 3.81	0.0854	0.1891
FEV1 (%)	50.57 ± 13.88	54.00 ± 20.86	54.60 ± 25.02	44.78 ± 17.07	52.50 ± 20.39	0.9377	0.8334
Antibiotic							
A	0 (0.00)	2 (6.90)	1 (11.11)	0 (0.00)	2 (12.50)	0.5557	0.5220
Am	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (6.25)		
Az	1 (14.29)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
B	0 (0.00)	2 (6.90)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (6.25)		
C	1 (14.29)	3 (10.34)	2 (22.22)	5 (33.33)	1 (6.25)		
Cl	0 (0.00)	1 (3.45)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
Co	0 (0.00)	1 (3.45)	1 (11.11)	1 (6.67)	1 (6.25)		
F	1 (14.29)	4 (13.79)	1 (11.11)	1 (6.67)	1 (6.25)		
M	1 (14.29)	5 (17.24)	0 (0.00)	3 (20.00)	3 (18.75)		
N	4 (57.14)	9 (31.03)	2 (22.22)	3 (20.00)	2 (12.50)		
P	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	2 (12.50)		
R	0 (0.00)	1 (3.45)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
T	1 (14.29)	0 (0.00)	1 (11.11)	2 (13.33)	0 (0.00)		
Tg	1 (14.29)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)		
To	2 (28.57)	1 (3.45)	1 (11.11)	0 (0.00)	2 (12.50)		
Length of colonization z(months)	160.71 ± 48.21	170.52 ± 86.44	157.00 ± 92.36	122.33 ± 95.29	127.20 ± 73.66	0.6413	0.5182

Last antibiotic administered to patients (A, amoxicillin + clavulanic acid; Am, amikacin; Az, aztreonam; B, cotrimoxazole; C, ciprofloxacin; Cl, ticarcillin + clavulanic acid; Co, colimycin; F, ceftazidime; M, meropenem; N, tobramycin/intravenous; P, pristinamycin; R, rifampicin; T, piperacillin + tazobactam; Tg, teicoplanin; To, tobramycin/aerosol).

^ap-value for the five groups.
^bp-value for the four groups (A,B,C,D). Statistical analyses were performed using the chi-square test for categorical variables and ANOVA or Kruskal–Wallis tests for quantitative variables.

extracellular materials (chemokines, DNA, proteases, etc.) and inflammatory cells form a barrier potentially preventing or interfering with antibacterial treatments. The renewed interest in phage therapy and its successful use against acute *P. aeruginosa* lung infections in mice led us to investigate whether bacteriophages could effectively infect bacteria in the sputum of CF patients. Using a set of 58 sputum samples collected from three hospitals in France, we demonstrated the efficacy of a cocktail of ten bacteriophages not specifically selected for their ability to infect *P. aeruginosa* strains in sputum. Thus, the microenvironment in the lungs of CF patients does not prevent bacteriophage activity as we found that the number of bacteriophages increased over the threshold value in 86.4% (41 out of 48 samples containing *P. aeruginosa* strains) of samples. Furthermore, none of the clinical parameters tested was associated, either positively or negatively, with bacteriophage efficacy. This patient-independent efficacy supports the further development of bacteriophage treatments.

However, this pioneering study had some limitations. First, only bacteria growing on the selective medium within 24 h were taken into account, but some *P. aeruginosa* strains require longer incubation times for colony formation. This may account for the increase in bacteriophage counts in seven of the ten samples classified as not containing *P. aeruginosa* strains. Second, we used a short incubation period, to optimize the detection of decreases in bacterial counts by bacteriophages, because we expected the sputum samples to contain a mixed population of bacteriophage-susceptible and bacteriophage-resistant colonies.

Group A samples gave the most straightforward results, whereas the results for group B can be explained by a shift in phenotype to bacteriophage susceptibility between the sputum and agar plate environments. Upon environmental signals it is known that bacterial gene expression can affect bacteriophage susceptibility [24,24]. In group C samples, the decrease in the bacteriophage-susceptible population was probably compensated for by an increase in the bacteriophage-resistant population. Group D samples probably contained a minor bacteriophage-susceptible population and a larger bacteriophage-resistant population. Finally, some negative group samples were found to contain isolated colonies susceptible to bacteriophages, suggesting that bacteria may be less susceptible to bacteriophage infection in the sample than on plates. Furthermore, patient factors (immune cells, proteases, etc.) and other microorganisms (fungi and viruses) may also hinder interactions between bacteriophages and bacteria.

In sputum samples, the amplification of individual bacteriophages could be evaluated only for LBL3 (infecting only one indicative strain), which gave the two highest levels of bacteriophage amplification (samples 50 and 58). LBL3 was also the second most active bacteriophage in analyses on isolated colonies (see Supplementary Excel file, phages numeration tab). The most active bacteriophage, PAK_P5, is genetically closely related to PAK_P3, P3_CHA and CHA_PI (the least active of the ten bacteriophages tested). These four bacteriophages had protein sequences that were about 90% identical. The genomic data of bacteriophages is therefore insufficient for predicting infectivity in clinical bacterial strains [19].

CF patients colonized by a single clonal population of *P. aeruginosa* displayed several phenotypes [22,23]. Consequently, it was not surprising to observe that the 20 colonies isolated from a single sputum sample were not equally infected by the ten individual bacteriophages, in any of the 48 samples (except those containing only resistant colonies). This confirms that various phenotypes can emerge from a unique genotype in the sputum of a patient, which can indeed affect bacterial susceptibility to bacteriophages. It is also an indication that genotyping may be too imprecise for the identification of clonal mutations relevant to bacteriophage susceptibility. Testing a set of bacteriophages against a large panel of isolated colonies for each patient would therefore be the best approach for formulating bacteriophage cocktails. However, the possibility of phenotypic variation between the sputum and agar plate environments represents an additional drawback. Nevertheless, our recent results clearly suggest that the most efficient bacteriophages *in vivo* are likely to be those isolated 'deliberately', using patients' strains, supporting the use of a personalized approach to achieve optimal treatment [19,26,27].

Acknowledgements

We would like to thank the medical and technical staff of the three hospitals involved in collecting the sputum samples.

Funding

This work was supported by *Vaincre la Mucoviscidose*, the French Cystic Fibrosis Foundation [RC20120600714/1/1/141], and *Programme Transversal de Recherches* [417] from Institut Pasteur and Assistance Publique Hôpitaux de Paris.

Funding sources had no role in this study.

Author contributions

ES, IV, RC, FC, NM and LD contributed to the conception and design of the study. ES, IV, RC, BG and IS contributed to the acquisition of data. ES, IV, RC, IS, ND, JPP, DdV, NM and LD contributed to the analysis and interpretation of data.

Transparency Declaration

The authors declare no conflicts of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Data S1. Supplement to methods.

Data S2. Excel file with the entire set of data including tabs S1 to S8 designated as follows.

Table S1. Threshold evaluation.

Table S2. Phages numeration.

Table S3. Bacteria numeration.

Table S4. Prophages.

Table S5. Susceptibility to phages.

Table S6. Genotyping.

Table S7. Analyses.

Table S8. Clinical data.

References

- Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2002; 34: 91–100.
- Henry RL, Mellis CM, Petrovic L. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 1992; 12: 158–161.
- Hoiby N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med* 2011; 9: 32.
- Hansen CR, Pressler T, Hoiby N. Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. *J Cyst Fibros* 2008; 7: 523–530.
- Croughs PD, Li B, Hoogkamp-Korstanje JA, Stobberingh E. Thirteen years of antibiotic susceptibility surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care units and urology services in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 283–288.
- Reyes A, Haynes M, Hanson N et al. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 2010; 466: 334–338.
- Rodriguez-Valera F, Martin-Cuadrado AB, Rodriguez-Brito B et al. Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 828–836.
- Gomez P, Buckling A. Bacteria-phage antagonistic coevolution in soil. *Science* 2011; 332: 106–109.
- Matos RC, Lapaque N, Rigottier-Gois L et al. Enterococcus faecalis prophage dynamics and contributions to pathogenic traits. *PLoS Genet* 2013; 9: e1003539.
- Barr JJ, Auro R, Furlan M et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 10771–10776.
- d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Les Comptes rendus de l'Académie des sciences* 1917; 165: 373–375.
- Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 437–451.
- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011; 1: 66–85.

14. Chanishvili N. Phage therapy—history from Twort and d'Herelle through soviet experience to current approaches. *Adv Virus Res* 2012; 83: 3–40.
15. Maura D, Debarbieux L. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90: 851–859.
16. Thiel K. Old dogma, new tricks—21st century phage therapy. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 31–36.
17. Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O et al. Bacteriophages phimr299-2 and phinh-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio* 2012; 3: e00029–12.
18. Debarbieux L, Leduc D, Maura D et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis* 2010; 201: 1096–1104.
19. Henry M, Lavigne R, Debarbieux L. Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 5961–5968.
20. Morello E, Sausseureau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, Debarbieux L. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: First steps towards treatment and prevention. *PLoS One* 2011; 6: e16963.
21. Lu JJ, Perng CL, Lee SY, Wan CC. Use of pcr with universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2076–2080.
22. Mowat E, Paterson S, Fothergill JL et al. *Pseudomonas aeruginosa* population diversity and turnover in cystic fibrosis chronic infections. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 1674–1679.
23. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B et al. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. *PLoS ONE* 2013; 8: e60225.
24. Hoyland-Kroghsbo NM, Maerkedahl RB, Svenningsen SL. A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism. *MBio* 2013; 4: e00362–00312.
25. Debarbieux L. Bacterial sensing of bacteriophages in communities: The search for the rosetta stone. *Curr Opin Microbiol* 2014; 20C: 125–130.
26. Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G et al. The phage therapy paradigm: Pret-a-porter or sur-mesure? *Pharm Res* 2011; 28: 934–937.
27. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 2013; 8: 769–783.

Article 2, publié dans la revue
« *Critical Care Medicine* »

Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages

Nicolas Dufour, MD, MSc^{1,2,3,4}; Laurent Debarbieux, PhD¹; Mélanie Fromentin, MSc²;
Jean-Damien Ricard, MD, PhD^{2,3,4}

Objective: To study the effect of bacteriophage treatment on highly virulent extraintestinal *Escherichia coli* pneumonia in mice and compare it with conventional antimicrobial treatment.

Design: Animal investigation.

Setting: University research laboratory.

Subjects: Pathogen-free 8-week-old Balb/cJrj male mice.

Interventions: Two bacteriophages (536_P1 and 536_P7) were isolated from sewage using strain 536, a highly virulent extraintestinal *E. coli*. Their in vitro and in vivo efficacy against strain 536 and a ventilator-associated pneumonia *E. coli* were tested. The first group of mice were infected by intranasal instillation of bioluminescent strain 536 and received 536_P1 intranasally, cef-

triaxone, or control. The second group of mice was infected with the ventilator-associated pneumonia strain and received 536_P7. Adaptation of 536_P7 to this clinical isolate was also evaluated in vitro and in vivo.

Measurements and Main Results: In vivo efficacy of bacteriophage and antibiotic treatment were assessed by recording bioluminescence for short-time periods and by recording body weight and survival of mice for longer periods. Both treatments improved survival compared with control (100% vs 0%), and in vivo bioluminescence recordings showed a similar rapid decrease of emitted light, suggesting prompt bacterial clearance. The majority of mice infected by the ventilator-associated pneumonia strain were not rescued by treatment with 536_P7; however, in vitro adaptation of this bacteriophage toward the ventilator-associated pneumonia strain led to isolate a variant which significantly improved in vivo treatment efficacy (animal survival increased from 20% to 75%).

Conclusions: Bacteriophage treatment was as effective as anti-biotherapy to provide 100% survival rate in a lethal model of highly virulent *E. coli* pneumonia. Adaptation of a bacteriophage is a rapid solution to improve its efficacy toward specific strains. These results suggest that phage therapy could be a promising therapeutic strategy for ventilator-associated pneumonia. (*Crit Care Med* 2015; XX:00–00)

Key Words: bacteriophage; *Escherichia coli*; lung infection; nosocomial infections; phage therapy; ventilator-associated pneumonia

¹Department of Microbiology, Institut Pasteur, Molecular Biology of Gene in Extremophiles, Paris, France.

²Institut National de la Santé et la Recherche Médicale, INSERM, IAME, UMR 1137, Paris, France.

³Univ Paris Diderot, IAME, UMR 1137, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

⁴AP-HP, Hôpital Louis Mourier, Service de Réanimation Médico-chirurgicale, Colombes, France.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website (<http://journals.lww.com/ccmjournal>).

Supported, in part, by a joint research grant from both Institut Pasteur and Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (Programme Transversal de Recherches no 417).

Dr. Dufour received support for article research from the Institut Pasteur and Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (joint research grant; recipient of a Poste d'Accueil). His institution received grant support from the Institut Pasteur (joint research grant between Assistance Publique–Hôpitaux de Paris and Institut Pasteur). Dr. Debarbieux received grant support from the National Science Center of Poland (reviewing grant application), other support from Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) (member of a jury to evaluate candidates for permanent positions in INRA), and support for article research from the Institut Pasteur and Assistance Publique des Hôpitaux de Paris. His institution received grant support from the Assistance Publique–Hôpitaux de Paris (grant received for a joint research program between Institut Pasteur and Assistance Publique des hôpitaux de Paris). Dr. Ricard served as a board member for Covidien and received support for travel from Fisher&Paykel. Ms. Fromentin has disclosed that she does not have any potential conflicts of interest.

For information regarding this article, E-mail: jean-damien.ricard@lmr.aphp.fr

Copyright © 2015 by the Society of Critical Care Medicine and Wolters Kluwer Health, Inc. All Rights Reserved.

DOI: 10.1097/CCM.0000000000000968

Lower respiratory tract infections (i.e., pneumonia) represent the third leading cause of mortality in the world according to the World Health Organization epidemiological data center (1) and the most frequent life-threatening nosocomial infection in the ICU. All patients undergoing invasive mechanical ventilation are indeed exposed to a time-dependent risk of ventilator-associated pneumonia (VAP). VAP is associated with an impaired prognosis and an increase in costs and probably also in mortality although recent studies have considerably lowered VAP attributable mortality (2–5). Two main factors directly impact treatment's efficacy of these infections and patients' outcome: bacterial virulence and

antibiotic resistance. In the United States, at least 23,000 death are directly linked to antibiotic-resistant infections, and the highest mortality is attributed to *Enterobacteriaceae* (mainly *Klebsiella* species and *Escherichia coli*) (6).

In western countries, *E. coli* is responsible for ICU infections as often as *Pseudomonas* (2, 7). Recently, *Enterobacteriaceae* were found more frequently than *Pseudomonas aeruginosa* in microbiologically documented VAP (8), *E. coli* being one of the most prevalent of them.

In the ICU setting, *E. coli* strains involved in VAP belong predominantly to the B2 phylogenetic group and possess a high number of virulence factors (9). Interestingly, a number of these strains belonged to subgroup III (sequence type 127), including the highly virulent archetypal strain 536 (10). Finally, *E. coli* is well known to develop antibiotic resistance (11) and is then emerging as one of the greatest microbiological threat to come, urging the development of specific antibacterial treatments (12, 13), especially in the ICU setting.

In this context, bacteriophages may offer an interesting perspective and recent calls have been made to promote their use (14–16). Bacteriophages are viruses that infect specifically bacterial cells. They are unique among antibacterial agents in their ability to increase their number in presence of the bacterial target. During the last decade, a renewed interest for phage therapy has led to publication of several encouraging *in vitro* and *in vivo* studies (17–20). Several clinical trials (<http://clinicaltrials.gov>) have been initiated, and the European Union has recently funded a large randomized controlled trial to test the efficacy of phage therapy to treat infected burn wounds (<http://www.phagoburn.eu>).

In this article, we investigated the use of bacteriophages to treat pneumonia induced by highly virulent extraintestinal pathogenic *E. coli*. Using *in vivo* kinetics assessed by bioluminescence recording, we showed that phage therapy is as effective as antibiotics. Additional observations demonstrate the flexibility of bacteriophage adaptation, which represents a rapid and easy way to improve bacteriophage efficacy toward clinical strains.

MATERIAL AND METHODS

E. coli Strains

Both strains, *E. coli* 536 (10) and PDP302, belong to the B2 phylogenetic group of highly virulent extraintestinal *E. coli*, determined by the triplex polymerase chain reaction technique (21). Strain PDP302 was isolated from an ICU patient under mechanical ventilation in whom VAP developed and belongs to a well-characterized collection (9).

The 536-lux strain was obtained by transformation of the wild-type 536 strain with plasmid pCM17. pCM17 carries the kanamycin-resistance gene and the *luxCDABE* operon from *Photobacterium luminescens* under *OmpC* promoter for a constitutive expression (22, 23). Stability over time of the light-emitting phenotype without antibiotic pressure has been checked by means of repeated seeding of liquid cultures over 10 days. Quantification and analysis of luminescence, both on liquid and

solid medium, showed that the light produced started to decrease only after the 7th day of intense growth conditions (**supplemental data**, pages 1 and 2, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>).

Bacteriophages Isolation, Preparation, Adaptation, and Sequencing

Bacteriophages 536_P1 and 536_P7 were isolated from sewage using strain 536 as previously described (20, 24).

In vitro activity of a given bacteriophage on a nonhost strain was assessed by its efficiency of plaquing (EOP). The term “nonhost strain” refers to a strain which was not the one used to isolate the bacteriophage. EOP was calculated as the ratio of number of plaques formed by the bacteriophage on the nonhost strain to the number of plaques formed on its host, using the same bacteriophage solution (supplemental data, pages 2 and 3, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>).

Bacteriophage 536_P1 and 536_P7 displayed an EOP of 1 on 536-lux strain (compared with wild-type 536). Bacteriophage 536_P7 displayed an EOP of 1 on strain PDP302 (supplemental data, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>). Heat-inactivated 536_P1 was obtained after incubation at 80°C for 10 minutes (total loss of infectivity was then confirmed by titration).

We adapted bacteriophage 536_P7 to strain PDP302 to improve its virulence against this strain. It is indeed known, since the pioneered study by d’Herelle (25) in 1917, that the amplification of bacteriophages on a bacterial strain different (but close enough) to the original host (initially used to isolate them) can lead to select bacteriophage variants that could display increased infectivity toward this different strain. The *in vitro* adaptation of bacteriophage 536_P7 to strain PDP302 was performed as follows: a liquid culture of strain PDP302 (50 mL, in Lysogenic broth) was infected by bacteriophage 536_P7 at multiplicity of infection (MOI) of 10^{-3} (i.e., a ratio of virus to bacteria equal to 0.001) for 3 hours. Then, 5 mL was centrifuged 5 minutes at 8,000 g and the supernatant was sterilized by filtration. A fraction of this lysate was titrated on both parental (536) and targeted (PDP302) strains before infecting a new 50 mL PDP302 liquid culture. These steps were repeated four times ending with plaque isolation (24) to purify the adapted bacteriophage, called 536_P7_PDP302. Kinetics of lysis of strain PDP302 by bacteriophages 536_P7 and 536_P7_PDP302 were performed in a 96-well plate (supplemental data, page 3, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>).

All bacteriophages solutions were purified as described previously using cesium chloride gradient ultracentrifugation (26). Transmission electron microscopy observations were performed following uranyl acetate staining (photographs of bacteriophages 536_P1 and 536_P7 are shown in the supplemental data (page 4, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>)).

Sequencing of bacteriophage 536_P1 and 536_P7 was performed using Illumina sequencing technology (Illumina, Inc., San Diego, CA). DNA was extracted from lysates, using a

DNase and RNase pretreatment followed by a phenol-chloroform extraction method, modified from Pickard (27). Genome of 536_P1 (149,471 bp) was found 99% identical on 90% of its length to *phAPEC8* bacteriophage (28). Genome of 536_P7 (148,442 bp) was found 98% identical on 93% of its length to *phi92* bacteriophage (29).

Animals and Ethics Statement

Eight-week-old BALB/cJrj male mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were housed in animal facility in accordance with French and European regulations on the care and protection of laboratory animals. Protocols were approved by the veterinary staff of the Institut Pasteur animal facility (approval number 10.565) and the National Ethics Committee regulating animal experimentation (approval number 2012-0018). Intraperitoneal administration of 1.25 μ g (50 μ g/kg) of buprenorphine (Buprecare; AST Farma, Oudewater, The Netherlands) was systematically performed on all mice at 8 and 24 hours post infection to limit pain and dyspnea. Food and drink were provided ad libitum.

Animal Infection and Treatment, Bioluminescence Recording

Mice, anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine administered via intramuscular route, were infected intranasally with 1×10^7 (non-100% lethal dose) or 4×10^7 colony-forming unit (CFU) (100% lethal dose) of 536-lux strain or by 1.5×10^7 CFU (non-100% lethal dose) of PDP302 strain and resuspended in 20 μ L of phosphate-buffered saline (PBS). Two hours later, mice were anesthetized by isoflurane inhalation (2%) or by a second intramuscular injection of ketamine/xylazine. Mice then received a second 20 μ L intranasal administration of PBS (control group) or 20 μ L of the therapeutic bacteriophage solution (in PBS) with a MOI of 0.3, 3, or 10. Mice were weighed daily (and euthanized if weight loss was > 25%, a limit never

reached in the present experiments) and visited twice daily to assess behavior and mortality for at least 14 days. Ceftriaxone sodium (TEVA, Paris, France) was suspended in normal saline. A 50 mg/kg dose (1,250 μ g, 200 μ L) was injected intraperitoneally 2 hours post infection and every 12 hours during 2 days (i.e., a total of five injections). In parallel, control group received 200 μ L injections of normal saline. Ceftriaxone minimal inhibitory concentration for the 536-lux strain was inferior to 0.03 mg/L (according to standardized disk diffusion method).

Photon emission of the luminescent bacteria was recorded and analyzed as previously described (20) using an Ivis Spectrum imaging system (PerkinElmer, Richmond, CA) and a dedicated software (Living Image; PerkinElmer). Amount of photon emitted was expressed as photon/s/cm²/steradian and normalized by subtracting the background luminescence noise using a noninfected control mouse included in each recording. A typical recording is shown in Figure 1.

Bacteriophage and Bacterial Counts in Lung Homogenate, Analysis of Bronchoalveolar Lavage Fluids

These analyses were performed independently from experiments assessing mortality and bioluminescence signal, using four mice per condition and per time point. Lungs were removed from euthanized mice at 2, 6, and 16 hours post infection, weighed, and mechanically homogenized (Ultra-Turrax; IKA, Staufen, Germany) before being serially diluted to count colony of strain 536 on agar plate containing kanamycin (triplicate) and count plaques of bacteriophage 536-P1 on agar plates covered with strain 536 (triplicate).

Bronchoalveolar lavage (BAL) procedure and processing of BAL fluids for cytological (cell counts and microscopic observations) and biochemical analysis (total proteins, lactate dehydrogenase, and keratinocyte-derived cytokine [KC] levels) were performed as detailed in the supplemental data (page 4, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed by using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA). The normal distribution of all variables was checked using the Kolmogorov-Smirnov test, and results are then expressed as mean \pm SD. In case of non-Gaussian distribution, results are expressed as median (25th, 75th percentile). Statistical tests (Student *t* test or Mann-Whitney test) were chosen accordingly. Survival curves were compared by using the

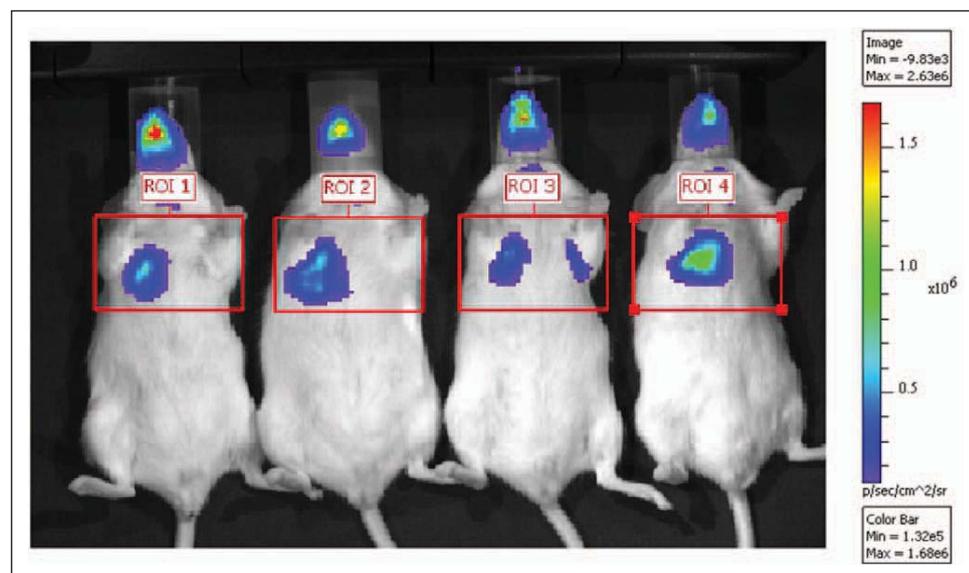


Figure 1. Typical acquisition of bioluminescence imaging. This picture represents a typical color-coded bioluminescence signal merged with classical photography. Four mice infected with strain 536-lux are shown, 4 hr after infection without treatment. *Red rectangles* represent regions of interest (ROI) of the chest area used for light quantification.

Log-rank test. Comparison of proportion was performed using Fisher exact test. A p value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Treatment of *E. coli* 536-Lux Pneumonia With Bacteriophage 536_P1

All mice ($n = 32$, two independent experiments) challenged with 1×10^7 CFU of *E. coli* 536-lux exhibited an acute weight loss with a maximum 3 days after bacterial inoculation ($-12.0\% \pm 4.8\%$), followed by a gradual recovery (baseline weight values were reached by day 7) (supplemental digital content, SDC page 5, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>). Mortality was 75% in the control group ($n = 16$, four survivors). By striking contrast, 100% of mice treated with bacteriophage 536_P1 with a MOI (*Material and Methods* section) of 0.3 ($n = 8$) or 3 ($n = 8$) survived (Fig. 2A). Luminescence quantification of the mice lung area revealed that the amount of light emitted was not different within the first 4 hours post infection but became significantly lower in the bacteriophage-treated mice as early as 6 hours post infection (i.e., 4 hr after the beginning of treatment; 5.0×10^3 [1.5×10^3 ; 6.7×10^3] vs 2.0×10^4 [1.6×10^4 ; 3.1×10^4] photon/s/cm²/steradian; $p < 0.005$) (Fig. 3A).

Microbiological and Cytological Analysis of Lung Homogenates and BAL Fluids

In a second set of two independent experiments, we quantified levels of bacteria, bacteriophages, cytokines, and cell markers in both PBS and bacteriophage-treated mice at 6 and 16 hours after initiating lung infection (Table 1). Bacterial counts were lower in the 536_P1-treated group than in the control group, reaching a difference greater than 2 Log₁₀. Given that bacteriophages cannot increase without bacterial lysis, bacteriophage counts were also in agreement with these data, and we observed an increase of the viral population of 1.1 Log₁₀ between 6 and 16 hours post infection.

In addition, the proportion of polymorphonuclears and the level of chemokine KC (C-X-C motif ligand [CXCL]-1) were reduced in the bacteriophage-treated group 16 hours post infection (Table 1). We also observed that BAL fluids from 536_P1-treated mice contained very few images of engulfed bacteria within polymorphonuclears or monocyte-macrophages compared with control mice (Table 1; see also representative pictures in supplemental data, pages 5–7, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>).

Total protein counts did not differ between treated and control mice. There was a trend toward lower levels of lactate dehydrogenase in the 536_P1-treated group ($p = 0.10$).

Comparison of *E. coli* 536-Lux Pneumonia Treatment With Either Bacteriophage 536_P1 or Ceftriaxone

In a third set of two independent experiments, all mice ($n = 28$) were challenged with a higher inoculum (4×10^7 CFU of *E. coli* 536-lux) leading to 100% lethal infection. Only treated mice were alive at day 3 and exhibited a greater weight

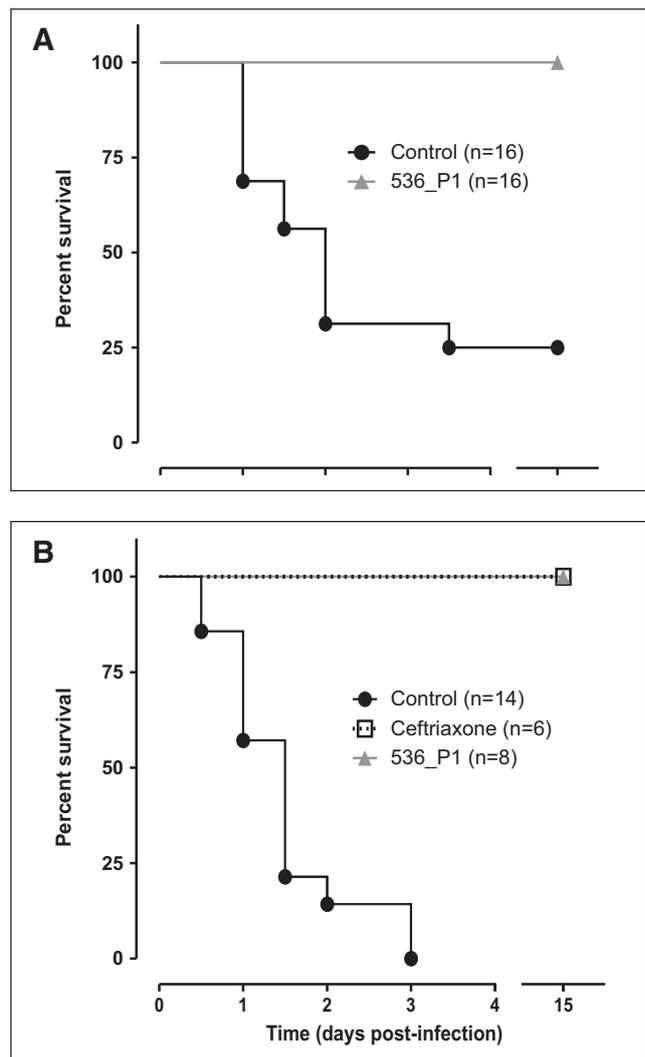


Figure 2. Effect of bacteriophage treatment on survival of *Escherichia coli*-infected mice. **A**, Survival of mice infected with 1×10^7 CFU of strain 536-lux ($n = 32$) and treated with bacteriophage 536_P1 ($n = 16$, gray line and triangle) at a multiplicity of infection of 0.3 ($n = 8$) or 3 ($n = 8$). Control mice ($n = 16$, black line and dots) received phosphate-buffered saline (PBS). **B**, Survival of mice infected with 4×10^7 CFU of strain 536-lux ($n = 28$) and treated with either bacteriophage 536_P1 at a multiplicity of infection of 3 ($n = 8$, gray line and triangle) or ceftriaxone ($n = 6$, dotted line and square). Control mice ($n = 14$, black line and dots) received normal saline intraperitoneally and either intranasal PBS ($n = 10$) or heat-inactivated 536_P1 ($n = 4$).

loss ($-18.5\% \pm 0.8\%$; $p < 0.001$) than during the set of experiment performed with a 1×10^7 CFU inoculum. Despite this, they presented the same recovery pattern (supplemental digital content, SDC page 5, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>). Mortality at day 3 was 100% in the control group ($n = 14$) (Fig. 2B). Survival was 100% in both bacteriophage-treated mice ($n = 8$, MOI of 3) and ceftriaxone-treated mice ($n = 6$). Within the first 48 hours post infection, quantification of light emitted from lungs revealed that bacteriophage 536_P1 and ceftriaxone-treated groups led to an identical decrease of the signal, whether it be in terms of kinetic (slope) or raw values (Fig. 3B).

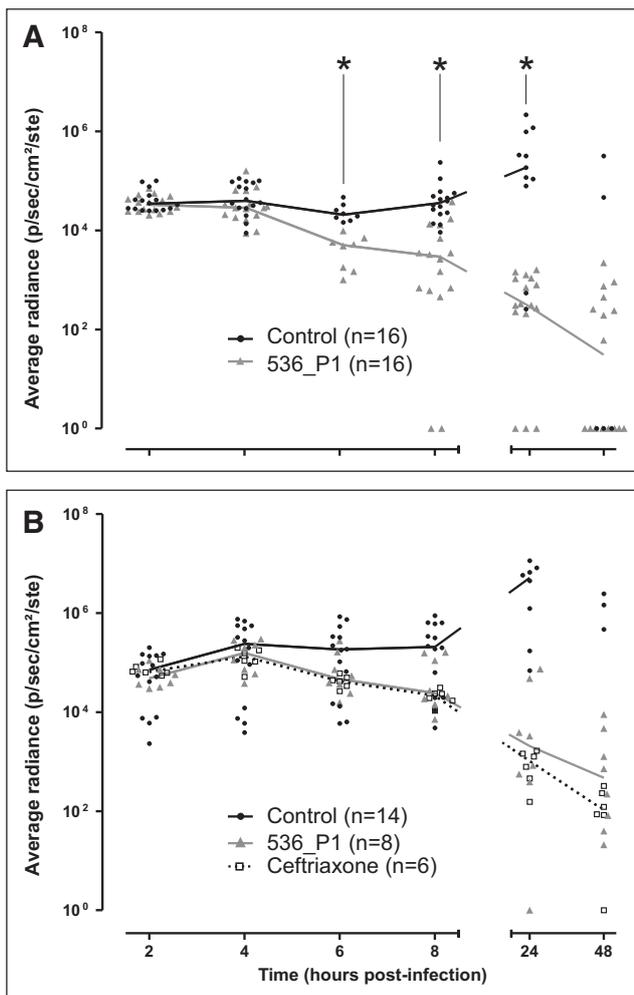


Figure 3. Light quantification over time from the chest area of infected mice. **A**, Light emitted from mice infected with 1×10^7 CFU of strain 536-lux ($n = 32$) and treated with bacteriophage 536_P1 ($n = 16$, gray line and triangles) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.3 ($n = 8$) or 3 ($n = 8$). Control mice ($n = 16$, black line and dots) received phosphate-buffered saline (PBS). * $p < 0.05$ between the two groups. NB: Due to a temporary anesthetic system failure during one of the two independent experiments, the number of points recorded at 6 hr after infection is reduced. **B**, Light emitted from mice infected with 4×10^7 CFU of strain 536-lux ($n = 28$) treated with either bacteriophage 536_P1 at a MOI of 3 ($n = 8$, gray line and triangles) or ceftriaxone ($n = 6$, dotted lines and squares). Control mice ($n = 14$, black line and dots) received normal saline intraperitoneally and either intranasal PBS ($n = 10$) or heat-inactivated 536_P1 ($n = 4$). For A and B, each point (dots, square, and triangles) represents the amount of light emitted from individual mice in logarithmic (10) unit. Median value for each group is represented by a line (the latter is not shown for control group at 48 hr post infection as the number of surviving mice was too small to be representative).

In Vitro Adaptation of Bacteriophages 536_P7 Is Required to Reach Efficient Pneumonia Treatment

Next, we searched for an *E. coli* VAP strain displaying equivalent characteristic to the archetypal strain 536 and identified strain PDP302 from our collection (9). In vitro, this clinical strain was as efficiently infected by bacteriophage 536_P7 as strain 536 (EOP of 1; *Material and Methods* section) (supplemental digital content, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>). Once infected with PDP302 (1.5×10^7

CFU), untreated mice (PBS, $n = 9$) and those treated with bacteriophage 536_P7 ($n = 10$, MOI of 10) displayed, respectively, 88% and 80% mortality rate (two independent experiments). We then hypothesized that serial in vitro passages of 536_P7 bacteriophage on strain PDP302 could improve its in vivo infectivity toward this strain.

Treatment with 536_P7_PDP302, the resulting adapted bacteriophage isolated after five serial passages (*Material and Methods* section), was associated with a significant increase in survival (75%, $p = 0.001$, $n = 8$, MOI of 10) (Fig. 4). Although agar plate assays were not able to differentiate 536_P7 and 536_P7_PDP302 bacteriophages (no gain in EOP), the in vivo improvement observed was in agreement with data obtained from lysis kinetics assays (Fig. 5; supplemental digital content, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/CCM/B242>). Indeed, with 536_P7_PDP302, the optical density reached 0.085 in 90 minutes before lysis occurred, whereas it reached 0.162 in 105 minutes with 536_P7.

DISCUSSION

In this study, we showed for the first time that experimental *E. coli* pneumonia was efficiently treated by bacteriophages. Its main results can be summarized as follows: 1) bacteriophage treatment enabled 100% survival of mice lethally infected with highly virulent extraintestinal *E. coli* strain 536; 2) it was associated with a significant decrease in lung inflammation; 3) it appeared to be as effective as ceftriaxone antibiotic treatment reaching 100% survival; 4) it decreased bacterial load in the lungs in a comparable manner as ceftriaxone treatment; and 5) in vivo bacteriophages efficacy could be rapidly enhanced by in vitro adaptation toward the targeted strain.

In this study, we focused on *E. coli* for the following reasons: 1) oropharyngeal colonization with *Enterobacteriaceae* has been long known as the first step toward Gram-negative bacteria VAP (30, 31); 2) recent data suggest that *Enterobacteriaceae* (including *E. coli*) are increasingly responsible for VAP, ahead of *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* (8, 32); and 3) *Enterobacteriaceae* in general and *E. coli* in particular represent the major threat in terms of antimicrobial resistance, including VAP (33). We recently reported that *E. coli* strains infecting ICU patients closely resembled the highly virulent archetypal ExPEC strain 536 in terms of phylogenetic grouping, virulence factors, genes content, and in vivo virulence (9, 10). To complete this proof of concept study, we reasoned it was necessary to also assess the efficacy of bacteriophage on strain PDP302, a clinical strain responsible for a VAP in an ICU patient. Strain PDP302 was one of the infrequent strain (10 tested) to be pathogenic for mice in our lung infection model, and interestingly, this strain turned out to share the same sequence type (ST127) as strain 536 (i.e., same clonal complex, ST127 being one of the most prominent sequence type within ExPEC). This observation fully illustrates the correlation that exists between sequence type and pathogenicity (34).

The observed therapeutic effect was due to rapid bacterial clearance, as suggested by the rapid decrease in bioluminescence signal in the lungs (Fig. 3) and confirmed by direct

TABLE 1. Bacterial and Bacteriophage Counts on Lung Homogenates and Data Obtained From Bronchoalveolar Lavage Fluids

Variable	Uninfected Animals	2 Hr Post Infection (Without Treatment)	6 Hr Post Infection		16 Hr Post Infection	
			PBS (Control)	536_P1 (Treatment)	PBS (Control)	536_P1 (Treatment)
Bacterial count (lung homogenate, CFU/g)	NA	1.0 × 10 ⁸ [4.5 × 10 ⁷ ; 1.6 × 10 ⁸]	8.3 × 10 ⁶ [5.2 × 10 ⁶ ; 1.0 × 10 ⁷]	4.3 × 10 ⁵ [2.0 × 10 ⁵ ; 1.3 × 10 ⁶] ^a	4.8 × 10 ⁸ [2.1 × 10 ⁸ ; 5.5 × 10 ⁸]	2.4 × 10 ⁶ [2.1 × 10 ⁵ ; 1.8 × 10 ⁷] ^a
Bacteriophage count (lung homogenate, PFU/g)	NA	NA	0	8.8 × 10 ⁸ [2.6 × 10 ⁸ ; 1.4 × 10 ⁹]	0	1.1 × 10 ¹⁰ [2.5 × 10 ⁹ ; 1.5 × 10 ¹⁰] ^b
Bronchoalveolar lavage fluid analysis						
Total nucleated cell count (cells/mL)	1.3 × 10 ⁶ ± 2.3 × 10 ⁵	NA	3.1 × 10 ⁶ (± 9.7 × 10 ⁵)	3.9 × 10 ⁶ (± 9.4 × 10 ⁵)	1.0 × 10 ⁷ (± 2.3 × 10 ⁶)	1.0 × 10 ⁷ (± 4.5 × 10 ⁶) ^b
Ratio of polymorphonuclears/ monocyte-macrophages (%)	4.2/95.8 (± 1.5)	NA	93.2/6.8 (± 2.7)	92.2/7.8 (± 4.2)	96.8/3.2 (± 1.8)	91.8/8.2 (± 4.8) ^a
Percentage of phagocytes with engulfed bacteria (%)	NA	NA	NA	NA	26.6 (± 6.8)	0.6 (± 0.2) ^a
Total protein (µg/mL)	74 (± 6)	NA	140 (± 59)	208 (± 44)	320 (± 62)	304 (± 76) ^b
LDH activity (fold change compared with noninfected condition)	1	NA	1.3 (± 0.3)	1.3 (± 0.2)	3.9 (± 0.7)	3.1 (± 0.6) ^b
KC/CXCL-1 (pg/mL)	24 (± 12)	NA	14,816 (± 3,720)	17,729 (± 2,531)	14,927 (± 1,044)	3,487 (± 1,264) ^a

PBS = phosphate-buffered saline, CFU = colony-forming unit, NA = not applicable or not assessed, PFU = plaque-forming unit.

^a*p* < 0.05 for intergroup comparison at the same time point.

^b*p* < 0.05 when comparing both control and treated group at time 6 versus 16 hr post infection.

Data displayed are median [25th; 75th percentile] or mean (± sd). Four mice per condition and per time point. Infection with 1.10 × 10⁷ CFU of 536, treatment with 536_P1 (multiplicity of infection of 10).

bacterial count 6 hours post infection. Next, we compared, for the first time in such model, efficacy of bacteriophage treatment to conventional antibiotherapy. Both treatments displayed striking resemblance in terms of kinetics (Fig. 3B) and both rescued 100% of lethally infected animals. In this regard, it should also be noted that we deliberately used a high-dose ceftriaxone treatment (100 mg/kg/d with repeated administrations), a molecule to which *E. coli* 536 is highly sensitive (minimum inhibitory concentration < 0.03 mg/L) to ensure maximum efficacy of the antimicrobial treatment and to avoid any bias in favor of the bacteriophage-treated group. We also observed that 16 hours after infection, bacteriophage-treated mice displayed less lung inflammation compared with untreated mice based on KC (CXCL-1) cytokine level. These data corroborated with cytological observations since phagocytic cells present in BAL fluids were virtually free of intracellular bacteria in bacteriophage-treated mice. We also found an increased number of monocytes-macrophages in BAL fluids of bacteriophage-treated mice 16 hours post infection (that we interpreted as the beginning of a resolution phase), but we did not perform phenotype analysis to check the precise part of resident cells (i.e., alveolar macrophages) and recruited ones (i.e., monocytes). Indeed, the latter could promote specific changes in local inflammatory balance (35). However, in our case, given the minimal increase observed,

even if statistically significant, the physiological relevance could be weak at this time point.

In this study, we observed in vitro/in vivo bacteriophages efficacy discrepancies. These disparities that have been described a long time ago with antibiotics (36) have also, although more recently, been reported with bacteriophages (37, 38). However, in striking contrast to antibiotic optimization that requires months if not years of research, bacteriophages can evolve very quickly (hours to days) enabling them to eventually adapt to a given targeted bacteria. We clearly show that this adaptation can lead to a considerable gain in efficacy, as mortality decreased from 80% to 25% when using an adapted bacteriophage. The adaptation procedure used was based on evolution of population where the most efficient bacteriophages are favored. After each passage, during which 536_P7 bacteriophage was infecting strain PDP302, a fraction of the evolved viral population was submitted to the next round. After five rounds, bacteriophages from a plaque-forming unit were amplified and purified to establish the adapted 536_P7_PDP302 bacteriophage population.

Previous studies focusing on bacteria-bacteriophages interactions have already described several mechanisms by which bacteriophages may improve their infectivity. These

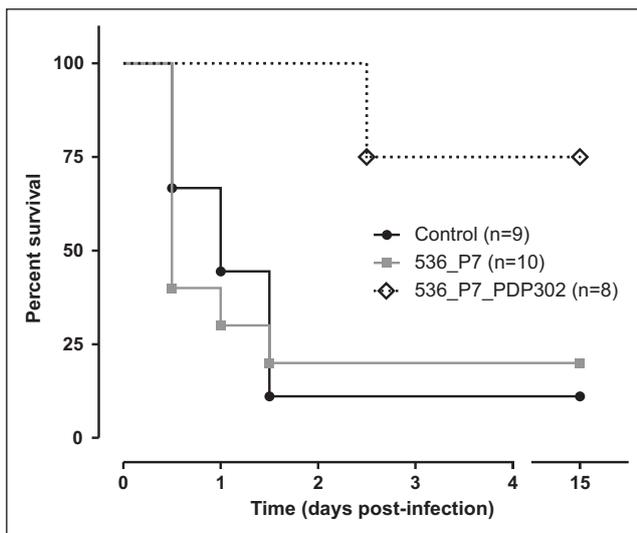


Figure 4. Bacteriophage adaptation improves mice survival. Survival of mice infected with strain PDP302 (1.5×10^7 CFU; $n = 27$) and treated with either bacteriophage 536_P7 ($n = 10$, gray line and squares) or bacteriophage 536_P7_PDP302 ($n = 8$, black dotted line and diamonds), both at multiplicity of infection of 10. Control mice ($n = 9$) received phosphate-buffered saline (black line and dots).

include increase in adsorption capability achieved by receptor variation (39–42), increase in number of released viruses (43), shortening of latent period, and improvement of

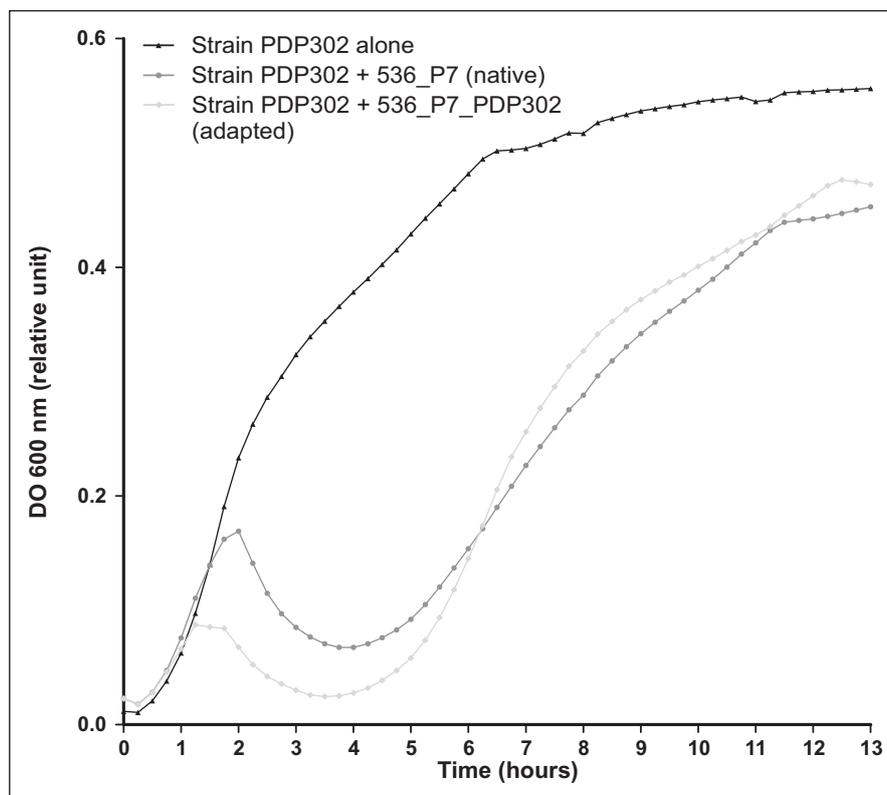


Figure 5. In vitro lysis kinetics of native and adapted bacteriophages on clinical strain PDP302. Strain PDP302 was incubated at 37°C in LB broth without (triangles) or with bacteriophages at multiplicity of infection of 0.01 (536_P7, black dots; 536_P7_PDP302, diamonds), and OD_{600nm} was recorded during 12 hr.

resistance to bacterial defense against virus invasion using anti-clustered regularly interspaced short palindromic repeats system (44, 45). It should also be noted that the adaptation procedure performed in vitro is not an absolute guarantee to drive the selection of a bacteriophage variant toward in vivo improved efficacy (37).

This study has some potential limitations. First, one could argue that treatment with bacteriophages was administered shortly after bacterial challenge (2 hr). This delay is within the same order of magnitude than that of other models of acute infection with different pathogens (mainly *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Klebsiella pneumoniae*), varying between 1 and 4 hours (46–49). This takes into account the fact that, contrary to the clinical scenario, pneumonia develops within hours of a large and single bacterial inoculation, as demonstrated by the kinetic of the bioluminescence signal. We, however, cannot rule out that a delayed treatment (bacteriophage and antibiotic based) could be less efficient.

Second, some could question the applicability of phage therapy to the ICU because of time constraints to obtain a specific bacteriophage against the identified bacteria. There are in fact two arguments that on the contrary support the use of bacteriophages in ICU: 1) based on the epidemiological surveillance of clinical strains sampled over the years in hospitals, it is possible to elaborate cocktails of several ready-to-use bacteriophages, thereby extending host spectrum (50), and 2) most importantly, because oropharyngeal colonization precedes nosocomial pneumonia (51), it will be possible right from the beginning to select bacteriophages against the bacteria (eventually including an adaptation step as described in our study) and have the treatment available when the infection occurs. Finally, administering bacteriophages once colonization is detected may be a means to prevent secondary infection.

Third, caution is required regarding the extrapolation of our experimental results to the clinical setting of mechanical ventilation. Obviously, they serve as a proof of concept and whether similar results will be obtained in mechanically ventilated lungs, within pre-existing inflammation and possible injury, will need to be addressed in future studies.

Finally, a possible toxicity related to bacteriophage therapy can be questioned. First of all, it is important to recall that bacteriophages are not foreign to the human being, since we harbor a vast amount of bacteriophages, mainly in our intestinal tract and mucous membranes (52). We also eat and drink each day thousands of bacteriophages

without experiencing any trouble (53). Second, contrary to viruses used in viral gene therapy, bacteriophages are unable to penetrate eukaryotic cells. Third, from an immunological point of view, bacteriophages do not elicit a significant acute inflammatory response in mammals as shown by several studies on both purified structural proteins and entire virions (17, 54). In our work, we observed a nonsignificant increase in BAL fluid total proteins in bacteriophage-treated mice compared with control mice 6 hours post infection (208 and 140 µg/mL, respectively). Importantly, this difference was not confirmed at H16 (304 and 320 µg/mL, respectively) while the amount of bacteriophages increased (Table 1). We therefore believe that these nonsignificant differences reflect sampling fluctuation rather than differences in lung permeability (in addition, LDH activity is identical in both group at H6 and tends to be weaker in bacteriophage-treated mice at H16).

This absence of acute immunological response should be distinguished from the long-lasting humoral immunity where, conversely, bacteriophages have been shown to be able to induce specific antibodies production (55). Although not harmful for the host, these antibodies could be problematic if a repeated administration of the bacteriophage is planned because these antibodies could be neutralizing.

Many reviews have listed pros and cons of phage therapy (56), which is beyond the scope of this work. We can, however, mention that bacteriophages reported here fit well into a consensus, which indicates that all candidate bacteriophages should be sequenced (in order to discard those which carry putative unwelcome genes, mainly toxins and antibiotic-resistance genes) and when possible, the most infective bacteriophages (based on in vitro assessment) should be chosen.

Facing growing bacterial resistance to antibiotics, urgent measures need to be taken both to spare antibiotics and to investigate new therapeutic strategies. Among putative solutions, use of bacteriophages is the only one to have been widely used in the past in humans (57). Regarding lung infection, bacteriophage treatment of experimental *P. aeruginosa* pneumonia with strains isolated in cystic fibrosis patients or *Klebsiella* infection also proven to be effective (18, 20, 37, 58, 59). For all of the above reasons and because patients in the ICU are among the most exposed to the threat of resistant pathogens (and therefore under close bacterial surveillance), the ICU setting seems to be particularly appropriate for phage therapy to fight bacterial infections. This is in agreement with recent calls to promote the use of phage therapy to overcome antibioresistance, to limit antibiotic selective pressure, and to protect natural commensals (14–16). Our results provide then the first evidence that bacteriophage therapy could be part of the nosocomial pneumonia treatment.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr. James Kaper (University of Maryland School of Medicine, Baltimore) for the gift of pCM17 and Jonathan Messika for the PDP302 strain. We thank Marie-Anne Nicola (Imagopole, Institut Pasteur) for her technical assistance and all members of the animal housing facility for their help in mice management. We also express our gratefulness to Chantal Archambeau and Estelle Atse for logistics support and media preparation.

REFERENCES

- World Health Organization: The 10 leading causes of death by broad income group. 2008. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html>. Accessed March 15, 2014
- Fagon JY, Chastre J, Hance AJ, et al: Nosocomial pneumonia in ventilated patients: A cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med* 1993; 94:281–288
- Heyland DK, Cook DJ, Griffith L, et al: The attributable morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critically ill patient. The Canadian Critical Trials Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1249–1256
- Kollef MH: Ventilator-associated pneumonia. A multivariate analysis. *JAMA* 1993; 270:1965–1970
- Torres A, Aznar R, Gatell JM, et al: Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:523–528
- Center for Disease Control: Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>. Accessed March 15, 2014
- Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al; EPIC II Group of Investigators: International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 2009; 302:2323–2329
- Hamet M, Pavon A, Dalle F, et al: *Candida* spp. airway colonization could promote antibiotic-resistant bacteria selection in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2012; 38:1272–1279
- Messika J, Magdoud F, Clermont O, et al: Pathophysiology of *Escherichia coli* ventilator-associated pneumonia: Implication of highly virulent extraintestinal pathogenic strains. *Intensive Care Med* 2012; 38:2007–2016
- Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, et al: How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:12879–12884
- Lynch JP 3rd, Clark NM, Zhanel GG: Evolution of antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae (focus on extended spectrum β-lactamases and carbapenemases). *Expert Opin Pharmacother* 2013; 14:199–210
- Ricard JD: New therapies for pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 2012; 18:181–186
- Roux D, Ricard JD: Novel therapies for *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Disord Drug Targets* 2011; 11:389–394
- Fauci AS, Marston HD: The perpetual challenge of antimicrobial resistance. *JAMA* 2014; 311:1853–1854
- Brüssow H: What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology* 2012; 434:138–142
- Matsuzaki S, Uchiyama J, Takemura-Uchiyama I, et al: Perspective: The age of the phage. *Nature* 2014; 509:S9
- Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, et al: Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J Infect Dis* 2010; 201:264–271
- Chhibber S, Kaur S, Kumari S: Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. *J Med Microbiol* 2008; 57:1508–1513
- Chhibber S, Kaur T, Sandeep Kaur: Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: Effective treatment in eliminating methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from diabetic foot infections. *PLoS One* 2013; 8:e56022
- Debarbieux L, Leduc D, Maura D, et al: Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis* 2010; 201:1096–1104
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E: Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:4555–4558
- Morin CE, Kaper JB: Use of stabilized luciferase-expressing plasmids to examine in vivo-induced promoters in the *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 57:69–79
- Rhee KJ, Cheng H, Harris A, et al: Determination of spatial and temporal colonization of enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* in mice using bioluminescent in vivo imaging. *Gut Microbes* 2011; 2:34–41

24. Van Twest R, Kropinski AM: Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol Biol* 2009; 501:15–21
25. d'Herelle F: Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C R Acad Sci Paris* 1917; 165:373–375
26. Boulanger P: Purification of bacteriophages and SDS-PAGE analysis of phage structural proteins from ghost particles. *Methods Mol Biol* 2009; 502:227–238
27. Pickard DJ: Preparation of bacteriophage lysates and pure DNA. *Methods Mol Biol* 2009; 502:3–9
28. Tsonos J, Adriaenssens EM, Klumpp J, et al: Complete genome sequence of the novel *Escherichia coli* phage phAPEC8. *J Virol* 2012; 86:13117–13118
29. Kwiatkowski B, Boschek B, Thiele H, et al: Substrate specificity of two bacteriophage-associated endo-N-acetylneuraminidases. *J Virol* 1983; 45:367–374
30. Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP: Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. *N Engl J Med* 1969; 281:1137–1140
31. Johanson WG Jr, Pierce AK, Sanford JP, et al: Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med* 1972; 77:701–706
32. Ricard JD, Roux D: Candida colonization in ventilated ICU patients: No longer a bystander! *Intensive Care Med* 2012; 38:1243–1245
33. Ho WS, Gan HM, Yap KP, et al: Genome sequence of multidrug-resistant *Escherichia coli* EC302/04, isolated from a human tracheal aspirate. *J Bacteriol* 2012; 194:6691–6692
34. Köhler CD, Dobrindt U: What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol* 2011; 301:642–647
35. Herold S, Tabar TS, Janssen H, et al: Exudate macrophages attenuate lung injury by the release of IL-1 receptor antagonist in gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183:1380–1390
36. Greenwood D: In vitro veritas? Antimicrobial susceptibility tests and their clinical relevance. *J Infect Dis* 1981; 144:380–385
37. Henry M, Lavigne R, Debarbieux L: Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:5961–5968
38. Bull JJ, Otto G, Molineux IJ: In vivo growth rates are poorly correlated with phage therapy success in a mouse infection model. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:949–954
39. Duplessis M, Lévesque CM, Moineau S: Characterization of *Streptococcus thermophilus* host range phage mutants. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72:3036–3041
40. Qimron U, Marintcheva B, Tabor S, et al: Genomewide screens for *Escherichia coli* genes affecting growth of T7 bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:19039–19044
41. Ravin V, Räisänen L, Alatossava T: A conserved C-terminal region in Gp71 of the small isometric-head phage LL-H and ORF474 of the prolate-head phage JCL1032 is implicated in specificity of adsorption of phage to its host, *Lactobacillus delbrueckii*. *J Bacteriol* 2002; 184:2455–2459
42. Uchiyama J, Takemura I, Satoh M, et al: Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage ΦEF24C with a spontaneous point mutation. *PLoS One* 2011; 6:e26648
43. Nguyen HM, Kang C: Lysis delay and burst shrinkage of coliphage T7 by deletion of terminator T_φ reversed by deletion of early genes. *J Virol* 2014; 88:2107–2115
44. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, et al: Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 2013; 493:429–432
45. Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, et al: A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 2013; 494:489–491
46. Sauve C, Azoulay-Dupuis E, Moine P, et al: Efficacies of cefotaxime and ceftriaxone in a mouse model of pneumonia induced by two penicillin- and cephalosporin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2829–2834
47. Dominguez-Herrera J, Velasco C, Docobo-Pérez F, et al: Impact of qnrA1, qnrB1 and qnrS1 on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by *Escherichia coli* with or without the GyrA mutation Ser83Leu. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:1609–1615
48. Docobo-Pérez F, Nordmann P, Dominguez-Herrera J, et al: Efficacies of colistin and tigecycline in mice with experimental pneumonia due to NDM-1-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:251–254
49. Knudsen JD, Fuursted K, Frimodt-Møller N, et al: Comparison of the effect of cefepime with four cephalosporins against pneumococci with various susceptibilities to penicillin, in vitro and in the mouse peritonitis model. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:679–686
50. Chan BK, Abedon ST: Phage therapy pharmacology phage cocktails. *Adv Appl Microbiol* 2012; 78:1–23
51. Craven DE, Steger KA: Epidemiology of nosocomial pneumonia. New perspectives on an old disease. *Chest* 1995; 108:1S–16S
52. Letarov A, Kulikov E: The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J Appl Microbiol* 2009; 107:1–13
53. Méndez J, Audicana A, Cancer M, et al: Assessment of drinking water quality using indicator bacteria and bacteriophages. *J Water Health* 2004; 2:201–214
54. Miernikiewicz P, Dąbrowska K, Piotrowicz A, et al: T4 phage and its head surface proteins do not stimulate inflammatory mediator production. *PLoS One* 2013; 8:e71036
55. Dąbrowska K, Miernikiewicz P, Piotrowicz A, et al: Immunogenicity studies of proteins forming the T4 phage head surface. *J Virol* 2014; 88:12551–12557
56. Loc-Carrillo C, Abedon ST: Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011; 1:111–114
57. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, et al: Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011; 1:66–85
58. Morello E, Saussereau E, Maura D, et al: Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: First steps towards treatment and prevention. *PLoS One* 2011; 6:e16963
59. Alemayehu D, Casey PG, McAuliffe O, et al: Bacteriophages φMR299-2 and φNH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio* 2012; 3:e00029–e00012

Résumé

D'année en année, la multi-résistance bactérienne aux antibiotiques gagne du terrain. Véritable problème de santé publique, elle est particulièrement prégnante au cours des infections nosocomiales. Parmi les alternatives aux antibiotiques, l'utilisation thérapeutique des bactériophages apparaît comme crédible et est actuellement en pleine réévaluation dans les pays occidentaux.

Ce travail se propose d'étudier la faisabilité d'une approche thérapeutique par les bactériophages pour la prise en charge d'une infection nosocomiale grave et fréquente dans le contexte de la réanimation : la pneumonie acquise sous ventilation mécanique. Nous avons centré notre attention sur un des pathogènes couramment rencontré dans ce type d'infection respiratoire et particulièrement investi par le problème de l'antibiorésistance : *Escherichia coli*.

A partir d'une large collection multicentrique de souches isolées des voies aériennes de patients sous ventilation mécanique, nous avons ainsi montré qu'il n'existait pas d'obstacle pratique à l'isolement d'une collection de bactériophages capable de cibler un large éventail de souches. En étudiant la meilleure combinaison de spectre d'hôte, l'utilisation de 5 bactériophages permettait une couverture de 70 %. Nous avons ensuite démontré expérimentalement l'activité thérapeutique de deux bactériophages dans un modèle murin de pneumonie létale, permettant ainsi une survie de 100 %. Grâce à l'outil de bioluminescence nous avons pu observer que la cinétique de décroissance de l'inoculum bactérien provoqué par un bactériophage était identique à celle obtenue avec un antibiotique de référence. Enfin, nous nous sommes focalisés sur LM33-P1, un bactériophage hautement spécialisé car n'infectant que les souches O25b, un sérotype particulièrement problématique en termes d'antibiorésistance et de pathogénicité. LM33-P1, dont la spécificité est apparue dépendante d'une interaction avec le LPS, s'est montré capable de lyser 74 % des souches O25b testées et s'est avéré également efficace *in vivo*.

Ces travaux apportent de nouvelles connaissances permettant d'envisager de façon crédible le développement de la phagothérapie pour le traitement des infections respiratoires à *E. coli* dans le cadre de la ventilation mécanique, mais pas exclusivement. Compte tenu de la physiopathologie de ce type d'infection, une prise en charge prophylactique apparaît également prometteuse.

Year after year, multi-drug resistant bacteria expand over the world. As a real public health concern, bacterial resistance is particularly significant within healthcare-associated infections. Among alternative therapy to antibiotics, phage therapy appears as one of the most promising approach and is now reappraised in western countries.

This work is dedicated to a feasibility approach in order to evaluate phage therapy potential in the most frequent and severe complication in the intensive care unit context: the ventilator-associated pneumonia. We focused on a commonly involved bacterium which is also highly affected by antibiotic resistance: *Escherichia coli*.

Starting from a large multicenter collection of strains isolated from airways of mechanically ventilated patients, we showed that there was no practical impediment to get a bacteriophage collection able to target efficiently a large range of strains. By selecting the best host range combination, we observed that 5 bacteriophages were able to cover 70% of the collection. We then experimentally demonstrated that two bacteriophages were able to rescue deadly infected mice in a murine pneumonia model. By using the bioluminescence imaging tool, we also observed that the kinetic of bacterial load decrease obtained with the bacteriophage treatment was as fast as the one obtained with a reference antibiotic. Finally, we concentrated on a highly specialized bacteriophage (LM33-P1) that turned out to be only able to infect O25b strains, a particularly worrisome serotype in terms of antibiotic resistance and pathogenicity. LM33-P1 was able to lyse 74% of O25b strains and its specificity was shown to be LPS-dependent. We also demonstrated that this bacteriophage was biologically active *in vivo*.

These results provide new knowledge allowing the consideration of phage therapy development in the field of respiratory infections due to *E. coli*, in the context of mechanical ventilation but not only. Given the pathophysiology of such infection, a preventive approach seems promising.