



HAL
open science

Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique

Christiane You Essoh

► **To cite this version:**

Christiane You Essoh. Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI; Université de Cocody (Abidjan, Côte d'Ivoire; 1995-2012), 2013. Français. NNT: 2013PA112072 . tel-00962607

HAL Id: tel-00962607

<https://theses.hal.science/tel-00962607>

Submitted on 21 Mar 2014

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.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI

THESE EN COTUTELLE INTERNATIONALE

École doctorale Gènes Génomes Cellules (GGC)

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

Présentée par

Christiane You ESSOH

Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique.

Soutenue le 30 mai 2013 devant la commission d'examen :

M. Jean Didier CAVALLO

Rapporteur

M. Laurent DEBARBIEUX

Rapporteur

Mme Marie-Agnès PETIT

Examineur

M. Michael DUBOW

Examineur

M. Guillaume Yao LOUKOU

Examineur

Mme Christine POURCEL

Directeur de Thèse

M. Simon-Pierre NGUETTA

Co-Directeur de Thèse

Remerciements

J'adresse d'emblée ma profonde gratitude à tous les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail, en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs orientations et propositions.

Je tiens aussi à exprimer mes plus sincères remerciements à Monsieur Gilles VERGNAUD, Directeur de l'équipe GPMS pour m'avoir permis de réaliser ce projet dans les meilleures conditions.

Un immense merci à Madame Christine POURCEL, Directeur de thèse pour sa justesse de vue dans la meilleure orientation de ce travail, pour sa confiance et ses précieux conseils qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pu être mené à bon port.

Mes vifs remerciements vont également à l'endroit des membres du comité de thèse en particulier à Madame Anick JACQ pour l'intérêt qu'elle a porté à mon projet de recherche et pour ses précieuses remarques constructives dans l'aboutissement de ce travail.

Que le Pr Guillaume LOUKOU trouve dans ces lignes un vibrant hommage à sa haute personnalité scientifique et toute ma gratitude pour m'avoir bien accueillie au Laboratoire National de Santé Publique (LNSP) et m'avoir ouvert les horizons du monde scientifique ivoirien, en m'accordant aussi les conditions nécessaires à la réalisation de ce travail au cours de mes deux séjours à Abidjan (Côte d'Ivoire).

Je tiens aussi à remercier vivement le Pr NGUETTA Simon-Pierre, co-Directeur de thèse pour avoir jeté les bases d'échanges entre les Universités Paris 11 et Félix HOUPHOUET-Boigny (FHB), avec une réactivité exemplaire malgré son agenda très chargé.

Je remercie le Docteur Jérôme LARCHÉ et Hoang VU-THIEN pour la mise à disposition de certaines souches cliniques que j'ai utilisées.

Mes remerciements vont également aux Docteurs NANGA, LATHRO, CABLAN, ADJI et YAO du LNSP pour leur contribution à ce travail.

Mes remerciements vont aussi aux Docteurs TONNY et OUASSA du CeDres pour leur accueil chaleureux, leur sympathie, leur esprit d'ouverture et leur rigueur professionnelle.

J'adresse vivement mes remerciements et ma gratitude à Philippe Le FLECHE, Yolande HAUCK, Yann BLOUIN, Christophe TOURTEREL et Libera LATINO pour les moments agréables passés ensemble dans la convivialité et les discussions enrichissantes que nous avons en partage autour de nos travaux respectifs et sur nos perspectives d'avenir.

J'exprime ma profonde gratitude à Athanase KRA, doctorant à LNSP pour m'avoir aidée à faire les prélèvements des eaux usées d'Abidjan.

Je n'oublie pas mes parents pour leur contribution, leur soutien moral et spirituel, leur patience et leur compréhension durant mes longues années d'études.

Je dédie spécialement ce travail à mon feu père Léon ESSOH qui aurait voulu faire avec une joie incommensurable la moisson de tant d'années d'éducation, d'instruction et de sacrifices consentis pour mon harmonieux épanouissement. Mais hélas ! La vie en a décidé autrement...

J'adresse mes plus sincères remerciements à tous mes proches et amis, pour leur soutien et encouragements indéfectibles au cours de cette thèse.

Enfin, je remercie l'association "Vaincre la Mucoviscidose" (VLM) et l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) qui m'ont fait confiance en m'apportant leur soutien financier, soutien sans lequel ce travail n'aurait pu être effectué.

Merci du fond du cœur à toutes et à tous.

Table des Matières

Remerciements.....	3
1. Introduction.....	15
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.1.1. Description.....	15
1.1.2. Épidémiologie moléculaire de <i>P. aeruginosa</i>	16
1.1.3. Structure de population.....	24
1.1.4. Infection chronique chez les patients mucoviscidosiques	25
1.1.5. Emergence de clones multirésistants aux antibiotiques.....	26
1.2. Les bactériophages	28
1.2.1. Historique des bactériophages	28
1.2.2. Caractéristiques morphologiques des phages	30
1.2.3. Origine	34
1.3. Impact des bactériophages sur la biosphère	36
1.3.1. Les communautés microbiennes.....	36
1.3.2. Impact sur la « fitness » du génome bactérien.....	39
1.4. Diversité des phages.....	41
1.4.1. L'observation de la diversité est limitée par les méthodes standard de culture	41
1.4.2. Diversité au niveau métagénomique.....	42
1.5. Génomique des bactériophages.....	43
1.5.1. Structure des génomes	43
1.5.2. Mécanisme d'évolution et mosaïcisme des phages tempérés.....	46
1.6. Les Bactériophages de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49

1.6.1.	Les myovirus.....	50
1.6.2.	Les Siphovirus	52
1.6.3.	Les Podovirus.....	54
1.7.	Mécanisme de résistance bactérienne : course aux armements.....	59
1.7.1.	Blocage de l'adsorption : rôle des récepteurs bactériens	59
1.7.2.	Systèmes de Restriction/ modification (R/M).....	61
1.7.3.	Système CRISPRs-Cas	63
1.8.	Applications des bactériophages	66
1.8.1.	Phagothérapie.....	66
1.8.2.	Avantages et inconvénients de la phagothérapie versus antibiothérapie	70
1.8.3.	Biocontrôle.....	74
2.	Résultat	79
2.1.	Positionnement et but du travail.....	79
2.2.	Article 1: The susceptibility of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates from cystic fibrosis patients to bacteriophages.....	83
2.3.	Article 2: Diversity of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacteriophages in Abidjan, Côte d'Ivoire.....	125
2.4.	Article 3: Phages against multidrug resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	159
3.	Discussion et perspectives	183
3.1.	Diversité des souches de <i>P. aeruginosa</i>	183
3.2.	Diversité des phages de <i>P. aeruginosa</i>	185
3.2.1.	Les phages dérivés du Pyophage	185
3.2.2.	Phages nouvellement isolés	188
3.3.	Phagothérapie : alternative efficace à l'antibiothérapie	196

3.3.1.	Spectre d'hôte des phages : notion du genre et d'espèce de phage	196
3.3.2.	Proposition d'un cocktail de phage thérapeutique pour un traitement efficace 197	
4.	Conclusion	203
5.	Matériel et méthodes.....	207
5.1.1.	Milieus de culture	207
5.1.2.	Souches bactériennes et phages	207
5.1.3.	Génotypage par la méthode MLVA.....	208
5.1.4.	Etude du système CRISPR.....	210
5.1.5.	Isolement des phages	210
5.1.6.	Préparation d'un stock de phages	212
5.1.7.	Purification de phage pour l'observation microscopique	213
5.1.8.	Isolement de prophages intégrés dans le génome bactérien	213
5.1.9.	Spectre d'hôte des phages.....	216
5.1.10.	Préparation rapide de l'ADN phagique.....	216
5.1.1.	Séquençage du génome complet des phages	217
5.1.2.	Clonage des fragments d'ADN et purification des clones.....	218
6.	Bibliographie.....	221
7.	Annexes.....	237

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A : Adénine	kpb : kilo paire de base
ADN : Acide désoxyribonucléique	MBL : métallo- β -lactamases à large spectre
AES : Advanced Expert System	MDR : Multidrug- Resistant
ARN : Acide ribonucléique	MLEE : Multilocus Enzyme Electrophoresis
BMR : bactérie multi-résistante	MLST : Multi Locus Sequence Type
BLSE : β -lactamases à spectre élargi	MLVA : Multiple-Locus Variable number tandem repeat
C : Cytosine	LES : Liverpool Epidemic Strain
Cas : CRISPR associated genes	LOS : Lipooligosaccharide
CASS : CRISPR associated system	LPS : Lipopolysaccharide
CC : Complexe Clonal	LUCA : Last Universal Common Ancestor
CF : Cystic Fibrosis	Ocr : Overcome classical restriction activity
cfr : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator	PAMs Protospacer Associated Motif
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats	pb : paire de base
DR : Direct repeats	PDR : Pandrug-Resistant
ESBL: Extended-Spectrum -betalactamase	PER : <i>Pseudomonas</i> Extended Resistance
ECP : Electrophorèse en Champ Pulsé	PFGE: Pulse Field Gel Electrophoresis
FDA : Food and Drug Administration	PFP : polyédriques, filamenteux, pléomorphe
GRA : Generally Recognized As Safe	R/M : Restriction / Modification
HMC : hydromethylcytosine	ST : sequence Type
ICTV : International committee on taxonomy of viruses	UV : Ultra Violet
ICU : intensive care unit	VNTR : Variable Number Tandem Repeats
PFU : Plaque Forming Unit	XDR : extensively Drug-Resistant
OD: Optical Density	RVB : Rapport Virus sur Bactérie
RFLP: restriction fragment length polymorphism	MOI : Mutiplicity of Infection
	PCR: Polymerase Chaim reaction
	RADP : Random Amplified Length Polymorphism

Avant propos

Depuis plus de deux décennies, d'aucuns présagent avec alarmisme « la fin de l'âge d'or des antibiotiques » en soulignant que « *Nous devons nous attaquer très sérieusement au problème posé par la résistance aux antibiotiques* » et que « *Si rien n'est entrepris, nous risquons à terme de revenir à l'ère pré-antibiotiques* ». Entre le pessimisme ou l'alarmisme, saurons nous trouver une alternative au « tout antibiotique » utilisés souvent sans respect de la posologie et avec des prescriptions mal contrôlées. Est-ce une menace qui plane sur la médecine moderne ? Peut-on imaginer la vie sans antibiotiques ? Qu'en était-il il y a 100 ans lorsque pneumonie et tuberculose étaient les causes les plus fréquentes de mortalité ? Les antibiotiques sont apparus comme un remède miraculeux. Aujourd'hui, cette panacée semble inopérante dans bien des cas thérapeutiques. On assiste à l'extension progressive d'une résistance microbienne. En même temps, aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'a été découverte au cours de ces 30 dernières années.

Ainsi, certaines souches bactériennes parviennent à éviter notre arsenal de molécules antimicrobiennes. Pour cette raison, il semble pertinent de réexaminer le potentiel des virus de bactéries ou bactériophages autrefois en usage dans les années 1920.

Cette approche remise au goût du jour a fait l'objet de ma préoccupation pour trois raisons :

- 1- Evaluer la capacité des phages à infecter les souches de phénotypes mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* issues des patients atteints de mucoviscidose, bactérie fréquemment associée à une mortalité élevée. Ce sujet est à l'honneur dans les médias locaux comme Paris Match dans son n° spécial de février 2013 intitulé « phagothérapie : des virus naturels pour tuer les infections ».
- 2- L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a attiré notre attention du fait de sa résistance phénoménale aux antibiotiques et du manque de vaccin pour prévenir les infections.
- 3- Faire un travail de précurseur sur les bactériophages pour une meilleure sensibilisation à cette approche du milieu scientifique africain.

J'espère que vous trouverez dans les lignes qui suivent la passion de découvrir et d'aller au fond de notre questionnement sur un sujet un peu hermétique, mais prometteur...

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*.

1.1.1. Description

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est une bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, dépourvue de capsule. Comme la plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. Par conséquent, elle peut être isolée en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteur, tel que le cétrimide. Elle est strictement aérobie et sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine.

L'espèce *P. aeruginosa* est ubiquitaire dans l'environnement et peut être commensale du tube digestif. Dans l'environnement, elle est trouvée dans le sol, dans l'eau, à la surface des plantes et des animaux. En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est parfois retrouvée dans les solutions aseptiques et sur les instruments tels que les cathéters, les sondes, ou encore dans les canalisations, les lavabos. Son extrême adaptabilité à différents environnements est probablement liée à la plasticité de son grand génome (environ 6Mpb) constitué d'une partie conservée qui représente jusqu'à 90% et d'une partie variable caractérisée par les échanges horizontaux de gènes. (Wolfgang, Kulasekara *et al.* 2003).

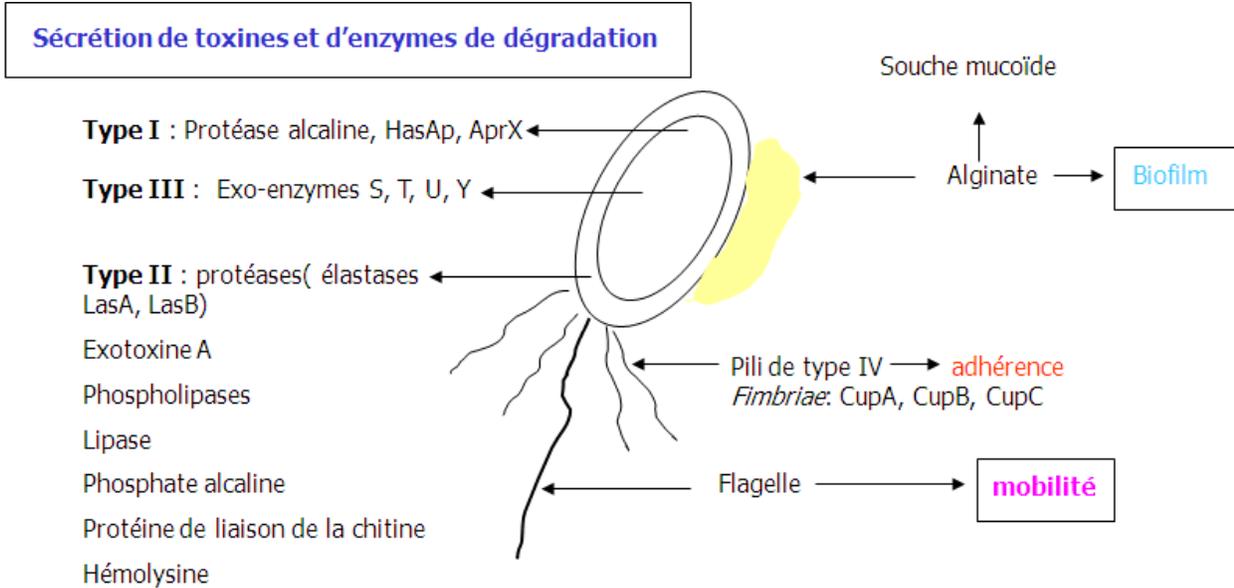


Figure 1 : Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

Pathogène opportuniste et responsable d'infections nosocomiales, *P. aeruginosa* peut causer des infections des voies urinaires, des voies respiratoires surtout chez les patients atteints de mucoviscidose, et des infections de plaies chez des brûlés. La pathogénicité de *P. aeruginosa* est conférée par l'interaction avec certaines structures de surface et par la sécrétion de nombreux facteurs de virulence (Figure 1).

L'expression de la virulence est souvent multifactorielle et combinatoire (Lee, Urbach *et al.* 2006). Les différentes souches de *P. aeruginosa* affichent une évolution similaire grâce à des interactions de gènes impliqués dans leur pathogénicité pouvant également conduire à la diversification de l'espèce.

1.1.2. Épidémiologie moléculaire de *P. aeruginosa*

1.1.2.1. Méthodes de génotypage de *P. aeruginosa*

Dans le but de comprendre le mode de dissémination des infections dans les communautés et les hôpitaux, mais également d'appréhender les changements évolutifs qui ont donné lieu à des avantages sélectifs, la distinction précise entre différents isolats d'une espèce est indispensable. Ceci peut être fait grâce aux techniques moléculaires de typage ou

génotypage. Cependant, un bon outil de génotypage doit être facile dans sa mise en œuvre (faisabilité), hautement discriminatoire, reproductible, et peu coûteux donc accessible à tous. Plusieurs techniques de génotypage sont disponibles pour *P. aeruginosa* et des études menant à leur comparaison ont été réalisées permettant d'identifier les plus informatives pour évaluer la diversité des souches cliniques et environnementales. Les avantages et inconvénients de ces méthodes sont présentés dans le tableau 1.

1.1.2.1.1. Méthode basée sur l'analyse des profils de restriction

Il s'agit de méthodes reposant sur l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments d'ADN générés par digestion enzymatique et mis en évidence à l'aide d'une sonde oligonucléotidique. Parmi ces techniques figure le RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) qui consiste à couper l'ADN génomique totale par des enzymes de restrictions. Les fragments digérés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et transférés sur membrane suivie d'une hybridation par une sonde. Le pouvoir discriminant de cette technique est variable et dépend du fragment d'ADN ciblé par la sonde (le gène *toxA* est généralement analysé chez *P. aeruginosa*). Les éléments mobiles constituent une des cibles de la technique. Développé dans les années 1980, le RFLP reste utilisé chez les espèces bactériennes comme *Yersinia pestis* et *Mycobacterium tuberculosis* en vue de déterminer le polymorphisme associé à des séquences d'insertion (IS) par exemple IS116 de *M. tuberculosis*. L'opéron contenant les gènes ribosomiques 16S-23S est souvent utilisé comme sonde et la méthode est appelée Ribotypage. En principe le ribotypage est approprié pour la différenciation des souches bactériennes ayant plusieurs opérons ribosomiaux. Il est d'une utilité limitée pour des souches possédant moins d'opérons comme *P. aeruginosa* (Hafiane et Ravaoarino 2008). Par ailleurs, l'automatisation du ribotypage par « Riboprinter » a amélioré la reproductibilité mais demeure très complexe dans la mise en œuvre.

Similaire au RFLP, le PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*) d'où électrophorèse en champ pulsé (ECP) est fondé sur l'analyse de fragments d'ADN de très grande taille issus de la

digestion enzymatique (macrorestriction). Il demeure la méthode de choix pour plusieurs bactéries dont *P. aeruginosa* mais est difficile à mettre en place et les résultats sont peu reproductibles.

1.1.2.1.2. Les méthodes basées sur l'analyse des produits d'amplification

Ces techniques possèdent d'une grande sensibilité et spécificité permettant d'analyser une faible quantité d'ADN. Simultanément proposé en 1990 par Williams et par Welsh, la technique RADP (*Random Amplified Length Polymorphism*) repose sur l'amplification aléatoire des portions du génome bactérien à partir d'amorce de courte séquence (9-10pb). Le polymorphisme résulte du nombre et la localisation des sites d'hybridation des amorces, variable par mutation ponctuelle. Cependant, le manque de reproductibilité et la standardisation ont occasionné la mise au point de technique analogue tel que rep-PCR qui utilise des amorces spécifiques ciblant des séquences conservées et répétitives dispersées dans le génome bactérien. Il existe plusieurs familles de séquences répétées dont les utilisées pour le typage rep-PCR sont REP, BOX et ERIC. Bien que rapide et facile dans la mise en œuvre avec un pouvoir discriminatoire satisfaisant, l'interprétation des profils d'amplification est limitée au sein d'un laboratoire.

Introduite en 1995 par de Vos et al, la technique AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) implique trois différentes étapes : une digestion enzymatique de l'ADN génomique et ligation d'adaptateurs aux fragments générés, une amplification sélective des fragments d'ADN suivie d'une migration sur gel d'agarose (Vos, Hogers *et al.* 1995). Cette technique révèle conjointement le polymorphisme des sites de restriction et d'hybridation d'amorces localisés au niveau des adaptateurs du site de restriction. Elle est très puissante, beaucoup plus robuste et reproductible mais l'AFLP demeure couteuse, fastidieuse et peu standardisée. En revanche, les méthodes émergentes à l'exemple du MLVA produisent des données aisément partageables via des bases de données en ligne.

La technique MLVA

Grâce au développement du séquençage du génome, la présence de structures génomiques caractérisées par une répétition en tandem de séquences nucléotidiques a été révélée chez presque toutes les espèces bactériennes pathogènes. Dans certains cas les séquences répétées localisées au niveau des régions codantes ou dans les régions intergéniques présentent un polymorphisme et dans d'autres cas semblent jouer un important rôle dans l'adaptation des bactéries à différents environnements (Vergnaud et Pourcel 2009).

L'analyse MLVA, Multiple Locus VNTR (*Variable Number of Tandem Repeat*) Analysis, repose sur l'étude par PCR du polymorphisme de séquences répétées en tandem. Le nombre de motifs répétés varie d'une souche à une autre. À l'instar du MLST, chaque souche est décrite par un code numérique définissant le nombre d'unités répétées des VNTRs analysés. Ces codes peuvent être facilement comparés entre laboratoires à travers des bases de données sur des sites web, tels que celui du laboratoire GPMS à Orsay.

Le typage de répétition en tandem est une technique facile dans sa mise en œuvre, d'un coût abordable, d'une reproductibilité parfaite entre laboratoires et d'un pouvoir discriminant élevé dans l'identification des souches génétiquement proches. Le MLVA est en développement constant et pourrait devenir la méthode de choix pour le génotypage de nombreux pathogènes. Chez *P. aeruginosa* les premières études de faisabilité ont été possibles grâce au séquençage du génome complet de la souche PAO1, et ont par la suite été améliorées avec la disponibilité du génome de la souche PA14 (Onteniente, Brisse *et al.* 2003 ; Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007).

Récemment, un protocole automatisé a été développé permettant d'amplifier 16 VNTRs en deux réactions PCR (Sobral, Mariani-Kurkdjian *et al.* 2012). L'analyse comparative avec la méthode de référence a révélé que le MLVA était parfois plus informatif que l'ECP.

1.1.2.1.3. Méthode basée sur l'hybridation par une sonde

Ces méthodes reposent principalement sur l'hybridation utilisant plusieurs sondes d'ADN spécifiques pouvant cibler simultanément différents marqueurs génétiques (sérotypage, gène de

virulence, gène de résistance etc.). La performance de ces méthodes est déterminée par le nombre et la sélection des sondes spécifiques appropriés. Elle est considérée comme une puce à ADN ou « *Array DNA* » lorsque le nombre de sonde utilisé est très élevé (parfois jusqu'à plusieurs milliers). Communément appelée « *DNA microarray* », la puce à ADN est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. Son fonctionnement repose sur le même principe que des technologies telles que le Southern blot ou le northern blot, utilisées pour détecter et quantifier la présence d'une séquence nucléique spécifique au sein d'un échantillon biologique complexe, par hybridation à une sonde de séquence complémentaire portant un marquage radioactif. Cette méthode peut détecter simultanément des variations génétiques due à des réarrangement chromosomiques et insertions/délétions localisés tout le long du génome bactérien. Le « *Microarray* » est moins utilisé en raison du cout très élevé et d'une faible reproductibilité ainsi que la complexité de la mise en œuvre. Par conséquent, des méthodes dérivées plus simples ont été élaborées pour de nombreuses espèces bactériennes.

Le Kit « *P. aeruginosa* Genotyping Kit 2 » développé et commercialisé par Alere technologies GmbH (Allemagne) est une puce à ADN avec 99 sondes spécifiques combinant différents marqueurs génétiques et biochimiques insérée dans un micro-tube similaire aux tubes Eppendorf (<http://alere-technologies.com>). La méthode permet la caractérisation génotypique des souches de *P. aeruginosa* pour des études phylogénétiques et épidémiologiques. Le marquage de l'ADN avec de la biotine est directement généré à partir de colonies bactériennes lors de réactions d'amplification PCR utilisant des amorces de multiplexage puis transféré dans le micro-tube dans lequel a lieu l'hybridation. Les signaux d'hybridation sont détectés par colorimétrie et sont automatiquement convertis sous forme de génotype multi-locus (Wiehlmann, Wagner *et al.* 2007). Les données de typage obtenues fournissent des informations en attribuant des codes numériques aux modèles d'hybridation, qui peuvent facilement être stockées et comparées aux profils des autres isolats via des bases de données. Ces Kits existent également pour d'autres espèces bactériennes (*S. aureus*, *E. coli*, *M. tuberculosis* etc..) mais le cout reste très élevé.

1.1.2.1.4. Méthode basée sur le Séquençage

Avec le progrès des technologies de séquençage capable de générer des informations non ambiguës et de très bonne qualité sur les données de séquences, et un cout relativement abordable, le nombre de génomes bactériens entièrement séquencés a augmenté durant ces deux dernières décennies. Par conséquent, des méthodes dont le principe est d'analyser directement les variations sur des séquences nucléotidiques ont été développées. Le MLST (*Multilocus sequence typing*) s'appuie sur les variations au niveau des gènes de ménage et les SNPs (*Single Nucleotide polymorphism*) indiquent les points de mutation au niveau de gènes d'intérêt localisés le long d'un génome.

La technique MLST

Le MLST est basé sur l'analyse par séquençage du polymorphisme de fragments de gènes de ménage (400-500pb). La technique a été initialement développée pour l'étude de *Neisseria meningitidis* du fait de la difficulté de comparer les résultats de MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*). Pour *P. aeruginosa*, le MLST a été développé et mis au point par Curran et al. en 2004 (Curran, Jonas *et al.* 2004) puis modifié par van Mansfeld et al. en 2009 (van Mansfeld, Jongerden *et al.* 2010). Il utilise sept gènes de ménage importants dans le métabolisme de la bactérie et conservés au cours de l'évolution. La séquence d'un locus donné permet de différencier des allèles apparentés par des mutations ou recombinaisons. Pour chaque souche, la combinaison des allèles permet également de définir un code appelé « sequence type » ou ST. Ces STs constituent une empreinte génétique et peuvent être stockés dans des bases de données consultables en ligne comme par exemple le site <http://pubmlst.org/paeruginosa/>. L'analyse MLST, initialement proposée comme méthode de typage pour des études épidémiologiques est hautement reproductible et transférable entre laboratoires. Elle permet d'identifier sans ambiguïté des clones, et d'obtenir une meilleure compréhension de la structure de la population bactérienne. Par ailleurs, le MLST permet d'établir des relations évolutives entre les clones, donc approprié pour les analyses phylogénétiques. Toutefois la technique est peu utilisée probablement à cause de son cout très élevé et parce qu'elle est parfois moins informative comparée à l'électrophorèse en

champ pulsé (ECP) qui reste la méthode de référence (Garcia-Castillo, Del Campo *et al.* 2011 ; Kidd, Ritchie *et al.* 2012).

Analyse des SNPs

Parce que le séquençage du génome entier reste cher et peu pratique pour l'épidémiologie moléculaire, la détection directement par séquençage des points de mutation au niveau des gènes d'intérêt ou SNP a évolué vers une stratégie de séquençage de nouvelle génération.

L'étude des SNPs s'est beaucoup développée avec la disponibilité des séquences de génomes complets, permettant ainsi la comparaison de séquences de plusieurs génomes d'une même espèce pour rechercher les SNPs. Certains SNPs observés par comparaison de génomes peuvent être la conséquence d'erreurs de séquençage, ce qui nécessite des études de validation au niveau expérimental. La variabilité génétique des SNPs peut avoir un rôle important pour la pathogénicité de l'espèce, par exemple lorsqu'un SNP est localisé dans un gène de virulence, résistance aux antibiotiques ou de la réponse immunitaire de l'hôte.

Chez *P. aeruginosa* des SNPs ont été identifiés au niveau de sept gènes conservés et des gènes ceux codant pour des toxines de sécrétion de type III (*exoS*, *exoT*, *exoU* et *exoY*) respectivement analysés par RFLP (Morales, Wiehlmann *et al.* 2004) et PCR multiplexe (Ajayi, Allmond *et al.* 2003). Actuellement les puces à ADN sont largement utilisées pour l'analyse de SNPs. L'analyse des SNPs est plus informative dans la caractérisation des bactéries ayant une structure clonale.

Tableau 1: Les différents avantages et inconvénients des techniques de génotypage

	Technique de typage	Typabilité	Reproductibilité	Pouvoir discriminatoire	Facilité d'utilisation	Facilité d'interprétation	Accessibilité	Coût
Digestion ADN	RFLP	Excellente	Faible	variable	Bonne	Moyenne	Moyenne	Moyen
	PFGE	Excellente	Bonne	Excellent	Bonne	Faible	Faible	Elevé
	Ribotypage	Excellente	Excellente	Bon	Bonne	Bonne	Faible	Elevé
Amplification ADN	RADP	Excellente	Faible	Faible	Bonne	Faible	Bonne	Moyen
	AFLP	Excellente	Bonne	Excellent	Bonne	Moyenne	Faible	Elevé
	MLVA	Excellente	Excellente	Excellent	Bonne	Excellente	Bonne	Faible
Hybridation	microarray	Excellente	faible	excellent	Bonne	Bonne	Faible	Elevé
Séquençage	SNP	Excellente	Excellente	Faible	Bonne	Excellente	Faible	Elevé
	MLST	Bonne	Excellente	Excellent	Bonne	Excellente	Faible	Elevé

1.1.3. Structure de population

Trois types de structure de population ont été décrits chez les espèces bactériennes : clonale, panmictique, et une structure mixte appelée épidémique (Smith, Smith *et al.* 1993). Chez les espèces clonales, les différences génétiques entre les isolats reflètent des changements qui se sont accumulés de manière séquentielle pendant l'évolution de bactéries ancestrales. Une structure clonale ne peut donc exister que si les recombinaisons génétiques et les échanges horizontaux sont rares. Les clones sont spécifiés par leur adaptation à un habitat particulier. À l'inverse, certaines espèces bactériennes telles que *Neisseria gonorrhoeae* et *Helicobacter pylori* évoluent principalement par de multiples événements de recombinaison et par transfert horizontal de gène à telle enseigne que les petites variations (mutations ponctuelles) ne sont détectables que lorsqu'elles persistent dans le temps. *H. pylori* présente un degré extraordinaire d'hétérogénéité génétique, la majorité des isolats a un génotype propre. Les échanges horizontaux et recombinaisons sont si fréquents que des gènes différents au sein de chaque locus sont tous à l'équilibre de liaison (Suerbaum, Smith *et al.* 1998). La structure de la population qui en résulte est dite panmictique. Quand à la structure mixte représentée généralement par l'espèce *N. meningitidis*, elle résulte du développement et de la propagation rapide de certains clones recombinants (panmixie) qui peuvent transitoirement posséder une structure clonale.

Chez *P. aeruginosa*, plusieurs études ont révélé une structure non clonale avec des clones épidémiques dominants (Pirnay, Bilocq *et al.* 2009 ; Kidd, Ritchie *et al.* 2012) notamment les clones C et PA14 largement répandus à travers le monde. Ces souches sont couramment observées dans l'environnement et dans différents contextes cliniques surtout chez les patients mucoviscidosiques où ils subissent des variations génétiques au cours de la maladie (Cramer, Klockgether *et al.* 2011). Bien que les souches cliniques et environnementales soient génotypiquement identiques, des études récentes ont montré des souches particulièrement observées chez les patients atteints de mucoviscidose (van Mansfeld, Jongerden *et al.* 2010).

1.1.4. Infection chronique chez les patients mucoviscidosiques

La mucoviscidose, ou *Cystic Fibrosis* (CF) en anglais est une maladie génétique causée par la mutation du gène *cfr* (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), un transporteur membranaire de substrats. Son dysfonctionnement cause une augmentation de l'absorption des ions sodium (Na⁺) et une diminution des ions chlore (Cl⁻). Cette perturbation physiologique entraîne la production par les cellules d'un mucus anormalement épais qui est difficilement évacué, provoquant l'obstruction progressive des voies respiratoires ainsi qu'une diminution de propriétés antibactériennes. L'altération du mucus respiratoire favorise ainsi l'acquisition de plusieurs bactéries pathogènes évoluant au cours de l'infection vers la colonisation chronique. Les infections précoces de patients atteints de mucoviscidose sont le plus souvent causées par *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* puis par *P. aeruginosa*. Des infections graves mais rares sont causées par l'espèce *Burkholderia* (le plus souvent *B. cenocepacia* et *B. multivorans*) (Mahenthiralingam, Vandamme *et al.* 2001).

P. aeruginosa est l'agent pathogène prédominant associé à une morbidité et mortalité élevées chez les patients souffrant de mucoviscidose. Alors que les infections croisées sont rares, de nombreuses infections sont causées par des souches uniques et indépendantes dont la principale source d'acquisition semble être l'environnement. Les poumons des patients sont souvent colonisés de façon intermittente dès l'enfance, colonisation qui aboutit finalement à une infection pulmonaire chronique où la même lignée bactérienne peut persister pendant des décennies (Jelsbak, Johansen *et al.* 2007 ; Mott, Park *et al.* 2012), malgré l'antibiothérapie. La bactérie est ainsi soumise à une forte sélection menant à des changements génétiques et phénotypiques importants (Smith, Buckley *et al.* 2006 ; Mena, Smith *et al.* 2008) concernant la diversification de la mobilité, la sensibilité aux antimicrobiens et la production d'alginate, adhésines et métabolites secondaire (Lee, Haagensen *et al.* 2005).

Des études longitudinales des infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose ont été effectuées par génotypage et ont révélé l'existence de clones épidémiques qui semblent être bien adaptés dans les voies respiratoires. Parmi ceux-ci on rencontre fréquemment le clone C très répandu en Europe (Romling, Kader *et al.* 2005), le

clone PA14, dont la souche de référence est particulièrement virulente infectant des organismes phylogénétiquement distincts (Rahme, Ausubel *et al.* 2000), et le clone LES (*Liverpool Epidemic Strain*) fréquemment retrouvé depuis les années 1990 chez les patients en Grande-Bretagne. Plusieurs autres clones ont été mis en évidence par génotypage au cours d'une étude longitudinale de souches infectant des enfants atteints de mucoviscidose (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007 ; Sobral, Mariani-Kurkdjian *et al.* 2012). En effet, lors d'une première infection les bactéries sont de phénotype non mucoïde. Elles finissent par s'adapter dans les voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose, passant du phénotype non mucoïde à un phénotype mucoïde. Les bactéries sont entourées d'un gel d'alginate, une matrice de polymère impliquée dans la viscosité des sécrétions bronchiques (Figure 2). Cette caractéristique favorise la formation de biofilm constitué de microcolonies engainées dans l'alginate. Sous cette forme, les bactéries résistent mieux aux antibiotiques (Drenkard et Ausubel 2002 ; Li, Kosorok *et al.* 2005). La présence d'un biofilm résistant aux antibiotiques contribue à la persistance des bactéries dans les infections chroniques.



Figure 2 : Souche de *P. aeruginosa* de phénotype mucoïde fraîchement isolée chez un patient mucoviscidosique

1.1.5. Emergence de clones multirésistants aux antibiotiques

Par sa fréquence, *P. aeruginosa* est le troisième germe responsable d'infections nosocomiales en France et la cause majeure de mortalité et morbidité élevées chez les patients atteints de

mucoviscidose. Les infections à *P. aeruginosa* sont souvent difficiles à traiter à cause de la grande tolérance naturelle de cette bactérie à de nombreux antibiotiques, ainsi que de sa capacité remarquable à acquérir des mécanismes de résistance à plusieurs groupes d'agent antibactériens. L'espèce développe presque tous les mécanismes connus de résistance antibactérienne (Strateva et Yordanov 2009).

La résistance intrinsèque résulte de la faible perméabilité de la membrane externe aux antibiotiques due aux porines (Opr). La limitation de la vitesse de pénétration des molécules, l'efficacité des pompes d'efflux à empêcher les antibiotiques d'atteindre leur cible, et la synthèse d'enzymes d'inactivation. Environ 800 β -lactamases ont été décrites chez les bacilles Gram négatif et au moins 120 ont été retrouvées chez les souches de *P. aeruginosa* (Zhao et Hu 2010). Les échecs thérapeutiques sont en majorité liés à la production des enzymes AmpC, BLSEs (β -lactamases à spectre élargi) et MBLs (métallo- β -lactamases à spectre élargi). La majorité des souches de *P. aeruginosa* produit une β -lactamase à large spectre appelé AmpC qui agit sur plusieurs antibiotiques. La production d'une autre β -lactamase naturelle (oxacillinase) appelée OXA-50 (Girlich, Naas et Nordmann 2004) ciblant d'autres types de molécules rend la bactérie résistante à une proportion élevée des antibiotiques disponibles. Cependant, les mécanismes de résistance naturelle peuvent apparaître sous l'effet de mutations spontanées entraînant parfois la perte des porines, la surexpression des enzymes d'inactivation et la surproduction des pompes d'efflux. Par ailleurs, certaines résistances apparaissent principalement par acquisition de matériel génétique étranger porté par des plasmides, des transposons et des intégrons. Les BLSEs et MBLs peuvent être portées par les déterminants génétiques mobiles et sont transférables au sein des populations bactériennes par des mécanismes souvent très complexes. C'est ainsi que le gène codant pour l'enzyme PER-1 (*Pseudomonas* Extended Resistance), une BLSE portée initialement par le génome de *P. aeruginosa*, a été retrouvé plus tard chez des isolats cliniques à travers le monde hébergé par des plasmides, et chez d'autres espèces bactériennes proches ou éloignées avec une localisation chromosomique ou plasmidique. Cependant, des études épidémiologiques ont révélé l'association des clones MLST CC11 et CC4 (initialement désignés BG11 et BG4 et majoritairement de sérotypes O11 et O12) à diverses

β -lactamases, y compris l'enzyme PER-1 et les MBL-VIMs (Empel, Filczak *et al.* 2007) (Giske, Libisch *et al.* 2006). Ces clones, et particulièrement le clone CC235 (Maatallah, Cheriaa *et al.* 2011) sont multirésistants voire toto-résistants aux antibiotiques et sont largement répandus dans le monde.

Au sein de l'arsenal thérapeutique antibactérien disponible, seule la colistine, un polycationique peu utilisé est actif sur les souches cliniques multirésistantes de *P. aeruginosa*. Son mode d'action est la désorganisation de la membrane externe et cytoplasmique, mais quelques isolats parviennent à inhiber l'activité de la molécule par des mécanismes encore mal élucidés (Muller, Plesiat et Jeannot 2011). Cependant, les résistances dépendent parfois de la formation d'un biofilm, fréquemment observé dans les souches issues de patients atteints de mucoviscidose. La croissance en biofilm augmente la tolérance aux antibiotiques (Aaron, Ferris *et al.* 2002). Souvent tous ces mécanismes existent simultanément, ce qui confère une résistance combinée à tout l'arsenal de molécules utilisables d'où la recherche d'un complément ou d'une alternative efficace à l'antibiothérapie.

1.2. Les bactériophages

1.2.1. Historique des bactériophages

Les virus de bactéries sont communément appelés bactériophages ou phages et sont considérés comme étant les entités biologiques les plus abondantes de la biosphère (Brussow et Hendrix 2002 ; Suttle 2005). Toute espèce bactérienne, voire même toute souche, semble pouvoir être la proie de différentes espèces phagiques. La découverte des bactériophages est généralement associée aux noms de Frédéric Twort et Félix d'Hérelle. Même si la primauté du principe lytique revient à Twort qui décrit en 1915 la présence de zone vitreuse « glassy areas » sur les microcoques (*S. aureus*) et les bacilles intestinaux, Félix d'Hérelle a été le premier à mentionner l'existence de « microbe invisible » infectant et tuant les bactéries isolées chez les patients atteints d'une dysenterie probablement due à *Shigella dysenteriae* (d'Hérelle 1917). Il a aussitôt établi que ces nouvelles entités étaient des virus analogues à des

virus déjà connus de plantes et de vertébrés, tels que le virus de la mosaïque du tabac et de la fièvre aphteuse. Il nota la présence de taches vitreuses (trous) sur les cultures de bactéries en gélose sur boîte, qu'il appela «plages de lyse». Un comptage de ces zones claires lui permit d'estimer le nombre de virus présents et de conclure que les virus ne se multipliaient que dans la bactérie vivante. D'Hérelle inventa alors, suite à sa dernière observation, le nom "bactériophage" ou "mangeur de bactéries" qui dérive de bactérie et du mot grecque "phagein" qui signifie manger. Dès 1919, il réussit à utiliser les bactériophages comme agents antimicrobiens à l'occasion d'une importante épidémie de choléra des poules en France. La première administration humaine de phages a été réalisée par d'Hérelle à l'hôpital des Enfants-malades de Paris (France) en 1921 chez des patients atteints de dysenterie (Dublanche et Fruciano 2008 ; Abedon, Kuhl *et al.* 2011). Dans le même temps, une étude conduite par des chercheurs belges a montré une amélioration après injection de phages ciblant *S. aureus* près de la base de furoncles cutanés chez six patients. À partir de ce moment, des préparations variées de phages ont été produites et commercialisées dans le monde. A cette époque, le manque de connaissance fondamentale sur la biologie des phages et leur mauvaise utilisation ont conduit à des échecs thérapeutiques. Pendant ce temps l'arrivée des antibiotiques dans le milieu des années 1940 et leur simplicité d'utilisation ont contribué au déclin de l'intérêt pour la phagothérapie dans les pays occidentaux. Toutefois, dans certains pays de l'Europe de l'Est et de l'ex-Union Soviétique, la phagothérapie est toujours utilisée avec succès (voir paragraphe dédié à la phagothérapie). Les différents événements ayant marqué l'histoire des phages sont présentés dans la figure 3.

Par ailleurs, l'étude des phages a contribué à la naissance de la biologie moléculaire et fourni des indications fondamentales sur le mode de répllication et la morphogenèse des virus. Les phages ont également contribué à la compréhension de certaines épidémies et des maladies infectieuses. Ils sont par ailleurs responsables de fermentations défectueuses dans l'industrie laitière, et sont utilisés dans le diagnostic (Singh, Arutyunov *et al.* 2012) et dans le biocontrôle. Actuellement, beaucoup de recherches sont orientées sur la génomique des phages, l'évolution, l'écologie et la découverte de nouveaux phages à des fins thérapeutiques.

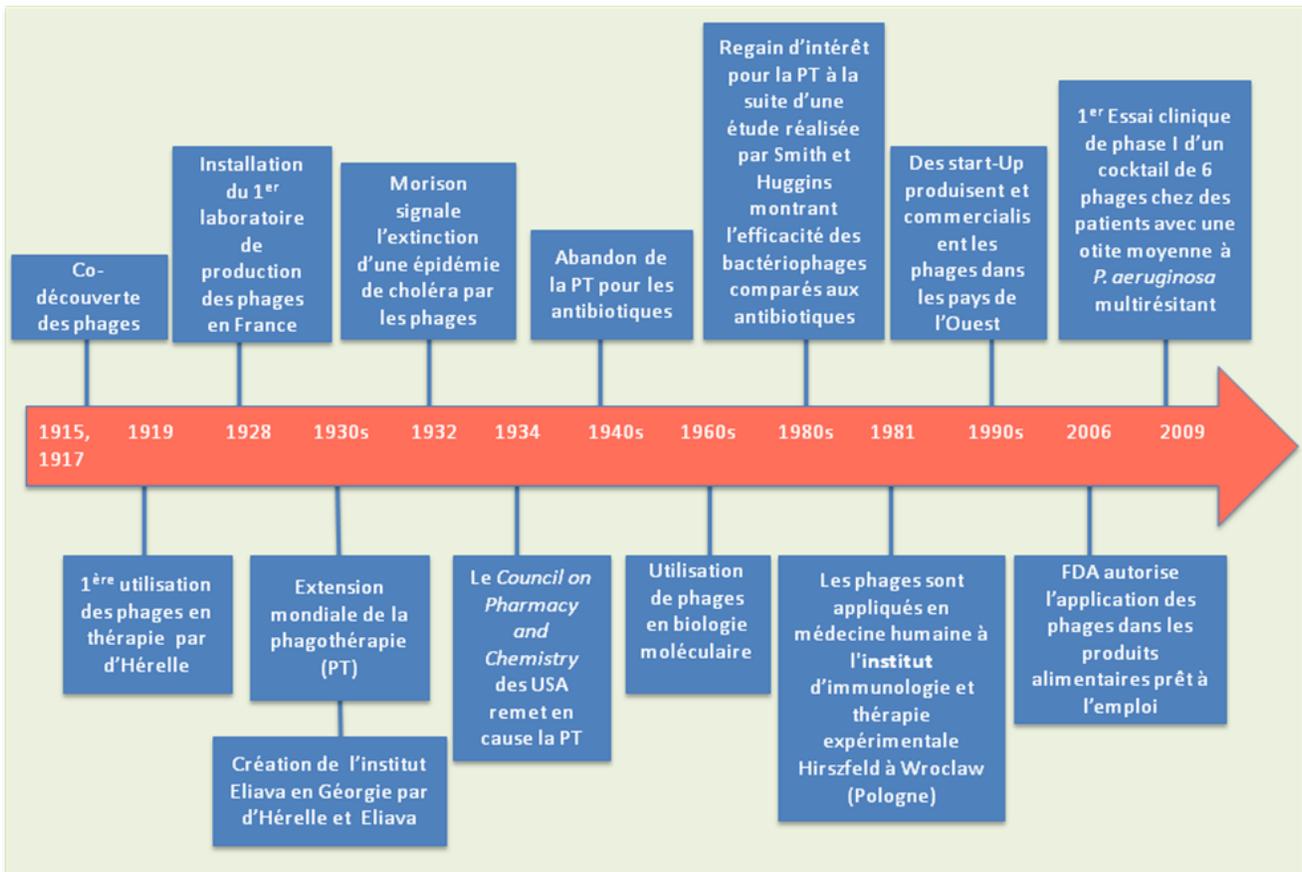


Figure 3 : Les différents évènements ayant marqué l'histoire des bactériophages

1.2.2. Caractéristiques morphologiques des phages

Tout comme les virus des organismes pluricellulaires, les phages ont un génome constitué d'ADN ou d'ARN, mais ne possèdent pas la machinerie nécessaire pour se reproduire. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires de bactéries. Les bactériophages sont extrêmement diversifiés et ubiquitaires s'attaquant à leurs hôtes présents dans diverses niches écologiques. Près de 10^{23} procaryotes succomberaient chaque seconde aux attaques par les phages dans le milieu aquatique modifiant le cycle biogéochimique ce qui impacte considérablement la dynamique de la population bactérienne (Suttle 2007). La classification

des bactériophages ainsi que des virus des eucaryotes et des Archées est standardisée par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV : International committee on taxonomy of viruses) selon la morphologie et la nature de l'acide nucléique. La structure de la capsid est une caractéristique phénotypique commode généralement utilisée pour classer les virus des procaryotes. Cependant les analyses des génomes de bactériophages ont fait apparaître quelques incohérences lors de l'utilisation de la morphologie en taxonomie des phages. Bien que morphologiquement distinct, le phage P22 est considéré comme proche du phage λ car ils ont la même organisation génomique, utilisent la même stratégie de répllication et ont plusieurs gènes en commun (Vander Byl et Kropinski 2000 ; Casjens et Thuman-Commike 2011). Les bactériophages présentent des structures capsidiques très variées et sont repartis dans 13 familles en fonction de leur morphologie et de la nature du matériel génétique. La majorité des bactériophages (97%) décrite par examen au microscope est caudée et appartient à 3 familles : les *Myoviridae* (~24%), caractérisés par une longue queue contractile, les *Siphoviridae* les plus représentés (~60%) avec une queue non contractile et les *Podoviridae* (~15%) avec une courte queue. Ces familles sont regroupées au sein des *Caudoviridae*, seul ordre des bacteriophages (Ackermann 2012) et leur matériel génétique est sous forme d'ADN double brin. Seulement 3% sont représentés par les phages polyédriques, filamenteux, pléomorphe (PFP) regroupant 10 familles (Ackermann 2007) caractérisés par des génomes de petites taille sous forme d'ADN simple ou double brin et ARN simple ou double brin parfois entouré d'une enveloppe lipidique.

Contrairement aux phages PFP, les phages caudés, souvent appelés grands phages, ont des génomes de grande taille. Par exemple le génome du phage G de *Bacillus megaterium* a une taille de 500 kbp (Hatfull et Hendrix 2011). En général, le génome est contenu dans une capsid protéique dont la taille fixe dans une certaine mesure celle du génome. Tous les phages caudés ont une capsid de structure icosaédrique (20 faces et 12 sommets) construite à partir d'unités en forme d'anneau ou bouton appelés capsomères. Un ou très rarement quelques gènes sont responsables de la formation de la capsid. Les bactériophages, y compris ceux qui infectent le même hôte, possèdent des protéines de capsides très variées. Chez les phages caudés, la queue se présente sous forme d'un tube creux, à travers lequel

l'ADN passe lors de l'infection (Figure). Chez certains phages comme T4, la queue est entourée par une gaine qui se contracte lors de l'infection de la bactérie. Par conséquent, les mécanismes de l'injection d'ADN diffèrent en fonction du type de queue. En général, les phages reconnaissent, grâce à leurs fibres caudales, des récepteurs à la surface de la bactérie auxquels ils se fixent. Ils injectent leur matériel génétique à l'intérieur de la bactérie suite à un changement conformationnel de la protéine portale de la queue ou par addition séquentielle de protéines qui s'étendent le long du canal portal ou adaptateurs (Tavares, Zinn-Justin et Orlova 2012). Pour la plupart des phages, seul l'acide nucléique pénètre dans l'hôte et la capsidie reste à l'extérieur.

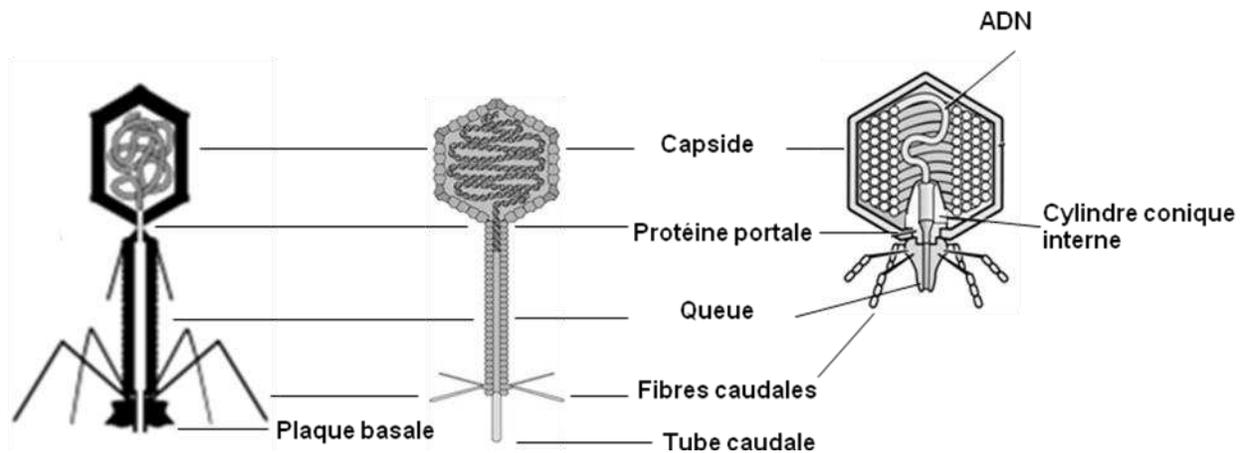


Figure 4 : Structure morphologique des Caudoviridae. De gauche à droite, phage T4 (*Myoviridae*), phage Lambda (*Siphoviridae*) et phage T7 (*Podoviridae*)

Les bactériophages utilisent, une fois leur génome dans le cytoplasme, le métabolisme de la bactérie pour synthétiser leurs composants. On distingue deux types de phages en fonction de leur cycle de reproduction : les phages lytiques ou virulents et les phages tempérés (Figure 5). Les phages lytiques se multiplient à l'intérieur de la bactérie et les nouveaux virions sont libérés après la lyse bactérienne. Les phages tempérés peuvent soit effectuer un cycle lytique, soit intégrer leur ADN dans le génome bactérien créant ainsi un prophage. De nombreux phages caudés notamment les Siphovirus sont des phages tempérés. Les bactéries porteuses d'un prophage sont dites lysogènes et la relation stable entre le phage tempéré et la cellule hôte est appelée lysogénie. La relation peut être de courte durée et le phage se

maintenir sous forme extra-chromosomique, on parle alors de pseudolysogénie. À l'instar d'un plasmide le phage F116 de *P. aeruginosa* peut rester sous forme circulaire dans le cytoplasme bactérien (Byrne et Kropinski 2005) créant ainsi une pseudolysogène. Cette situation semble résulter de la carence nutritionnelle de la bactérie. Casjens et col. ont montré en 2003 que sur 82 génomes de bactéries disponibles dans la base de données GenBank, 51 portaient environ 230 prophages putatifs reconnaissables. Ces prophages peuvent constituer 10-20% du génome d'une bactérie et contribuent significativement à leur évolution (Casjens 2003). La souche *E. coli* O157: H7 est la bactérie qui possède le plus de prophages avec près de 24 séquences phagiques (Hayashi, Makino *et al.* 2001). Plus de 90% des souches de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose possèdent un ou plusieurs prophages dans leur génome comme par exemple la souche LES (Liverpool Epidemic Strain) qui héberge six prophages dont quatre sont capables d'effectuer un cycle lytique (Winstanley, Langille *et al.* 2009 ; Fothergill, Walshaw et Winstanley 2012).

Dans certaines conditions, le prophage peut s'exciser du génome de l'hôte par un processus d'induction pour initier un cycle lytique et infecter un nouvel hôte. Dans ce processus, le phage peut emporter des fragments d'ADN de la bactérie hôte qui peuvent être des gènes de virulence, de pathogénicité, et de résistance aux antibiotiques transmissibles à d'autres bactéries.

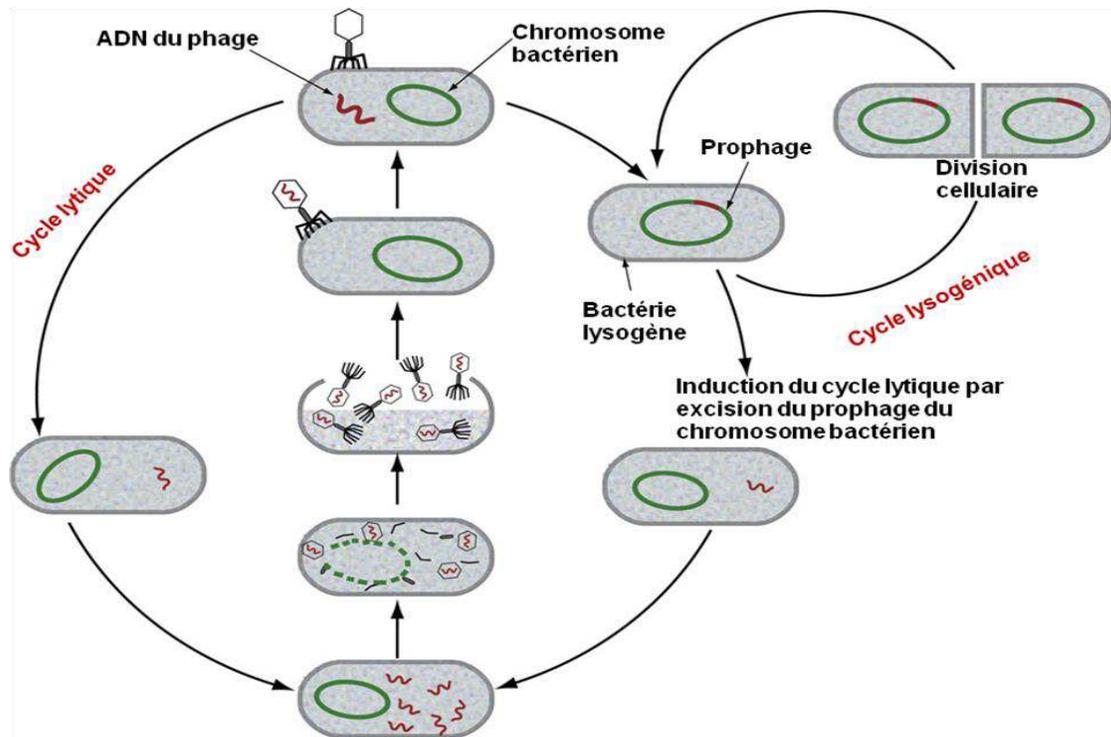


Figure 5: Cycle lytique et lysogénique des bactériophages (Brovko, Anany et Griffiths 2012)

1.2.3. Origine

Ce qui caractérise un virus par rapport à une cellule est l'absence de ribosomes mais surtout l'existence d'une capsid protéique (Krupovic et Bamford 2010) dans laquelle le matériel génétique est présent seul ou accompagné de certaines protéines nécessaires à sa multiplication. L'origine des virus ainsi que le lien qui pourrait concerner l'évolution de la vie cellulaire suscitent l'intérêt des biologistes depuis leur découverte. Le débat a connu un rebondissement suite à la découverte de mimivirus. La taille physique et celle du génome (1.2Mpb) de ce virus géant sont comparables à ceux des organismes cellulaires, mais possède une machinerie de traduction spécifique des virus (Raoult, Audic *et al.* 2004) suggérant une forme de vie distincte intermédiaire entre l'organisme cellulaire et les virus (Legendre, Arslan *et al.* 2012). Sur la base de la présence de ribosomes et de capsides, Raoult et Forterre ont proposé de scinder le monde du vivant en deux principaux groupes d'organismes: les organismes qui codent pour les ribosomes (archées, bactéries et eucaryotes) représentant les descendants de LUCA (Last Universal Common Ancestor), et les virus codant pour une

capside (Raoult et Forterre 2008) (Figure 6). Les auteurs ont suggéré que les virus étaient issus d'un ancêtre commun au tout début de l'évolution du vivant. Cette théorie a été renforcée par l'identification de structures similaires des protéines de la capsidie du bactériophage PRD1 un tectivirus, de l'adénovirus humain et le virus PBCV-1 un phycodnavirus des archés (Benson, Bamford *et al.* 2004). Une autre étude a établi des liens structurels entre certains virus icosaédriques comme les bactériophages à queue et le virus de l'herpès ainsi que des bactériophages à ARN double brin et les réovirus (Baker, Jiang *et al.* 2005 ; Krupovic et Bamford 2008). Plus récemment, une étude de modélisation structurelle des protéines de capsidie a révélé que les virus caudés des archées adoptent la même topologie que les protéines correspondantes de bactériophages à queue et du virus de l'herpès (Krupovic, Forterre et Bamford 2010). Toutes ces observations ont donné lieu à une hypothèse de lignée virale prédisant une origine commune aux virus qui partagent la même architecture de capsidie mais infectent différents hôtes.

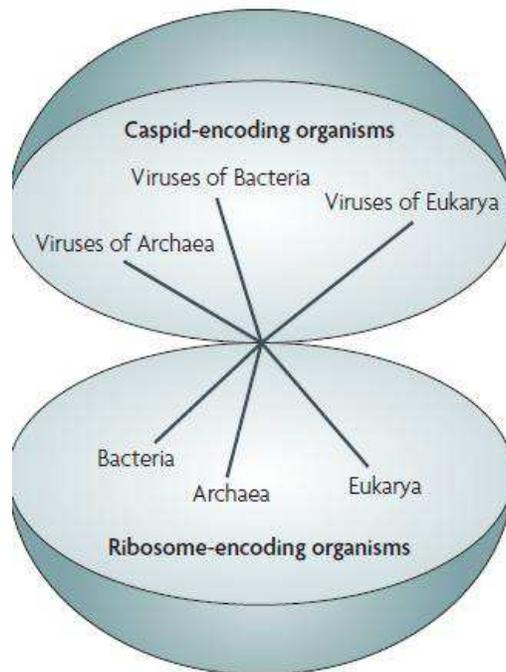


Figure 6 : Séparation du monde du vivant en 2 groupes (Raoult et Forterre 2008)

Ce modèle est rejeté par certains biologistes en excluant les virus de l'arbre du vivant issu de LUCA, sur le motif que les virus étant des parasites obligatoires, leur propagation dépendait de cellules hôtes, ne faisant pas d'eux des précurseurs plausibles (Moreira et Lopez-Garcia 2009). De plus, aucun gène n'est partagé par tous les virus ou même par les lignées virales infectant des hôtes de différents domaines du vivant. Pour justifier la présence d'une capsidie protéique chez les virus, certains auteurs supposent que les capsides virales sont des structures géométriques simples dont la structure tertiaire des protéines est soumise à de fortes contraintes sujettes à la convergence. Par exemple les carboxysomes qui sont des organites protéiques bactériens, forment une capsidie icosaédrique géométriquement similaire à celles des capsides virales (Yeates, Kerfeld *et al.* 2008). Cependant plusieurs études positionnent les virus dans l'arbre et suggèrent que le premier virus a dérivé d'une structure cellulaire préexistante ou un processus métabolique qui a appris à être partiellement indépendante d'une cellule.

1.3. Impact des bactériophages sur la biosphère

1.3.1. *Les communautés microbiennes*

Les bactéries et leurs virus (bactériophages) constituent les deux entités biologiques les plus abondantes de la terre. Le nombre global de virus est estimé à 10^{31} . La plupart des particules virales de différentes niches écologiques correspondent à des bactériophages. Ces derniers sont fréquemment retrouvés dans le sol avec 10^7 - 10^9 phages/g de sol (Williamson, Radosevich et Wommack 2005) et dans les environnements aquatiques avec 10^7 particules virales par millilitre d'eau. Dans le milieu marin, les virus constituent 94% du matériel génétique global et sont 15 fois plus nombreux que les bactéries et les archées (Suttle 2007). Prédateurs naturels de bactéries, les bactériophages sont la principale cause de mortalité des bactéries modifiant le cycle biogéochimique, et influencent la composition de la population microbienne contribuant ainsi à son évolution (Suttle 2005). En outre, les virus marins sont un des facteurs biotiques clés capables d'influencer l'impact des océans sur les changements climatiques (Danovaro, Corinaldesi *et al.* 2011).

Dans toutes les niches écologiques, l'abondance des bactériophages varie généralement avec la densité et la croissance des bactéries. Cette relation est exprimée par le rapport du virus sur bactérie (RVB) et est souvent estimé à 10 selon l'hypothèse que chaque espèce bactérienne peut être infectée par au moins 10 espèces phagiques différentes (Brussow et Hendrix 2002 ; Chibani-Chennoufi, Bruttin *et al.* 2004). Des valeurs de RVB variant de moins de cinq à plus de 100 ont été mesurées dans différents milieux aquatiques. Dans le lac du Bourget (France) en hiver, le RVB est de 70 tandis que celui-ci est faible en été et au printemps (Thomas, Berdjeb *et al.* 2011). Dans l'ensemble, les changements dans l'abondance des virus spécifiques et hôtes au sein d'un environnement donné sont épisodiques. Les phages sont généralement spécifiques à certains hôtes et l'infection est dépendante de la densité de l'hôte. En raison du fort taux de contact, les virus sont plus susceptibles d'infecter les hôtes de forte densité et les deux antagonistes se comportent suivant le modèle "killing the winner" ou "le vainqueur meurt" (Weinbauer et Rassoulzadegan 2004). Dans ce modèle, la population de l'hôte le plus abondant est réduite par ses prédateurs viraux. La réduction de la population de l'hôte le plus abondant crée alors une niche propice au développement d'un nouvel hôte qui devient à son tour abondant. De même, lorsque la concentration de virus a été réduite à des taux inférieurs de contact, les taxons qui sont généralement rares augmentent abondamment, tandis que les taxons qui étaient les plus abondants diminuent (Bouvier et del Giorgio 2007). De cette manière, le taxon abondant est en constante évolution et est sous le contrôle des virus. Par exemple, lors des épidémies saisonnières de choléra en Inde, l'apparition d'une épidémie est liée à la réduction du titre de phage de *Vibrio cholerae* dans les eaux fluviales tandis que son extinction est due à l'apparition et propagation des phages (Faruque, Naser *et al.* 2005).

Les interactions observées entre les phages et l'hôte (coévolution antagoniste) sont une des causes de l'évolution des pressions de sélection menant à la diversification rapide des populations bactériennes (évolution de bactéries résistantes et virulence des phages) (Buckling et Rainey 2002). De nombreuses études expérimentales ont été menées pour évaluer la pression sélective de la coévolution. Chez la souche hypermutable *P. fluorescens* après moins de 200 générations, 25% des bactéries ont enregistré 10 à 100 fois plus de

mutations principalement au niveau des gènes de réparation de l'ADN parmi lesquelles des bactéries devenues résistantes aux phages (Pal, Macia *et al.* 2007). Une étude parallèle a montré également des variations phénotypiques et génotypiques au cours de l'infection phagique dues à des mutations localisées principalement au niveau des gènes de structures phagiques (Paterson, Vogwill *et al.* 2010). Une étude récente de la coévolution montre la diversification rapide de *Synechococcus* marins et du virus infectant. Pendant 170 jours de culture continue, entre 4 et 13 nouveaux phénotypes viraux qui diffèrent par le spectre d'hôte ont été détectés et 4 à 11 nouveaux phénotypes *Synechococcus* caractérisés par la résistance virale (Marston, Pierciey *et al.* 2012). Concernant les phages, des variations ont lieu au niveau de multiples gènes autres que les gènes de structures. Quant au génome bactérien, il présente des modifications aussi bien au niveau des récepteurs phagiques que des gènes de la biosynthèse du LPS.

Pour évaluer l'influence de l'environnement sur l'évolution de la résistance, Koskella et al. ont comparé le niveau de résistance des hôtes évolué dans un environnement hétérogène (différentes particules virales) et homogène (présence d'un phage unique). Les auteurs montrent que les bactéries développent des résistances spécifiques locales, cependant celles qui ont évolué dans l'environnement hétérogène sont moins avantagées que celles des environnements homogènes en termes de croissance en absence du phage spécifique (Koskella, Lin *et al.* 2012). Toutes ces observations suggèrent que le spectre d'hôte des phages ainsi que la susceptibilité des bactéries sont en partie influencés par l'adaptation locale pendant la coévolution (Flores, Valverde et Weitz 2012). Les phages sont plus infectieux pour les bactéries locales que pour celles qui sont séparées géographiquement. Des observations similaires ont été faites dans le sol sur des bactéries situées dans un périmètre de 25cm par rapport aux bactéries localisées à 1km (Vos, Birkett *et al.* 2009). L'interaction phages et bactéries associées a été mise en évidence sur les feuilles de différents arbres de marronniers (Koskella, Thompson *et al.* 2011). Les phages sont là encore plus infectieux pour les bactéries d'une même arborescence par rapport à celles provenant d'autres arbres.

1.3.2. Impact sur la « fitness » du génome bactérien

Chaque infection virale est susceptible d'introduire une nouvelle information génétique dans la cellule hôte ou dans la descendance virale, entraînant ainsi l'évolution de l'hôte et des nouveaux virions (Suttle 2007). Le gène de la photosynthèse *psbA* codant pour la protéine D1 photosystème II d'origine bactérienne a été retrouvé chez les phages qui infectent *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. Par conséquent l'expression de ce gène au cours de l'infection réduit la synthèse de la protéine D1 de la bactérie et augmente ainsi le métabolisme bactérien du phage.

De nombreux phages à queue, principalement les siphovirus sont des phages tempérés et ont deux options pour se reproduire. Ils sont capables d'effectuer le cycle productif aboutissant à la libération de nombreux virions ou intégrer leur génome dans celui de la bactérie qui est ensuite transmis aux cellules filles au cours de la division bactérienne. Les bactéries lysogènes se reproduisent et semblent normales sous de nombreux aspects mais ont deux caractéristiques particulières. D'une part, les bactéries lysogènes ne peuvent pas être réinfectées par le même virus, c'est à dire qu'elles possèdent une immunité contre la surinfection. D'autre part, phage tempéré induit un changement phénotypique chez son hôte par l'expression de ses gènes. Cette caractéristique importante de la lysogénie donne lieu à la conversion lysogénique. Elle implique souvent des altérations des caractéristiques superficielles notamment les récepteurs phagiques. Par exemple l'infection de *Salmonella* par le phage tempéré epsilon15 modifie l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans la biosynthèse du lipopolysaccharide (LPS) et ainsi les propriétés antigéniques de la bactérie. Le phage D3 de *P. aeruginosa* provoque la séroconversion du sérotype O5 en O16 de l'hôte au cours de la lysogénisation. L'émergence de nouveaux sérogroupes chez *V. cholerae* est parfois provoquée par les phages. De nombreuses autres conversions lysogénique donnent à l'hôte des propriétés pathogènes (Brussow, Canchaya et Hardt 2004). Seules les souches de *Corynebacterium diphtheriae* porteuses du phage beta, codant le gène *tox* de la toxine diphtérique provoquent la diphtérie. Les souches de *V. cholerae* non virulentes porteuses d'un prophage qui code le gène *ctx* subissent une conversion lysogénique donnant lieu à des souches pathogènes responsables du choléra. Chez *P. aeruginosa*, le phage phiCTX est

responsable de la pathogénicité de souches non virulentes. La toxine de Shiga de la souche entérohémorragique O157:H7 est déterminée par un prophage qui code le gène *stx* absent chez la souche non pathogène K12. De nombreux prophages comme DT102, DT104 et U302 infectant *Salmonella* sont associés à la résistance à plusieurs antibiotiques chez cette bactérie (Mulvey, Boyd *et al.* 2006).

Généralement d'origine phagique ces gènes sont parfois retrouvés directement dans le génome bactérien. L'acquisition des gènes s'effectue via le bactériophage par transduction (spécialisée ou généralisée) et peut contribuer à l'évolution des souches pathogènes (Busby, Kristensen et Koonin 2012 ; Faruque et Mekalanos 2012). Outre les phages tempérés/prophages qui sont les principales sources de nouveaux gènes souvent fonctionnels, les bactériophages lytiques peuvent également porter des facteurs de virulence bactériens via la transduction généralisée. Au cours de l'assemblage, l'ADN bactérien est encapsidé par inadvertance dans la capsidite au lieu de l'ADN du phage. La taille de l'ADN bactérien incorporé dans la capsidite est voisine de celle du phage. Comme toute particule virale, les phages défectueux peuvent reconnaître des récepteurs à la surface bactérienne et injecter leur ADN dans le cytoplasme bactérien. Une fois à l'intérieur, l'ADN se stabilise soit en s'intégrant dans le chromosome de l'hôte par recombinaison homologue, soit par réplication et est transmis aux cellules filles. Ce processus a été mis en évidence au cours du cycle lytique des phages tempérés P22 (44kb) et P1 (94kbp) infectant respectivement les souches de *Salmonella* et *E.coli* et incorporant chacun en particulier 44kb et 110-115kb d'ADN bactérien. De nombreux phages apparentés à P22 comme DT104 et U302 sont capables de transférer l'îlot de pathogénicité (SGI1) de 43Kb associé à la région des gènes de résistance aux antibiotiques de *Salmonella enterica* de sérotype *Typhimurium* (Mulvey, Boyd *et al.* 2006).

1.4. Diversité des phages

1.4.1. L'observation de la diversité est limitée par les méthodes standard de culture

Les virus sont retrouvés dans tous les écosystèmes microbiens tels que l'eau, le sol et les sédiments en nombre élevé et variable selon les niches écologiques considérées. Le nombre de particules virales est estimé à 10^7 - 10^9 /g de sol et 10^7 /ml d'eau douce et marine par comptage direct au microscope épifluorescent et consiste majoritairement en virus de bactéries. La méthode classique d'isolement d'un phage est la formation de plages de lyse sur milieu solide. Dans ce procédé, la bactérie d'enrichissement est cultivée dans un milieu liquide, puis mise en contact avec les prélèvements environnementaux (phage). Le mélange phages-bactéries est remis en suspension dans la gélose molle et versé sur une boîte de milieu solide. Le phage diffuse à travers la gélose molle et infecte les bactéries voisines. Lorsque cela se produit, le tapis bactérien est tué et une plage de lyse apparaît. Cependant, de nombreux bactériophages viables ne sont pas détectés par ces procédures classiques d'isolement. Près de 97% des phages collectés par cette méthode sont caudés (Ackermann 2007 ; Ackermann 2012) et la majorité des génomes séquencés a une taille comprise entre 30 et 50 kbp (Hatfull 2008 ; Hatfull et Hendrix 2011). Les bactériophages avec des têtes anormalement grandes correspondant aux génomes de taille plus grande (>200 kbp) ou « phages géants » représentent une petite fraction. Seulement 7 sur 721 (1%) des phages caractérisés ont un génome de plus de 200kbp, dont quatre infectant le genre *Pseudomonas*. En revanche, les analyses statistiques ont révélé que les virus géants sont plus fréquents dans la nature et sont des contributeurs importants à l'écologie bactérienne ; ils sont cependant sous-échantillonnés en raison de l'utilisation de procédures classiques de propagation (Claverie, Ogata *et al.* 2006). Par exemple, le bactériophage G de *Bacillus megaterium* dont le génome fait environ 500 kpb (Hatfull et Hendrix 2011) a été découvert au gré du hasard pendant l'observation microscopique d'un autre bactériophage. Ces phages géants font parfois des plages de lyse extrêmement petites sur gélose standard. Ils sont par conséquent facilement négligés et nécessitent une amélioration des procédures d'enrichissement. Le bactériophage ϕ 8-36 de *Bacillus thuringiensis* dont le génome (221 kbp) a été analysé par

champ pulsé présente une forte dépendance de la concentration du milieu en gélose (Serwer, Hayes *et al.* 2007). Il ne produit pas de plages visibles dans les gels traditionnels. Les limites des méthodes standards d'isolement sont préjudiciables et les génomes de bactériophages incapables de se propager sont potentiellement une source importante de gènes actuellement inexplorés.

1.4.2. Diversité au niveau métagénomique

La majorité des bactéries n'est pas cultivable, par conséquent les phages qui les infectent ne peuvent pas être caractérisés par la méthode classique. Une autre difficulté s'ajoute à l'étude de la diversité notamment l'absence de gène universel analogue au gène ARNr 16S utilisé pour l'ensemble des microbes. Cependant, les comparaisons de génomes entiers ont montré qu'il existe des gènes conservés et partagés entre tous les membres au sein de certains groupes viraux. Ces gènes conservés (gènes de signature) ont été proposés pour leur utilisation comme outils taxonomiques des phages (Rohwer et Edwards 2002). Un des marqueurs utilisés pour l'étude de la diversité des phages de différents environnements est le gène de la protéine capsidique g20 du coliphage T4. Ce gène est omniprésent parmi les phages apparentés à T4 infectant plusieurs espèces bactériennes y compris les cyanobactéries (Fuller, Wilson *et al.* 1998 ; Sullivan, Coleman *et al.* 2008). En outre, des séquences ayant des similarités qui dépassent 99% avec g20 ont été identifiées dans différentes niches écologiques (Short et Suttle 2005 ; Sullivan, Coleman *et al.* 2008). Plusieurs autres gènes de signature comprenant les gènes de réplication entre autres l'ADN polymérase du coliphage T7 (Breitbart, Miyake et Rohwer 2004 ; Labonte, Reid et Suttle 2009) et le gène psbA de la photosynthèse (Chenard et Suttle 2008) ont été utilisés pour étudier la diversité des phages principalement en milieux marins. Cependant l'utilisation de gènes de signature est limitée à l'identification de nouveaux phages appartenant à des sous-groupes de phages déjà connus (nouvelles espèces de phages) et non de phages complètement nouveaux.

La connaissance de la diversité des virus dans l'environnement a été accrue par l'utilisation d'approches métagénomique. Cette approche consiste à analyser par séquençage la composante virale à partir d'un environnement, et a été rendue possible grâce aux progrès

des technologies de séquençage, et la réduction des coûts devenus relativement abordables. Pour évaluer la diversité totale de l'ADN double brin, Breitbart et al. ont partiellement séquencé les composantes virales à partir d'eau de mer, de sédiments marins et de selles d'origine humaine (Breitbart, Salamon *et al.* 2002 ; Breitbart, Hewson *et al.* 2003 ; Breitbart, Felts *et al.* 2004). Dans 200 litres d'eau de mer, plus de 5000 espèces virales ont été identifiées tandis que dans un gramme de fèces humaines plus de 1000 espèces virales sont présentes et un million de virus différents par kilogramme de sédiments marins. Des études de sang ont également montré que l'homme sain porte un certain nombre de virus inconnus, ainsi que des phages de pathogènes humains connus (Breitbart et Rohwer 2005). En outre, des analyses métagénomiques ont été réalisées en milieux marins pour évaluer la diversité des virus à ARN (Culley, Lang et Suttle 2006). Des virus à ARN de génotypes distincts y compris les Picornavirus marins, et les virus éloignés infectant les arthropodes et les plantes supérieures ont été identifiés. Dans tous les cas, la majorité de la diversité virale reste inconnue avec des virus extrêmement variés. Plus de ~90% des séquences virales n'ont pas d'homologues de séquence dans Genbank (Suttle 2007) et appartiennent à des nouveaux groupes ne possédant aucun représentant des gènes de signature.

1.5. Génomique des bactériophages

1.5.1. Structure des génomes

En raison de leur taille relativement petite et de la simplicité de purification de leur matériel génétique, le génome des virus, principalement celui des bactériophages, a été le premier à être séquencé. Le bactériophage ϕ X174 dont le génome est constitué d'ADN simple brin de 5386 nucléotides est le tout premier génome séquencé par la méthode de Sanger en 1977 suivi du génome ADN double brin des coliphages lambda (48502pb) et T7 (39936pb). Grâce au progrès des méthodes de séquençage et en raison de l'intérêt de leur utilisation à des fins thérapeutiques, le nombre de génomes de phages séquencés a très fortement augmenté durant ces dix dernières années. À la date du 06 novembre 2012, 721 génomes de bactériophages ont été enregistrés dans la base de données publique GenBank avec près de 100 nouveaux génomes en 2012 (Figure 7). Déjà en 2003, plus de 50 génomes de phages avaient été

déposés. Les plus petits génomes des phages caudés à ADN double brin (ADNdb) sont représentés par ceux du phage P1 de *Mycoplasma* (11,5 kpb), du phage RRH1 de *Rhodococcus* (14 kpb), et du phage phi1402 de *Bdellovibrio* (24 kpb) appartenant respectivement aux *Podoviridae*, *Siphoviridae* et *Myoviridae*, mais il existe des tailles variables parmi ces différentes familles.

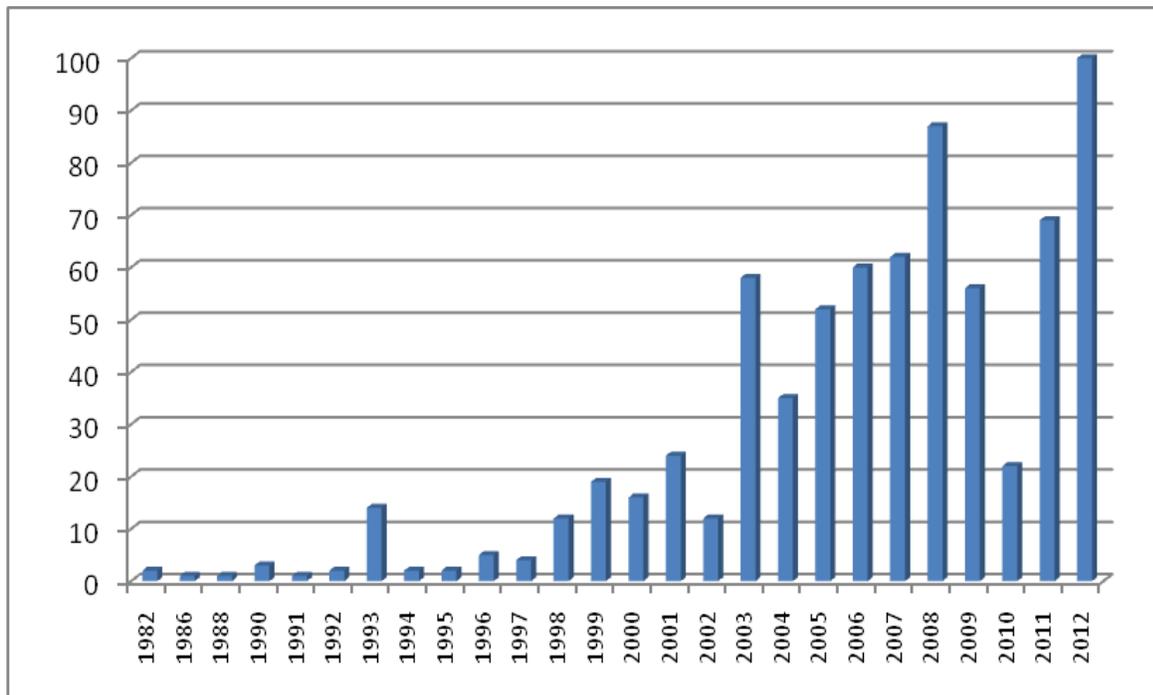


Figure 7 : Génomes de phages séquencés disponibles dans GenBank à la date du 6 novembre 2012

Ces phages ont des génomes organisés sous forme de modules, chaque module regroupant les fonctions qui servent à une même étape du cycle viral. La structure minimale d'un génome de phage caudé contient des gènes de contrôle du métabolisme bactérien, de transcription et répllication, des gènes de structure (encapsidation de l'ADN, morphogenèse de la tête et de la queue) et des gènes de lyse bactérienne. En outre, les phages tempérés comme λ codent pour un groupe de gènes responsables de l'intégration dans le chromosome de l'hôte et le maintien de l'état lysogène (represseur c, intégrase, excisionase etc).

L'organisation du génome semble assurer un contrôle efficace du cycle phagique. Après injection du génome du bactériophage souvent co-injecté avec des protéines phagiques, l'ARN polymérase de l'hôte reconnaît des promoteurs situés au niveau du génome du phage, entraînant la transcription immédiate de gènes phagique précoces. Les protéines précoces fournissent une protection contre les mécanismes de défense de la bactérie (paragraphe 1.7), inhibent ou redirigent vers d'autres fonctions les enzymes bactériennes et prennent le contrôle du métabolisme cellulaire de la bactérie (Roucourt et Lavigne 2009 ; Hauser, Blasche *et al.* 2012). Grâce à ces interactions, les bactériophages créent des conditions optimales en vue d'établir un cycle d'infection efficace et dirigent certains composants de la machinerie de la cellule hôte vers la production de nouveaux virions. Les gènes précoces des phages sont généralement très spécifiques et ne sont pas conservés, même entre phages très proches et présentent parfois des réarrangements avec des gènes non homologues avec ceux disponibles dans les bases de données (Roucourt et Lavigne 2009). Contrairement aux phages tempérés qui dépendent de la cellule hôte pour leur réplication, les phages virulents (lytiques) codent souvent leur propre machinerie de réplication à l'exemple des phages apparentés à N4. La réplication donne lieu à des ADN concaténaires et une fois terminée, l'assemblage est assuré par les gènes tardifs qui codent pour les protéines de structure des virions. L'ADN du phage est empaqueté dans les procapsides grâce à la double activité de la terminase du phage dotée d'une nucléase qui est responsable du clivage de l'ADN répliqué et d'une ATPase qui facilite la translocation de l'ADN (Rao et Feiss 2008 ; Casjens et Thuman-Commike 2011). Après l'encapsidation de l'ADN, les protéines de la morphogénèse de la queue se lient à la surface de la protéine portale de la procapside afin d'amorcer l'assemblage de la queue. Une fois l'assemblage terminé, le peptidoglycane de la paroi bactérienne est dégradé par l'action de l'endolysine souvent après perméabilisation et déstabilisation par une autre enzyme appelée holine. Cette action va entraîner la lyse de bactérie et la libération des nouveaux virions pour infecter de nouvelles cellules.

Alors que les protéines de la morphogénèse de la tête sont généralement conservées, celles de la queue présentent des variations considérables au niveau nucléotidique. Dans la majorité des cas, les gènes précoces et tardifs sont groupés séparément dans le génome et sont parfois

transcrits dans des directions opposées. Chaque infection phagique est susceptible de contribuer à l'évolution des phages via des échanges entre génomes viraux et ADN de l'hôte. L'acquisition de fragments d'ADN est parfois facilitée par la structure modulaire des génomes de phages.

1.5.2. Mécanisme d'évolution et mosaïcisme des phages tempérés

Les bactériophages à ADN double brin dominés par l'ordre des *Caudoviridae*, ayant émergés à partir des virus à ARN ou indépendamment, constituent des vecteurs de transfert de gènes entre les populations bactériennes. Ils sont plus nombreux que les bactériophages des autres divisions et ont un génome qui varie entre 11,5 et 500 kpb. Même s'ils ne représentent qu'une fraction de la diversité des bactériophages, l'analyse de leur génome montre une organisation nettement en mosaïque qui résulte d'une évolution par transfert horizontal de gènes. Les phages peuvent échanger des fragments d'ADN par recombinaison non homologue ou illégitime entre différents génomes. Ce phénomène se produit aléatoirement partout dans le génome entre des séquences non similaires permettant au phage d'acquérir des gènes d'origine bactérienne. La plupart de ces événements de recombinaison se produisent au sein d'un gène, transformant la taille du génome du phage au-delà des limites utiles, ou perturbent des groupes de gènes, ce qui rend le phage recombinant non fonctionnel. Seuls quelques rares événements de recombinaison conduisent à un phage viable (Hendrix 2002). Par conséquent, des phages proches ont en commun des gènes de séquence similaires avec des transitions nettes aux régions adjacentes de gènes de séquence peu ou pas homologues. Les éléments génétiques qui ne présentent aucune similitude avec les gènes de phages apparentés sont appelés "morrans" et ont été mis en évidence dans les régions de la capsidie et la queue des génomes lambdaïdes HK97 et HK022 (Juhala, Ford *et al.* 2000). Dans le génome de la plupart de phages proches de P22, les gènes de structure des virions de phages se trouvent dans un cluster contigu à l'exception du gène de la pointe de la queue qui est séparé des autres par des "morrans" qui ne codent pas pour des protéines de la morphogénèse (Casjens et Thuman-Commike 2011). Au cours de l'évolution, ces "morrans" peuvent être délétés ou être maintenus par sélection positive et peuvent jouer un rôle essentiel dans l'adaptation des phages à de nouveaux environnements (Breitbart et Rohwer 2005).

Une forme particulière d'acquisition de matériel génétique entre les phages est le réassortiment génétique provoqué par recombinaison homologue. Ce phénomène a lieu entre les phages proches qui présentent dans leur génome de courtes régions de séquences homologues entre les gènes de modules différents favorisant le transfert d'un bloc de gènes entre les phages (Figure). Par exemple, les phages de *P. aeruginosa* apparentés à D3112 utilisent la même stratégie de répllication (par transposition) que le coliphage Mu (myovirus) mais ressemblent morphologiquement au phage lambda (Braid, Silhavy *et al.* 2004). Les génomes lambdoïdes possèdent des sites de recombinaison situés entre les blocs de gènes de la tête et la queue. Les phages λ et HK97 ont des gènes de queue assez similaires, mais les gènes de la capsidie sont très différents (Juhala, Ford *et al.* 2000). De même le phage P22 appartenant à la famille des podovirus (queue très courte) est généralement considéré comme un membre des phages "lambdoïdes" car ses gènes précoces et ceux de lyse sont pour la plupart des homologues de gènes du phage λ . L'organisation du génome et le sens de transcription des gènes sont très similaires. En outre, P22 peut former des hybrides viables avec le phage λ (Casjens et Thuman-Commike 2011). Bien que le réassortiment par recombinaison homologue contribue à l'évolution des phages, on ignore s'il s'agit du mécanisme général, les limites de gènes phagiques étant souvent associées à des régions de séquences conservées trop courtes pour être reconnue par la machinerie de recombinaison homologue (Hatfull et Hendrix 2011). D'autres mécanismes plausibles mais *a priori* rares comme la transposition de gènes, la recombinaison spécifique des site de liaison, ou la restriction par les endonucléases du phage pourraient contribuer au transfert d'un groupe de gènes entre les phages (Hatfull et Hendrix 2011). Récemment, l'analyse de gènes de structure de 57 phages apparentés à P22 a révélé la présence de sites de restriction situés au niveau des bornes de gènes dans certains génomes (Casjens et Thuman-Commike 2011). Toutefois, les échanges horizontaux surviennent fréquemment entre les phages très proches (même espèce phagique) mais sont rares entre des phages éloignés (Brussow et Hendrix 2002 ; Casjens et Thuman-Commike 2011).

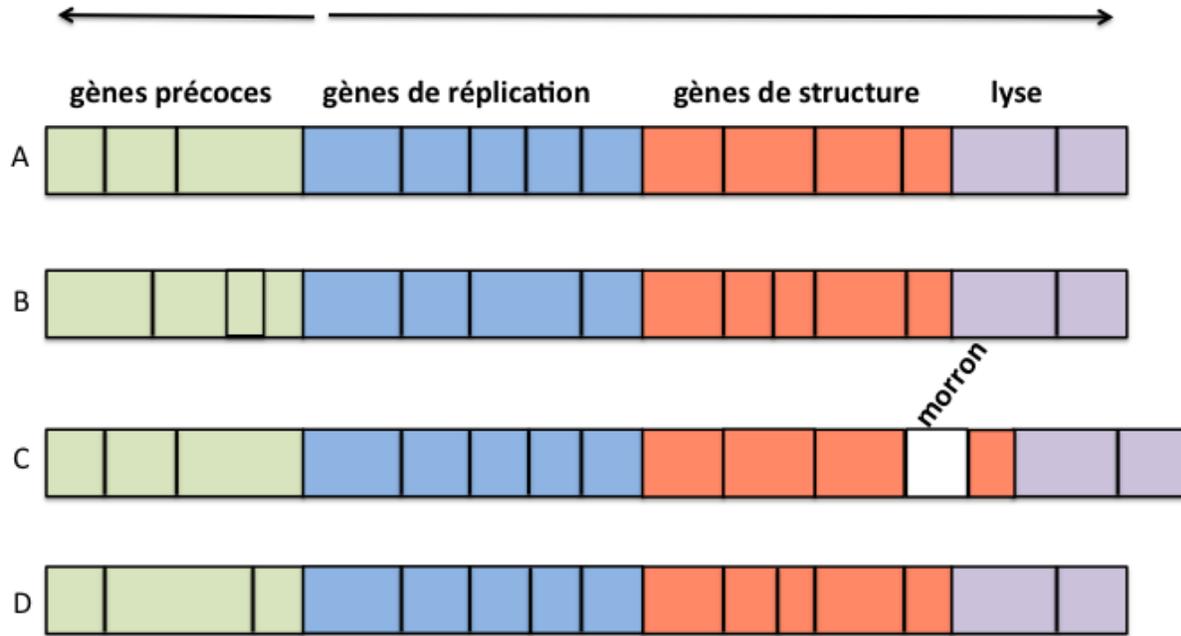


Figure 8: mécanisme d'évolution des phages appartenant à une même espèce. Les phages A et B sont très proches, partagent la même structure génomique et ont plusieurs gènes en commun. Par recombinaison non homologue (illégitime) le phage A acquiert un élément génétique appelé morron pour donner le phage C. Morron code pour une protéine dont la fonction est différente de celle des protéines de la morphogénèse et n'a pas d'homologue. Le phage D résulte d'une recombinaison homologue entre les phages A et B conduisant au transfert des gènes de structure de B vers A. Les gènes précoces sont généralement spécifiques au sein d'une espèce de phage. Les flèches indiquent le sens de transcription des gènes. En général, gènes précoces et gènes tardifs (gènes de structures) sont transcrits en sens opposé.

Les fonctions des phases ouvertes de lecture (ORF : Open Reading Frame) des phages restent largement inconnues, mis à part les gènes nécessaires à la structure et à l'assemblage du virion ainsi que ceux de la répliation de l'ADN qui peuvent souvent être identifiés, notamment du fait qu'ils sont en général disposés dans le même ordre au sein des phages similaires. Les fonctions putatives sont relativement rares et concernent moins de 30% des gènes de phages. Seulement la moitié des gènes de T4 (phage le plus étudié) ont été prédits comme des fonctions putatives. En outre, les génomes de phages contiennent des ORFs appelées ORFans qui n'ont pas d'homologues de protéine détectables dans les bases de données publiques GenBank/EMBL. L'analyse de 18368 ORFs de 280 génomes de phages a

révélé que près de 38% des ORF n'ont pas d'homologues avec d'autres phages et 30% n'en ont ni avec les génomes viraux, ni avec les procaryotes (Yin et Fischer 2008). La majorité des ORFans viraux a une séquence courte (moins de 100 aa) et résulte probablement d'un transfert latéral à partir de virus.

1.6. Les Bactériophages de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa est considérée comme l'exemple type des bactéries pathogènes opportunistes. Pratiquement inoffensive chez l'individu sain, la bactérie se révèle redoutable chez les sujets immuno-déficients et ceux souffrant d'affections chroniques comme la mucoviscidose. Outre un arsenal assez impressionnant de facteurs de virulence, *P. aeruginosa* possède les mécanismes lui permettant de résister naturellement à de nombreux agents antibactériens, de coloniser les surfaces inertes et les épithéliums (animaux et végétaux), de former des biofilms protecteurs. Par conséquent, les bactériophages infectant *P. aeruginosa* ont depuis longtemps fait l'objet d'études et ont été utilisés pour le typage de souches bactériennes dans un processus appelé lysotypie. La possibilité de caractériser les souches de *P. aeruginosa* selon des profils de lyse a été montrée dans les années 1950 ; depuis ce temps 13 panels de phages ont été introduits. Le plus réussi est celui proposé en 1964 par Lindberg contenant 18 phages (Lindberg et Latta 1974) morphologiquement repartis en 8 groupes (Figure 9), tous des phages caudés. Certains de ces phages ont été entièrement séquencés durant ces dernières années (Kwan, Liu *et al.* 2006).

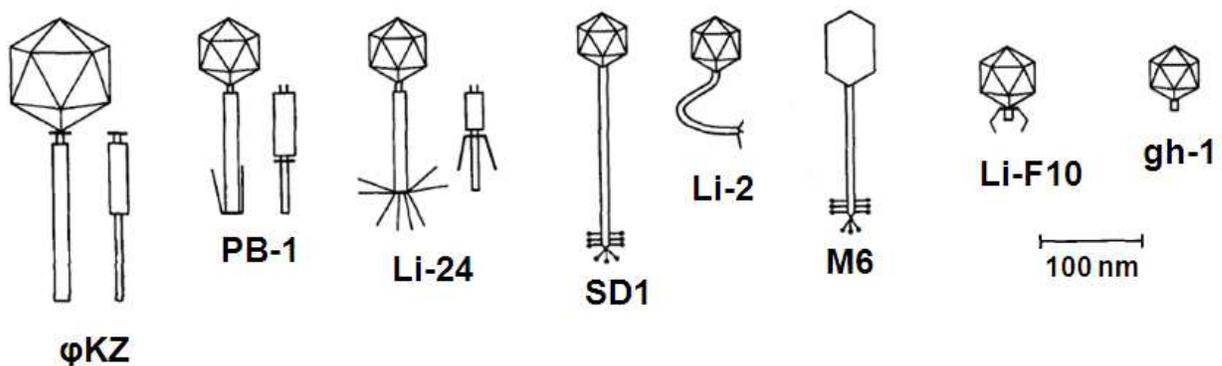


Figure 9: Représentation schématique des différents morphotypes de phages appartenant au panel de Lindberg (Ackermann, Cartier *et al.* 1988)

Grâce au progrès des méthodes de séquençage, les génomes des bactériophages sont de plus en plus souvent séquencés bien que les génomes disponibles dans les bases de données ne représentent qu'en moyenne 10% des phages isolés. Plus de 60 phages du genre *Pseudomonas* ont été entièrement séquencés (la plupart étant des phages de *P. aeruginosa*), derrière ceux infectant les entérobactéries et *Mycobacterium* (Figure 10). La majorité des phages séquencés appartient à l'ordre des *Caudoviridae* (tableau 2).

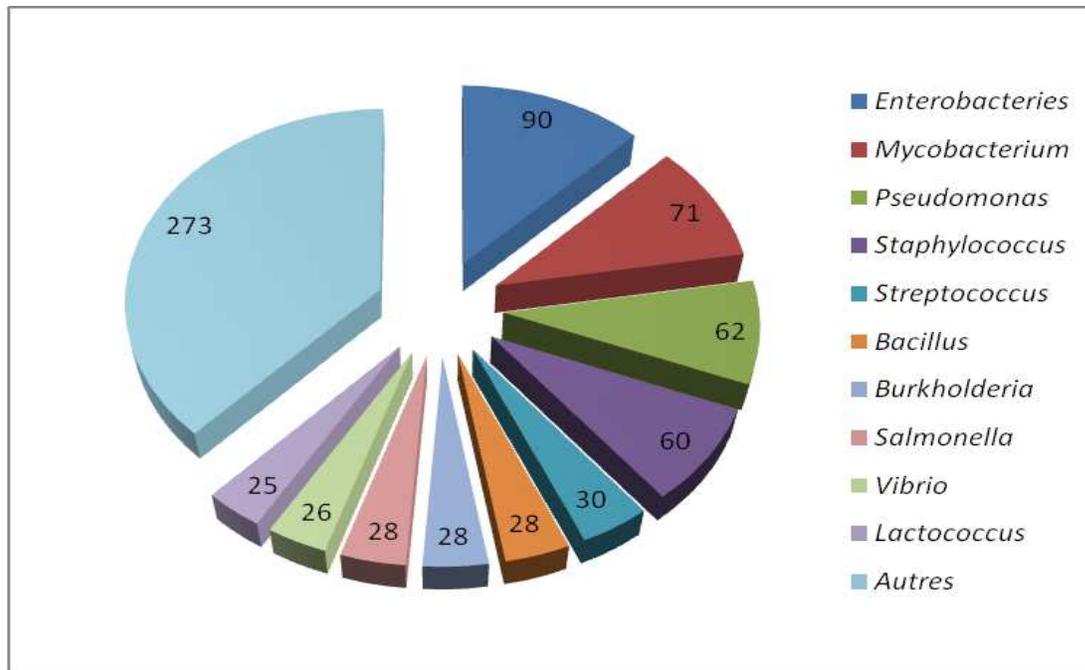


Figure 10 : Nombre de phages séquencés par genre bactérien et consulté le 6 novembre 2012. Les phages du genre *Pseudomonas* majoritairement ceux infectant l'espèce *P. aeruginosa* occupent la 3^{ème} place derrière les phages des enterobactéries et ceux de *Mycobactérium*.

1.6.1. Les myovirus

Les phages appartenant aux *Myoviridae* sont munis d'une queue longue qui se contracte lors de l'infection. Parmi les myovirus, le phage ϕ KZ représente un groupe de phages (genre) avec une capsidie icosaédrique de grande taille (~140nm de diamètre) et une longue queue contractile de près de 200nm avec des fibres en vrac (Ackermann, Cartier *et al.* 1988). Le génome du phage ϕ KZ fait environ 280kb (Mesyanzhinov, Robben *et al.* 2002) et est parmi les plus grands génomes de phages séquencés à ce jour. Ce phage présente jusqu'à 99% de

similarité au niveau nucléotique avec le phage SD1-M (Kwan, Liu *et al.* 2006). Une autre espèce est représentée par le phage Lin68 qui possède une queue nettement plus courte que celle du phage ϕ KZ (Krylov, Pletneva *et al.* 2003). Le phage EL est le plus éloigné du groupe avec un génome de 211kb (Hertveldt, Lavigne *et al.* 2005), et représente une autre espèce de phages géants de *P. aeruginosa*. Les phages du groupe ϕ KZ sont instables au cours de l'infection menant parfois à une pseudolysogénisation de la bactérie hôte (Krylov, Pletneva *et al.* 2011 ; Krylov, Shaburova *et al.* 2012). Malgré la possibilité d'effectuer une transduction généralisée, les phages ϕ KZ sont beaucoup employés dans les mixtures de phages thérapeutiques en Russie (Krylov, Shaburova *et al.* 2012).

Les phages apparentés au phage PB-1 forment un autre genre de la famille des myovirus. Les membres de ce groupe sont caractérisés par des capsomères visibles, apparaissant sous forme de dépressions ressemblant à une coupe d'environ 8nm de diamètre sur la tête des phages, et avec une queue portant quatre fibres caudales, pliées en état de repos le long de la gaine (Ackermann, Cartier *et al.* 1988). Plus de 40 phages proches du phage PB-1 ont été décrits, principalement sur la base de leur morphologie (une tête d'environ 70nm de diamètre et une queue de 140nm en moyenne) et par hybridation ADN-ADN (Ceysens et Lavigne 2010 ; Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012). Ils possèdent un large spectre d'hôte et utilisent le LPS comme récepteur. Malgré leur abondance, seulement 8 génomes ont été séquencés (PB-1, 14-1, LBL3, LMA, SN, F8, JG024 et NH-4). Ces phages sont remarquablement semblables les uns aux autres (96% de similarité) avec un génome d'environ 65kb et sont strictement virulents (Ceysens, Miroshnikov *et al.* 2009). Les phages appartenant à ce groupe, à l'exemple du phage 14-1, ont été employés dans des essais thérapeutiques chez les brûlés (Merabishvili, Pirnay *et al.* 2009). Récemment, l'efficacité du phage JG024 a été testée dans les conditions similaires à une infection pulmonaire chronique chez des patients atteints de mucoviscidose (Garbe, Wesche *et al.* 2010).

Le troisième genre représenté par le phage Li-24 est constitué de phages morphologiquement identiques au phage Felix O1 de Salmonella. La queue présente une configuration croisée de sous unité et une plaque basale qui se sépare facilement de la gaine au cours de la contraction, une caractéristique commune avec le genre PB-1. Toutefois, les phages se

distinguent par une queue sur laquelle sont fixées huit fibres caudales (Ackermann, Cartier *et al.* 1988). Debarbieux et col ont décrit le phage PAK-P1 comme étant morphologiquement proche de Felix O1 (Debarbieux, Leduc *et al.* 2010). Deux autres phages, PaP1 (HQ832595.1) et JG004 (Garbe, Bunk *et al.* 2011) ont été isolés respectivement en Chine et en Allemagne. Un autre phage du genre PB-1 a été isolé au Mexique (Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012) montrant que ce genre est largement répandu à travers le monde. Ces phages ont un génome de plus de 91kb comprenant 12 ARNt (ARN de transfert) et dépourvu de gènes responsables de la lysogénisation. À l’instar du groupe PB-1, ils dépendent de la présence du LPS et présentent un spectre de virulence assez large (Garbe, Bunk *et al.* 2011). Deux autres phages, KPP10 (Uchiyama, Rashel *et al.* 2012) et PAK-P3 (Morello, Saussereau *et al.* 2011) avec un génome de 88kb, et de morphotype A1 Felix O1 ne présentent pas d’homologie au niveau nucléotidique avec les phages PAK-P1, JG004, PaP1 mais montrent des similarités au niveau protéique avec certaines ORFs (Uchiyama, Rashel *et al.* 2012). Des résultats prometteurs ont été obtenus avec les phages PAK_P1 et PAK_P3 utilisés dans des études expérimentales de phagothérapie pour combattre les infections pulmonaires aiguës provoquées par *P. aeruginosa* chez des souris (Debarbieux, Leduc *et al.* 2010 ; Morello, Saussereau *et al.* 2011).

Contrairement aux autres phages décrits plus haut, le phage phi CTX est un phage tempéré responsable de la conversion lysogénique de la bactérie hôte (Hayashi, Baba *et al.* 1990). Son génome de 35kb code le gène de la cytotoxine *ctx* qui est exprimé une fois le phage intégré dans le génome bactérien rendant la bactérie virulente. Un prophage proche de phi CTX mais dépourvu du gène *ctx* a été identifié dans le génome de la souche de *P. aeruginosa* PSE9 (Battle, Rello et Hauser 2009).

1.6.2. Les Siphovirus

Les siphovirus sont caractérisés par une longue queue flexible non contractile et sont les plus nombreux des phages caudés décrits chez *P. aeruginosa* (Ackermann 2007). La majorité des phages appartenant à cette famille est tempérée. Ceysens et col. ont signalé l’existence de 8 espèces de siphovirus chez *P. aeruginosa* (Ceysens et Lavigne 2010) et très récemment de

nouvelles espèces supplémentaires ont été rapportées (Cady, Bondy-Denomy *et al.* 2012 ; Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012).

Les mieux étudiés sont les phages transposables B3 (Braid, Silhavy *et al.* 2004) et D3112 (Wang, Chu et Guttman 2004) de morphotype SD1 (Figure) isolés chez *P. aeruginosa*. Ces phages se répliquent par transposition de leur génome à l'instar du coliphage Mu (myovirus), mais ressemblent morphologiquement au phage lambda (Braid, Silhavy *et al.* 2004). Le génome d'environ 36kb présente une structure très mosaïque. Des gènes homologues aux phages ont été retrouvés chez les souches de *E. coli*, *S. enterica*, *V. cholerae* et *H. influenzae* (Ceysens et Lavigne 2010). De plus, la réplication du phage MP22 est inhibée en présence du phage D3112 de nature similaire (exclusion de surinfection) alors que ce dernier se développe en présence du phage MP22. (Heo, Chung *et al.* 2007). Ce comportement est lié à la nature du gène *c* répresseur responsable de la lysogénéisation des phages. Un autre phage proche, DMS3, est capable d'effectuer une transduction généralisée de fragments d'ADN entre des souches de *P. aeruginosa* PA14 et PAO1 (Budzik, Rosche *et al.* 2004). Alors que tous les phages de ce groupe sont tempérés, un phage strictement lytique proche de D3112 a été signalé récemment. Le phage PA1Ø est dépourvu de gène répresseur *c* et est capable de lyser en plus de *P. aeruginosa*, la bactérie *Shigella sonnei* et même les bactéries Gram positif comme *S. aureus*, *S. salivarius* et *Listeria monocytogenes* (Kim, Rahman *et al.* 2012).

Un autre genre au sein des Siphovirus est représenté par le phage D3, qui provoque la conversion de sérotype O5 en O16 de l'hôte au cours de la lysogénéisation (Kuzio et Kropinski 1983). Le phage D3 n'est pas transposable mais morphologiquement identique à D3112. Son génome est nettement plus grand (56 kb) et a la possibilité de s'intégrer à deux locus distincts dans le génome de l'hôte (Kropinski 2000). Basé sur l'organisation génomique, PAJU2 (45kb) est le seul phage proche de D3 mais morphologiquement distinct avec une tête allongée (Uchiyama, Rashel *et al.* 2009).

Le troisième genre est constitué de phages ayant une tête allongée et représentés par les phages YuA et M6. Ces phages sont dépendants des pilus de type IV et leur génome d'environ 58kb (Kwan, Liu *et al.* 2006 ; Ceysens, Mesyanzhinov *et al.* 2008) présente des

similarités avec celui du phage PhiJL001 (63kb) qui infecte une bactérie marine (Lohr, Chen et Hill 2005). Une vingtaine de phages dont MP1412 (61kb) (Bae, Chung *et al.* 2012) est apparentée au groupe YuA sur la base d'hybridation d'ADN (Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012). Ils portent dans leur génome des protéines anti-restrictions et des enzymes de modification qui les protègent contre les endonucléases bactériennes.

D'autres phages comme PA11 (49kb), F10 (39kb) et PA73 (49kb, collection Lindberg) sont moins étudiés (Ceysens et Lavigne 2010). Le phage PA73 morphologiquement identique au phage D3112 (Ackermann, Cartier *et al.* 1988), présente des similitudes importantes dans les gènes responsables de la morphogénèse de tête avec le phage YuA (Ceysens, Mesyanzhinov *et al.* 2008). Récemment un phage strictement virulent, Kakheti25, proche du phage 73, a été signalé en Géorgie (Karumidze, Thomas *et al.* 2012) et pourrait être utilisé en phagothérapie en raison de son spectre de virulence assez large.

1.6.3. Les Podovirus

Les phages appartenant aux Podovirus se distinguent nettement des autres caudovirus par une queue très courte. Au sein de cette famille, les phages se différencient par leur stratégie de répllication et l'organisation du génome. Il existe environ 5 genres différents de podovirus de *P. aeruginosa*. Le genre PhiKMV-like renferme les phages qui ressemblent au coliphage T7 mais leur génome d'au moins 42kb code le gène de l'ARN polymérase situé en aval des gènes de modification du métabolisme de l'ADN bactérien, au lieu des gènes précoces (Lavigne, Burkal'tseva *et al.* 2003 ; Ceysens et Lavigne 2010). Deux espèces différentes de phages sont distinguables au sein du genre. Les phages comme LK16, LUZ19, PT2, PT5 et PhikF77 sont très proches du phage PhiKMV (premier décrit chez *P. aeruginosa*) avec une similarité allant jusqu'à 97% tandis que le phage LKA1 présente seulement 48% d'homologie au niveau nucléotidique avec PhiKMV (Ceysens, Lavigne *et al.* 2006 ; Kulakov, Ksenzenko *et al.* 2009). LKA1 utilise le LPS comme récepteur contrairement aux phages PhiKMV-like qui se servent de l'adhésine du pilus de type IV pour infecter leur hôte (Ceysens, Lavigne *et al.* 2006). Tous les phages proches de PhiKMV portent dans leur génome des cassures simple brin intergéniques, un trait génomique distinctif observé

uniquement chez le coliphage T5 (Kulakov, Ksenzenko *et al.* 2009). Ces régions interrompues sont supposées jouer un rôle au cours de l'encapsidation de l'ADN. En outre, le phage LUZ24 a été signalé comme très proche de PhiKMV sur la base de l'analyse *de novo* de protéines structurales phagiques (Ceysens, Noben *et al.* 2009). Au niveau phénotypique, les espèces proches de PhiKMV font de très grosses plages de lyse (4-5mm de diamètre), ce qui reflète un temps très court de répliation (Ceysens, Lavigne *et al.* 2006 ; Ceysens, Glonti *et al.* 2011) et les virions sont le plus souvent associés à la production d'alginate dépolymérase, enzyme capable de dégrader le biofilm bactérien (Glonti, Chanishvili et Taylor 2010). Ces phages virulents lysent leur hôte grâce à l'action combinée de l'endolysine et de la holine (Ceysens et Lavigne 2010). Bien que des insertions et délétions aient été observées dans leur génome, les phages proches de PhiKMV évoluent principalement de façon verticale (Lavigne, Burkal'tseva *et al.* 2003).

Un second genre est représenté par le phage virulent LUZ24 (Ceysens, Hertveldt *et al.* 2008) bien que le premier décrit soit le phage PaP3 (Tan, Zhang *et al.* 2007). Ce dernier a été décrit comme tempéré capable de s'intégrer au génome bactérien via le gène ARNt Lys plutôt que l'intégrase. Toutefois, les deux phages sont proches avec 71% de similarité (Ceysens, Hertveldt *et al.* 2008). Récemment le phage virulent MR299-2 capable de dégrader le biofilm formé par *P. aeruginosa* dans un modèle animal de mucoviscidose a été signalé comme très lié à ces deux phages (Alemayehu, Casey *et al.* 2012). Les phages de ce groupe sont morphologiquement indistinguables de PhiKMV mais partagent peu d'homologie avec les gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN et sont entièrement dépendant de l'hôte pour la répliation car leur génome est dépourvu d'ARN polymérase (Ceysens et Lavigne 2010). Le genre LUZ24 partage l'organisation génomique bidirectionnelle avec des phages infectant d'autres espèces bactériennes. Toutefois les phages PaP3 isolé en Chine et MR299-2 isolé en Irlande possèdent quatre ARNt (ARNt-Asn, ARNt-Asp, ARNt-Pro et ARNt-Tyr) tandis que LUZ24 en possède deux. Capable de lyser les souches multi-résistantes aux antibiotiques, le phage virulent LUZ24 possède des protéines de décoration de tête (Ceysens, Hertveldt *et al.* 2008).

Le troisième genre comprend les phages capables de se multiplier comme le coliphage N4. Ce phage utilise trois ARN polymérase (ARNPs) différentes, y compris une ARNP géante de 3500 acides aminés, résistante à la rifampicine, qui est co-injectée avec l'ADN viral (ARNPv) au cours du cycle infectieux. Une fois dans le cytoplasme, l'ARNPv déclenche la transcription à partir de promoteurs localisés au niveau des gènes précoces du génome. Des phages proches de N4 (phage considéré comme orphelin pendant de nombreuses années) et infectant différentes espèces bactériennes dont *P. aeruginosa* ont été récemment caractérisés. Trois phages LIT1, PVE2 et LUZ7 dont le génome est de 72kbp ont la même architecture globale ainsi que 25 produits de gènes essentiels au coliphage N4 et des phages proches, EE36φ1 et DSS3φ2, qui infectent les bactéries marines *Roseobacter* (Zhao, Wang *et al.* 2009 ; Ceysens et Lavigne 2010). Les phages LIT1 provenant des eaux usées d'un hôpital belge, et PVE2 issu d'une station d'épuration aux USA, sont très proches (94% de similarité) alors que LUZ7 de même origine que LIT1 est plus distant avec 58% de similarité et partage seulement 60 protéines (Ceysens, Brabban *et al.* 2010). En revanche, les virions associés à ces trois phages contiennent un ARN géant de 3398 acides aminés qui est dépourvu de résidus de cystéine. Les phages de *P. aeruginosa* sont morphologiquement distincts de N4 bien que l'ordre des gènes de structure soit conservé dans l'ensemble. Ils ne possèdent pas les protéines de décoration de la tête observées chez N4 (Ceysens, Noben *et al.* 2009). En outre, des réarrangements importants sont observés entre les gènes de réplication de l'ADN, de la morphogénèse de la queue et de la lyse de l'hôte. Les deux espèces LIT1/PEV2 et LUZ7 sont dépourvues d'ARNt contrairement à N4 qui code pour trois gènes d'ARNt (Ceysens, Brabban *et al.* 2010). Chez LIT1/PEV2 et LUZ7, l'ensemble de gènes de queue de N4 est remplacé par un groupe de gènes intégrés (en orientation inverse) dans le module de réplication (ORFs 52-59 de LUZ7, 48-56 ORFs de LIT1) (Ceysens, Brabban *et al.* 2010). Ces protéines affichent de fortes similarités avec des protéines de prophage de *P. aeruginosa* et des protéines de queues de différents autres podovirus. Les phages de *P. aeruginosa* proches de N4 pourraient donc avoir acquis les gènes codant pour les protéines caudales à partir d'un prophage de l'hôte. Ces gènes sont fortement régulés dans les conditions de stress comme l'infection phagique. Par ailleurs, quelques différences notables sont présentes au sein des deux espèces, comme la fusion de ORF52 et ORF53 de LIT1 en un seul grand gène

(ORF56) chez LUZ7, une des raisons de différences observées dans la morphologie de queue entre ces phages. Le phage PA26 isolé dans un réservoir d'eau en Corée du Sud est très proche de LIT1 au niveau nucléotidique mais est morphologiquement très différent (Kim, Cha et Myung 2012). Bien que l'ORF56 de LIT1 soit très similaire, le phage PA26 est muni d'une longue queue contractile (myovirus). Toutefois ORF53, une des protéines impliquées dans la morphogénèse de la queue, présente peu d'homologie avec celle de PA26. Les phages de *P. aeruginosa* proches de N4 sont dépourvus d'endolysine, enzyme responsable de la lyse bactérienne. La région du génome codant pour l'acétylmuramidase de N4 et l'endolysine de EE36φ1 (Zhao, Wang *et al.* 2009) est délétée chez les deux espèces LUZ7 et LIT1/PEV2 qui utiliseraient donc un autre mécanisme pour lyser l'hôte (Ceyssens, Brabban *et al.* 2010).

Un quatrième genre est représenté par le phage tempéré F116 de 65kbp qui utilise le pilus de type IV comme récepteur (Byrne et Kropinski 2005). En dépit de la présence d'un gène codant pour l'intégrase, le phage F116 se maintient sous forme circulaire comme un plasmide au cours de son cycle lysogénique. Pour infecter son hôte, le phage dégrade l'alginate, lui permettant ainsi d'accéder à ses récepteurs. Aucun phage proche n'est actuellement décrit et F116 est considéré comme un phage orphelin.

Comme le quatrième, le dernier genre comprend des phages tempérés PaP2 et 119X, qui affichent 93% d'identité de séquence de nucléotides (Kwan, Liu *et al.* 2006) malgré leur origine et période d'isolement assez distinctes. Le phage 119X est l'un des phages de la collection de Lindberg (Lindberg et Latta 1974) et est morphologiquement semblable au coliphage T7 (Ackermann, Cartier *et al.* 1988).

Tableau 2 : classification selon ICTV et caractéristiques des bactériophages de *Pseudomonas aeruginosa*

Famille	Sous-famille	Genres	Espèces	Génome (Kbp)	Recepteurs	Cycle	Phages proches
<i>Myoviridae</i>	Non assigné	Phikzlikevirus	- phiKZ	280	LPS	lytique	SD1-M, Lin21, PTB80, NN
			- EL	211	LPS	lytique	RU
			- Lin68	Non séquencé	LPS	lytique	
		Pb1likevirus	- PB1	65	LPS	lytique	JG024, NH-4, KPP12
			- SN	66	LPS	lytique	
			- 14-1	66	LPS	lytique	
			- F8	66	LPS	lytique	
			- LBL3	70	Autre	lytique	
			- LMA2	70	Autre	lytique	
		Non assigné	- PAK-P1	93	LPS	lytique	JG004, PaP1
			- PAK-P3	88		lytique	KPP10
			- PhiCTX	35	LPS	tempéré	
		<i>Podoviridae</i>	<i>Autographivirinae</i>	Phikmvlikevirus	- PhiKMV	42	Pili IV
- LKA1	43				LPS	lytique	
Non assigné	Luz24likevirus		- LUZ24	45	LPS, Pili IV	lytique	MR299-2
			- PaP3	45	Pili IV	tempéré	
			N4likevirus	- LIT1	72	Pili IV	lytique
Non assigné			- LUZ7	74	LPS	lytique	
			- F116	65	Pili IV	tempéré	
			- 119X	43		tempéré	PaP2
<i>Siphoviridae</i>	Non assigné		Yualikevirus	- Yua	58	Pili IV	tempéré
		- M6		59	Pili IV	tempéré	
		D3112likevirus	- D3112	37	Pili IV	tempéré	DMS3, PM22, MP29, MP38, JDB24
			- B3	38	Pili IV	tempéré	
		D3likevirus	- D3	56	LPS	tempéré	
			- PAJU2	46	LPS	tempéré	
		Non assigné	- PA73	42	Pili IV	tempéré	Kakheti25
			- PA11	49		tempéré	
	- F10	39		tempéré			

1.7.Mécanisme de résistance bactérienne : course aux armements

Le processus lytique du phage se déroule en plusieurs étapes comprenant l'adsorption, l'injection du matériel génétique, le métabolisme (transition), la réplication, la morphogénèse et la libération des nouveaux virions. Le cycle d'un phage est complet dans la mesure où les différentes étapes sont menées de façon productive conduisant à la libération de virions et l'infection de nouvelles cellules. Les bactériophages sont les virus probablement les plus anciens, étant apparus au début de l'évolution bactérienne estimée à 2 milliards d'années. Par conséquent, les bactéries et les bactériophages ont une longue histoire évolutive commune. Pour éviter leur extinction face à la menace des phages, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance contre les bactériophages. Ces mécanismes très variés et en constante évolution, permettent la survie des bactéries. Les bactériophages une fois qu'ils s'adaptent aux systèmes de défense bactériens, élaborent des stratégies pour contourner ces mécanismes anti-phages et restaurer leur capacité infectieuse.

1.7.1. Blocage de l'adsorption : rôle des récepteurs bactériens

Comme tous les virus, les bactériophages ne s'attachent pas au hasard à la surface de la cellule hôte. Ils se fixent à des sites bien spécifiques appelés récepteurs. La sélection naturelle des interactions coévolutives entre bactéries et phages porte souvent sur la capacité d'un phage à se fixer à la surface d'une bactérie, et la capacité des bactéries à empêcher l'adsorption. L'adsorption constitue la première étape du cycle infectieux et est l'un des événements les plus complexes puisque la nature des récepteurs est spécifique de l'hôte et varie avec le phage (Shin, Lee *et al.* 2012). Les lipopolysaccharides (LPS), les protéines de la paroi cellulaire, les acides teichoïques, le flagelle, les pilus et la capsule peuvent servir de récepteurs et sont également impliqués dans la pathogénicité de la bactérie. Les différences entre les propriétés de ces récepteurs sont en partie responsables du spectre d'hôte des phages. Outre la diversité des récepteurs, les bactéries ont développé des mécanismes pour empêcher l'adsorption des phages. Ces mécanismes peuvent être divisés en au moins trois catégories : la perte de fonction des récepteurs, la production de matrice extracellulaire et la

production d'inhibiteurs (Hyman et Abedon 2010 ; Labrie, Samson et Moineau 2010). Les récepteurs sont des structures superficielles bactériennes et sont souvent rendues inaccessibles par la production par la bactérie d'une matrice extracellulaire bloquant l'adsorption des phages. Cette barrière physique entre les phages et leurs récepteurs est contournée par certains phages capables de produire des enzymes de dégradation au cours de l'infection. Chez *Azotobacter* la production de l'alginate est liée à l'augmentation du niveau de résistance aux phages. Toutefois, l'alginate est activement dégradé par les virions, par la production d'alginate lyase (Davidson, Lawson et Sutherland 1977) ou alginate dépolymérase. Plusieurs phages du genre *Pseudomonas* produisent également l'enzyme exopolysaccharide dépolymérase. Les phages ont la capacité de réduire *in vitro* la viscosité d'un alginate et de provoquer la lyse de bactéries sous forme de biofilm (Hanlon, Denyer *et al.* 2001). Pour infecter son hôte, le podophage F116 de *P. aeruginosa* commence par dégrader l'alginate réduisant ainsi sa viscosité et facilitant la dispersion du phage (Hanlon, Denyer *et al.* 2001). Des phages proche de PhiKMV (Lavigne, Burkal'tseva *et al.* 2003) possèdent une activité dépolymérase capable de dégrader le biofilm (Glonti, Chanishvili et Taylor 2010). De même les virions du phage $\phi 15$ infectant l'espèce *P. putida*, morphologiquement identiques au coliphage T7, présentent des propriétés associées à la dégradation des biofilms (Cornelissen, Ceysens *et al.* 2011). Par ailleurs, la lyase produite par certains phages peut avoir une affinité pour la capsule polysaccharidique de certaines espèces comme l'illustre le bactériophage JA dirigé contre *V. cholerae* O139 (Linnerborg, Weintraub *et al.* 2001). Le spectre d'action de ces enzymes de dégradation est cependant très restreint (Sutherland, Hughes *et al.* 2004) contrairement à certains dérivés phagiques comme la lysine PlyC produite par le phage C1 infectant les *Streptococcus* du groupe C (Nelson, Schuch *et al.* 2006).

Une fois la difficulté franchie, le phage peut être confronté à une modification du récepteur due à des mutations. L'adsorption abortive ne requiert pas nécessairement la perte totale du récepteur phagique. Même un changement modeste dans la structure d'un récepteur peut avoir des effets dramatiques sur la liaison de phages sans trop affecter le fonctionnement normal (Hyman et Abedon 2010). Ce phénomène est fréquent malgré le rôle important des

récepteurs phagiques dans le métabolisme bactérien. Chez *P. aeruginosa* bien que les résistances aux phages liées à l'altération du LPS aient été signalées, la majorité des phages utilise les pilus de type IV (Ceysens, Noben *et al.* 2009). Le pilus de type IV et le flagelle sont les principaux acteurs dans l'adhésion de la bactérie aux cellules cibles (Bucior, Pielage et Engel 2012) et jouent un rôle majeur dans la formation du biofilm (O'Toole et Kolter 1998). De même la protéine de la membrane externe OmpA de *E. coli* qui sert de récepteur pour les coliphages comme K3 peut aussi intervenir dans l'adhésion et l'invasion, tout comme dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte et participe également à la formation de biofilms (Smith, Mahon *et al.* 2007). La perte d'un tel récepteur rend la bactérie non virulente. D'autres facteurs indépendants des mutations peuvent affecter le fonctionnement des récepteurs. Chez certaines souches de *H. influenzae* la perte du récepteur phagique lipooligosaccharide (LOS) due à la duplication d'un gène de biosynthèse de LOS entraîne le dysfonctionnement du système restriction-modification (R/M) (Zaleski, Wojciechowski et Piekarowicz 2005). Le système R/M est l'un des moyens de défense protégeant la bactérie contre l'invasion d'ADN étranger y compris l'infection phagique et son inactivation pourrait être profitable à certains bactériophages qui n'utilisent pas LOS comme récepteurs.

1.7.2. Systèmes de Restriction/ modification (R/M)

Les génomes bactériens contiennent une grande variété de systèmes génétiques qui agissent biologiquement pour protéger l'hôte contre les infections phagiques en ciblant chaque étape de leur cycle (Labrie, Samson et Moineau 2010). Le système de restriction/modification (R/M) présent chez la majorité des espèces bactériennes protège la bactérie contre l'invasion d'ADN étranger provenant d'un phage ou d'un plasmide. Il existe 4 types de système R/M classés en fonction de leur composition et de leur mécanisme d'action (Tock et Dryden 2005). Le système de type II est le plus fréquent et ne nécessite pas d'énergie pour son action (Pingoud, Fuxreiter *et al.* 2005) (Taylor et Stoddard 2012). Certaines espèces bactériennes comme *N. gonorrhoeae* et *H. pylori* ont respectivement 16 et 30 systèmes R/M différents (Jeltsch 2002) probablement acquis par transfert horizontal de gènes (Jeltsch et Pingoud 1996).

Les systèmes R/M comprennent deux activités enzymatiques: une méthyltransférase qui modifie les résidus adénine (A) ou cytosine (C) à certains sites de coupure (Jeltsch 2002) et une endonucléase de restriction qui reconnaît spécifiquement de courtes séquences nucléotidiques de 4-8bp et clive l'ADN étranger non modifié par les méthylases (Pingoud et Jeltsch 1997). L'enzyme de restriction est souvent plus active que la méthylase, et l'ADN du phage entrant est généralement clivé du fait de l'abondance des enzymes de modification de la bactérie. De plus, les méthylases agissent généralement de façon très spécifique (Jeltsch 2002). Lorsque l'ADN du phage est méthylé, les nouveaux virions deviennent insensibles à l'enzyme de restriction correspondante et infectent alors les cellules voisines contenant le même système R/M. Le phage reste insensible jusqu'à ce qu'il infecte une bactérie qui ne code pas pour le même gène de méthylase. Les nouveaux virions non protégés deviennent à nouveau sensibles au système de R/M de la bactérie originale (Labrie, Samson et Moineau 2010).

Pour faire face à ces systèmes R/M, les phages ont développé plusieurs stratégies. Une de ces stratégies est l'absence de sites de reconnaissance dans leurs génomes grâce à l'accumulation de mutations ponctuelles (Skiena 2001). Plusieurs génomes de phages (~ 400) codent pour des enzymes de modification de nucléotides conduisant à leur protection (www.rebase.com). Par exemple, le phage T4 synthétise un composant inhabituel, hydrométhyl cytosine (HMC), un nucléotide modifié qui remplace la cytosine dans l'ADN du phage. En présence de HMC, la réplication de l'ADN est modifiée par addition du glucose au résidu HMC qui protège l'ADN du phage contre l'attaque par les endonucléases (Labrie, Samson et Moineau 2010). Le prophage CP-933R de la souche *E. coli* O157:H7 code pour une 5-cytosine méthyltransférase empêchant la digestion par NotI (Chiou, Li *et al.* 2010). De même, le bactériophage transposable B3 de *P. aeruginosa* code pour une adénine-méthyltransférase (Braid, Silhavy *et al.* 2004). Des enzymes de modification d'ADN ont également été signalées dans le génome du phage tempéré F116 (Byrne et Kropinski 2005) et du phage virulent JG004 (Garbe, Bunk *et al.* 2011). Le génome du phage XP12 de *Xanthomonas campestris* morphologiquement identique au phage M6 de *P. aeruginosa*, un siphovirus avec

une tête allongée (Ackermann, Cartier *et al.* 1988) contient des cytosines substituées par la 5-méthylcytosine.

D'autres stratégies anti-restriction faisant intervenir des protéines inhibitrices sont utilisées par certains phages. Le phage YuA dirigé contre *P. aeruginosa* porte dans son génome une protéine inhibitrice appelé ArdB (ORF45) (Ceysens, Mesyanzhinov *et al.* 2008). Généralement d'origine plasmidique, la protéine Ard inhibe le système R/M de type I protégeant l'ADN plasmidique ou phagique non modifié, de la dégradation. Cette protéine est également retrouvée dans le génome du coliphage T7 ainsi que la protéine Ocr (Overcome classical restriction activity) qui inhibe l'action de EcoRI (Zavilgelskii, Kotova et Rastorguev 2011). Le phage T7 utilise un procédé à deux étapes d'injection de l'ADN. Seule une faible partie de son génome comprenant le gène qui code pour la protéine Ocr est d'abord injecté. Immédiatement, la protéine Ocr s'exprime en se liant directement à certaines enzymes de restriction d'*E.coli* telles que *EcoRI*. Après inhibition des endonucléases, le reste du génome est transféré dans la cellule bactérienne pour initier le cycle lytique. Dans leur course aux armements, certaines bactéries ont acquis la capacité de contourner les mécanismes anti-restriction.

1.7.3. Système CRISPRs-Cas

Décrit pour la première fois dans le génome de *E. coli* (Ishino, Shinagawa *et al.* 1987), la structure CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associée aux gènes *cas* constitue un mécanisme unique de résistance bactérienne aux infections phagiques. Le locus CRISPR est retrouvé dans le génome d'environ 50% de bactéries et chez la plupart des archae (Grissa, Vergnaud et Pourcel 2007). Il est caractérisé par une série de répétitions d'un motif bien conservé (*direct repeat* : DR) d'une taille comprise entre 21 et 48 pb, espacées par des séquences uniques mais de longueur constante (*spacer*) de 26-72pb le plus souvent homologues à des séquences de phages ou plasmide (Bolotin, Quinquis *et al.* 2005 ; Pourcel, Salvignol et Vergnaud 2005) (Figure 11). Le premier DR est parfois précédé d'une région riche en (A-T) appelée Leader qui sert de région promotrice de la transcription du CRISPR (Marraffini et Sontheimer 2010). La présence d'un locus CRISPRs dans un

génomique est associée à des gènes appelés *cas* (CRISPR associated gene) qui forment avec celui-ci le système CRISPR-Cas. Un système *cas* peut assurer le fonctionnement de plusieurs structures CRISPR en *cis* ou en *trans*. Plus de 65 familles de protéines CAS ont été identifiées (Makarova, Haft *et al.* 2011). Le nombre de gènes *cas* dans un système CRISPR-Cas donné est variable (4-20), certains sont conservés et limités à certaines espèces tandis que d'autres gènes *cas* similaires peuvent être retrouvés dans des micro-organismes phylogénétiquement éloignés (Szczepankowska 2012). Par ailleurs les gènes *cas1* et *cas2* sont retrouvés dans tous les systèmes CRISPR-Cas ce qui a permis de les répartir en trois grands groupes (type I à III) avec des divisions supplémentaires en sous-type (Makarova, Haft *et al.* 2011). Chaque type se caractérise par la présence de certains gènes *cas*.

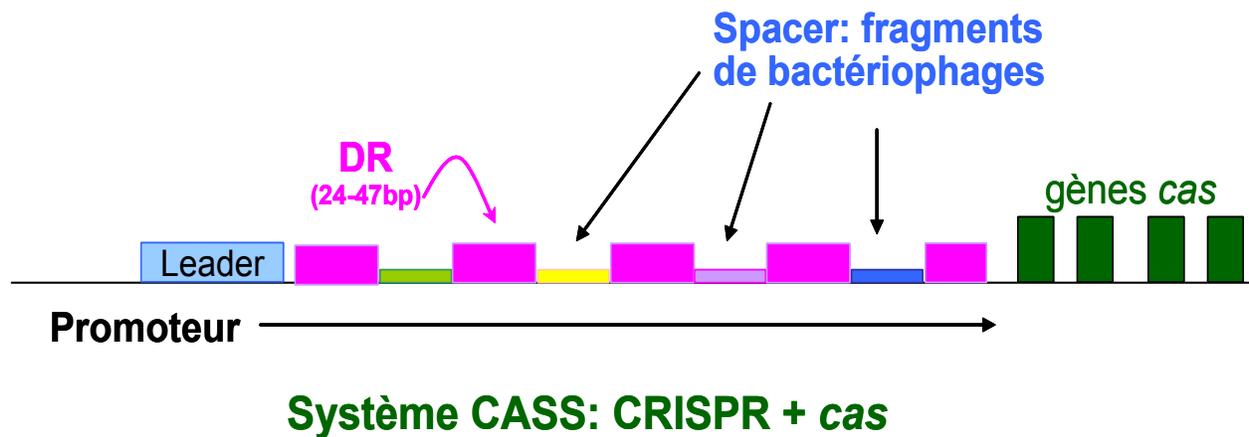


Figure 11: Structure d'un locus CRISPR-Cas (Grissa, Vergnaud et Pourcel 2007)

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer le rôle biologique du système CRISPR-Cas. Il a été constaté notamment qu'il s'agit d'un système de défense protégeant bactéries et archées contre de l'ADN étranger d'origine plasmidique ou phagique, mais d'autres fonctions sont suspectées. Son implication dans l'inhibition d'un biofilm a été montrée chez *P. aeruginosa* (Zegans, Wagner *et al.* 2009). En se basant sur la nature des protéines Cas (nucléase, hélicase, ARN polymérase et protéines de liaison à l'ARN) et les travaux expérimentaux antérieurs, Makarova et col. ont proposé l'existence d'une résistance par un mécanisme de type interférence à ARN (Makarova, Grishin *et al.* 2006). Le mécanisme de défense se déroule en 3 étapes distinctes: (i) l'adaptation, (ii) l'expression de

petits ARNs et (iii) l'interférence de l'ADN cible (van der Oost, Jore *et al.* 2009). L'adaptation (ou immunisation) du système CRISPR-Cas via l'intégration de spacers a été démontrée expérimentalement dans la résistance de *S. thermophilus* au phage infectant (Barrangou, Fremaux *et al.* 2007) et chez *E. coli* infecté par le phage λ (Brouns, Jore *et al.* 2008). Dans au moins certains types de CRISPR, la sélection des fragments d'ADN étranger (protospacers) n'est pas faite au hasard. Des motifs de courte séquence (3-6 nt) retrouvés à côté du protospacer dans le génome étranger et appelés PAMs (Protospacer Associated Motif), sont essentiels à la reconnaissance de celui-ci par les protéines Cas notamment Cas1, et de l'intégration du spacer dans le CRISPR (Mojica, Diez-Villasenor *et al.* 2009 ; Deveau, Garneau et Moineau 2010). L'acquisition d'un nouveau spacer est polarisée ; elle se fait de façon adjacente au Leader alors que la perte de celui-ci survient tout le long du locus (Pourcel, Salvignol et Vergnaud 2005 ; Barrangou, Fremaux *et al.* 2007). Par conséquent, les spacers les plus anciens sont souvent identiques chez les souches d'une même espèce tandis que celui adjacent au leader est généralement unique (Sorek, Kunin et Hugenholtz 2008). Le locus CRISPR est transcrit en un long ARN messager (ARNm) qui est par la suite coupé en petits ARNs CRISPR mature non codant (ARNcr) (Barrangou, Fremaux *et al.* 2007 ; Marraffini et Sontheimer 2010 ; Cady, White *et al.* 2011). Les ARNcr forment un complexe avec des protéines Cas permettant la reconnaissance et la destruction des ADN invasifs portant des séquences correspondantes. La capacité du système CRISPR-Cas à incorporer des séquences d'ADN étranger nouvellement rencontrées et permettant ensuite à la bactérie de résister à des phages ou plasmides contenant ces séquences a conduit à l'appellation de système immunitaire adaptatif (van der Oost, Jore *et al.* 2009).

Tous les génomes bactériens ne contiennent pas de CRISPRs, et même s'ils y sont présents, tous ne sont pas fonctionnels (Szczepankowska 2012). C'est le cas d'une partie des souches de *P. aeruginosa*. Par exemple, la souche PA14 a deux CRISPRs différents appartenant au type I-F (*Yersinia*) tandis que la souche PAO1 n'en possède pas (Figure 12) (Grissa, Vergnaud et Pourcel 2007). Un deuxième système CRISPR-Cas avec un DR différent de type I-E est observé dans la souche 2192. Cette souche possède également le système Pa14 (type I-F).

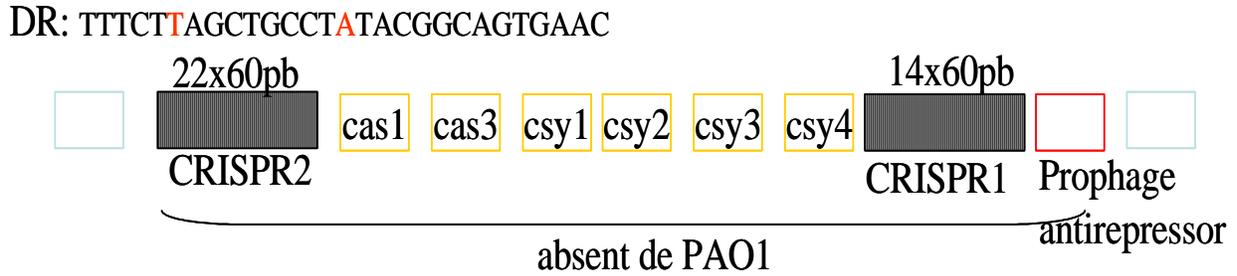


Figure 12 : Structure du système CRISPR-Cas de la souche PA14. Deux CRISPRs encadrent un groupe de 6 gènes cas.

Parmi 122 souches cliniques de *P. aeruginosa* analysées, la présence d'une région CRISPR a été révélée chez 45 souches avec une prédominance du Type I-F (33%) et 6% du type I-E (Cady, White *et al.* 2011). L'étude a également mis en évidence 132 spacers 100% identiques aux séquences de phages tempérés ou prophages infectant *P. aeruginosa* et non de phages lytiques. Très récemment, le même groupe de chercheurs a montré l'implication du CRISPR dans l'inhibition de la réplication de six phages tempérés et de phages dépourvus de gènes de lysogénéisation tout en soulignant le rôle crucial du PAM (Cady, Bondy-Denomy *et al.* 2012). L'immunité se met en place lorsque le spacer nouvellement intégré est 100% identique au fragment du phage infectant (Barrangou, Fremaux *et al.* 2007). Une seule mutation au niveau du spacer ou du PAM est suffisante pour échapper au système de défense bactérien. Des gènes capables d'inactiver l'expression du système CRISPRs-Cas de *P. aeruginosa* ont aussi été identifiés chez certains phages du groupe D3112 (Bondy-Denomy, Pawluk *et al.* 2012). Les phages sont des entités biologiques dynamiques en perpétuelle évolution avec leurs hôtes, l'un pour échapper aux mécanismes de l'autre, et peuvent ainsi être utilisés à combattre les bactéries nuisibles pour l'homme dans un usage approprié.

1.8.Applications des bactériophages

1.8.1. Phagothérapie.

À ce jour les antibiotiques restent la principale arme pour combattre les infections bactériennes, mais de plus en plus souvent les bactéries développent une résistance à ces

médicaments. Face à l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR) voire toto-résistance, la recherche d'une alternative ou d'un complément efficace à l'antibiothérapie s'impose. Dans ce contexte, la phagothérapie qui consiste en l'utilisation de bactériophages ou de leurs dérivés comme agents biologiques pour le traitement ou la prévention de maladies infectieuses connaît un regain d'intérêt. En effet les phages ont été utilisés dès 1919 par Félix d'Hérelle en médecine humaine et vétérinaire pour contrôler les infections bactériennes. Les bactériophages ont permis de traiter avec succès la dysenterie bacillaire, le cholera aviaire et aussi de réduire le taux de mortalité due au choléra en Inde. Comme c'était souvent le cas en médecine à l'époque, Félix d'Hérelle a fait appel aux membres de sa famille et à ses collègues pour évaluer l'innocuité des phages (Sulakvelidze, Alavidze et Morris 2001 ; Summers 2001). Les premières préparations commerciales ont été élaborées en France par son laboratoire, et comprenaient 5 cocktails de phages nommés bacté-Coli-phage, bacté-intesti-phage, bacté-dysenterie-phage, bacté-Pyo-phages et bac-Rhino-Phage (Abedon, Kuhl *et al.* 2011). Ensuite des préparations phagiques ont été mises en œuvre puis commercialisées par divers laboratoires à travers le monde dans des domaines variés de la médecine (Dublanche et Fruciano 2008). Cependant, il y'a eu des préparations n'ayant pas de qualité requise et parfois totalement inactives au point d'entraîner des niveaux variables de succès.

L'avènement des antibiotiques dans les années 1940 et le manque de connaissances fondamentales sur la biologie des phages à cette époque ont d'une part conduit à des échecs de traitement et d'autre part au déclin de l'intérêt pour la phagothérapie dans les pays occidentaux. Toutefois, dans certains pays de l'Europe de l'Est et de l'ex-Union Soviétique, la phagothérapie est toujours utilisée avec succès (Sulakvelidze, Alavidze et Morris 2001 ; Abedon, Kuhl *et al.* 2011) ou utilisée comme un complément à l'antibiothérapie conventionnelle (Kutter, De Vos *et al.* 2010). Par exemple en Géorgie, la thérapie par les phages fait partie des protocoles de soins standards. L'institut Eliava en Géorgie qui constitue l'un des centres de référence de la phagothérapie produit des phages thérapeutiques comprenant soit un phage adapté soit une mixture de plusieurs phages dirigés contre plusieurs espèces bactériennes (Kutateladze et Adamia 2008). Deux formulations de D'Hérelle, le Pyophage et l'intestiphage sont actuellement les principales utilisées en Géorgie

et en Russie (Kutter, De Vos *et al.* 2010). Le Pyophage cible les bactéries qui causent les infections purulentes: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, deux espèces de *Proteus*, et plusieurs espèces de *Streptococcus*. L'intestiphage vise environ 23 différentes bactéries entériques, ainsi que des souches de *S. aureus* et *P. aeruginosa* de la flore intestinale (Kutateladze et Adamia 2008 ; Kutter, De Vos *et al.* 2010). Ces préparations ne sont pas statiques mais sont continuellement renouvelées par ajout de nouveaux phages en réponse aux changements des cibles pathogènes. Il existe deux types de formulation de bactériophages thérapeutiques : les cocktails et des préparations contenant un phage unique (Abedon, Kuhl *et al.* 2011). Les cocktails de phages ont un large spectre d'activité alors que les phages adaptés sont préparés pour certaines souches bactériennes.

Longtemps négligée dans les pays occidentaux la phagothérapie connaît actuellement un retour en force grâce à une étude réalisée par Smith et ses collaborateurs dans les années 80 (Smith et Huggins 1983) qui a montré l'efficacité des phages par rapport aux antibiotiques dans le traitement d'une gastroentérite chez les volailles. La thérapie par les phages utilise les phages lytiques et non les tempérés. Ces derniers ne sont pas appropriés car leur mode d'action peut mener à un transfert de gènes de virulence et/ou de gènes de résistance aux antibiotiques entre espèces bactériennes (Brussow 2005). Une caractérisation approfondie à la fois génomique et phénotypique des bactériophages est recommandée afin de s'assurer que ceux-ci sont strictement virulents (Sausseureau et Debarbieux 2012).

Différentes études expérimentales dans un modèle animal ont montré l'efficacité des phages dans le traitement de nombreuses maladies d'origine bactérienne faisant de cette thérapie une alternative efficace à l'antibiothérapie. En général, l'activité d'un phage *in vitro* est la même *in vivo*. Par conséquent, les bactériophages ont été employés pour traiter avec succès l'otite chronique à *P. aeruginosa* chez les chiens. Le tout premier essai clinique chez l'homme en conformité avec les normes de l'Union Européenne (Verbeken, De Vos *et al.* 2007) a été mené en Grande Bretagne sur 24 patients atteints d'une otite chronique. Un cocktail de 6 phages virulents (Biophage-PA) dirigés contre des souches multirésistantes de *P. aeruginosa* a été administré localement aux patients qui ont vu leur état s'améliorer après le traitement (Wright, Hawkins *et al.* 2009). Dans le même temps, un autre essai clinique de phase I d'un

cocktail de phages dirigés contre des pathogènes responsables d'infection nosocomiales (*E. coli*, *S. aureus* et *P. aeruginosa*) a eu lieu aux USA chez 42 patients atteints d'un ulcère chronique de la jambe (Rhoads, Wolcott *et al.* 2009). Aucun effet indésirable n'a été signalé au cours des différents traitements. Une étude clinique de phase II d'un cocktail de variants du phage T4 sponsorisé par Nestlé est actuellement en cours au Bangladesh chez des enfants atteints de diarrhée (Brussow 2012). En Belgique, un cocktail de phages thérapeutique (deux phages de *P. aeruginosa* et un de *S. aureus*) visant à traiter les brûlés est produit sous le nom de BFC-1 selon les normes Européennes (Merabishvili, Pirnay *et al.* 2009). Cependant, les chercheurs belges sont confrontés à la difficulté d'obtenir une autorisation pour un essai clinique. La phagothérapie est loin d'être une réalité en Europe de l'Ouest (Brussow 2012) qui toutefois autorise un traitement compassionnel dans les cas jugés désespérés (Verbeken, De Vos *et al.* 2007). C'est ainsi qu'en France quelques essais de thérapie par les phages ont été réalisés notamment par le Dr Alain Dublanquet infectiologue à l'hôpital de Villeneuve Saint-Georges, en utilisant des préparations de phages Géorgien et Russe. La Pologne, ancien membre du bloc soviétique, est le seul pays de l'Union Européenne qui pratique actuellement la phagothérapie (Fortuna, Miedzybrodzki *et al.* 2008). Les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose représentent un problème clinique difficile en raison de la formation des biofilms. À Tbilissi en Géorgie, des patients atteints de mucoviscidose ont été traités avec succès par des phages administrés par aérosols (Kutateladze et Adamia 2010). Récemment une approche expérimentale dans un modèle animal a montré l'efficacité des phages dans le traitement d'une infection à *P. aeruginosa* sous forme d'un biofilm dans les voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose (Alemayehu, Casey *et al.* 2012). De même, un prétraitement de cathéters avec un cocktail de phages de *P. aeruginosa* empêche la formation de biofilm en milieu hospitalier (Fu, Forster *et al.* 2010).

Par ailleurs, certains dérivés de phages ont une activité antimicrobienne. Par exemple l'endolysine et la lysine ont pour effet de dégrader le peptidoglycane de la bactérie hôte et provoquer la lyse bactérienne. L'endolysine de phages qui infectent les bactéries Gram positif (*S. aureus*, les *Streptococcus* et les Pneumocoques) est active même à partir de

l'extérieur une fois purifiée (Nelson, Schmelcher *et al.* 2012 ; Schmelcher, Donovan et Loessner 2012). La plus efficace est PlyC produite par le phage C1 et capable de lyser les streptocoques A et C, alors que ce phage n'infecte pas les streptocoques du groupe A (Nelson, Schmelcher *et al.* 2012). Cependant, le premier cas de résistance à l'endolysine a été récemment signalé chez des souches de *S. aureus* (Schmelcher, Powell *et al.* 2012). L'absence ou le peu de résistance bactérienne contre la lysine est considérée comme un avantage majeur dans l'éventualité de son utilisation comme agent antibactérien.

Contrairement aux antibiotiques qui sont des molécules figées, les phages sont des entités biologiques qui co-évoluent avec leur hôte pour contourner les mécanismes de résistance bactérienne. En outre les cocktails de phages qui ciblent de multiples récepteurs bactériens limitent l'apparition de résistances. D'ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité des cocktails phagiques par rapport à un phage unique, dans le traitement des infections bactériennes (Brussow 2005). La réponse à une infection de *P. aeruginosa* par les phages appliqués de façon séquentielle *in vitro* et *in vivo* chez les larves d'une mite (waxmoth) est la même que celle produite par l'application simultanée des phages (cocktail) (Hall, De Vos *et al.* 2012). Par ailleurs, les combinaisons bactériophages antibiotiques contribuent à éliminer de façon significative les bactéries et les biofilms bactériens.

1.8.2. Avantages et inconvénients de la phagothérapie versus antibiothérapie

Une thérapie constitue un traitement médical appliqué à une personne ou un animal dans lequel le rapport bénéfice/risque doit être supérieur. Il existe plusieurs types de thérapie variables en fonction du traitement visé. L'antibiothérapie et les vaccins appliqués en prophylaxie sont les principales armes de lutte contre les infections bactériennes. Une autre catégorie de thérapie est celle utilisant les bactériophages comme agents antibactériens. Cette dernière est principalement utilisée en Géorgie, Russie et Pologne dans les soins les plus courants. Les avantages de la phagothérapie sont multiples et profitables, comparé à l'antibiothérapie mais il existe également des inconvénients qui cependant semblent être relativement mineurs (Loc-Carrillo et Abedon 2011).

Les bactériophages sont très spécifiques, ne ciblant au cours du traitement que les bactéries visées. Cette spécificité est un atout en même temps qu'un problème pour leur utilisation car elle s'applique aussi au niveau d'une souche. Néanmoins les bactériophages sont extrêmement diversifiés et des cocktails de phages peuvent être appliqués pour pallier ce problème. Les antibiotiques à large spectre d'hôte ont le désavantage de détruire la flore commensale, provoquant des effets indésirables graves comme la diarrhée ou les infections secondaires.

Les connaissances sur la pharmacocinétique et pharmacodynamique ont été rendus possibles grâce aux études menées au niveau des modèles animaux. En revanche, les données d'essais précliniques et cliniques effectués en Europe de l'Est restent pour la plupart indisponibles, et il existe peu de traduction en langue anglaise des publications scientifiques. Des chercheurs de l'Institut Eliava à Tbilissi ont entrepris de publier une revue de nombreux cas de traitements d'infections par des bactériophages depuis les premières années de leur utilisation en Géorgie et en URSS (Livre : A literature review of the practical application of bacteriophages research ; 2009, Institute Eliava). Dans ces pays les préparations de phages ont été longtemps réalisées de façons empiriques mais les résultats sont satisfaisants. En effet, le succès de la phagothérapie est généralement attribué à la non-toxicité et à l'auto-réplication des phages qui constitue la pharmacodynamie. A la différence des antibiotiques, les phages ont la capacité de se multiplier une fois administrés. Ils augmentent en nombre en particulier au niveau du site infectieux en fonction de la densité bactérienne. Les phages eux-mêmes contribuent à établir une dose optimale dans le processus d'auto "dosage" (Abedon et Thomas-Abedon 2010 ; Loc-Carrillo et Abedon 2011). La faible toxicité des phages résulte de leur composition. Seul l'ADN est injecté dans le cytoplasme bactérien, parfois accompagné de quelques protéines phagiques. Toutefois, le traitement par les phages peut créer des chocs anaphylactiques provoqués vraisemblablement par les endotoxines issus de suspension phagique mal purifiée ou libérés au cours du traitement suite à la lyse bactérienne. En revanche, les risques associés à des traitements avec les antibiotiques sont bien plus graves : allergie aux beta-lactamines, diarrhée, mycose, infections bactériennes secondaires, atteintes des fonctions rénales et de l'audition (aminosides etc..).

L'aspect pharmacocinétique des phages concerne les variations de leur densité dans différents tissus de l'hôte (Levin et Bull 2004 ; Abedon et Thomas-Abedon 2010). Les applications des phages sont variables selon le mode d'administration (local, oral, nasal, par injection intramusculaire, intraveineuse, intrarachidienne etc.) en passant par les formes galéniques (suspension, suppositoire, comprimé, nébulisation, imprégné etc.). Les phages sont facilement absorbés malgré leur taille importante et sont actifs dans les organes traités. Leur utilisation est cependant délicate dans le traitement des infections autres que celles localisées à la surface de la peau (brûlure, otite, plaie, etc.). En effet les phages sont considérés comme des éléments étrangers et sont éliminés par le système réticulo-endothélial lors de leur passage par la barrière intestinale pour atteindre la circulation sanguine. Par conséquent, l'efficacité de la phagothérapie dépend du site infectieux et du mode d'administration ainsi que de la dose administrée.

Chez *P. aeruginosa*, des modèles animaux visant le traitement de trois types d'infections à savoir la septicémie, les infections de plaies des brûlés et les infections pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose ont été développés (Saussereau et Debarbieux 2012). Les applications directes sur le site infectieux sont les plus efficaces notamment pour le traitement des plaies de brûlés. L'administration par voie intrapéritonéale donne également des résultats satisfaisants avec 88% du taux de survie des souris infectées alors que des taux de survie de moins de 30% ont été obtenus avec les injections sous-cutanées et intramusculaires (McVay, Velasquez et Fralick 2007). De même, l'injection intrapéritonéale de bactériophages est beaucoup plus efficace que l'injection intramusculaire ou par voie orale pour le traitement de septicémies (Heo, Lee *et al.* 2009). La protection des souris par les phages 24 heures après l'infection est moins efficace voire nulle par voie orale. Le traitement par les bactériophages diminue également de façon significative les niveaux de cytokines notamment les interleukines (Watanabe, Matsumoto *et al.* 2007). Dans le traitement des infections pulmonaires aiguës ils doivent être administrés rapidement pour atteindre une efficacité maximale (Saussereau et Debarbieux 2012). Une seule dose de bactériophages administrée par voie intranasale après 2 heures d'infection dans les conditions de la mucoviscidose a entraîné des taux de survie de 90 à 100% des souris (Morello, Saussereau *et*

al. 2011). Les bactériophages se reproduisent et tuent les bactéries aussi longtemps que celles-ci sont présentes.

Certains antibiotiques sont mal tolérés et d'autres ont une activité bactériostatique notamment la tétracycline entraînant facilement une évolution des bactéries vers la résistance. Heureusement, les mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques diffèrent de ceux des phages. Par conséquent, les bactériophages montrent une efficacité identique contre les bactéries sensibles et résistantes aux antibiotiques. Ils sont également en mesure de détruire les biofilms bactériens. Naturellement actifs dans l'environnement, les phages sont facilement isolés pour en faire un remède. En outre, les bactériophages et leur hôte sont en perpétuelle coévolution. Cette interaction évolutive peut affecter de multiples gènes chez les deux protagonistes (Marston, Pierciey *et al.* 2012) entraînant parfois le rétablissement de la sensibilité aux antibiotiques de la bactérie (Edgar, Friedman *et al.* 2012).

Par ailleurs, les antibiotiques peuvent influencer considérablement la virulence des phages en créant les conditions optimales au cours de l'infection. La croissance plus importante des phages en présence de pénicilline (Krueger, Cohn *et al.* 1948 ; Hadas, Einav *et al.* 1997), l'induction du cycle lytique des prophages (Maiques, Ubeda *et al.* 2006) et la dégradation significative de biofilm par les phages en présence d'antibiotique (Bedi, Verma et Chhibber 2009) ont été signalés. Des études de synergie phage-antibiotique ou "*Phage-Antibiotic-Synergie*" (PAS) ont révélé que l'activité des phages était fortement stimulée à des concentrations sublétales d'antibiotiques (Comeau, Tetart *et al.* 2007). Par exemple, une faible dose de céfotaxime (Céphalosporine) augmente de plus de 7 fois l'activité du phage lytique Φ MFP de *E. coli*. Cette synergie a été également mise en évidence chez les phages T4 avec différentes familles d'antibiotiques notamment les beta-lactamines et les quinolones, ainsi que la mitomycine C. De même, Ryan et col ont récemment montré que la combinaison « bactériophage T4 et céfotaxime » améliorerait considérablement l'élimination des biofilms bactériens par rapport au traitement par la céfotaxime seule (Ryan, Alkawareek *et al.* 2012). De plus, l'association phage-bactérie empêche l'évolution de bactéries résistantes aux phages et aux antibiotiques (Kirby 2012 ; Zhang et Buckling 2012). Dans la synergie phage-

antibiotique, la concentration optimale d'antibiotique doit être suffisamment faible pour ne pas inhiber la formation de tapis bactérien tout en permettant la formation de plages de lyse de taille maximale (indicatif d'un nombre élevé de phages) (Santos, Carvalho *et al.* 2009). Au plan clinique, les combinaisons phages antibiotiques en synergie pourraient donc raviver l'utilisation de certains agents antibiotiques considérés comme toxiques à des doses létales pour la bactérie.

Cependant la rigueur des protocoles d'utilisation des médicaments constitue un obstacle au développement de la phagothérapie. Son utilisation a des limites pour des bactéries ayant une multiplication intracellulaire notamment *M. tuberculosis*. Puisque les phages n'infectent que les bactéries, ils sont par conséquent incapables de franchir la membrane de la cellule eucaryote pour infecter les bactéries dans les macrophages. De même, l'utilisation des phages infectant les bactéries ayant une structure clonale peut être restreinte à une localisation géographique donnée. Les phages de *P. aeruginosa* peuvent cependant être appliqués au delà des limites géographiques. Néanmoins, d'autres applications sont possibles dans divers domaines notamment l'agro-alimentaire.

1.8.3. Biocontrôle

Les intoxications alimentaires d'origine microbienne majoritairement bactérienne constituent un sérieux problème pour la sécurité alimentaire dans le monde entier. Environ 76 millions de cas et 5.000 décès sont enregistrés aux Etats-Unis chaque année (Mead, Slutsker *et al.* 1999). À l'heure actuelle, les principales causes de décès dues aux pathogènes bactériens alimentaires sont les infections à *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli* (*E. coli* O157: H7, en particulier) et *Campylobacter jejunii*. Pour y remédier, les aliments sont traités avec des conservateurs chimiques destinés à freiner ou empêcher l'activité bactérienne afin d'éviter la fermentation, la putréfaction, les moisissures nuisant à la qualité du produit. Cependant, certains traitements provoquent la perte des propriétés organoleptiques des aliments (aspect, goût) et sont potentiellement nuisibles pour le consommateur. Ainsi l'augmentation de l'aversion alimentaire des consommateurs due aux conservateurs chimiques a mis en

évidence la nécessité d'adopter des alternatives et des approches jugées plus naturelles pour lutter contre la présence de microbes.

Les bactériophages sont capables d'infecter leur hôte spécifique et de s'y multiplier sans causer des effets délétères sur la microflore intestinale de l'homme, et présentent donc des propriétés semblables aux probiotiques, définis comme étant des microbes vivants associés à des effets bénéfiques pour la santé de l'homme (Abedon, Kuhl *et al.* 2011). Les phages sont également considérés dans l'industrie alimentaire pour contrôler la contamination bactérienne des aliments dans un processus appelé "lutte biologique" ou biocontrôle. Ils sont appliqués à titre préventif pour le contrôle des bactéries pathogènes dans les aliments d'origine animale ou végétale et dans les industries de transformation alimentaire et sont relativement stable dans la chaîne de production alimentaire (Brovko, Anany et Griffiths 2012). Par exemple, le traitement par les phages avant l'abattage des animaux a permis le contrôle de salmonelloses dans des carcasses de poulets artificiellement contaminées (Guenther, Herzig *et al.* 2012). Les phages dirigés contre *L. monocytogenes* ont également été appliqués pour maîtriser la croissance du pathogène dans les produits laitiers et les charcuteries (Carlton, Noordman *et al.* 2005). Une combinaison de phages P100 et A511 de *Listeria* a été mise au point (Guenther, Huwyler *et al.* 2009) (Holck et Berg 2009). La souche *E. coli* O157:H7 potentiellement mortelle vit à l'état commensal dans le tube digestif des bovins et est à l'origine d'intoxications alimentaires. Cette souche est rapidement éliminée après traitements des animaux et des végétaux avec des phages spécifiques (Abuladze, Li *et al.* 2008). Plusieurs autres pathogènes comme *C. jejuni* sont contrôlés par les phages dans une variété d'aliments réfrigérés tels que les fruits et les produits laitiers (Brovko, Anany et Griffiths 2012). Les phages ont également la capacité de contrôler des maladies des plantes causées par des bactéries. Par exemple, l'inhibition par les phages des phytopathogènes *Erwinia amylovora* et *X. campestris* a réduit l'incidence de maladies telles que le feu bactérien chez les pommiers et la tache bactérienne de la tomate, de la pêche et de la poire (Greer 2005). De même la prolifération de bactéries responsables du pourrissement et de la jambe noire de la pomme de terre a été maîtrisée après traitement des champs avec des bactériophages (Adriaenssens, Van Vaerenbergh *et al.* 2012). Toutefois, l'application des phages dans les

champs est soumise à des facteurs environnementaux telles que les variations de température (exposition au soleil, humidité) conduisant à l'inactivation rapide des phages appliqués (Maura et Debarbieux 2011).

Si pour des raisons multiples l'application des bactériophages thérapeutiques en médecine humaine est loin d'être opérationnelle dans les pays occidentaux, l'intérêt de les utiliser dans d'autres domaines est différent. Plusieurs formulations phagiques sont commercialisées et ont reçu le statut de GRA (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration), une agence réglementaire aux USA, pour une utilisation comme agent antimicrobien contre la contamination bactérienne dans les produits alimentaires prêts à l'emploi. Les formulations sont sous forme d'un cocktail ou d'un phage unique pour ceux ayant un large spectre d'hôte comme le phage *Listeria* P100 (Carlton, Noordman *et al.* 2005).

RÉSULTATS

2. RÉSULTAT

2.1. Positionnement et but du travail

P. aeruginosa est une bactérie hautement versatile capable de s'adapter à différentes niches écologiques et constitue un pathogène opportuniste causant différents types d'infections chez les personnes immunodéprimées. En plus de sa résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques, la bactérie est capable d'acquérir de nouvelles résistances. Chez les malades atteints de mucoviscidose *P. aeruginosa* est responsable d'infections pulmonaires chroniques et la formation d'un biofilm rend le traitement d'éradication plus lourd et souvent inefficace. Face à l'émergence de souches multirésistantes, l'urgence de trouver une alternative thérapeutique efficace s'impose.

Afin d'envisager la phagothérapie dans les meilleures conditions possibles aussi bien en terme d'efficacité que de sécurité, de nombreuses études restent à faire. En effet la stratégie qui devra être adoptée dans la préparation des bactériophages à usage thérapeutique n'est toujours pas claire et dépendra très certainement du type d'infection et du contexte clinique et industriel. Le choix entre « prêt à porter » et « sur mesure » est en grande partie lié au spectre de virulence des bactériophages disponibles et à la fréquence avec laquelle les bactéries résistantes émergeront. Dans ce travail de thèse nous avons cherché à contribuer à l'utilisation des phages pour combattre les infections à *P. aeruginosa* en abordant plusieurs questions :

- Quelle est la diversité des souches cliniques de *P. aeruginosa*, et pouvons nous constituer une collection de référence pour tester le spectre de virulence des phages ?
- Quel serait la composition d'un cocktail de phages capable de lyser cette collection de référence ?
- Existe-t-il des souches qui ne peuvent être lysées par aucun phage ?
- Le système CRISPR-Cas joue-t'il un rôle dans la résistance ?

Le laboratoire possède une longue expérience des études de population de différentes espèces de bactéries pathogènes et des outils de génotypage ont été mis en place dans ce but. Grâce à différentes collaborations avec des laboratoires de microbiologie clinique, plusieurs centaines de

souches de *P. aeruginosa* issues majoritairement de patients atteints de mucoviscidose ont été génotypées (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007 ; Sobral, Mariani-Kurkdjian *et al.* 2012). Au cours de ce travail de thèse de nouvelles souches ont été analysées, principalement des souches multirésistantes aux antibiotiques provenant de différents hôpitaux en France et à l'étranger et associées à divers types de pathologies. Ainsi nous disposons d'une collection large de bactéries représentatives nous permettant d'évaluer *in vitro* dans un premier temps, la faisabilité de la phagothérapie.

Une première analyse de susceptibilité des souches de patients mucoviscidosiques a consisté à tester une préparation phagique très utilisée en Géorgie et ailleurs, le Pyophage. Nous avons identifié des souches qui n'étaient sensibles ni à la préparation, ni à aucun des six phages isolés de cette préparation ni à deux phages nouvellement isolés, l'ensemble correspondant à 5 genres différents. Le polymorphisme du système CRISPRs-Cas dans les souches bactériennes a été également étudié (Article 1).

Ensuite nous avons voulu disposer d'une plus large collection de phages et pour ceci nous avons effectué deux campagnes de prélèvement et purification avec différentes souches bactériennes. Trente nouveaux phages ont été isolés et caractérisés montrant que plusieurs appartiennent à des genres qui n'avaient pas été isolés du Pyophage. Dix génomes ont pu être séquencés et annotés pendant cette thèse et les autres sont en cours d'analyse. La caractérisation des nouveaux phages sera poursuivie par le laboratoire mais ces phages ont permis d'aller plus loin dans l'étude de la susceptibilité des souches de *P. aeruginosa* de notre collection et d'identifier certaines qu'aucun phage ne peut lyser (Article 2, en cours).

Enfin nous avons initié une étude sur des souches multirésistantes aux antibiotiques, et, en collaboration avec la société Pherecydes Pharma, nous avons analysé la susceptibilité d'un panel de souches à trois bactériophages nouvellement isolés (Article 3).

ARTICLE 1

2.2. Article 1: The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients to bacteriophages.

Article accepté pour publication dans PLoS One

Résumé

La mucoviscidose est une maladie génétique causée par la mutation du gène *cftr*, un transporteur transmembranaire dont le dysfonctionnement provoque une obstruction des voies respiratoires. Les patients sont fréquemment colonisés par *P. aeruginosa*, responsable d'infection chronique grave associé à une mortalité et morbidité élevées. Les infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose sont difficiles à traiter en raison de la formation de biofilms, due à la production d'alginate.

Dans cette étude, six phages ont été caractérisés à partir du Pyophage et leur spectre de virulence déterminé sur une collection de 50 souches de *P. aeruginosa* y compris les souches de références PAO1, PA14 et une souche appartenant au clone C. Les six phages sont distribués au sein de quatre genres différents, PB-1, ϕ KMV, N4 et LUZ24, et sont incapables de lyser 12 souches bactériennes. Les souches résistantes au Pyophage ont permis d'isoler deux nouveaux phages 1-14Or et Ab01 respectivement à partir des eaux usées d'Orsay (France) et Abidjan (Côte d'Ivoire). Le séquençage de l'ADN des phages a été réalisé par technologie Illumina et l'assemblage des séquences génomiques ainsi que l'annotation ont été effectués par le logiciel BioNumerics. Le phage 1-14Or est un podovirus et son génome de 45kb présente 96% de similarité au niveau nucléotidique avec le phage MR-299, un phage du genre LUZ24. Morphologiquement, le phage Ab01 est muni d'une longue queue contractile (Myovirus) et son génome de 93 kb ressemble à celui des phages JG004 et PAK-P1 avec respectivement 94% et 90% de similarité. Leur génome est dépourvu de gènes indésirables impliqués dans la lysogénéisation des phages et de gènes potentiellement toxiques ainsi que de gènes d'origine bactérienne. L'association des 6 phages dérivés du Pyophage et des 2 phages nouvellement isolés permet de lyser des souches auparavant résistantes au Pyophage. Toutefois quatre souches demeurent résistantes aux 5 genres de phages.

La présence du système CRISPRs-Cas impliqué dans la résistance aux phages a été analysée par amplification PCR des deux loci CRISPRs de type I-F de *P. aeruginosa*. En raison du polymorphisme assez élevé, la région du locus CRISPR1 de 17 souches a été séquencée. Sur 50 souches bactériennes, 24 y compris les souches PA14 et C50 possèdent le système type I-F (*Yersinia*) et seulement 6 ont le type I-E (*Escherichia*) parmi lesquelles 3 avec le type I-F. La majorité des souches dépourvues du système CRISPR-Cas est résistante aux différents phages. Au total 264 spacers ont été obtenus parmi lesquels 40% correspondent dans les bases de données GenBank à des fragments de phages tempérés/prophages de *P. aeruginosa* et non à des phages lytiques. Quelques uns correspondent à des fragments de plasmide, des îlots de pathogénicité, des transposons et pyocines. Plus de 90% des souches sont lysogènes et la présence de CRISPRs pourrait jouer un rôle dans la régulation des prophages.

Afin d'utiliser efficacement la phagothérapie dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*, il est nécessaire de disposer de cocktails de phages lytiques. La connaissance des mécanismes de résistance de certaines souches bactériennes hautement résistantes devrait permettre de mieux anticiper les réponses à la phagothérapie et de compléter efficacement les cocktails de phages existants.

The susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients to bacteriophages.

Christiane Essoh^{1,2}, Yann Blouin^{1,2}, Guillaume Loukou³, Arsher Cablanmian³, Serge Lathro³, Elizabeth Kutter⁴, Hoang Vu Thien⁵, Gilles Vergnaud^{1,2,6}, Christine Pourcel^{1,2#}

¹Univ Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Orsay, France

²CNRS, Orsay, France

³Laboratoire National de Santé Publique, Abidjan, Côte d'Ivoire

⁴The Evergreen State College, Olympia, WA, USA

⁵Hôpital Armand Trousseau, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Bactériologie, Paris, France

⁶DGA/MRIS- Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique, Bagneux, France

Corresponding author : Christine Pourcel : Institut de Génétique et Microbiologie, Bat. 400, UMR CNRS 8621, Université Paris Sud 11, 91405 Orsay cedex, France

christine.pourcel@u-psud.fr

Keywords: Bacteriophage, *Pseudomonas aeruginosa*, Phage therapy, resistance, CRISPR, cystic fibrosis, genome, Next generation sequencing

ABSTRACT

Phage therapy may become a complement to antibiotics in the treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. To design efficient therapeutic cocktails, the genetic diversity of the species and the spectrum of susceptibility to bacteriophages must be investigated. Bacterial strains showing high levels of phage resistance need to be identified in order to decipher the underlying mechanisms. Here we have selected genetically diverse *P. aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients and tested their susceptibility to a large collection of phages. Based on plaque morphology and restriction profiles, six different phages were purified from “pyophage”, a commercial cocktail directed against five different bacterial species, including *P. aeruginosa*. Characterization of these phages by electron microscopy and sequencing of genome fragments showed that they belong to 4 different genera. Among 47 *P. aeruginosa* strains, 13 were not lysed by any of the isolated phages individually or by pyophage. We isolated two new phages that could lyse some of these strains, and their genomes were sequenced. The presence/absence of a CRISPR-Cas system (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and Crispr associated genes) was investigated to evaluate the role of the system in phage resistance. Altogether, the results show that some *P. aeruginosa* strains cannot support the growth of any of the tested phages belonging to 5 different genera, and suggest that the CRISPR-Cas system is not a major defence mechanism against these lytic phages.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a highly heterogeneous species whose members show various levels of pathogenicity towards plants and animals (Rahme, Stevens *et al.* 1995 ; He, Baldini *et al.* 2004). It is widely distributed in the environment and is a normal human commensal. *P. aeruginosa* is naturally resistant to many drugs and its capacity to form biofilms makes it very difficult to eradicate, particularly in chronically infected cystic fibrosis (CF) patients (Davies et Bilton 2009 ; Lipuma 2010).

Due to the recent increase in multidrug resistant bacteria, phage therapy is being considered as a therapeutic alternative to antibiotics (Kutter, De Vos *et al.* 2010 ; Abedon, Kuhl *et al.* 2011). It has been used since soon after the 1917 discovery of bacteriophages by Felix d'Herelle at the Pasteur Institute in Paris, mostly in countries of Eastern Europe. Although controlled studies were seldom available, its efficacy has been clearly demonstrated in numerous cases (Chanishvili 2012 ; Miedzybrodzki, Borysowski *et al.* 2012). Phages have the capacity to reach bacteria trapped inside biofilms such as those that form in the lung of cystic fibrosis patients (Alemayehu, Casey *et al.* 2012 ; Brussow 2012). Therapeutic cocktails such as the “pyophage” formulation widely used in Georgia to treat purulent skin, wound and lung infections, contain many different phages against each of their target pathogens (which are *staphylococcus*, *streptococcus*, *proteus*, *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*, for pyophage). Each set must be modified twice a year to retain its ability to lyse a large proportion of the target species (Kutateladze et Adamia 2008 ; Kutter, De Vos *et al.* 2010). *P. aeruginosa* bacteriophages are numerous, and current knowledge of their diversity shows that they are distributed in at least 7 genera of purely lytic phages (T7-like, Φ KMV-like, LUZ24-like, N4-like, PB1-like, Φ KZ-like, JG004-like) in addition to a similar number of temperate genera (Ceysens et Lavigne 2010 ; Pirnay, De Vos *et al.* 2011). Within each genus, phages with a variety of different host spectra are observed, in part at least reflecting differences in their tail-associated adhesins (Krylov, Pleteneva *et al.* 2003 ; Kwan, Liu *et al.* 2006 ; Ceysens et Lavigne 2010). Yet the combination of phages used to treat different types of infections remain empirical and usually target not more than 85% of the isolates necessitating the development of a “Sur-mesure” strategy (Pirnay, De Vos *et al.* 2011). For this strategy, at least one virulent phage for a patient’s given otherwise recalcitrant bacterial strain is identified from a collection, or even *de novo* isolated when none is available, and a therapeutical preparation is freshly made. A major challenge is the regular emergence of bacteria resistant to any given phage, which necessitates the ongoing isolation of new phages or variants of phages targeting different hosts or host receptors.

The mechanisms of bacterial resistance to phages are diverse, driving co-evolution of bacteria and bacteriophages (Pleteneva, Shaburova *et al.* 2008 ; Hyman et Abedon 2010 ; Stern et Sorek 2011 ; Koskella, Lin *et al.* 2012). They involve not only the inhibition of the adsorption of phages on the bacteria but also the injection of DNA, the degradation of phage DNA by restriction enzymes and

the recently-identified bacterial immunity system called CRISPR-Cas (Hyman et Abedon 2010 ; Labrie, Samson et Moineau 2010). CRISPRs (which stand for Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) store copies of fragments of foreign DNA called spacers which, together with the Cas proteins, are used to target incoming DNA, leading to their inactivation (Pourcel, Salvignol et Vergnaud 2005 ; Barrangou, Fremaux *et al.* 2007 ; Sorek, Kunin et Hugenholtz 2008). In *P. aeruginosa* recent experiments demonstrated a CRISPR-Cas mediated interference against specific temperate phages (Cady, Bondy-Denomy *et al.* 2012). The majority of clinical strains of *P. aeruginosa* harbour prophages and it has been suggested that they may play a role in mucoid conversion in CF patients (Miller et Rubero 1984). Interestingly it was shown that some phages belonging to the Mu-like genus carry genes that inactivate the CRISPR-Cas system, illustrating the complex arm-race between phages and bacteria (Bondy-Denomy, Pawluk *et al.* 2013).

In past years, we have investigated the diversity of over 600 *P. aeruginosa* isolates using a Multiple Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) assay (MLVA) (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007 ; Sobral, Mariani-Kurkdjian *et al.* 2012). Many clusters were found, some of them containing more than 10 non-epidemiologically related isolates recovered in multiple countries and representing clonal complexes. Indeed clones are seemingly emerging in relation to antibiotic resistance or in relation to certain diseases such as CF, in a population that is considered as panmictic (Romling, Wingender *et al.* 1994 ; Scott et Pitt 2004 ; Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007). We recently showed that many multidrug resistant strains belonging to international clones could be lysed *in vitro* by bacteriophages (Larche, Pouillot *et al.* 2012).

Here, we sought to investigate the spectrum of phage-susceptibility in a selection of *P. aeruginosa* strains representative of the species diversity in CF patients, and to characterize the genera and other properties of phages that are particularly successful clinically, as seen in the Republic of Georgia. To look for resistance mechanisms other than lack of relevant surface receptors, we examined the CRISPR-Cas system pattern and showed that it does not play a primary role in resistance to these various lytic phages.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The present project is in compliance with the Helsinki Declaration (Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects). Strains were collected from sputum as part of the patients' usual care, without any additional sampling. The ethic committee "Comité Consultatif pour la Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) Ile-De-France" was consulted, specifically approved this study and declared that patient informed consent was not needed.

Strains

Clinical *P. aeruginosa* strains were isolated from CF patients in the context of longitudinal surveys (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007 ; Sobral, Mariani-Kurkdjian *et al.* 2012). The letter C refers to CF, the first digit corresponds to a center and the second digit to the strain index in this center. They were genotyped by MLVA as described previously (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007) and their characteristics will be reported in more details (Llanes *et al.* JAC 2013 in press). Forty seven strains were selected for phage isolation and 18 additional ones were used for CRISPR-Cas investigation. Strains UCBPP-PA14 and PAO1 were purchased from the "Collection de l'Institut Pasteur" (CIP, Paris, France) and C50 was a gift of U. Römling (Karolinska Institutet, Sweden).

Bacteriophages

The pyophage preparation was obtained from the Eliava Institute (Tbilisi, Georgia). It is a mixture of phages directed against five bacterial species that predominate in purulent infections, including *P. aeruginosa*, and is used for phage therapy (Kutateladze *et al.* 2008 ; Kutter, De Vos *et al.* 2010).

Culture of bacteria for phages isolation

One colony of *P. aeruginosa* was added to 20mL Luria Broth (LB) and incubated overnight at 37°C, the culture was centrifuged at 2500g for 10min and the bacteria were concentrated 10 times into saline magnesium (SM) buffer (50mM Tris-HCL pH7.5, 100mM NaCl, 8.1mM MgSO₄, 0.01% gelatin) (density of approximately 15 OD_{600nm}).

Isolation of phages from pyophage

Several dilutions of pyophage were prepared in SM buffer and 10μL of each dilution were incubated for 15min at room temperature with 50μL bacterial suspension before adding 4mL soft agar (0.7%) LB medium and pouring immediately onto LB agar plates. After overnight incubation at 37°C, a single plaque was picked and purified by several successive platings on host bacteria. Purified phages were amplified on agar plates by infecting 10⁸ bacteria with 10⁶ phages (MOI=0.01) and incubating at 37°C for 8 hours. A double agar layer plaque assay was used to titrate phage suspensions with 10μL each of different phage dilutions.

Prophage induction

To induce prophages, 20mL of an exponential bacterial culture (0.6 OD_{600nm}) was centrifuged and resuspended in 5mL of 100mM MgSO₄. Bacterial cells were transferred onto a Petri dish and placed under a germicide UV light for 30s before adding 5mL of fresh LB medium. Irradiated bacteria were then cultured until the absorbance at 600nm dropped and were pelleted by centrifugation at 2500g for 10min at 4°C. The pH of the supernatant was neutralized with 0.1N NaOH and bacteriophage presence was tested by spotting 10μL onto at least four bacterial strains from the panel of 47. When no lysis was observed the assay was repeated with two more strains.

Isolation of new phages

New bacteriophages were isolated from sewage samples after overnight enrichment on several bacterial strains. For this, the sewage sample was clarified by centrifugation at 4000 rpm for 20min and filtered through 45μm pore size membranes (Sarstedt, Marnay, France). Then, 5mL of filtrate were incubated overnight with selected bacterial strains (200μL of a tenfold concentration of an

overnight culture) and 10mL of LB medium at 37°C. About 100µL of chloroform were added to the culture and bacteria debris were removed by centrifugation at 2500g for 10min. Ten microliters of the supernatant were spotted onto different bacterial strains including the strain used for phage enrichment. Phages were recovered from lysis zones and purified by two cycles of plating on the enrichment bacterial strain. Following the proposal by Kropinski et al. (Kropinski, Prangishvili et Lavigne 2009), the full name of a bacteriophage will include vB for virus of bacteria, and indication of the host species and the virus family. For example the first phage isolated on *P. aeruginosa* strain C1-14 in Orsay will be called vB_Pae_M-C1-14_{Or01}. "M" indicates that the phage is a myovirus.

Phage host range

In order to determine phage host range, 10µL of concentrated phages (titer $\geq 10^9$ “plaque forming units” PFU per mL) were spotted on stationary growing bacteria and plaque assays were used to check the sensitivity of bacteria. This assay was repeated three times. For those testing positive, their efficiency of plating was determined by spotting 5µL of phages at ten-fold serial dilutions (10^{-1} - 10^{-8}) onto the bacterial lawn. Similarly, phages cocktails prepared by mixing 10^7 PFU of each phage, were tested using serial dilutions.

Electron microscopy

Phages were amplified by culturing with selected bacterial strains on fresh LB agar plates for 8 hours at 37°C, and the soft agar was recovered in 4mL of SM buffer and a few drops of chloroform. After centrifugation at 2500g for 10min, the supernatant was filtrated through 0.45µm pore size membranes, and the phages were pelleted by ultracentrifugation (Beckman Coulter SW41 rotor) at 260,000xg for 2 hours at 4°C. Phages were purified by two washings with 100mM ammonium acetate pH7 and the pellet was finally resuspended in 100µL SM buffer. Then 3µL of concentrated bacteriophages were spotted on carbon-coated grids and were allowed to adsorb for 5 min. Phages were stained by adding a drop of 2% potassium phosphotungstate (pH7) for 30sec, and excess sample was removed by carefully touching the side of the grid with filter paper. The grid was then visualized using an EM208S transmission electron microscope (FEI, Eindhoven, The Netherlands) operating at 80 kV.

DNA preparation and restriction enzyme digestion

For rapid DNA purification, phages were amplified by culturing on fresh LB agar plates for 8 hours at 37°C. Then 5mL of a 10mM Tris PH 7.5, 10mM MgSO₄ solution were added to the plate followed by overnight incubation at 4°C. The buffer was transferred to a 50mL tube and bacteria debris were pelleted by centrifugation at 2500g for 10min at 4°C. A mixture of 0.2mL 2M Tris pH 7.5, 0.4mL 0.5M EDTA, 0.2 mL 10% SDS and 10µL diethylpyrocarbonate was added to 4mL of supernatant. Following incubation at 65°C for 30min, the tube was cooled on ice and 1mL 5M KOH was added. After 1 hour incubation in ice, centrifugation was performed at 25000g for 20min at 4°C. The DNA contained in the supernatant was precipitated with 2 volumes of absolute ethanol, pelleted by centrifugation, washed twice with 70% ethanol, dried and dissolved in 0.4mL 10mM Tris pH7.5, 1mM EDTA. For restriction enzyme analysis, 10µL bacteriophage DNA was digested according to the manufacturer's recommendations and analysed on a 0.8% agarose gel in 0.5 x TB buffer. In some cases, digestion was carried out overnight to ensure total digestion. The restriction enzymes were *EcoRI*, *HindIII*, *BssHII*, *BglII*, *Sau3A*, *AluI*, *HaeII*.

Phage whole genome sequencing

Phage DNA was prepared using the rapid protocol described above and the quality was checked by restriction enzyme digestion, followed by gel analysis. Then 5 µg were sent to the CNRS sequencing facility in Gif sur Yvette (IMAGIF) for preparation of a library and sequencing on the Illumina platform (Illumina Genome Analyzer IIx). Paired-end 75bp reads were produced, from mean insert length around 300 bp. The BioNumerics tools (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) were used for assembly and comparison of genome sequences. For the *de novo* assembly, two algorithms were applied to produce contigs, namely Velvet (Zerbino et Birney 2008) and Ray (Boisvert, Laviolette et Corbeil 2010). Both are implemented in the 6.6 version of the BioNumerics software, in the "Power Assembler" module. A single contig was obtained without any gap and the distribution of reads along this contig was analysed. After alignment with published sequences large regions of deletion were verified by PCR amplification using primers selected in flanking sequences. Annotated sequences were deposited at EMBL-EBI under accession number HE983845 for phage vB_PaeM_C2-10_Ab01, and HE983844 for phage

vB_PaeP_C1-14_Or01. Additional information is available at the web site <http://bacteriophages.igmors.u-psud.fr>.

Amplification and sequencing of CRISPR and of *cas* genes

Two CRISPR-Cas systems have been observed in sequenced genomes of *P. aeruginosa*. The type I-F (*Yersinia*) system or CASS3 subtype (Makarova, Aravind *et al.* 2011) found in strain PA14 includes two CRISPRs with 28bp repeats. They are referred to as NC_6483_2 or CRISPR1 with repeat TTTCTTAGCTGCCTATACGGCAGTGAAC and NC_006483_3 or CRISPR2 with repeat TTTCTTAGCTGCCTACACGGCAGTGAAC (Grissa, Vergnaud et Pourcel 2007). They are associated with a set of *cas* genes, from among which *cas1* was selected for amplification. The primers used for *cas1* and CRISPR PCR amplification are shown on Table 1.

Table 1: Primers used for PCR amplification in the present study

Primers	Sequence 5' to 3'	Reference
CRISPRPaer-F	CTTGACGACCTATGTGGCAG	This study
CRISPRPaer-R	GTCGCTGCAAAAAGAGGGTT	This study
CRISPR2Paer-F	TTTTCGTCTGTGTGAGGAGC	This study
CRISPR2Paer-R	AGCAAGTTACGAGACCTCGA	This study
CRISPR3Paer-F	ATTTCCAGGAGCGGCGCGAG	This study
CRISPR3Paer-R	GATCACGCCACTGGTCGTAG	This study
PaerCas1_F	GACATTTCTCCAGCGAACTGA	This study
PaerCas1_R	CTTCTTCGGTCAGTAGATGCTC	This study
<i>Pseudomonas cse3</i> For	ATGTACCTGACCAGACTGACCCTTGATCCTCGCAGCG	(Cady, 2011)
<i>Pseudomonas cse3</i> Rev	GGCTCAGCAGGCCACAGCCGAAAGCCTTG	(Cady, 2011)

In the unpublished draft genome sequence of strain 2192 (Mathee, Narasimhan *et al.* 2008) (NZ_AAKW00000000, available from the Broad Institute web site www.broad.mit.edu/annotation/genome/pseudomonas_group/MultiHome.html) the type I-F CRISPR-Cas system is present together with another system composed of three CRISPRs with a 29bp repeat and another set of *cas* genes. This system is called type I-E (*Escherichia*) or CASS2

(Makarova, Haft *et al.* 2011). Cse3_2192 was amplified using primers Pseudomonas cse3 For and Pseudomonas cse3 Rev described by Cady *et al.* (Cady, White *et al.* 2011).

PCR products were sequenced by Eurofins MWG biotech after purification using the DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN). To classify the spacers in CRISPRs, the CRISPRtionary tool at the CRISPRcompar web site was used (<http://crispr.u-psud.fr/CRISPRcompar/>) (Grissa, Vergnaud *et al.* Pourcel 2008). A dictionary of spacers was produced for CRISPR1 in the orientation based on repeat sequence TTTCTTAGCTGCCTATACGGCAGTGAAC such as described by Cady *et al.* (Cady, White *et al.* 2011).

RESULTS

Purification of bacteriophages from pyophage on selected *P. aeruginosa* strains

The complex commercial Eliava “pyophage” formulation has a very broad host range, built up over the years, but the details of its composition are unknown. To isolate bacteriophages from pyophage and to test their host ranges, 47 *P. aeruginosa* strains were selected from among 325 strains from French CF patients, on the basis of their distribution into different MLVA clusters (Fig.S1). Two to three members each of 14 MLVA clusters were chosen in order to check whether a similar pattern of phage susceptibility would be observed within each cluster. In addition three reference laboratory strains, PA14, PAO1 and C50, were also used. In about 90% of the strains, the presence of prophages or pyocins could be demonstrated following UV activation and spot testing onto 4 to 6 different strains among the panel of 47 (data not shown). To isolate phages, the pyophage preparation was titered at 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4} dilution on a subgroup of 14 CF strains, distributed into the different MLVA clusters, and on the reference strains PAO1 and C50. On C50, C3-16, C7-12, C7-25, C8-20 and C9-6 no plaques were seen whereas plaques of different sizes and morphologies were observed on the other strains. A total of 10 plaques were recovered from 10 different bacterial strains (C1-14, C1-15, C2-10, C3-20, C5-13, C8-5, C8-13, C8-17, PAO1, Tr60) and purified by three successive platings on the same strain. Different plaque sizes

and shapes were observed and were characteristic for a phage on a given strain (three examples are shown on Fig. 1).

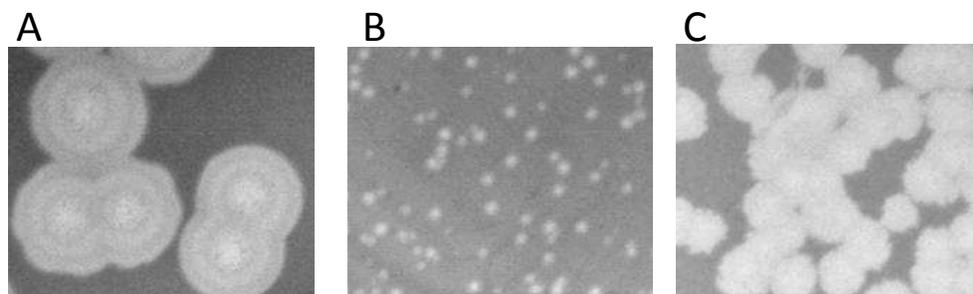


Figure 1: Morphology of plaques produced by three different phages of the pyophage A) P1-15_{pyo} on PAO1, B) P1-14_{pyo} on C1-14, C) PTr60_{pyo} on Tr60.

All phages produced clear plaques after two rounds of infection on a strain. On PAO1, four phages produced very large plaques surrounded by a halo, which kept enlarging with time, suggesting the presence of a strong depolymerase activity (Fig.1A).

The restriction profiles of phage genomic DNA were investigated using several enzymes. *EcoRI*, *HindIII*, *Sau3A* and *AluI* were able to restrict all of the samples, although full digestion of P1-14_{pyo} was not observed with *EcoRI* and *HindIII*. The four phages producing a large halo had the same profile with different enzymes (data not shown) and only one, P1-15_{pyo}, was retained for further analysis. Finally, six phages showing different *Hind III* restriction profiles were selected (Fig. 2).

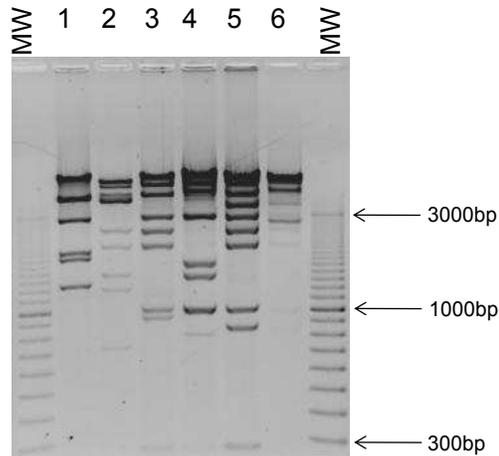


Figure 2: Restriction analysis of phage DNA. The DNA of each of six phages from pyophage was digested by HindIII and electrophorezed on a 0.8% agarose gel. From 1 to 6: P1-15_{pyo}, P8-13_{pyo}, P2-10_{pyo}, P3-20_{pyo}, PTr60_{pyo}, P1-14_{pyo}. MW is a size marker. On the side are indicated the sizes of three DNA fragments. The DNA of P1-14_{pyo} is not totally digested.

Sequencing of several genomic fragments and evaluation of the genome size by analysis of restriction enzyme patterns, suggested that P1-15_{pyo} is a Φ KMV-like phage, P8-13_{pyo} is an N4-like phage, P2-10_{pyo}, P3-20_{pyo} and PTr60_{pyo} are LUZ24-like phages, and P1-14_{pyo} is a PB1-like phage (Fig. S2 and data not shown) (Ceyssens et Lavigne 2010). In agreement with these results, electron microscopy analysis showed that phage P1-14_{pyo} with a 72nm diameter head and a 140-142nm long tail belonged to the *Myoviridae* family, whereas P1-15_{pyo}, P8-13_{pyo} and P2-10_{pyo} with isometric heads of respectively 63-65nm, 72nm and 58-60nm diameter belonged to the *Podoviridae* (Fig. 3). The morphology of P3-20_{pyo} and PTr60_{pyo} was similar to that of podovirus P2-10_{pyo} (data not shown).

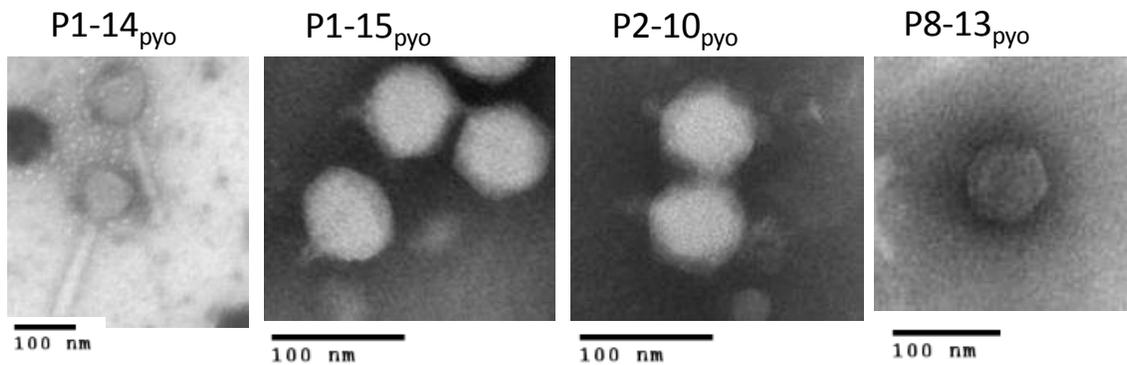


Figure 3: Electron microscopy observation of four phages from pyophage: P8-13_{pyo}, P1-14_{pyo}, P1-15_{pyo}, P2-10_{pyo}.

Virulence of the pyophage-isolated phages

We evaluated the host range and virulence of the six pyophage-derived phages toward the full collection of 47 *P. aeruginosa* strains representative of the diversity in CF patients and towards the three reference strains, by spotting a concentrated suspension onto a bacterial lawn. Table 2 shows the bacteriophage virulence profile. No clear lysis zone could be seen even with high phage concentrations on eleven strains (C50, C5-2, C7-6, C7-12, C7-25, C7-26, C8-7, C8-14, C8-15, C8-20, C9-6) and only a turbid zone or trace growth was observed on 3 additional strains (C3-16, C5-13, C9-5) in good agreement with the lack of susceptibility to the pyophage cocktail presented in the previous paragraph. The other strains showed different susceptibilities to the six phages, mostly independent of their MLVA genotypes. In four cases, strains with the same MLVA genotype showed the same or highly similar phage susceptibility (C8-14 and C8-15, C10-3 and C10-4, C7-25 and C7-26, C8-7 and C8-20) but they corresponded to strains from epidemiologically related cases. In other instances, strains with the same MLVA genotype originating from patients in different hospitals displayed different phage susceptibility profiles (C50 and C10-5; C3-13, C5-13 and C10-1; C1-7 and C3-16; Tr60, C7-11 and C8-12).

Table 2: Susceptibility of 50 *P. aeruginosa* strains to 6 pyophage-derived phages, and CRISPR content

	N4-like	Φ-KMV-like	PB1-like	LUZ24-like			type I-F			type I-E
	p8-13 _{pyo}	p1-15 _{pyo}	p1-14 _{pyo}	pTr60 _{pyo}	p3-20 _{pyo}	p2-10 _{pyo}	CRISPR1	CRISPR2	cas 1	cas 1
PAO1^a	C ^b	C	-	-	-	-	-	-	-	-
PA14	-	-	C	-	-	T	+	+	+	-
C50	T	-	-	-	-	-	+	+	+	-
Tr60	-	C	C	C	C	C	+	+	+	-
C1-1	C	C	T	C	-	-	+	+	+	-
C1-2	T	T	T	T	T	T	-	-	-	-
C1-3	T	-	C	C	C	C	-	-	-	-
C1-4	-	-	-	C	C	C	-	-	-	-
C1-7	C	-	C	T	-	T	+	+	+	-
C1-11	-	-	-	C	C	T	+	+	+	-
C1-14	C	C	C	C	T	T	-	-	-	-
C1-15	-	C	-	C	-	-	+	+	+	-
C2-3	T	-	-	C	C	T	+	+	+	-
C2-10	-	-	-	C	C	C	-	-	-	-
C3-13	C	T	C	T	-	-	+	+	+	+
C3-14	C	-	-	C	C	C	-	-	-	-
C3-16	C	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C3-17	-	-	C	C	C	C	-	-	-	+
C3-20	T	-	-	C	C	C	-	-	-	-
C4-12	-	T	-	C	C	T	-	-	-	-
C4-17	T	T	-	C	C	C	+	+	+	-
C5-2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
C5-12	-	-	T	T	T	T	+	+	+	-
C5-13	-	T	-	-	-	-	-	-	-	+
C7-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-11	-	-	C	C	C	C	+	+	+	-
C7-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-22	-	-	-	C	C	C	-	-	-	-
C7-25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8-5	T	T	-	T	T	-	+	+	+	-
C8-7	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-
C8-12	-	-	C	T	T	T	+	+	+	-
C8-13	T	-	C	C	C	C	+	+	+	-
C8-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8-17	-	C	-	C	-	-	+	+	+	-
C8-19	-	-	-	C	T	T	+	+	+	-
C8-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9-2	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-
C9-5	-	T	-	T	-	-	-	-	-	-
C9-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9-11	C	C	C	C	C	-	+	+	+	-
C9-17	-	-	T	-	T	-	+	+	+	-
C10-1	C	-	-	-	-	-	+	+	+	+
C10-2	C	-	C	C	C	C	+	+	+	-
C10-3	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
C10-4	C	-	-	-	-	T	-	-	-	-
C10-5	C	-	T	T	C	T	+	+	+	-
C10-6	T	-	-	T	C	C	-	-	-	+

^a in bold are shown strains used to purify phages from pyophage

^bC means clear lysis zone and T means turbid lysis zone

Isolation and whole genome sequencing of two new phages

Different strains that were not susceptible to pyophage were used to enrich for phages in sewage water from Orsay (France) and Abidjan (Ivory Coast) and one from each place was selected for further characterization. One phage isolated in Orsay using C8-15, and thereafter amplified on C1-14, was called “vB_PaeP_C1-14_Or01” abbreviated as P1-14_{Or01}. It is a podovirus as shown by EM analysis, with a 60 nm head and a short tail (Fig. 4).

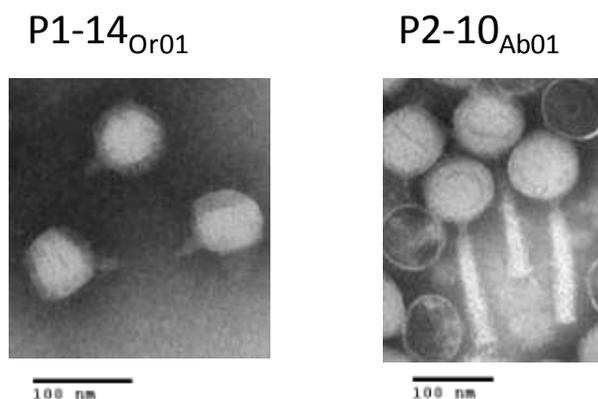


Figure 4: Electron microscopy observation of the new phages P1-14_{Or01} and P2-10_{Ab01}.

Whole-genome sequencing was performed using the Illumina technology and a single contig of 45,469 nucleotides was assembled. Interestingly, when we analysed the reads coverage along this contig we noticed the presence of high peaks with one defined end on one strand (Fig. S3). Two peaks could be assigned to the genome ends (labelled RE and LE Fig S3A) and 8 peaks were distributed along the genome. At the 8 sites we found a short conserved sequence which consensus is GTCATAGTAC (Fig. S3B).

Upon alignment of the P1-14_{Or01} genome with sequenced genomes present in Genbank, the closest phages were Φ MR299-2 with 97% average nucleotide similarity (Alemayehu, Casey *et al.* 2012), PaP3 with 95% average similarity (Tan, Zhang *et al.* 2007), and LUZ24 with 90 % average similarity (Ceyssens, Hertveldt *et al.* 2008). The differences were not evenly distributed but were concentrated into several regions with 84 to 94% identity with the closest phage genome Φ MR299-2. An approximately 3000bp fragment showed 97% similarity with phage PaP3 and

86% similarity with phage Φ MR299-2. It encompassed 3 hypothetical open reading frames (orf10 to orf13), two of which (orf12 and orf13) encode constituents of the phage particle. Another region of about 660bp showed 91% identity with Φ MR299-2 and 92% identity with LUZ24 and encompassed orf17 encoding a putative phage particle protein. Finally a 600bp region with 84% identity with Φ MR299-2 and 96% identity with PaP3 encoded orf25, a putative phage constituent protein. Figure 5 shows the gene organisation of P1-14_{Or01} and a comparison with that of phages Φ MR299-2 and LUZ24.

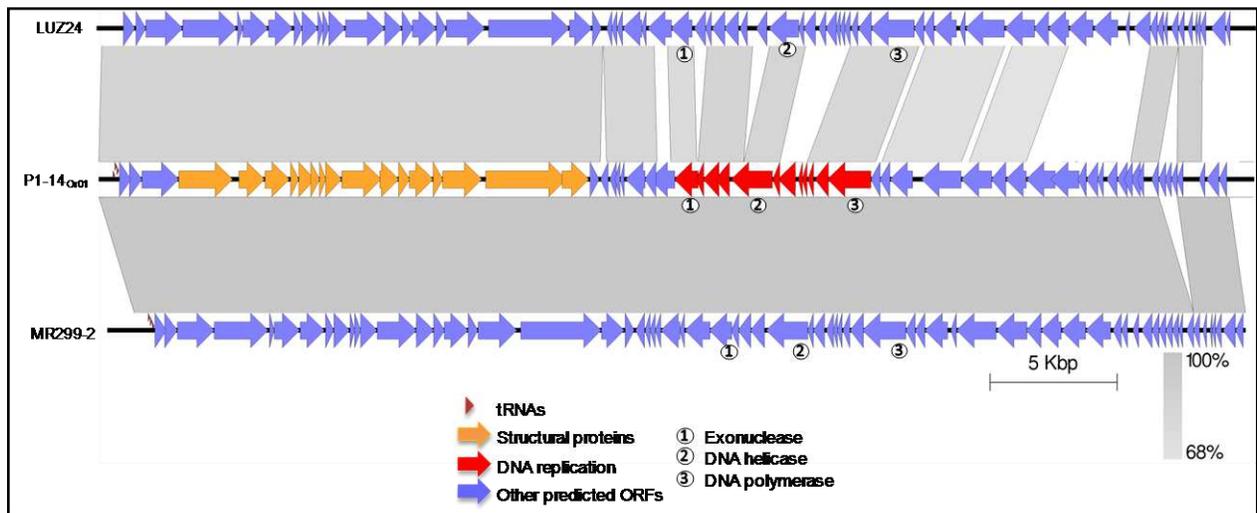


Figure 5: Alignment of P1-14_{Or01}, MR199-2 and LUZ24 genomes. Putative open reading frames (ORF) are shown with arrows. In red are shown the tentative cluster of genes encoding structural proteins and in yellow the genes involved in DNA replication. tRNA genes are shown with triangles. Boxes with different shades of grey represent degrees of similarities between genomes.

A 182bp sequence similar to the LUZ24 long terminal repeat sequence could be assembled on one end. Three tRNA genes (tRNA^{Asn}, tRNA^{Asp} and tRNA^{Pro}) were present in P1-14_{Or01} and phiMR199-2 compared to four in PaP3 and two in LUZ24. Phage Φ MT299-2 is lacking a 734bp region, as compared to P1-14_{Or01}, encompassing three putative genes (orf58 to orf60 in P1-14_{Or01}). No genes potentially involved in lysogeny (integrase, recombinase, repressor, or excisionase) were detected in this phage.

The second new phage recovered from a sewage water sample from Abidjan by enrichment with pyophage-resistant strain C7-6 produced large clear plaques on this strain, and on C9-5 but with a low efficiency. The highest degree of growth was seen on C2-10 and C9-11. It is a myovirus as shown by EM examination, with a 85nm diameter head and a 142nm long tail (Fig. 4). This phage, which was amplified on C2-10, was named “vB_PaeM_C2-10_Ab01” abbreviated as P2-10_{Ab01}. Genome sequencing produced a single contig of 92,777bp showing 93% average sequence similarity with JG004 (Garbe, Bunk *et al.* 2011), and 91% average similarity with PaKP1 (Debarbieux, Leduc *et al.* 2010) and PaP1 (HQ832595) which are JG004-like phages. Eleven tRNA genes were found (tRNA^{Gln}, tRNA^{Arg}, tRNA^{Lys}, tRNA^{Leu}, tRNA^{Ile}, tRNA^{Asp}, tRNA^{Cys}, tRNA^{Pro}, tRNA^{Gly}, tRNA^{Phe}, tRNA^{Glu}) compared to twelve in JG004 and PaKP1 (the same eleven plus tRNA^{Asn}).

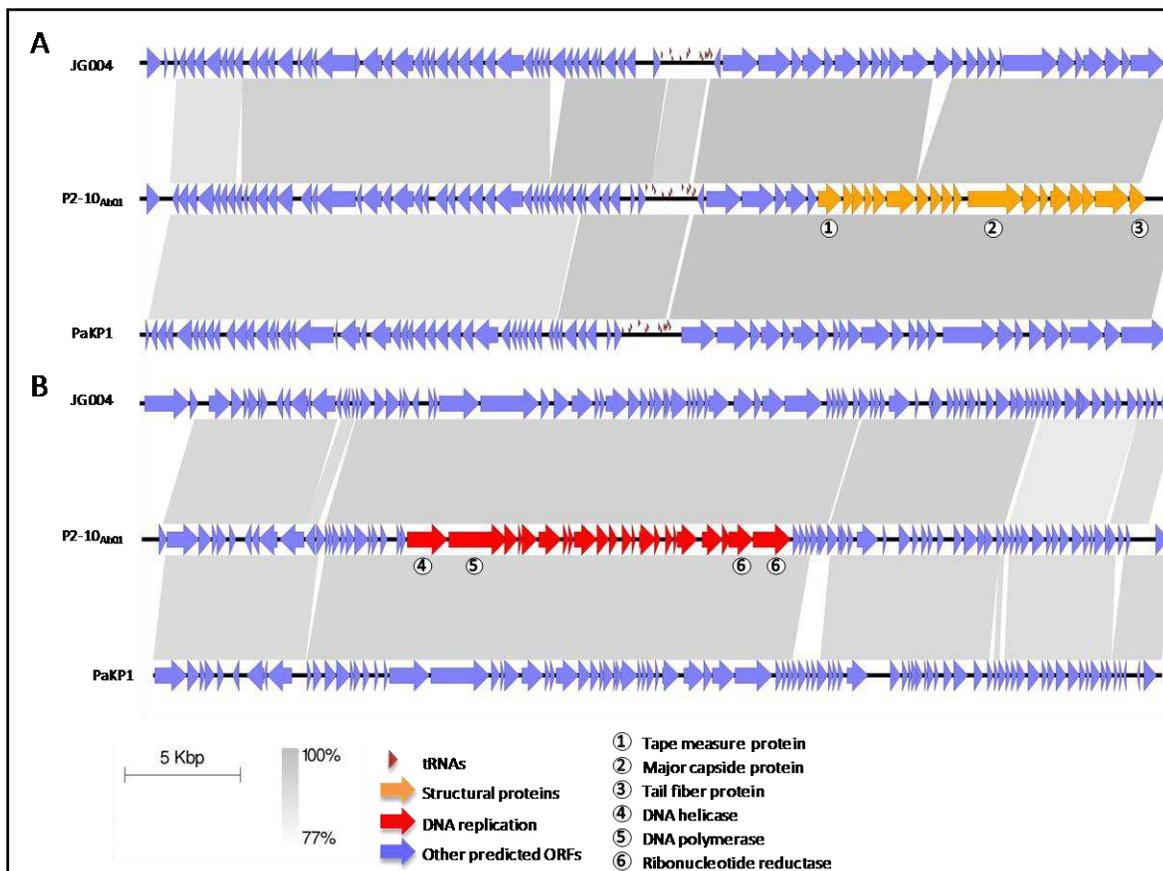


Figure 6: Alignment of P2-10_{Ab01}, JG004 and PAKP1 genomes. The genomes are separated into two sections (A and B) of approximately 46kb. The legend is that of Figure 5.

Alignment of P2-10_{Ab01}, PaKP1 and JG004 genomes (Fig. 6 A and B) emphasized the mosaic composition of the genomes and showed that the structural genes have the highest degree of conservation. The gene organization was similar, apart from short orfs which were differentially annotated in the three genomes. PJG4_036 and PJG4_070 encode two putative homing endonucleases which were absent from PaKP1 and from P2-10_{Ab01}, as confirmed by PCR using flanking primers (data not shown).

The susceptibility of 20 *P. aeruginosa* strains to the two newly isolated phages was investigated by spotting serial dilutions of phages (Table 3).

Table 3: Susceptibility of 17 *P. aeruginosa* strains to two newly isolated phages

	P1-14 _{Or01}	P2-10 _{Ab01}
PAO1	t ^a ++	-
PA14	-	t++
C50	t+	-
Tr60	c+++	t++
C1-14	c+++	c+
C2-10	c+++	c+++
C3-16	t++	t+
C3-20	t++	-
C5-2	-	-
C5-12	c+++	-
C7-6	t+	c+
C7-12	-	-
C7-25	-	-
C8-7	-	t++
C8-14	t+	-
C8-15	c+	-
C8-20	-	-
C9-5	t+	c+
C9-6	-	-
C9-11	t+	c+++

^a "t" - turbid plaques; "c" - clear plaques; "-" - no growth; "+" - degree of growth

P1-14_{Or01} differs from the three LUZ24-like phages isolated from the pyophage preparation by its virulence for C5-12 and by a low level of growth on C8-15 (Table 2 and Table 3). Interestingly P1-14_{Or01} systematically produced both clear and turbid plaques on C2-10, even after purification of a single plaque, whereas only clear plaques were seen on C1-14, C5-12 and C8-15. P2-10_{Ab01} produced plaques on C7-6 and C9-5 although with approximately 10 times lower efficiency as compared to growth on C2-10 and C9-11. Several strains which did not support growth of the pyophage-derived phages were not susceptible to the new phages (C5-2, C7-12, C7-25, C8-20). Partial 16S RNA gene amplification and sequencing was performed on DNA from these strains confirming that they belonged to the *P. aeruginosa* species.

Susceptibility of bacteria to phage cocktails

Three phages mixtures were prepared, respectively composed of the 6 pyophage-derived phages (6ph cocktail), the two newly isolated phages P1-14_{Or} and P2-10_{Ab01} (2ph cocktail) and the combination of 8 isolated phages (8ph cocktail) together representing 5 genera (Table 4).

Table 4: Bacteria susceptibility to four phage-cocktails

	Pyophage	6ph ^a	2ph ^b	8ph ^c
PAO1	c+++	c+++	t++	c+++
PA14	c+++	c+++	-	c+++
Tr60	c+	c+++	c+++	c+++
C50	-	-	-	-
C1-2	c+++	c+++	c+++	c+++
C1-14	c+++	c+++	t+	c+++
C2-10	c+	c+++	c+++	c+++
C3-16	-	-	-	-
C3-20	c+	c+++	t++	c+++
C5-2	-	-	-	-
C5-12	t+	c+++	c+++	c+++
C7-6	-	-	c+	c+
C7-12	-	-	-	-
C7-25	-	-	-	-
C8-5	t+	t+	t+	t+
C8-7	-	-	-	-
C8-14	-	-	-	-
C8-15	-	-	-	-
C8-20	-	-	-	-
C9-2	c+++	c+++	c+++	c+++
C9-5	t+	t+	c+++	c+++
C9-6	-	-	-	-
C9-17	c+++	c+++	c+++	c+++

^a 6ph is a mixture of the 6 pyophage-isolated phages

^b 2ph is a mixture of phages P1-14_{Or01} and P2-10_{Ab01}

^c 8ph is a combination of 6ph and 2ph

All mixtures contained 10⁷ PFU/mL of each phage. Susceptibility of bacteria toward pyophage and toward 6ph and 8ph cocktails were similar except for strains C7-6 and C9-5 which were lysed by P2-10_{Ab01} present in 6ph and 8ph. The trace growth seen for C8-15 using P1-14_{Or} alone was not

observed in the 2ph and 8ph cocktails. The concentration of phages in the pyophage was probably lower than in the other cocktails explaining the lower level of growth on different strains. All the strains that did not support the growth of pyophage were equally not infected by the 6ph cocktail. Altogether these results demonstrate that the association of several phages does not affect the activity of a given phage.

CRISPR and *cas1* gene analysis

In order to investigate the potential role of the CRISPR-Cas system in resistance to infection by these phages, we first searched for the presence of the type I-F (*Yersinia*) system in the selected *P. aeruginosa* strains. We used primer sequences localised in the *cas1* gene because this gene has been shown to be essential for the activity of the CRISPR-Cas system. We also used primers localised on both sides of the CRISPR1 and CRISPR2 loci in PA14 (Fig. S4). In 24 strains, including PA14 and C50, PCRs were positive for all three loci (Table 2). The CRISPRs size varied from one strain to the other. To analyse the DR and spacer diversity, CRISPR1 was sequenced in all these strains and in 18 additional ones from the same collection, resulting in sequences for a total of 264 spacers (Table S1). Common spacers were observed in strains belonging to clusters defined by MLVA (Fig. S5 and S6). A search for sequences homologous to spacers by BLAST in Genbank gave a 100% match for 40% of the spacers, corresponding mostly to temperate phages or prophages but in a few cases to sequences of plasmids, pyocins or pathogenicity islands. A given CRISPR often contained several fragments of a particular phage. In order to compare the CRISPR of our strains with those described in the literature we produced a combined dictionary of spacers found in the study of Cady et al. (Cady, White *et al.* 2011) and the spacers described in the present study (Table S2). Twenty six of our strains possessed spacers that were previously found in other strains.

We also investigated the presence of the type I-E (*Escherichia*) CRISPR-Cas by amplification using primers in the *cas1* gene. Six strains possessed the type I-E (*Escherichia*), three of which had also the type I-F (*Yersinia*) (Table 2). Interestingly, there was an inverse relationship between the presence of a CRISPR-Cas system and absence of growth of our phages.

DISCUSSION

The pyophage preparation

The pyophage formulation is continuously enriched by new phages and variants of these in response to changes in pathogen targets and it is not clear how many species are present (Abedon, Kuhl *et al.* 2011). The collection of strains we have used both to purify phages from pyophage and to test their virulence spectrum is representative of the diversity of clinical (CF) *P. aeruginosa* in French hospitals. The most susceptible *P. aeruginosa* strains in this collection were C1-14 and C2-10. A large variety of plaque morphologies could be observed on these strains. The present work allowed the identification of 6 phages showing different restriction enzyme profiles and belonging to four genera (Ceyskens et Lavigne 2010). P1-15_{pyo}, a Φ KMV-like phage, apparently produces an important depolymerase activity which may be of interest to lyse bacteria inside biofilms (Hughes, Sutherland *et al.* 1998). Three phages belonging to the LUZ24-like genus show the largest virulence spectra, with few differences between them, although their restriction profiles were rather different. Other phage species may be present in the pyophage but may have been missed on our collection of strains, because of their lower concentration, inability to target the particular strains being used or pure chance. For example, a JG004-like phage was isolated from pyophage in studies involving a large set of CF strains from Children's Hospital in Seattle, as well as phages from 3 of the genera observed above but with different host ranges (E. Kutter, unpublished). Further work including bulk sequencing will be needed to fully characterize the pyophage cocktail (Mzia Kutateladze and Marina Goderdzishvili, work in progress).

Isolation and sequencing of new phages

From Orsay sewage water a new phage, P1-14_{Or01}, was isolated which could lyse to some extent the pyophage-resistant strain C8-15. Its genome is close to that of phage PAP3 isolated in China (Tan, Zhang *et al.* 2007) and to that of Φ MR299-2 isolated in Ireland (Alemayehu, Casey *et al.* 2012). They all belong to the LUZ24-like genus but show substantial variability. PAP3 was

reported to be capable of lysogenization (by integration into a tRNA gene rather than by the usual integrase), but we did not find any such evidence for P1-14_{Or01}, nor did investigators studying LUZ24 and its other relatives. We observed a very important relative amount of sequencing reads at 8 positions along the genome and detected the consensus sequence GTACTATGAC at each of these positions. This sequence is very close to the consensus sequence 5'-TACTRTGMC-3' corresponding to single-strand DNA interruptions in phage *tf* of *P. putida* (Glukhov, Krutilina *et al.* 2012). Such nicks were never described in *P. aeruginosa* LUZ24-like phages although the site is present in all of the sequenced genomes reported so far. We believe that the DNA preparation method and/or the sequencing technique utilized in the present study is a convenient way to reveal the existence of nicks in phage genomes.

Phage P2-10_{Ab01} isolated from sewage water in Abidjan could lyse two pyophage-resistant strains, C7-6 and C9-5. Its genome is related to those of JG004 and other phages from Poland, France, Japan and Germany, representing a genus we did not detect in pyophage using our strains. Comparison of these phage genomes shows an important degree of mosaicism although the overall arrangement and gene distribution is similar. P2-10_{Ab01} and PAKP1 apparently lack two genes encoding putative homing endonucleases which were observed in phage JG004. JG004 orf36 encodes a 219 amino acids HNH endonuclease which shows similarities with homing endonucleases possessing a C-terminal AP2 DNA binding domain, found in many plants and some bacterial and viral proteins (Magnani, Sjolander et Hake 2004). Genes of this family are present in different bacteriophages including *Salmonella* phage Felix01 (Whichard, Weigt *et al.* 2010) and *P. chlororaphis* phiKZ-like phage 201phi2-1 (orf35) (Thomas, Rolando *et al.* 2008). Orf70 encodes a 258 amino acid putative endonuclease with a N-terminal GIY-YIC catalytic domain similar to that of the SegA-E proteins of phage T4 (Sharma, Ellis et Hinton 1992) and also present in many bacteriophages. Homing endonucleases can transpose and duplicate themselves and can move via lateral gene transfer (Gimble 2000). Their abundance in some genomes such as that of *Xanthomonas oryzae* phage Xp10 genome (Yuzenkova, Nechaev *et al.* 2003) or phage T4 (Edgell, Gibb et Belfort 2010) suggests that they play a role in the evolution of phages. They influence the distribution of sequences flanking their insertion site, whether this site is specific or not.

P2-10_{Ab01} and P1-14_{Or01} were able to grow on some strains that were not infected by the pyophage-derived phages. This may be due to the existence of a specific receptor in the case of phage P2-10_{Ab01} which belongs to a new genus. In the case of P1-14_{Or01} belonging to the LUZ24-like genus as three pyophage-derived phages, it might be due to a mutation in the tail binding domain.

New phages are continuously isolated for *P. aeruginosa*, and their capacity to target various clinical strains is tested *in vitro* and in animal models (Morello, Saussereau *et al.* 2011 ; Alemayehu, Casey *et al.* 2012 ; Vieira, Silva *et al.* 2012). Our first attempt to obtain phages that could lyse strains that do not support pyophage infection led in part to the isolation of phages which belong to different species or genera. Most new phages belong to already-recognized genera even though they may have new ranges of host specificities. From our observations we suggest that an efficient cocktail of lytic phages for treatment of CF patients should contain phages belonging to different genera such as proposed previously (Karumidze, Thomas *et al.* 2012). However it is not clear if the virulence of different phages in a cocktail will add up or if on the contrary different phage types may not be compatible (Chan et Abedon 2012). Our own observations suggest that phages behave similarly alone or in a cocktail. Work done with *E. coli* T4-like phages demonstrates a large variety of host ranges inside a single group (Chibani-Chennoufi, Sidoti *et al.* 2004 ; Kutter 2009), and a quite broad variation of host specificity have also been observed between members of some of the genera of *Pseudomonas* phages (E. Kutter, unpublished studies of phages targeting a set of 200 CF strains and phages targeting a set of 100 dog-ear strains). In cocktails containing multiple members of the same genus with different host ranges, there is a substantial possibility for recombination between such phages to generate new host specificities. It is quite probable that this occurs on a regular basis when pyophage is produced and used.

Mechanisms of resistance and the role of the CRISPR-Cas system

Thirteen out of 47 *P. aeruginosa* strains, including members of clone C frequently isolated from CF patients, were not lysed by the pyophage preparation or by each phage individually. Some were also not susceptible to a much larger collection of phages from different geographical origins and belonging to other genera such as Φ kZ-like phages (V. Krylov personal communication). Loss or significant alteration of receptors or overproduction of exopolysaccharides such as alginates may represent general mechanisms of resistance (Koskella, Lin *et al.* 2012). The existence of a particular restriction system is also possible. These strains were not genetically related, were not mucoid, and were susceptible to most antibiotics. The lung of CF patients is colonized very early by multiple bacterial species which coexist with bacteriophages inside a biofilm (Tejedor, Foulds *et al.* 1982). This might create a favourable environment for evolution of bacteria towards broad phage resistance although this was not observed experimentally either here or by others (Koskella, Lin *et al.* 2012).

We showed that, in the tested strains, the presence of a CRISPR-Cas system was not associated with resistance to a particular lytic phage. On the contrary, it appears that a CRISPR-Cas system was absent from the strains that could not support multiplication of any tested phages. However, in the light of the recent discovery in some Mu-like phages of genes that inactivate the CRISPR-Cas systems it is not possible to completely rule out a role of this system in controlling lytic phage infection (Bondy-Denomy, Pawluk *et al.* 2013). None of the phages present in this study belong to the Mu-like genus and we did not find a candidate gene in the configuration described by Bondy-Denomy *et al.* in the two sequenced genomes. Cady *et al.* analysed the prevalence of the two CRISPR-Cas systems in *P. aeruginosa* and showed that the 132 viral spacers with matches in sequence databases matched temperate bacteriophage/prophages capable of inserting into the host chromosome; none matched extrachromosomally replicating lytic *P. aeruginosa* bacteriophages (Cady, White *et al.* 2011). They later reported that the type I-F (*Yersinia*) CRISPR region of *P. aeruginosa* strain UCBPP-PA14 plays a role in immunity against specific temperate phages (Cady, Bondy-Denomy *et al.* 2012). In the strains used here, the majority of spacers with homologues in databases also match temperate phages. We observed some matches with chromosomal sequences such as pyocins and genes of pathogenicity islands, both of which often appear to have their

origins in temperate phages. The CRISPR-Cas system might thus be used to inhibit reactivation of prophages or transposable sequences. We confirmed that the majority of clinical *P. aeruginosa* strains are lysogenic (often multilycogenic), and that spontaneous activation of these phages is frequent, as previously reported (Holloway 1969 ; Miller et Rubero 1984). In *E. coli* and in *Streptococcus pyogenes* the CRISPR-Cas system is also involved in the control of lysogenisation and prophage induction (Edgar et Qimron 2010). To understand the role of the CRISPR-Cas system it will be necessary to further explore its function during the establishment and control of lysogeny.

Conclusion

Our results emphasize the difficulty in preparing a phage cocktail that could be efficient on the whole species, particularly given the wide diversity of the *P. aeruginosa* species. Several bacterial strains cannot support growth of all lytic phages investigated in this study and phages from other collections, representing a total of 6 different genera, which suggests that they may have developed new resistance mechanisms. These strains will need to be analysed in detail and their genomes fully sequenced to try and identify the involved mechanisms, including possible prophage-based ones, and look for ways of bypassing them.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mzia Kutateladze and Marina Goderdzishvili (Tbilisi, Georgia) for the pyophage and to Annick Jacq (Orsay) for her expertise and support. We thank Julien Navarro and Christophe Tourterel for their help with genome sequence analysis, and Danielle Jaillard and Luvidine Houel at the Electron Microscopy platform of University Paris Sud for performing EM examination. We thank Victor Krylov and Elena Pleteneva for testing their phage collection on some strains. This work has benefited from the facilities and expertise of the high throughput sequencing platform of IMAGIF (Centre de Recherche de Gif - www.imagif.cnrs.fr). We thank the association Vaincre la Mucoviscidose for its financial help.

REFERENCES

- Abedon, S. T., S. J. Kuhl, *et al.* (2011). "Phage treatment of human infections." Bacteriophage **1**(2): 66-85.
- Alemayehu, D., P. G. Casey, *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.
- Barrangou, R., C. Fremaux, *et al.* (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." Science **315**(5819): 1709-1712.
- Boisvert, S., F. Laviolette et J. Corbeil (2010). "Ray: simultaneous assembly of reads from a mix of high-throughput sequencing technologies." J Comput Biol **17**(11): 1519-1533.
- Bondy-Denomy, J., A. Pawluk, *et al.* (2013). "Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system." Nature **493**(7432): 429-432.
- Brussow, H. (2012). "*Pseudomonas* biofilms, cystic fibrosis, and phage: a silver lining?" MBio **3**(2).
- Cady, K. C., J. Bondy-Denomy, *et al.* (2012). "The CRISPR/Cas Adaptive Immune System of *Pseudomonas aeruginosa* Mediates Resistance to Naturally Occurring and Engineered Phages." J Bacteriol **194**(21): 5728-5738.
- Cady, K. C., A. S. White, *et al.* (2011). "Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates." Microbiology **157**(Pt 2): 430-437.
- Ceyssens, P. J., K. Hertveldt, *et al.* (2008). "The intron-containing genome of the lytic *Pseudomonas* phage LUZ24 resembles the temperate phage PaP3." Virology **377**(2): 233-238.
- Ceyssens, P. J. et R. Lavigne (2010). "Bacteriophages of *Pseudomonas*." Future Microbiol **5**(7): 1041-1055.
- Chan, B. K. et S. T. Abedon (2012). "Phage therapy pharmacology phage cocktails." Adv Appl Microbiol **78**: 1-23.
- Chanishvili, N. (2012). "Phage therapy--history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches." Adv Virus Res **83**: 3-40.
- Chibani-Chennoufi, S., J. Sidoti, *et al.* (2004). "Isolation of *Escherichia coli* bacteriophages from the stool of pediatric diarrhea patients in Bangladesh." J Bacteriol **186**(24): 8287-8294.
- Davies, J. C. et D. Bilton (2009). "Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis." Respir Care **54**(5): 628-640.
- Debarbieux, L., D. Leduc, *et al.* (2010). "Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections." J Infect Dis **201**(7): 1096-1104.
- Edgar, R. et U. Qimron (2010). "The *Escherichia coli* CRISPR System Protects from {lambda} Lysogenization, Lysogens, and Prophage Induction." J Bacteriol **192**(23): 6291-6294.
- Edgell, D. R., E. A. Gibb et M. Belfort (2010). "Mobile DNA elements in T4 and related phages." Virol J **7**: 290.
- Garbe, J., B. Bunk, *et al.* (2011). "Sequencing and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004." BMC Microbiol **11**: 102.
- Gimble, F. S. (2000). "Invasion of a multitude of genetic niches by mobile endonuclease genes." FEMS Microbiol Lett **185**(2): 99-107.

- Glukhov, A. S., A. I. Krutilina, *et al.* (2012). "Genomic analysis of *Pseudomonas putida* phage τ with localized single-strand DNA interruptions." PLoS One **7**(12): e51163.
- Grissa, I., G. Vergnaud et C. Pourcel (2007). "CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W52-57.
- Grissa, I., G. Vergnaud et C. Pourcel (2008). "CRISPRcompar: a website to compare clustered regularly interspaced short palindromic repeats." Nucleic Acids Res **36**(Web Server issue): W145-148.
- He, J., R. L. Baldini, *et al.* (2004). "The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2530-2535.
- Holloway, B. W. (1969). "Genetics of *Pseudomonas*." Bacteriol Rev **33**(3): 419-443.
- Hughes, K. A., I. W. Sutherland, *et al.* (1998). "Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases--novel tools for study of bacterial biofilms." J Appl Microbiol **85**(3): 583-590.
- Hyman, P. et S. T. Abedon (2010). "Bacteriophage host range and bacterial resistance." Adv Appl Microbiol **70**: 217-248.
- Karumidze, N., J. A. Thomas, *et al.* (2012). "Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences." Appl Microbiol Biotechnol **94**(6): 1609-1617.
- Koskella, B., D. M. Lin, *et al.* (2012). "The costs of evolving resistance in heterogeneous parasite environments." Proc Biol Sci **279**(1735): 1896-1903.
- Kropinski, A. M., D. Prangishvili et R. Lavigne (2009). "Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of *Bacteria* and *Archaea*." Environ Microbiol **11**(11): 2775-2777.
- Krylov, V., E. Pleteneva, *et al.* (2003). "Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway." Res Microbiol **154**(4): 269-275.
- Kutateladze, M. et R. Adamia (2008). "Phage therapy experience at the Eliava Institute." Med Mal Infect **38**(8): 426-430.
- Kutter, E. (2009). "Phage host range and efficiency of plating." Methods Mol Biol **501**: 141-149.
- Kutter, E., D. De Vos, *et al.* (2010). "Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections." Curr Pharm Biotechnol **11**(1): 69-86.
- Kwan, T., J. Liu, *et al.* (2006). "Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages." J Bacteriol **188**(3): 1184-1187.
- Labrie, S. J., J. E. Samson et S. Moineau (2010). "Bacteriophage resistance mechanisms." Nat Rev Microbiol **8**(5): 317-327.
- Larche, J., F. Pouillot, *et al.* (2012). "Rapid identification of international multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones by multiple locus VNTR analysis (MLVA) and investigation of their susceptibility to lytic bacteriophages." Antimicrob Agents Chemother.
- Lipuma, J. J. (2010). "The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis." Clin Microbiol Rev **23**(2): 299-323.
- Magnani, E., K. Sjolander et S. Hake (2004). "From endonucleases to transcription factors: evolution of the AP2 DNA binding domain in plants." Plant Cell **16**(9): 2265-2277.

- Makarova, K. S., L. Aravind, *et al.* (2011). "Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems." Biol Direct **6**: 38.
- Makarova, K. S., D. H. Haft, *et al.* (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." Nat Rev Microbiol **9**(6): 467-477.
- Mathee, K., G. Narasimhan, *et al.* (2008). "Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(8): 3100-3105.
- Miedzybrodzki, R., J. Borysowski, *et al.* (2012). "Clinical aspects of phage therapy." Adv Virus Res **83**: 73-121.
- Miller, R. V. et V. J. Rubero (1984). "Mucoïd conversion by phages of *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis." J Clin Microbiol **19**(5): 717-719.
- Morello, E., E. Sausseureau, *et al.* (2011). "Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention." PLoS One **6**(2): e16963.
- Pirnay, J. P., D. De Vos, *et al.* (2011). "The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure?" Pharm Res **28**(4): 934-937.
- Pleteneva, E. A., O. V. Shaburova, *et al.* (2008). "[Study of the diversity in a group of phages of *Pseudomonas aeruginosa* species PB1 (Myoviridae) and their behavior in adsorption-resistant bacterial mutants]." Genetika **44**(2): 185-194.
- Pourcel, C., G. Salvignol et G. Vergnaud (2005). "CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies." Microbiology **151**(Pt 3): 653-663.
- Rahme, L. G., E. J. Stevens, *et al.* (1995). "Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals." Science **268**(5219): 1899-1902.
- Romling, U., J. Wingender, *et al.* (1994). "A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats." Appl Environ Microbiol **60**(6): 1734-1738.
- Scott, F. W. et T. L. Pitt (2004). "Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales." J Med Microbiol **53**(Pt 7): 609-615.
- Sharma, M., R. L. Ellis et D. M. Hinton (1992). "Identification of a family of bacteriophage T4 genes encoding proteins similar to those present in group I introns of fungi and phage." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(14): 6658-6662.
- Sobral, D., P. Mariani-Kurkdjian, *et al.* (2012). "A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(9): 2247-2256.
- Sorek, R., V. Kunin et P. Hugenholz (2008). "CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea." Nat Rev Microbiol **6**(3): 181-186.
- Stern, A. et R. Sorek (2011). "The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes." Bioessays **33**(1): 43-51.
- Tan, Y., K. Zhang, *et al.* (2007). "Whole genome sequencing of a novel temperate bacteriophage of *P. aeruginosa*: evidence of tRNA gene mediating integration of the phage genome into the host bacterial chromosome." Cell Microbiol **9**(2): 479-491.
- Tejedor, C., J. Foulds et M. Zasloff (1982). "Bacteriophages in sputum of patients with bronchopulmonary *Pseudomonas* infections." Infect Immun **36**(1): 440-441.

- Thomas, J. A., M. R. Rolando, *et al.* (2008). "Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201varphi2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy." Virology **376**(2): 330-338.
- Vieira, A., Y. J. Silva, *et al.* (2012). "Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: in vitro and ex vivo experiments." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(11): 3241-3249.
- Vu-Thien, H., G. Corbineau, *et al.* (2007). "Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients." J Clin Microbiol **45**(10): 3175-3183.
- Whichard, J. M., L. A. Weigt, *et al.* (2010). "Complete genomic sequence of bacteriophage felix o1." Viruses **2**(3): 710-730.
- Yuzenkova, J., S. Nechaev, *et al.* (2003). "Genome of *Xanthomonas oryzae* bacteriophage Xp10: an odd T-odd phage." J Mol Biol **330**(4): 735-748.
- Zerbino, D. R. et E. Birney (2008). "Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs." Genome Res **18**(5): 821-829.

FIGURES ET TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 1

Figure S1: Minimum spanning tree representation of the clustering of 325 *P. aeruginosa* strains from CF patients. The 50 strains selected for phage isolation are colored in red.

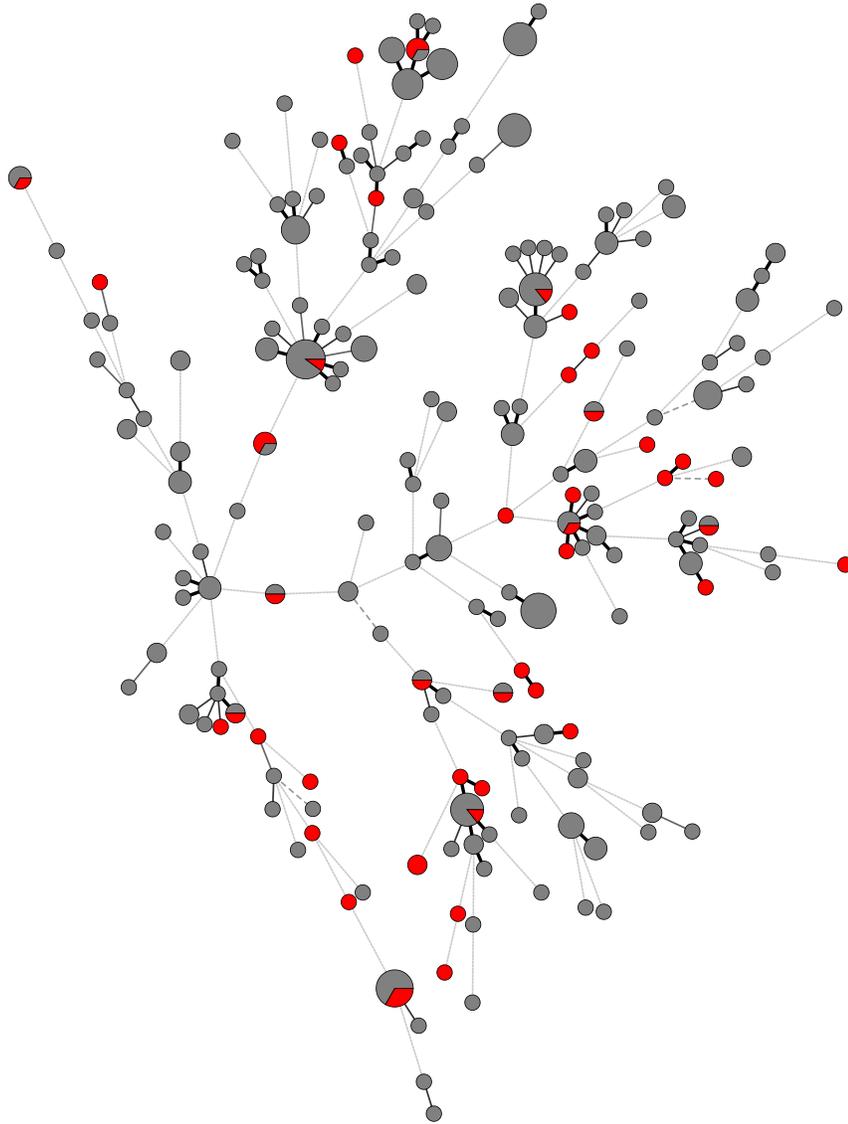


Figure S2: Restriction pattern of 5 Pyophage-derived phages using *EcoRI* and *HindIII*. The fragment sizes were measured using the BioNumerics software. Lanes 1 to 6, *HindIII*-digested lambda DNA used as size marker, P1-15_{pyo}, P8-13_{pyo}, P2-10_{pyo}, P3-20_{pyo}, PTr60_{pyo}. Double or triple bands were evaluated by analyzing the band intensity.

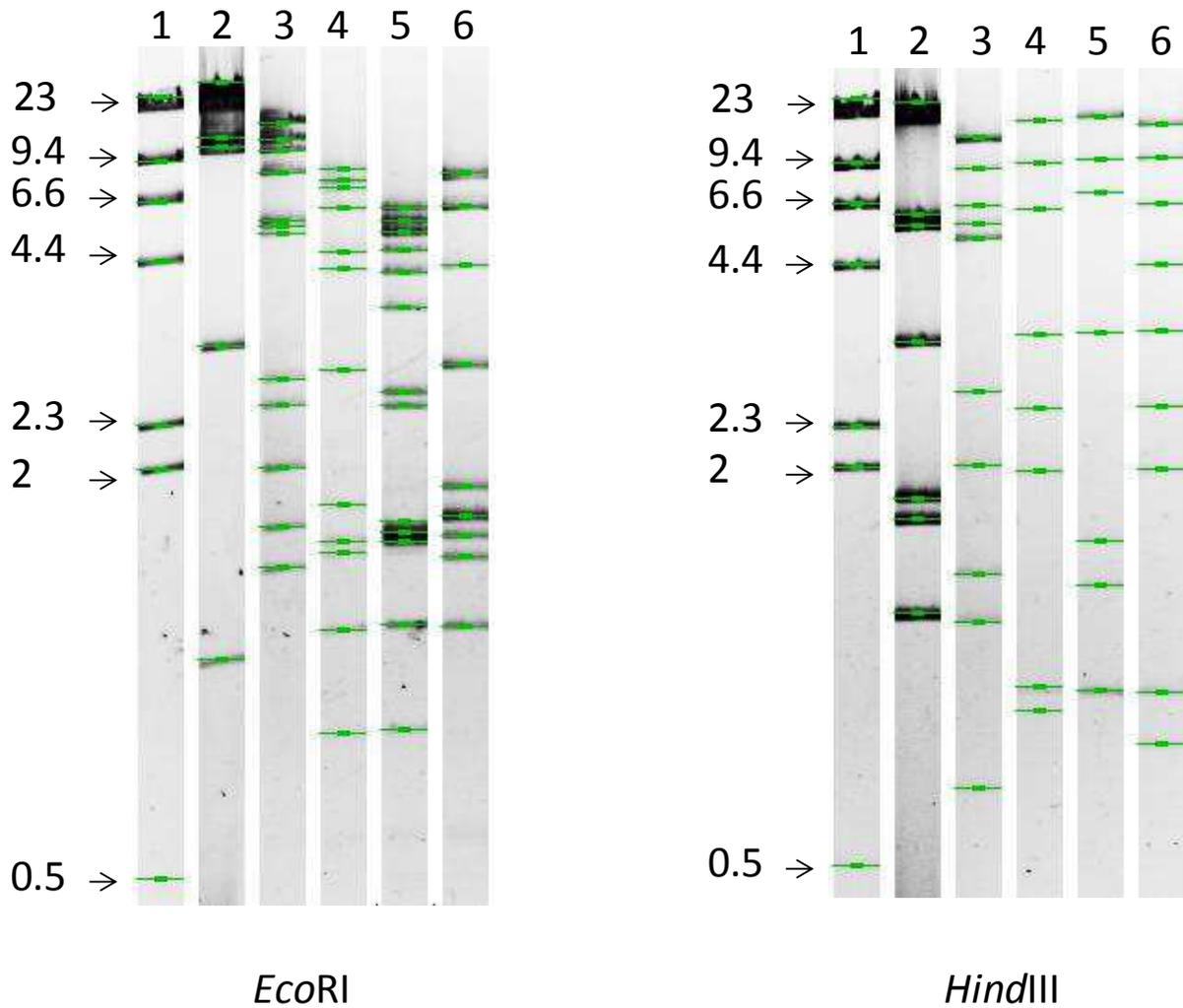
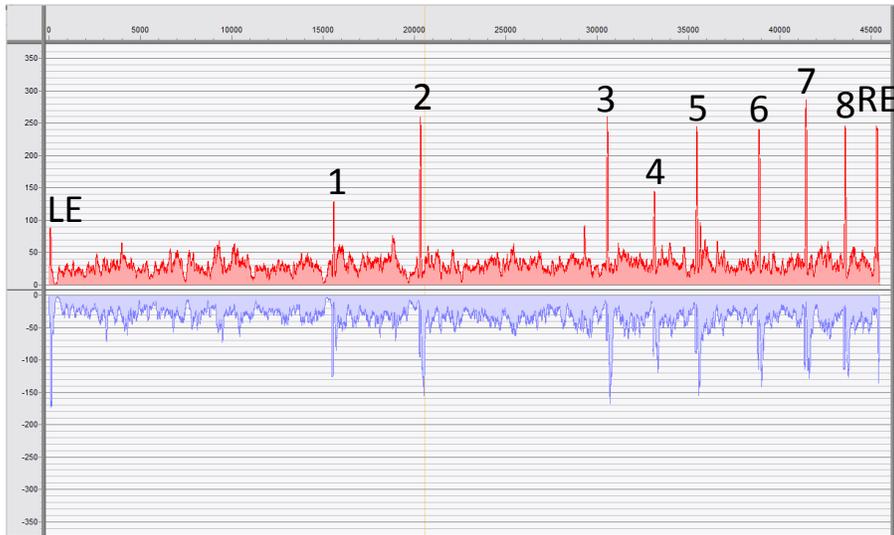


Figure S3: Distribution of nicks along the genome of phage P1-14_{Or1}. A) Sequence read coverage as observed in BioNumerics. B) Alignment of sequences at the nick site. The consensus motif is shown in red. The <> symbol in the center of the motif indicates the end of all the sequencing reads.

A



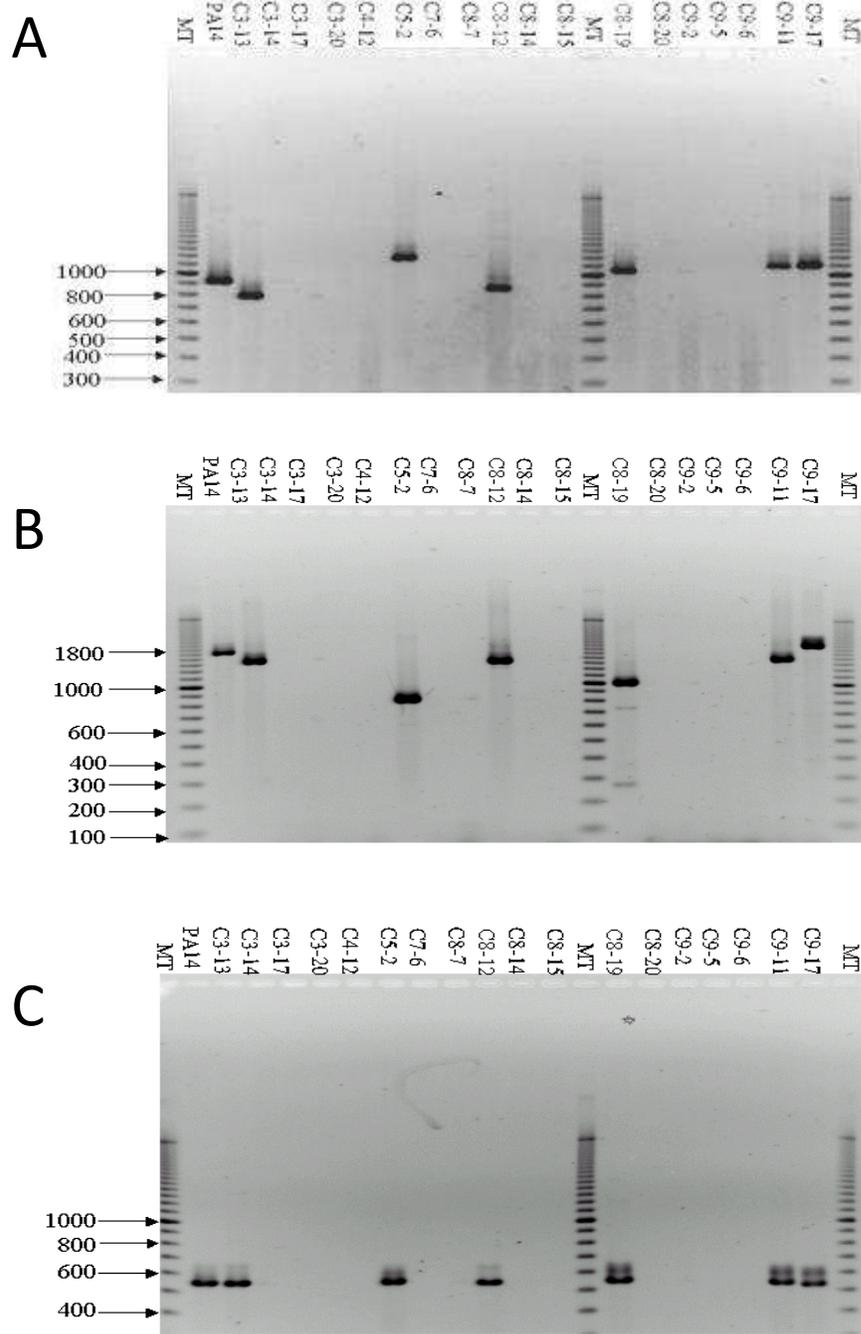
B

```

1-14_Or1:
15400-15700bp_ --GCCCAGGAGGCGTCAC<>AGTACGGAACCCA-----GATG--TTCGGTCTTTTGCC 201
20150-20450bp_ TAGTTCAGCTTTCGTCAT<>AGTACA-CCACCTT-----GTCG--CTAGTCTTGAGTAC 202
30400-30700bp_ TACCAGCAGACTCGTCAT<>AGTACCCGCTG--TAATCCG--AGTCA-TCCGTAGCAGGCTC 194
32950-33250bp_ TGCTTCC TTGATCGTCAT<>AGTACTCCCG-----AGGTATTGCTTCCAGGCGTC 189
35300-35600bp_ TCCCG--TGAAT-GTCAT<>AGTACCCGCTGGCCGGTCTGTGCGTCACTACATCACTGAAGC 189
38700-39000bp_ TT-- --CGTCAT<>AGTACATCAGACCTCCACCGT--GAAGGTATGGCCCTTGGGAA 206
41250-41550bp_ GTATTGGGCGGGCGTCAT<>AGTACACACCC TAG-----GCCGG-AGGTCCGAACCGAT 206
43400-43700bp_ CTG--GGGCG--CGTCAT<>AGTACACACCCAG-----GCGCA-CCCGGCGTTACGCT 204

```

Figure S4: Analysis of the *Yersinia* CRISPR-Cas system. PCR amplification of A) CRISPR1, B) CRISPR2 and C) *cas1* in 19 selected strains and reference strain PA14.



strain_spacer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
C10-1	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C10-2	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
C3-13	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C5-19	■	■					■	■	■	■	■
C5-5	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

strain_spacer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
C1-11	■	■	■	■	■	■	■	■	■														■	■	
C1-7										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C2-3										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C3-16										■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

strain_spacer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C2-22	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
C8-13			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
C9-20	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

strain_spacer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
C2-24	■	■	■	■																	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
C9-17					■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	■	■	■	■

ARTICLE 2

2.3. Article 2: Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages in Abidjan, Côte d'Ivoire

Article en cours de rédaction

Résumé

Ce travail décrit 30 phages de *P. aeruginosa* isolés à partir des eaux usées d'Abidjan (Côte d'Ivoire), pays situé en Afrique subsaharienne et qui n'a jamais été exploré pour la présence de phages dirigés contre *P. aeruginosa*. Ces phages ont été obtenus en utilisant comme bactéries propagatrices les souches cliniques résistantes à une large collection de phages d'origines diverses ainsi que des souches sensibles. Le spectre d'hôte des phages a été déterminé sur une collection de souches de *P. aeruginosa*, et leur génome a été analysé par profil de digestion enzymatique permettant d'identifier dix groupes de phages différents et des souches bactériennes résistantes. Le séquençage du génome complet de douze phages représentant chacun un groupe a été réalisé et leur morphologie déterminée au microscope électronique. Tous les phages sont munis d'une queue et appartiennent aux familles des Myovirus, Podovirus et Siphovirus. L'analyse de leur génome a révélé que les phages évoluent au sein de dix genres de phages différents dont les six genres lytiques Φ KMV, LUZ24, N4, PB-1, PAK-P1 (JG004) et PAK-P3 (KPP10). En revanche parmi les phages tempérés, le génome des phages Ab21 et Ab31 ne présente aucune homologie au niveau nucléotidique avec le génome des phages disponibles dans les bases de données publiques GenBank. Morphologiquement, le phage Ab21 est similaire au phage YUA, un siphovirus avec une tête allongée et partage de nombreux produits de gènes avec celui-ci. Par conséquent, le phage Ab18, ainsi que les phages Ab19, Ab20 et Ab21 très proches sur la base de leur profil de digestion enzymatique et leur spectre d'hôte, constituent une deuxième espèce du genre YUA. Le phage tempéré Ab31 est un podovirus qui ressemble au niveau morphologique au phage lambdaïde AF de *P. putida* et utilise la même stratégie de répllication que le phage PAJU2 de *P. aeruginosa*.

La diversité des phages isolés à Abidjan est très vaste renfermant des phages nouveaux dont des phages lytiques appropriés pour la phagothérapie. La présence de représentants de presque chaque genre de phages lytiques n'a jamais été décrite dans une même localité. L'incapacité de ces phages à infecter certaines souches bactériennes nécessite la recherche de nouveaux phages dans la nature. La caractérisation des mécanismes de résistances de ces souches, et l'étude des caractéristiques biologiques des phages permettront de mieux traiter les infections à *P. aeruginosa* avec les bactériophages.

Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages in Abidjan, Côte d'Ivoire

Running title: Phage/bacteria co-evolution

Christiane Esoh^{1,2}, Yann Blouin^{1,2}, Guillaume Loukou³, Simon-Pierre Nguetta⁴, Nanga Zinziédorf, Timothée Serge Lathro³, Arsher Cablanmian³, Athanase Kra, Gilles Vergnaud^{1,2,5}, Christine Pourcel^{1,2#}

Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Orsay, France¹

CNRS, Orsay, France²

Laboratoire National de Santé Publique, Abidjan, Côte d'Ivoire³

Laboratoire de génétique de l'UFR Biosciences, Université de Cocody, Côte d'Ivoire⁴

DGA/MRIS- Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique, Bagneux, France⁵

#Corresponding author

Institut de Génétique et Microbiologie, Bat. 400, UMR CNRS 8621, Université Paris Sud 11, 91405 Orsay cedex, France

ABSTRACT

Bacteriophages were isolated from sewage water from five different sites in the city of Abidjan using a collection of *P. aeruginosa* isolates with diverse genotypes. They were characterized by their virulence spectrum on a panel of selected strains and by comparison of their genome restriction map using several endonucleases. Among the thirty analyzed phages, twelve were selected for genome sequencing using the Illumina technology and for electron microscopy analysis. The combined observations showed that 23 phages distributed into six genera were virulent, and 7 were related to temperate phages belonging to four genera. Five showed little similarity at the protein level with known phages. Phage Ab31, a podovirus is related to *P. putida* phage AF, whereas Ab18 is a siphovirus showing some similarity with YUA. Some bacterial strains were not lysed by any of these phages showing a remarkable level of resistance. This is the first study of *P. aeruginosa* phage diversity in an African city and it shows that a large variety of species can be observed in a limited geographical site.

INTRODUCTION

Bacteriophages, viruses that infect exclusively bacteria, are the most numerous of all viruses in the biosphere and are estimated 10-fold more numerous than bacteria (Brussow et Hendrix 2002). This abundance influence global biogeochemical cycles and plays important roles in the evolution of bacterial communities (Brussow et Hendrix 2002). Thus, viruses constitute a huge reservoir of the greatest genetic diversity that is frequently revealed by discovery of novel genes especially in newly sequenced phage genomes (Suttle 2005). Metagenomic data from aquatic and human environments show that most viral diversity remains uncharacterized (Breitbart, Salamon *et al.* 2002) (Breitbart, Hewson *et al.* 2003). Similar observation was made by comparing phage genomes infecting *P. aeruginosa* (Kwan, Liu *et al.* 2006)

Ubiquitous in the environment, *P. aeruginosa* is one of the major life-threatening opportunistic bacteria responsible for nosocomial infections in immune compromised people and persistent respiratory infections in cystic fibrosis patients (Lyczak, Cannon et Pier 2000) (Fothergill,

Walshaw et Winstanley 2012). Its ability to adapt to different niches, even the hardest, and to develop resistance to classical antibiotic-based therapy has inspired a renewed interest in its bacteriophages. Phage cocktails are used to treat *P. aeruginosa* infections in different countries but clinical assays are needed to evaluate their efficiency and safety (Abedon, Kuhl *et al.* 2011) (Kutter, De Vos *et al.* 2010). Considering the large genetic diversity of the *P. aeruginosa* species it is important to evaluate the virulence spectrum of lytic phages for therapeutic use. The composition of therapeutical cocktails remains empirical and there is no clear rules on how many phages should be included and what would the criteria for selecting them. A large number of lytic and temperate *P. aeruginosa* phages have been isolated, mostly in man-made environments of European and Asian countries, and new ones are continuously described. Ceysens *et al.* analyzing morphologic features and genome organization of a large collection of phages revealed that most evolved within 12 genera gathering 21 species (Ceysens, Glonti *et al.* 2011). Later two new genera with several related species of lytic phages were described including PAKP1 and JG004 (Debarbieux, Leduc *et al.* 2010) (Garbe, Bunk *et al.* 2011), KPP10 and PAK-P3 (Uchiyama, Rashel *et al.* 2012) (Morello, Saussereau *et al.* 2011). Now it seems that newly isolated lytic phages across the world fall into already known genera although the diversity inside temperate phages is larger. Recently six new species, all belonging to the *Siphoviridae* family have been reported in Central Mexico, increasing the number of *P. aeruginosa* species to 29 species (Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012). We previously identified bacterial isolates from cystic fibrosis patients that were resistant to a large variety of lytic and temperate phages and used them to search for new phages (Essoh *et al.*, in press). We isolated in Ivory Coast, a phage closely related to JG004 and active against some multiphage-resistant strains. Here we report the isolation and characterisation of 30 *P. aeruginosa* phages from Abidjan using these bacterial strains. Characterization of these phages and comparison of 12 newly sequenced genomes to already known phages reveals a large diversity in a rather limited time and space scale.

MATERIALS AND METHODS

Medium

LB medium supplemented with calcium was routinely used for bacterial growth and phage titration. For phage isolation and growth, LB medium supplemented with NaCL was alternatively used.

Bacterial isolates

The *P. aeruginosa* isolates were from CF patients (Table1) (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007). PAO1 and PA14 are reference strains from the Institut Pasteur collection (Paris, France). C50 from clone C is a gift of Uthe Römling. Twelve *P. aeruginosa* isolates were used for phage isolation of which six were resistant to pyophage and to additional phages from Russia and USA (Essoh *et al.* PLoS One in press 2013). Five isolates were used for amplification of the purified phages.

Phage isolation, characterization and genome sequencing

The localization of the five different collect sources in Abidjan is indicated on Figure S1. They correspond to open-air or closed sewage systems. Two of these were from geographically distant hospitals waste water purification stations. The different steps of phage isolation were described in Essoh *et al.* 2013 (PLoS in press). A total of 21 and 9 phages were isolated in October 2010 and November 2011 respectively. After two rounds of purification using a single plaque, phages were amplified on solid plate culture by infecting 200-400 μ L of a 10 times concentrated overnight bacterial culture with one lysis plaque of 24 hours.

Virulence spectrum: Phages host range was determined by spotting 10 μ L of purified phages with high titer ($\geq 10^9$ PFU) on stationary growing *P. aeruginosa* cells. Presence or absence of lysis zone was appreciated after overnight incubation at 37°C. Phages sensitivity was then confirmed using plaque assay. Briefly, 10 μ L of undiluted phage were directly streaked on LB agar plate and 4ml of molten top agar (0.7%) containing overnight bacterial culture were poured over phages. Characteristics of isolated plaques were recorded.

Electron microscopy: Purified and concentrated phages were prepared and visualized by staining 3 μ L of phage with 2% potassium phosphotungstate (pH7) as described in Essoh et al. 2013 (PLoS in press).

DNA purification and enzymatic digestion

DNA preparation was performed using rapid DNA purification assay as previously described (Cameron, Philippsen et Davis 1977). Briefly, 4mL of amplified phages were treated with RNase (5U/ μ L) for 30 minutes at room temperature then 0.2mL 2M Tris PH 7.5, 0.4mL 0.5M EDTA, 0.2 mL 10% SDS and 10 μ L diethylpyrocarbonate were added. Following incubation at 65°C for 30min 5M KOH was added for 1 hour incubation in ice. Centrifugation was performed at 25000g for 20min at 4°C and the supernatant was precipitated with 2 volumes of absolute ethanol. DNA was pelleted by centrifugation and washed twice with 70% ethanol then dissolved in 0.4mL Tris 10mM PH7.5, 1mM EDTA. Enzymatic digestion was carried out on 8 μ L DNA in a final volume of 12 μ L according to the manufacturer's recommendations, and analysed on a 0,8% agarose gel.

Genome sequencing

Illumina paired-end sequencing was performed by BaseClear (The Netherlands). 100bp reads were assembled in BioNumerics (Applied Mahts, Gand, Belgium) using Velvet (Zerbino et Birney 2008) and Ray (Boisvert, Laviolette et Corbeil 2010). The coverage was 1000X. Multiple alignments were performed using BioNumerics modules.

RESULTS

Isolation of phages from sewage water

Table 1 shows the details of bacterial strains used for enrichment of phages and those used for phage amplification. The later were chosen for the good level of growth, PAO1 and C2-10 being most frequently used.

Table 1: List of bacteriophages isolated in Abidjan

Phage number	Alias	Site	Date	Enrichment strain ^a	Amplification strain
1	2-10V1	Carrefour Vie	oct-10	C7-6 (-)	C2-10
2	7-6gld	Indénié	nov-11	C7-6 (-)	C2-10
3	Pao1gCp	CHU de Cocody	nov-11	PAO1 (+)	PAO1
4	5-2pld	Indénié	nov-11	C5-2 (-)	PAO1
5	LNCp	CHU de Cocody	nov-11	LN (UN)	PAO1
6	Pao1gT	CHU de Treichville	nov-11	PAO1 (+)	PAO1
7	9-11V1	Carrefour Vie	oct-10	C9-11 (+)	C2-10
8	9-11ld	Indénié	oct-10	C9-11 (+)	C2-10
9	schld1	Indénié	oct-10	SCH (+)	C2-10
10	schV	Carrefour Vie	oct-10	SCH (+)	C2-10
11	VpPao1	Carrefour Vie	oct-10	PAO1 (+)	PAO1
13	2-10C1	Corniche	oct-10	C7-6 (-)	C2-10
14	2-10C2	Corniche	oct-10	C7-6 (-)	C2-10
15	9-11chu	CHU de Cocody	oct-10	C9-11 (+)	C2-10
16	9-11V2	Carrefour Vie	oct-10	C9-11 (+)	C2-10
17	Pao1gld	Indénié	nov-11	PAO1 (+)	PAO1
18	PaogVn	Carrefour Vie	oct-10	PAO1 (+)	PAO1
19	C50V	Carrefour Vie	oct-10	C50 (-)	PAO1
20	paold	Indénié	oct-10	PAO1 (+)	PAO1
21	Paogld	Indénié	oct-10	PAO1 (+)	PAO1
22	C8-20ld	Indénié	nov-11	C8-20 (-)	C2-10
23	C8-20gV	Carrefour Vie	oct-10	C8-20 (-)	C2-10
24	CorC8-14	Corniche	oct-10	C8-14 (-)	C2-10
25	schVp	Carrefour Vie	oct-10	SCH (+)	C2-10
26	schV	Carrefour Vie	oct-10	SCH (+)	SCH
27	C8-14chu	CHU de Cocody	oct-10	C8-14 (-)	C1-14
28	C8-14ld	Indénié	oct-10	C8-14 (-)	C1-14
29	C3-16ld	Indénié	oct-10	C3-16 (-)	PAO1
30	C3-16Vp	Carrefour Vie	oct-10	C3-16 (-)	PAO1
31	Pa14T	CHU de Treichville	nov-11	PA14 (+)	Tr60

^a in parenthese is indicated the pyophage-susceptibility

For phage enrichment from water samples, we selected six clinical isolates (C3-16, C7-6, C5-2, C8-14, C8-20 and C50) that were previously shown to be resistant to a large collection of phages of different genera, and three isolates (C9-11, C2-10, SCH) with large susceptibility to these phages (Essoh et al. 2013 PLoS in press). We also used reference strains PAO1 and PA14. Water was collected at six different sites in Abidjan in 2010 and 2011, four of which are in Cocody (Fig. S1). When different plaque morphologies were observed with a single sample, they were recovered and the phage was purified by replating (Fig. S2).

For 29 phages the phenotype was stabilized on the strain on which better growth was observed. Phage Ab22 produced two types of plaques on strain C2-10, clear and turbid, in high density zones and this phenotype was seen even after replating of a clear or a turbid plaque (Fig. S3). A similar phenotype had been observed previously with phage p1-14_{or}. Phages Ab22 and Ab23 originally isolated using C8-20 as enrichment bacteria failed to grow on these strains later on. Similarly phages Ab24, Ab27 and Ab28 were isolated using C8-14 but were not capable of regrowth on these strains after isolation.

Restriction map polymorphism

Genomic DNA was purified and phage genome diversity was analyzed using ten restriction enzymes. All the phage genomes were digested by *Sau3A*, *AluI*, *HaeIII*, *HpaII* but were uncut by *NotI*, *SmaI* and *XhoI* endonucleases. Only one phage genome, Ab09, was restricted by *BglII* suggesting that this phage was unique and differed from other phages of this study. The genomes of Ab18, Ab19, Ab20 and Ab21 were not restricted by *EcoRI* and *HindIII*. They display very similar restriction pattern to other endonucleases. These four phages produced small clear plaques (0.5-1mm) on PA01 and C50 (data no shown) which suppose the closely related phage genome . Phage Ab27 genome was also resistant to digestion by *HindIII* although this phage genome possess almost similar restriction profile with Ab28 and Ab29 using other enzymes. Phage Ab26 was susceptibility to *EcoRI* and *HindIII* and displayed unique profiles compared to others phages (data no shown). Figure 1 shows the restriction pattern of 30 phages using *EcoRI* endonuclease. The patterns were compared using BioNumerics and a tree was produced based on *EcoRI*

restriction profile, revealing 4 groups and 6 singletons. The largest group included 12 members (shown with red) and other groups included five to two phages.

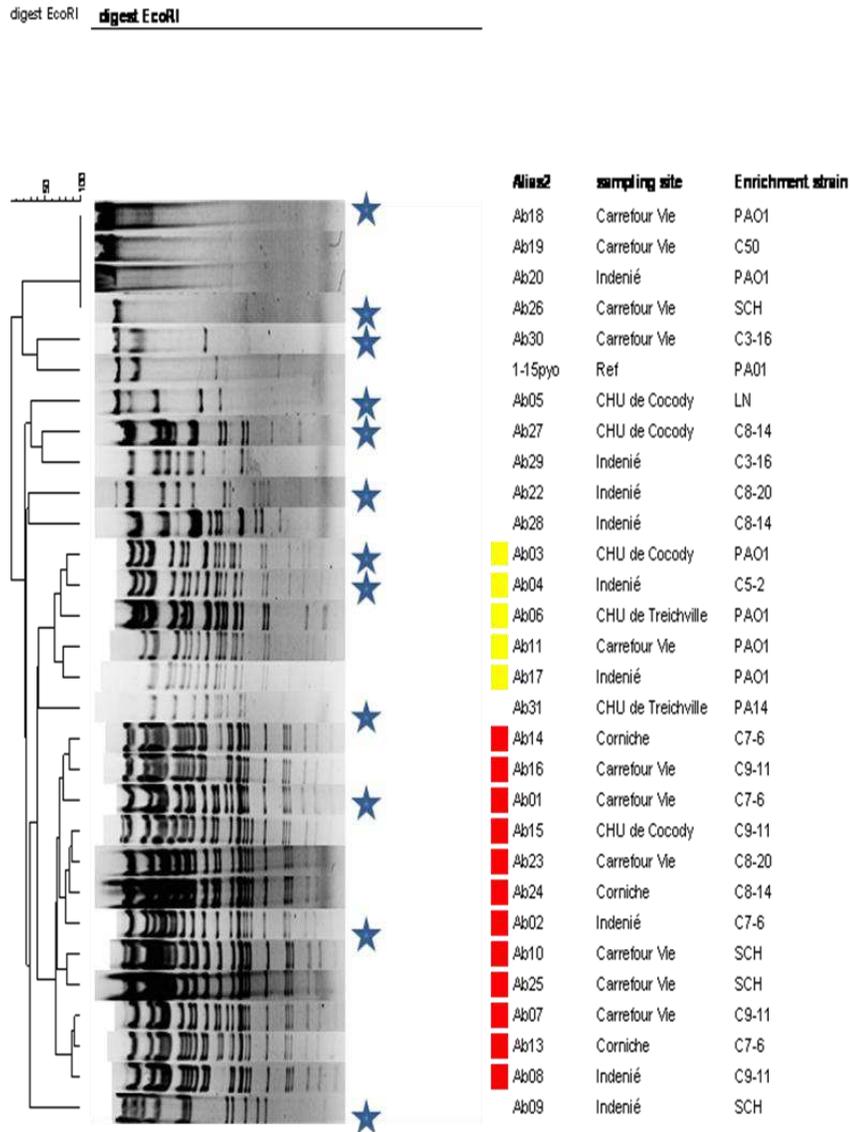


Figure 1: Clustering of 30 phages based on *EcoRI* restriction profiles. Phage genome selected for complete sequencing was indicated by blue star.

Full genome sequencing

The genome of one or two phages of each group and singleton (total 12 phages shown with stars on Figure 1) was sequenced using Illumina technology and the reads were assembled producing a single contig for all the phages. In 4 cases two nucleotides were present at a given position probably due to the existence of variants in a single preparation of DNA, and showing that the mutation rate is elevated.

Assembled genomes were aligned with all available *P. aeruginosa* phage genomes in order to identify the closest one. For several genomes the choice of the zero point was based on the presence of excess of reads with a unique end and was confirmed by genome comparison with phages belonging to the same genus (Fig.2).



Figure 2: Distribution of reads along the contig of phage Ab02. A large excess of reads was observed at two positions corresponding to the existence of the DTR at both ends of the genome.

The genome size and the closest published genomes are indicated on Table 2 and alignments are shown in supplementary figures (see paragraph below). For all phages except Ab18 (same group as Ab19, Ab20, Ab21), Ab26 and Ab31, 85-95% alignment was observed with a known genome.

In total the newly isolated phages appeared to belong to 10 genera, 2 of them PaP1-like viruses and KPP10-like viruses including 12 and 5 phage species respectively.

Table 2: List of phages which genome was sequenced

Family	Phages	Genome size (bp)	Average similarity	Phage group	Other related phages
<i>Myoviridae</i>	Ab01	92777	90% JG004	JG004	Ab07, Ab08, Ab10, Ab13, Ab14
	Ab02	93348			Ab15, Ab16, Ab23, Ab24, Ab25
	Ab03	86246	90% KPP10	KPP10	Ab06, Ab11, Ab17
	Ab04	86672			
	Ab27	66276	97% NH-4	PB1	Ab28, Ab29
<i>Podoviridae</i>	Ab05	43198	95% PT5	ΦKMV	
	Ab09	71198	91-95% LIT1	N4	
	Ab22	46095	86-96%LUZ24	LUZ24	
	Ab31	45559	<70% AF*	AF	
<i>Siphoviridae</i>	Ab18	58158	70% YUA*	YUA	Ab19, Ab20, Ab21
	Ab26	43055	87% PA73	PA73	
	Ab30	36961	91-97% DMS3	D3112	

Phage genome Ab31 and Ab18 present similarity at the protein level (*) respectively with phage AF and phage YUA while other sequenced genomes display resemblance at nucleotide level.

Phage characteristics

JG004 -like viruses

The genome of Ab02 was 93348bp long and it showed more than 90% similarity with the genome of JG004. When reads were aligned against the assembled sequence, we observed some positions with very high number of reads. One position corresponded to the putative genome end on closely related JG004-like genomes (Garbe, Bunk *et al.* 2011). DTR were suggested by the presence of sequence in between the two ends (Fig. 2). One phage belonging to this family Ab01 with a 92777bp long genome, was already described in our previous work. Ab01 and Ab02 showed

several different bands upon restriction by *EcoRI*. They were aligned to related phages JG004, PaP1 and PAK_P1 and the largest level of divergence was observed in tail fiber proteins whereas polymerase was highly stable (data not shown).

KPP10-like viruses

The genome of Ab03 was 86246bp long and that of Ab04 is 86672bp long. They showed 88-91% homology with the genomes of KPP10 (Uchiyama, Rashel *et al.* 2012) and PAK_P3 (Debarbieux, Leduc *et al.* 2010). Upon alignment of Ab03 and Ab04 four regions of variability were observed over largely similar genomes (Fig. S4). In the first region covering about 1kb the percentage of SNPs was 20 % as compared to 0.1% in the rest of the genome. A 387bp region was absent in Ab03 but present in Ab04 and the related JG004-like phages. It encompassed part of two “open reading frame” (ORF) in PAKP1 and KPP10 (ORF113 and 114) and produced a putative fusion protein in Ab03. The second region of deletion corresponded to a highly variable zone with a 522 bp deletion in Ab04 as compared to Ab03 and corresponding to DNA with no homology in Genbank except for short fragments with matches to the D3 genome. In this part of the genome 6 short orfs (ORF14 to ORF18 of Ab03) were identical in Ab03 and Ab04 but very different in PAKP3 (ORF144 to ORF155) and KPP10 (ORF147 to ORF157). The third region corresponded to a deletion of 528 bp in Ab03 as compared to Ab04 with no homology in Genbank at the nucleotide level. It encoded a short ORF with homology with MUG113 a protein of phage phi-Pto-bp6g of *P. tolosii*. Ab03 and Ab04 have two tRNA genes, Tyr and Gln, whereas KPP10 has three, Asn Tyr and Gln.

ΦKMV-like virus

Ab05 with a 43198bp long genome showed sequence similarity with phages of the ΦKMV genus but did not produce the large plaques with a halo characteristic of this genus on strain PAO1 (Ceysens, Glonti *et al.* 2011). Figure S5 shows the alignment of Ab05 genome with those of LUZ19 and ΦKMV. We also performed comparisons with phage P1-15_{pyo} previously isolated in our laboratory from pyophage and which showed similar *EcoRI* restriction profile. Four deletions were observed as well as many regions with low level of similarity at the nucleotide levels

reflecting recombination events. The smaller deletions encompassed a region containing a putative promoter and an intergenic region in phage LKD16 (Ceyskens, Lavigne *et al.* 2006). Deletion 3 encompassed the short ORF17.1 present in phiKF (Kulakov, Ksenzenko *et al.* 1985). Deletion 4 encompassed LUZ19 gp20 a short ORF present in all the sequenced Φ KMV-like phages.

N4-like virus

Ab09 genome was 71198bp long. It showed 91-95 % similarity with phage LIT1, a N4-like virus with a 72577bp genome (Ceyskens, Brabban *et al.* 2010). A 642bp sequence was found redundant on both ends corresponding to the 655bp repeat region of LIT1. A 1518bp deletion was observed in the genome of Ab09, encompassing four short ORFs (ORF86 to ORF89 in LIT1) (Fig. S6).

LUZ24-like virus

Ab22 genome was 46095bp long and showed 86-96 % similarity with LUZ24 with a 45625bp genome (AM910650) and with PaP3 and 1-14_{Or01} a phage that we previously isolated in France [Essoh 2013 in press] (Fig. S7). There was a 184bp repeated sequence on both ends. Several regions of deletions were observed. The longer region of 1206bp is present in Ab22 and absent in LUZ24 and all other *P. aeruginosa* phages. It has 70% similarity with a region of *P. fluorescens* temperate phage UFV-P2 (JX863101) encoding a transposase fusion protein. The second larger region of difference is a 665bp fragment specific for LUZ24 encoding the gp35 endonuclease.

PB1-like viruses

Ab27 genome was 66276bp long and showed 97 % similarity with several PB1-like phages such as NH-4 with a 66116bp genome (Alemayehu, Casey *et al.* 2012) and SN with a 66390bp genome (Ceyskens, Noben *et al.* 2009) (Fig. S8). Only one small region of presence absence was observed.

YuA-like viruses

Phage Ab19 was selected to represent a group of four phages with similar restriction profiles. The genome sequence of Ab19 was 58158bp long and showed at best 70% similarity over some parts of its genome with that of YuA (58663bp genome) (Ceyskens, Mesyanzhinov *et al.* 2008) and MP1412 with a 61167bp long genome (Bae, Chung *et al.* 2012) (Fig S9). Two regions of such

homology corresponded to the DNA polymerase A and the terminase genes. Other parts had no homology with any phage in the public databases. YuA-like phage genomes were reported to be resistant to many restriction enzymes including *EcoRI* although *EcoRI* restriction sites exist in their genome (Ceyskens, Mesyanzhinov *et al.* 2008) (Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012). We observed a similar resistance in the four phages from Abidjan and presence of 5 *EcoRI* sites in Ab19 (Figure 1).

PA73-like viruses

Ab26 genome was 43055bp long. It showed 87% homology with vB_Pae-Kakheti25 with a 42844bp genome (NC 007806) (Karumidze, Thomas *et al.* 2012). The 296bp at the beginning of the genome were very different in both phages. They encoded protein gp1 in PA73, found in lysis cassette. One region of 1600bp showed about 70% similarity with vB_Pae-Kakheti25 but 95% with PA73 with a 42999bp (DQ163913) (Kwan, Liu *et al.* 2006). It encoded three proteins found in mature virions. The region starting around 38000 position in vB_Pae-Kakheti25 and up to the end encoding many short hypothetical proteins showed multiple events of exchanges.

D3112-like viruses

With a 36961bp genome it showed between 91 to 99% similarity with phage DMS3 36415bp (Zegans, Wagner *et al.* 2009), MP38 a Lambda-like phage with a 36885bp genome (EU272037) and phage D3112 with a 37611bp genome (Wang, Chu et Guttman 2004). It possessed an extensive mosaic structure.

Ab31

Ab31 with a 45559bp genome had similarity with PAJU2 with a 46872bp genome (Uchiyama, Rashel *et al.* 2012) and D3 with a 56426bp genome (Kropinski 2000). A 5kb region at one phage end alternated highly similar segments to PAJU2 genome (more than 90% similarity) encoding genes for replication proteins O and P, nin B and nin G, antitermination protein Q and endolysin, separated by very divergent genome fragments. It also encoded an integrase which was very similar to that of PAJU2. Another segment of 1130bp with 86% similarity with PAJU2 encoded an hypothetical protein highly conserved also in phage D3 and with an homolog in numerous other

phages. The capsid and other structural genes were 75% similar to that of lambdoid *P. putida* phage AF with a 42689bp genome (Cornelissen, Ceysens *et al.* 2012). A fragment of approximately 20kpb corresponding to ORF1748-1760 of *Pseudomonas putida* GB1 prophage encoded virions structural proteins. Major capsid and tail-spike proteins were similar to lambdoid *P. putida* AF phage while tail protein was similar to that of *P. Putida* GB1 prophage. Phage terminase was homologous to some phages infecting *Salmonella*, *Chromobacter* and *Proteus*. Some fragments were found similar to several bacterial species such as *Serratia*, *E. coli*, *Chromobacter*, and *Klebsiella*.

Electron microscopy

EM examination was performed for at least one phage of each genus and singleton (Fig. 3).

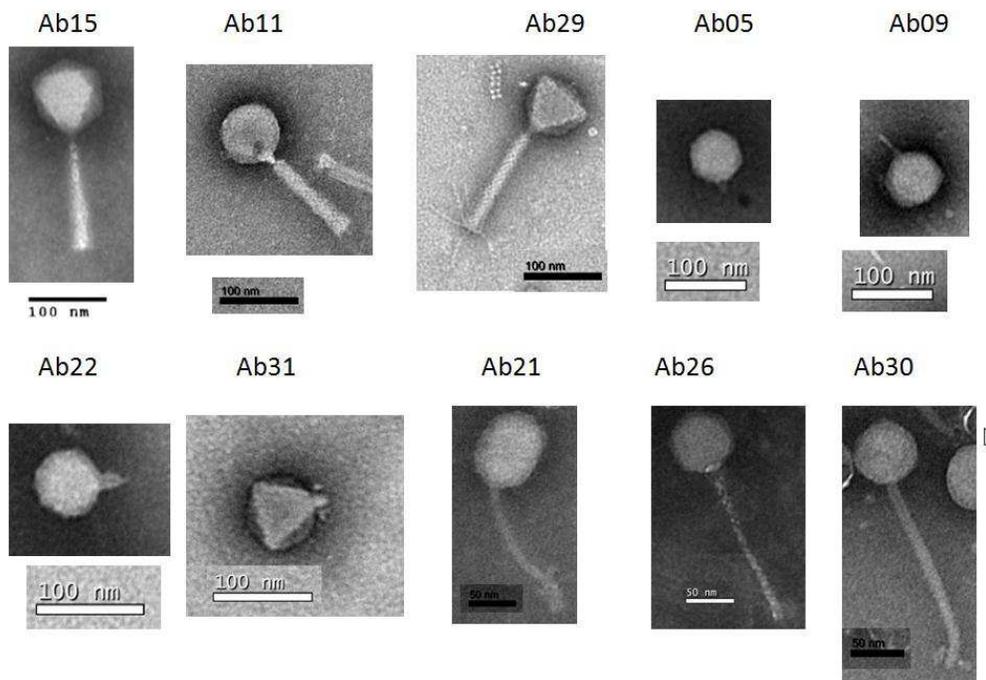


Figure 3: Electron microscopy examination of 10 phages representative of the 10 genera observed in our phage collection.

Five phages of the JG004-like group were analysed and all showed the same morphology. They are myoviruses with approximately 130nm tail and a 67-70nm head. Images of contracted tails were observed for phage Ab11 that is related to KPP10 group with a 70nm head and a 120nm long tail, while virions particles of Ab29, a PB1-like phage, possessed a 74nm head and a 140 nm long tail. Among phages with short tails, Ab05 and Ab22 belonging respectively to Φ KMV-like and LUZ24-like displayed 60nm icosahedral heads, while Ab09 a N4-like phage had a 70nm icosahedral head. The temperate phage Ab31 is a podovirus with short spikes-tail and an approximately 60nm head. The siphophages include phage Ab26 with 60nm head and 170nm tail long, Ab30 with 55nm head and tail 180nm long. Phage Ab21 possess an elongated head 85×60nm and 130nm tail similar to that of phage YUA.

Virulence spectrum

Phage host range was determined on the collection of *P. aeruginosa* isolates used in this study and on additional isolates selected for their resistance to Pyophage. The result is shown on Table 3.

Table 3a: Virulence spectrum of a first series of 15 phages

	JG004-like												PB1-like		
	Ph1	Ph2	ph7	ph8	Ph10	ph13	Ph14	Ph15	ph16	Ph23	Ph24	Ph25	Ph27	Ph28	Ph29
PAO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	c
PA14	t	-	t	t	t	t	t	t	t	-	-	-	-	-	-
Tr60	t	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t
SCH	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
C1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	c
C1-2	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	-	-	-
C1-14	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
C2-10	c	C	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	t	t	t
C3-16*	t	-	-	-	t	-	c	t	-	t	-	-	c	c	c
C3-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5-2	-	-	-	-	-	t	t	t	t	-	-	-	t	t	t
C5-12	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t	c	c	c
C5-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-6	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	-	-	-	-	t
C7-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	c
C7-25°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	c	c
C8-5	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	t	t	t	t
C8-7*	t	t	c	c	c	c	c	c	c	c	-	-	t	t	t
C8-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t
C8-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8-20*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	t
C9-5	c	-	c	c	c	c	c	c	c	c	c	-	c	c	c
C9-6	c	-	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c
C9-11	c	c	c	c	c	t	c	c	c	c	t	t	t	c	c
C9-17	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	t	c	c

* : slow growing strain

°: pseudolysogen

Table 3b: Virulence spectrum of 15 additional phages

	KPP10-like					LUZ24-like							Ph30	Ph31	
	Ph3	ph4	ph6	ph11	Ph17	ph5	ph9	Ph18	ph19	Ph20	ph21	Ph22			Ph26
PAO1	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	c	t	-	t	-
PA14	-	-	-	-	-	c	-	-	-	t	-	-	-	c	c
Tr60	-	-	-	-	-	t	-	-	-	t	-	t	-	-	c
C50	-	-	-	-	-	-	-	t	t	t	c	-	-	t	-
SCH	t	-	-	-	t	t	c	c	-	c	c	-	c	t	t
C1-1	t	-	t	t	t	t	c	t	-	t	t	-	-	-	-
C1-2	t	-	t	t	t	-	c	c	-	-	-	t	-	-	-
C1-14	t	t	t	t	t	t	c	t	-	t	t	t	-	-	-
C2-10	-	-	-	-	t	-	c	-	-	t	-	c	c	-	-
C3-16*	-	-	-	-	-	-	t	-	t	t	-	t	-	t	-
C3-20	c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	-
C5-2	-	-	-	-	-	-	c	t	c	t	c	-	t	t	t
C5-12	-	-	-	-	-	-	-	c	c	c	c	c	-	-	-
C5-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-6	-	-	-	-	-	t	-	t	t	t	t	-	-	-	-
C7-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-25°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8-5	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	t	t	t	t	t
C8-7*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	t	-	t	-
C8-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-
C8-15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-
C8-20*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-
C9-5	-	-	-	-	-	-	-	c	-	-	t	t	t	-	-
C9-6	-	-	-	-	-	t	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C9-11	t	-	t	t	t	-	c	c	-	c	t	t	t	t	-
C9-17	t	-	t	t	t	-	t	c	t	c	-	t	t	t	t

The members of a genus generally show similar virulence towards the selected panel of bacterial isolates with some exceptions. The phages of the JG004 family show the highest virulence both in term of spectrum and efficiency of plating. This probably explains the frequency at which these phages were isolated. Nine of them show a high degree of virulence for C7-6 on which they produce large clear plaques, whereas another one (Ab01) shows a 10 times lower growth and two (Ab24 and Ab25) do not grow. No clear plaques can be observed on this strain with any other tested phages. Some phages of this group could lyse strains C8-5 and C8-7 previously shown to be

resistant to pyophage. The second largest group corresponding to the KPP10-like phages was highly virulent to strain PAO1 and produced turbid plaques on a limited number of other isolates. In this group, only phage Ab03 was able to multiply on strain C3-20 which is also infected by phage Ab22, a LUZ24-like phage. Phage Ab22 and LUZ-24-like phages 2-10_{pyo}, 3-20_{pyo} and Tr60_{pyo} showed similar virulence pattern. As other phages of this genus, Ab22 produced two types of plaques, clear and turbid, on strain C2-10 and uniform turbid small plaques on strain PAO1. Phages Ab05, a Φ KMV-like phage infected the same isolates as phage 1-15_{pyo} with different efficiency which might be related to the phage titer, but also to some genomic differences. This phage gives irregular plaques on strain PAO1 and halo appears after a long time of incubation (> 24 hours). The N4-like phage Ab09 had a large virulence spectrum. The group of phages related to YUA showed a large variety of virulence profiles but the highest efficiency of plating was seen on PAO1. Interestingly only phages of this group infected the European widespread strain C50 (reference strain for clone C) that is also resistant to pyophage. The three PB-1-like phages displayed large host range, infecting five pyophage-resistant strains C7-12, C7-25, C7-26, C9-5 and C9-6. Several phages mostly temperate ones showed more specific virulence profiles. Ab31 only grew on PA14 and Tr60, two strains showing the same genotype. However, four isolates C5-13, C8-14, C8-15 and C8-20 were resistant to all our phages. Phages Ab24, Ab27 and Ab28 were isolated using C8-14 as enrichment strain of sewage water, and Ab22 and Ab23 were isolated on strain C8-20 (Table 1).

DISCUSSION

Using a selected panel of clinical *P. aeruginosa* isolates we were able to isolate 30 phages belonging to 10 genera in a relatively restricted localization. All the collect sites corresponded to waste water. As previously observed in different European or American countries, 27 phages of Africa belong to the worldwide distributed genera. Two phages showed homology with known phages only at the protein level and one appeared to be completely new. High throughput genome sequencing allowed fast sequencing of phage genomes with high accuracy. Assembly produced a single contig with only a few ns presumably reflecting a culture mosaicism. We have sequenced DNA extracted from two independent preparations of phage p1-15_{pyo} and found 6 SNPs out of

42744 nucleotides (data not shown). Excess reads were observed which corresponded to termini as described for T4 phages (Jiang, Jiang *et al.* 2011).

Several phages initially isolated after enrichment with strains C8-14 or C8-20 could not subsequently be amplified on these strains. Both strains show an extended resistance spectrum as none of the phages we tested could lyse them. It is possible that they display a general restriction capacity which is overcome in the method of enrichment using water. In addition, a European widespread strain C50 could use this strategy to overcome phage attack. Only YUA-like phages that are known to possess in their genome anti-restriction protein are able to infect strain C50. Although it displays a similar genome size, our YUA-like phages possess a slightly large head compare to phage YUA and share very little genes products suggesting a new phage species of the YuA genus.

The second new phage was represented by the temperate phage Ab31 that seems to be shaped from lambdoid phage AF and phage PAJU2 respectively infecting *P. putida* and *P. aeruginosa*. These bacterial species are closely related and phage genome exchanges occurred likely during infection of the same host. As a result of their mosaic structure, some temperate phage genomes can migrate between unrelated bacteria (Krylov, Kropinski *et al.* 2012). Although genetically distant, phages AF and PAJU2 share a lambdoid genome organization which could promote genetic replacement (modular exchanges or gene blocks) through homologous recombination (Brussow et Hendrix 2002). Phage Ab31 is morphologically similar to phage AF, a podovirus with tail spikes, and share the same replication genes with phage PAJU2. The existence of some short regions of sequence homology between virion structure and replication gene modules in two phage genomes is possible (Juhala, Ford *et al.* 2000 ; Casjens 2011). Presence of restriction sites as well as DNA transposition could also contribute to this event (Hatfull et Hendrix 2011). Similar events seem to occur between D3112-like phages morphologically identical to phage lambda and the transposable coliphage Mu belonging to *myoviridae* family (Braid, Silhavy *et al.* 2004).

Based on their genome characteristics the temperate phages Ab30 and Ab26 clearly resemble D3112-like and PA73-like phages respectively. D3112 genus includes *P. aeruginosa* transposable phages which frequently were isolated from bacterial strains and the environment. Amongst

D3112-like phages, DMS3 is the most closely related to Ab30, suggesting intuitively the same behavior. Previously, it was shown that inhibition of biofilm formation as well as swarming motility of DMS3-lysogenic bacteria was mediated by the CRISPRs-Cas system (Zegans, Wagner *et al.* 2009). The presence of atypical genes able to inactivate bacterial CRISPR-Cas system was identified within D3112-like genomes (Bondy-Denomy, Pawluk *et al.* 2013). Recently, lytic phages PAO and Kakheti25 lacking lysogeny gene modules, and belonging respectively to D3112-like and PA73-like genera, were reported (Karumidze, Thomas *et al.* 2012 ; Kim, Cha et Myung 2012). In contrast to Ab26 which is specific, phage Kakheti25 possesses a very large host range toward clinical strains suggesting a major role of lysogeny genes in phages virulence.

All temperate phages display a narrow host range on clinical strains of *P. aeruginosa*. The majority of strains analysed in this study are lysogenic (Essoh *et al.*, Plos One 2013) and the phage infection failure may be due to exclusion of surinfection. Presence of prophages in a bacterial chromosome immunizes bacteria against infection by phages of the same nature. During lysogeny steps, some phages such as D3 modify the LPS receptors rendering bacteria resistant to LPS-dependent phages as well as virulent phages.

As previously shown, KPP10-like phages are very specific toward certain clinical strains (Watanabe, Matsumoto *et al.* 2007) and display strong virulent activity on strain PAO1. Specificity can be caused by mutations in the tail fiber or receptor protein genes but it is also possible that the phage genome is unmethylated and rapidly degraded by bacterial enzymes upon infection. Another mechanism for specificity of virulent phages could be related to inhibition of the general phage defense mechanism built up by the CRISPR-Cas system.

Inside a genus the different phages showed a similar virulence pattern toward the full collection of isolates with occasional differences. Isolate C7-6 allowed the isolation of only JG004-like phages, from different sites in 2010 and 2011. More heterogeneity was observed in some phages genera as compared to others. Phages Ab 27, Ab28 and Ab29 are PB1-like phages and show different restriction enzyme profiles. Sequencing of the genomes is in progress and will allow comparisons and phylogenetic studies.

To efficiently treat *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients, cocktail of phages with large virulence spectrum are required. Different studies have already shown their potential effect in mouse models and against biofilms (Brussow 2012). A study by Ceysens et al 2011 has shown that inside a genus large variations of phenotypic properties exist, including host spectrum (Ceysens, Glonti *et al.* 2011). This may suggest that it is not necessary to select phages belonging to different genera to prepare a cocktail. However some bacteria may be able to resist all phages of a given genus by lacking the corresponding receptors. By mixing one representant of each genus in our collection we were capable of lysing all *P. aeruginosa* isolates except four. We also showed that these isolates were resistant to Φ KZ-like viruses (Essoh et al. submitted). Some isolates were killed only by one phage close to YUA and PAJU2 species possibly able to produce lysogens.

Acknowledgments

The work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr) which is supported by the Conseil Général de l'Essonne. We thank l'Association Vaincre la Mucoviscidose and Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) for its financial help.

Bibliography

- Abedon, S. T., S. J. Kuhl, *et al.* (2011). "Phage treatment of human infections." Bacteriophage **1**(2): 66-85.
- Alemayehu, D., P. G. Casey, *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.
- Bae, H. W., I. Y. Chung, *et al.* (2012). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* siphophage MP1412." J Virol **86**(17): 9537.
- Boisvert, S., F. Laviolette et J. Corbeil (2010). "Ray: simultaneous assembly of reads from a mix of high-throughput sequencing technologies." J Comput Biol **17**(11): 1519-1533.
- Bondy-Denomy, J., A. Pawluk, *et al.* (2013). "Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system." Nature **493**(7432): 429-432.
- Braid, M. D., J. L. Silhavy, *et al.* (2004). "Complete genomic sequence of bacteriophage B3, a Mu-like phage of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **186**(19): 6560-6574.
- Breitbart, M., I. Hewson, *et al.* (2003). "Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces." J Bacteriol **185**(20): 6220-6223.

- Breitbart, M., P. Salamon, *et al.* (2002). "Genomic analysis of uncultured marine viral communities." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14250-14255.
- Brussow, H. (2012). "*Pseudomonas* biofilms, cystic fibrosis, and phage: a silver lining?" MBio **3**(2).
- Brussow, H. et R. W. Hendrix (2002). "Phage genomics: small is beautiful." Cell **108**(1): 13-16.
- Cameron, J. R., P. Philippsen et R. W. Davis (1977). "Analysis of chromosomal integration and deletions of yeast plasmids." Nucleic Acids Res **4**(5): 1429-1448.
- Casjens, S. R. (2011). "The DNA-packaging nanomotor of tailed bacteriophages." Nat Rev Microbiol **9**(9): 647-657.
- Ceyssens, P. J., A. Brabban, *et al.* (2010). "Molecular and physiological analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the "N4-like viruses"." Virology **405**(1): 26-30.
- Ceyssens, P. J., T. Glonti, *et al.* (2011). "Phenotypic and genotypic variations within a single bacteriophage species." Virology **418**: 134.
- Ceyssens, P. J., R. Lavigne, *et al.* (2006). "Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LKD16 and LKA1: establishment of the phiKMV subgroup within the T7 supergroup." J Bacteriol **188**(19): 6924-6931.
- Ceyssens, P. J., V. Mesyanzhinov, *et al.* (2008). "The genome and structural proteome of YuA, a new *Pseudomonas aeruginosa* phage resembling M6." J Bacteriol **190**(4): 1429-1435.
- Ceyssens, P. J., J. P. Noben, *et al.* (2009). "Survey of *Pseudomonas aeruginosa* and its phages: de novo peptide sequencing as a novel tool to assess the diversity of worldwide collected viruses." Environ Microbiol.
- Cornelissen, A., P. J. Ceyssens, *et al.* (2012). "Identification of EPS-degrading activity within the tail spikes of the novel *Pseudomonas putida* phage AF." Virology.
- Debarbieux, L., D. Leduc, *et al.* (2010). "Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections." J Infect Dis **201**(7): 1096-1104.
- Fothergill, J. L., M. J. Walshaw et C. Winstanley (2012). "Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections." Eur Respir J **40**(1): 227-238.
- Garbe, J., B. Bunk, *et al.* (2011). "Sequencing and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004." BMC Microbiol **11**: 102.
- Hatfull, G. F. et R. W. Hendrix (2011). "Bacteriophages and their genomes." Curr Opin Virol **1**(4): 298-303.
- Jiang, X., H. Jiang, *et al.* (2011). "Sequence characteristics of T4-like bacteriophage IME08 genome termini revealed by high throughput sequencing." Virology **418**: 194.
- Juhala, R. J., M. E. Ford, *et al.* (2000). "Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdaoid bacteriophages." J Mol Biol **299**(1): 27-51.
- Karumidze, N., J. A. Thomas, *et al.* (2012). "Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences." Appl Microbiol Biotechnol **94**(6): 1609-1617.
- Kim, M. S., K. E. Cha et H. Myung (2012). "Complete genome of *Pseudomonas aeruginosa* phage PA26." J Virol **86**(18): 10244.
- Kropinski, A. M. (2000). "Sequence of the genome of the temperate, serotype-converting, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3." J Bacteriol **182**(21): 6066-6074.

- Krylov, S. V., A. M. Kropinski, *et al.* (2012). "[Properties of the new D3-like *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage phiPMG1: genome structure and prospects for the use in phage therapy]." *Genetika* **48**(9): 1057-1067.
- Kulakov, L. A., V. N. Ksenzenko, *et al.* (1985). "DNA homology and adsorption specificity of *Pseudomonas aeruginosa* virulent bacteriophages." *Mol Gen Genet* **200**(1): 123-127.
- Kutter, E., D. De Vos, *et al.* (2010). "Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections." *Curr Pharm Biotechnol* **11**(1): 69-86.
- Kwan, T., J. Liu, *et al.* (2006). "Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages." *J Bacteriol* **188**(3): 1184-1187.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon et G. B. Pier (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." *Microbes Infect* **2**(9): 1051-1060.
- Morello, E., E. Saussereau, *et al.* (2011). "Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention." *PLoS One* **6**(2): e16963.
- Sepulveda-Robles, O., L. Kameyama et G. Guarneros (2012). "High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages." *Appl Environ Microbiol* **78**(12): 4510-4515.
- Suttle, C. A. (2005). "Viruses in the sea." *Nature* **437**(7057): 356-361.
- Uchiyama, J., M. Rashel, *et al.* (2012). "Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10." *Arch Virol* **157**(4): 733-738.
- Vu-Thien, H., G. Corbineau, *et al.* (2007). "Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients." *J Clin Microbiol* **45**(10): 3175-3183.
- Wang, P. W., L. Chu et D. S. Guttman (2004). "Complete sequence and evolutionary genomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112." *J Bacteriol* **186**(2): 400-410.
- Watanabe, R., T. Matsumoto, *et al.* (2007). "Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice." *Antimicrob Agents Chemother* **51**(2): 446-452.
- Zegans, M. E., J. C. Wagner, *et al.* (2009). "Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* **191**(1): 210-219.
- Zerbino, D. R. et E. Birney (2008). "Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs." *Genome Res* **18**(5): 821-829.

FIGURES ET TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES DE L'ARTICLE 2

Figure S1: Map of Abidjan city indicating isolation sites of bacteriophages. Four sites are localized in Cocody



Figure S2: Different plaque morphologies were observed on different bacterial strains

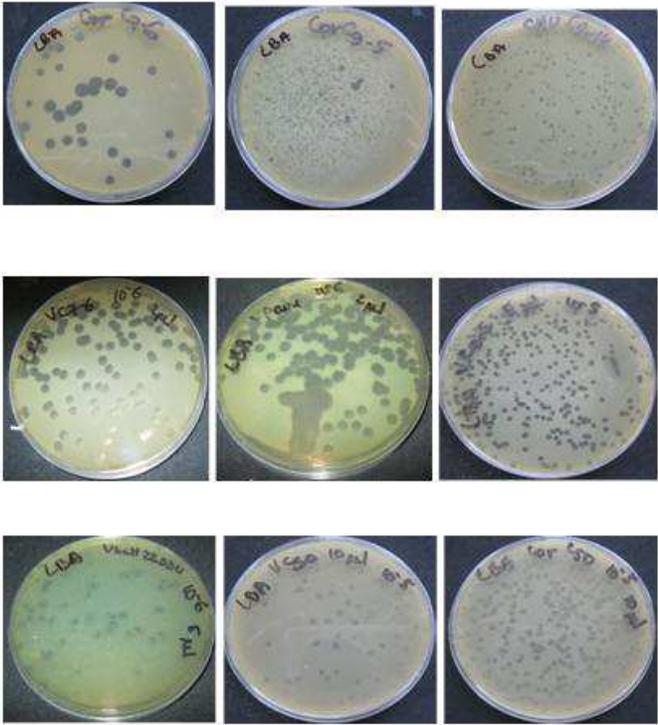


Figure S3: Plaque morphology of phage Ab22 on bacterial isolate C2-10

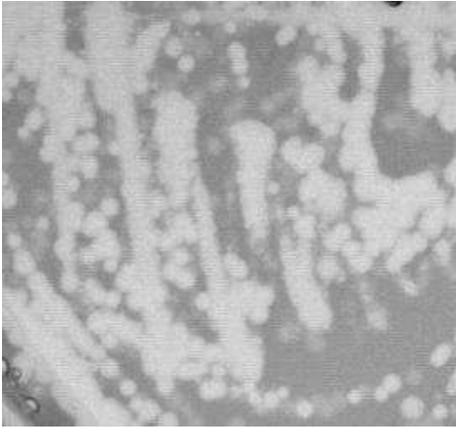


Figure S4 : Alignment of Ab03 and Ab04 genomes with KPP10. Structural genes are shown in yellow and replication genes are shown in red. The degree of similarity is shown with shades of grey.

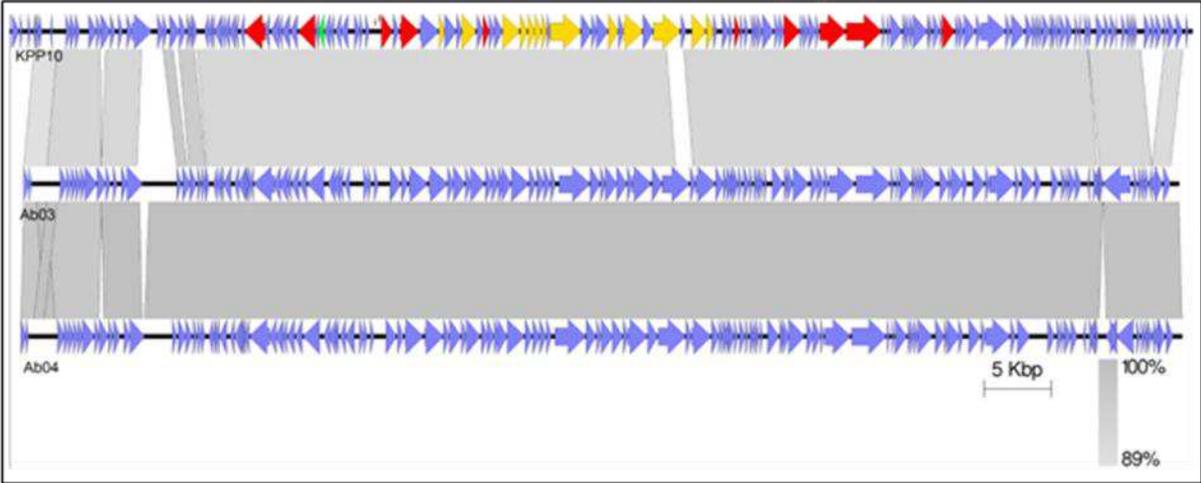


Figure S5: Alignment of Ab05 genome with those of LUZ19 and Φ KMV. Structural genes are shown in yellow and replication genes are shown in red. The degree of similarity is shown with shades of grey.

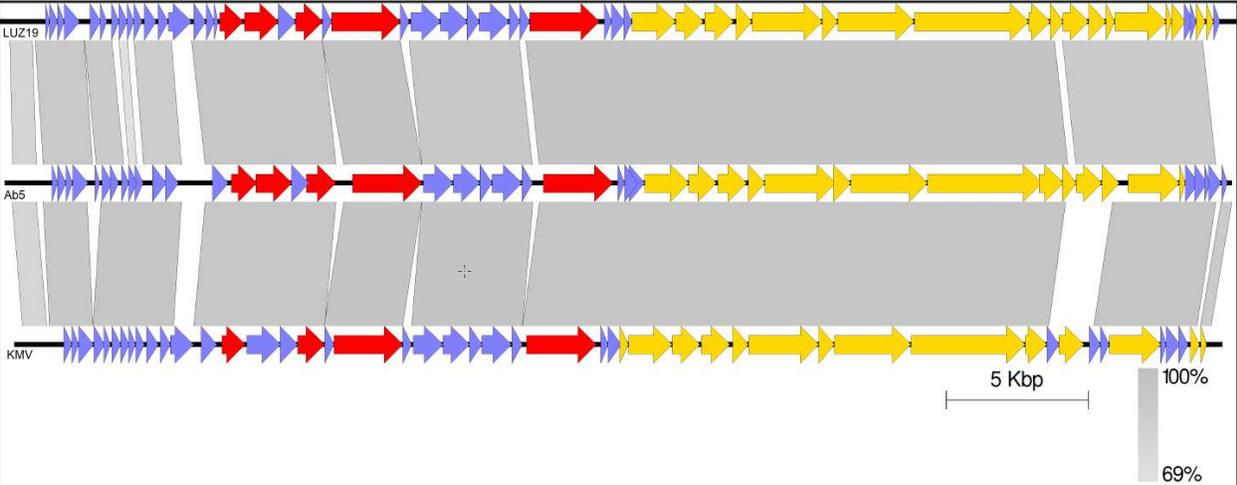


Figure S6: Alignment of Ab09 genome with that of LIT1. Structural genes are shown in yellow and replication genes are shown in red. The degree of similarity is shown with shades of grey.

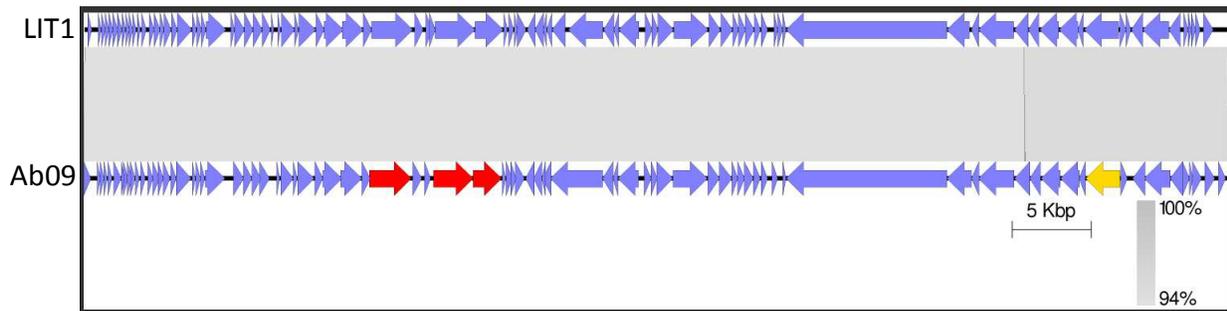


Figure S7: Alignment of Ab22 genome with those of LUZ24 and PaP3

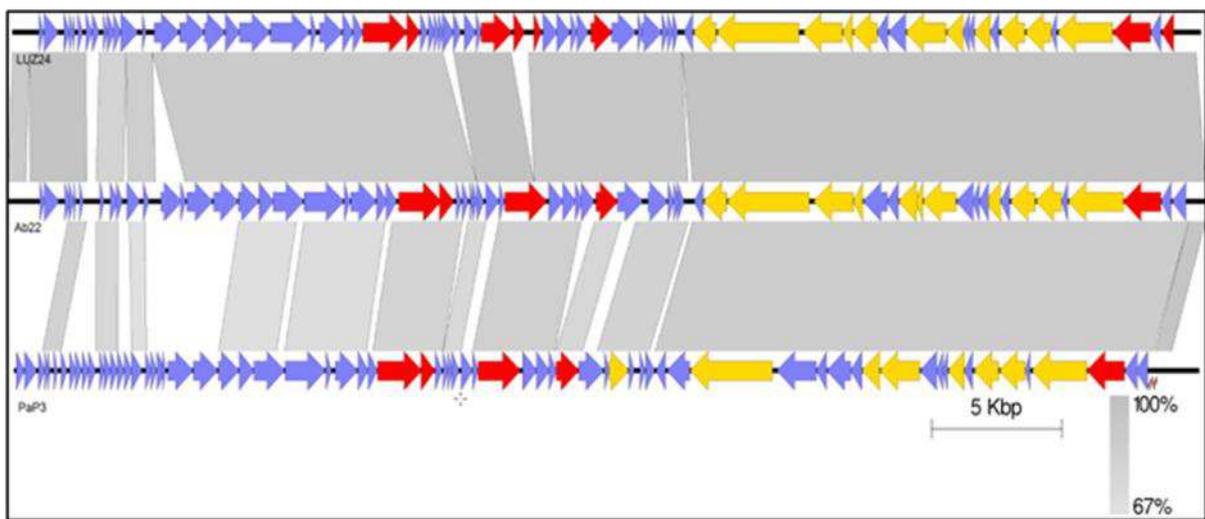


Figure S8: Alignment of Ab27 genome with those of NH4 and SN

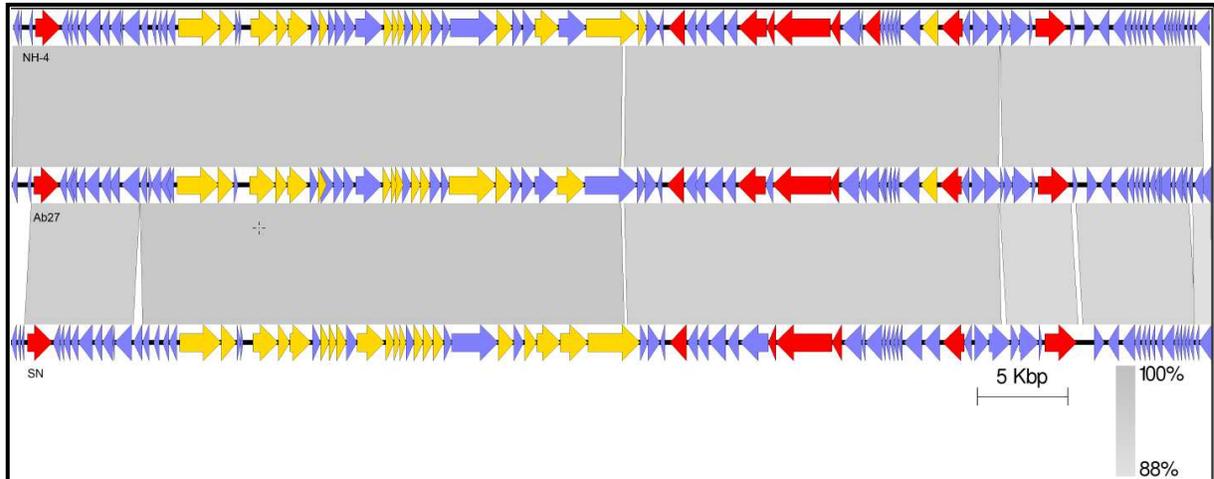
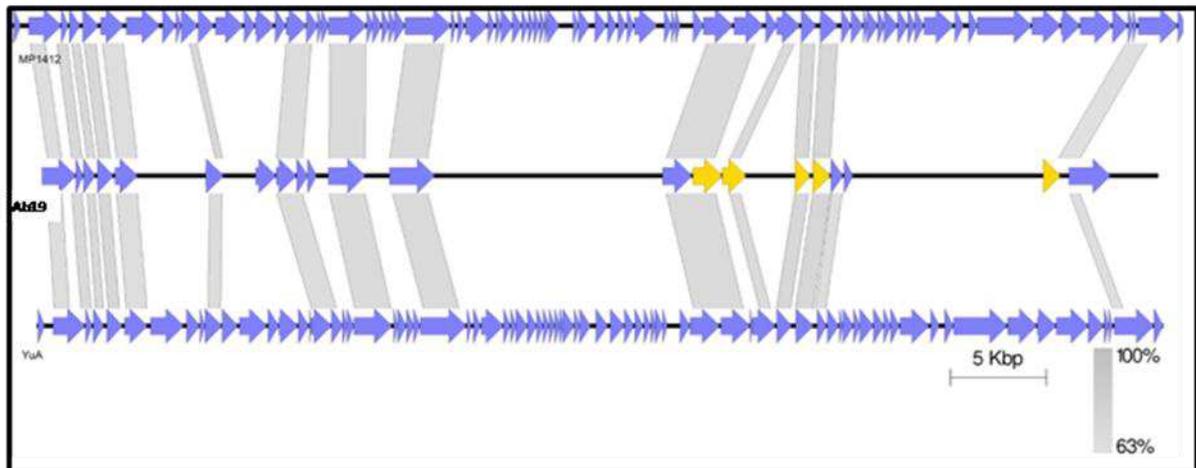


Figure S9: Alignment of Ab19 genome with those of MP1412 and YuA



ARTICLE 3

2.4. Article 3: Phages against multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Article publié dans AAC 2012

Présentation et contexte

Ce travail met en relief la capacité des phages à infecter les bactéries multi-résistantes appartenant à différents complexes clonaux. Un total de 47 souches de *P. aeruginosa* issues de patients en réanimation et multi-résistantes aux antibiotiques a été caractérisé sur la base de leur génotype MLVA permettant d'identifier 17 génotypes différents comprenant 5 complexes clonaux et 12 génotypes uniques. Ces souches ont été comparées avec 77 souches multi-résistantes provenant de Corée, Roumanie et Hongrie, précédemment caractérisées à la fois par MLST et MLVA. Le complexe clonal CC235 est le plus représenté avec 59 souches affichant différents mécanismes de résistance aux antibiotiques, y compris la présence des β -lactamases GES1, VIM-2, VIM-4 et IMP-1. D'autres souches appartiennent au clone CC11 associé généralement à la diffusion de gènes de résistance à travers le monde, principalement en Europe. La sensibilité de souches multi-résistantes isolées en France à trois phages de *P. aeruginosa* nouvellement isolés à partir des eaux usées a été déterminée. Ces phages sont capables de lyser jusqu'à 42 sur 44 des souches multi-résistantes. Les deux souches non lysées appartiennent au complexe clonal CC235.

La capacité des bactériophages à contrôler les souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* suggère que la phagothérapie pourrait constituer une alternative ou un complément efficace à l'antibiothérapie.

Rapid identification of international multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clones by multiple locus VNTR analysis (MLVA) and investigation of their susceptibility to lytic bacteriophages

Jérôme Larché¹, Flavie Pouillot², Christiane Essoh^{3,4}, Balázs Libisch⁵, Monica Straut⁶, Je Chul Lee⁷, Charles Soler⁸, Richard Lamarca¹, Elodie Gleize¹, Jérôme Gabard², Gilles Vergnaud^{3,4,9}, Christine Pourcel^{3,4,#}

Running title: Phages against drug resistant *P. aeruginosa* strains

Service de Réanimation Polyvalente, PHAGESPOIRS, Centre hospitalier de Narbonne, Bld du Docteur Lacroix, *Narbonne* cedex, France¹

Pherecydes Pharma, 102 Ave Gaston Roussel, Romainville, France²

Univ Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Orsay, France³

CNRS, 91405, Orsay, France⁴

Department of Bacteriology, National Center for Epidemiology, Budapest, Hungary⁵

National Institute for Research in Microbiology and Immunology, Cantacuzino, Spl. Independentei 103, Bucharest, Romania⁶

Department of Microbiology, Kyungpook National University, School of Medicine, Daegu 700-422, Korea⁷

Laboratoire de biologie clinique, HIA Percy, Clamart, France⁸

DGA/MRIS- Mission pour la Recherche et l'Innovation Scientifique, Bagneux, France⁸.

Key words: genotyping, MLVA, antibiotic resistance, bacteriophages, phage therapy

#Corresponding author: Christine Pourcel, Univ Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, 91405, Orsay, France

Email christine.pourcel@u-psud.fr

Tel : 33 1 69 15 30 01

Fax : 33 1 69 15 72 96

Abstract

The objective of this work was to determine the genetic diversity of multidrug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated over a period of 12 months in two French hospitals and to test their susceptibility to bacteriophages. Forty seven MDR isolates recovered from hospitalized patients were genotyped using Multiple Locus Variable number of tandem repeats (VNTR) analysis (MLVA). The genotypes were distributed into five clones (including 19, 5, 5, 3 and 3 isolates) and 11 singletons. Comparison with 77 MDR strains from three other countries, and MLST analysis of selected isolates showed the predominance of international MDR clones. The larger clone, CC235, contained 59 isolates displaying different antibiotic resistance mechanisms including presence of the GES1, VIM-2, VIM-4 and IMP-1 β -lactamases. Three newly isolated *P. aeruginosa* bacteriophages were found to lyse 42 of the 44 analyzed strains, distributed into the different clonal complexes. This pilot study suggests that systematical genotyping of *P. aeruginosa* MDR strains could improve epidemiological understanding of transmission at local (hospital) but also national level, and that phage therapy could be an alternative or a complementary treatment to antibiotics for treating MDR-infected patients.

INTRODUCTION

Infections associated with bacterial resistance carry high levels of morbidity and mortality and induce a heavy burden of direct and indirect financial costs (Roberts, Hota *et al.* 2009). Multidrug resistant (MDR) *P. aeruginosa* infections in the hospital setting are a serious concern, particularly for immunocompromised or intensive care unit (ICU) patients (Agodi, Barchitta *et al.* 2007). According to Magiorakos *et al.* MDR *P. aeruginosa* isolates are defined as resistant to one antimicrobial agent in three or more antimicrobial classes, whereas extensively drug-resistant (XDR) isolates are resistant to at least one antimicrobial agent in all but two or fewer antimicrobial classes (Magiorakos, Srinivasan *et al.* 2011). The therapeutic approaches to fight XDR and pandrug-resistant (PDR) strains are very limited (Falagas, Bliziotis *et al.* 2005 ; Lee, Ahn *et al.* 2007). For this reason, exploring *in vitro* susceptibility to phages might be of interest (Kutateladze *et al.* 2010).

The population genetics of *P. aeruginosa* has been described as panmictic with the existence of some epidemic clones (Denamur, Picard *et al.* 1993). Drug resistance is a factor favoring the expansion of international clonal complexes (Libisch, Watine *et al.* 2008 ; Libisch, Balogh *et al.* 2009). To perform molecular epidemiology studies, different genotyping techniques exist including pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), multilocus sequence typing (MLST) (Curran, Jonas *et al.* 2004) and multiple locus VNTR analysis (MLVA) (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007). While PFGE provides high level of resolution, this fingerprinting method does not allow inter-laboratory comparisons. MLST and MLVA provide the genotype under the form of a numeric code that can be stored in a database for easy comparison. MLST identified a clonal complex, first called BG11 (Giske, Libisch *et al.* 2006) then CC235, which is widespread since it has been detected in many European countries and in Russia. Metallo- β -lactamase (MBL) and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) expression in CC235 has been associated with different enzymes (Empel, Filczak *et al.* 2007 ; Viedma, Juan *et al.* 2009 ; Juan, Zamorano *et al.* 2010 ; Samuelsen, Toleman *et al.* 2010). A large database of sequence types (ST) exists already (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) but the technique remains too expensive for large studies to be performed. On the contrary, MLVA can be multiplexed to type large population of strains at a low

cost, as a first line typing tool (Sobral, Mariani-Kurkdjian *et al.* 2012). Then MLST can be applied on a subset of isolates selected for their relevance.

Here we used MLVA to investigate the genetic diversity of MDR isolates from four different countries and we tested the virulence of three newly isolated bacteriophages against the most frequent genotypes. We show that MDR and XDR isolates can be killed by lytic phages thus opening the way to a new therapeutic approach.

Material and Methods

Bacterial strains

The list of 124 isolates analysed in this study is provided in Table S1. Thirty MDR *P. aeruginosa* isolates were collected, from January to December 2010 in Narbonne hospital (France), from clinical specimens as part of the patients' usual care and without any additional sampling. Similarly, 17 XDR and MDR *P. aeruginosa* isolates were recovered in Percy hospital (France) in 2011. A total of 77 MDR isolates were recovered in Korea (40), Romania (18) and Hungary (19) (Libisch, Watine *et al.* 2008 ; Nho, Jin *et al.* 2008 ; Libisch, Balogh et Fuzi 2009 ; Szmolka, Libisch *et al.* 2009). Seven antibiotic susceptible isolates from Hungary were also included. In France the identification and antibiotic susceptibility of *P. aeruginosa* was performed by the colorimetric VITEK-2 Compact System with Advanced Expert System (AES) (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France) (Table S2), a fully automated tool providing species identification and antimicrobial susceptibility testing (Nakasone, Kinjo *et al.* 2007). MICs were interpreted according to the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) breakpoints version 2.0 http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. In Hungary and Korea, the antibiotic susceptibility tests were performed as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI <http://www.clsi.org/>) using the M100-S17 guidelines issued in 2007. In Romania MICs were performed for CAZ, IMP and MEM using E test and were interpreted according to the EUCAST breakpoints version 2.0. Antimicrobial susceptibility testing was performed with the disk diffusion method as recommended by the CLSI in the M02-A10 guidelines.

DNA purification

DNA was purified using the classical CTAB/phenol extraction method as described (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007). Purified DNA was suspended into TE buffer (10mM Tris HCl, pH 7.5, 1mM EDTA). The quality and concentration of DNA was measured using a ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop®, Labtech, Palaiseau, France).

MLVA genotyping

The 15 VNTRs analysed in the MLVA scheme, and the amplification protocol were as described by (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007). The MLVA genotype is expressed as its allelic profile corresponding to the number of repeats at each VNTR in the order ms77, ms127, ms142, ms172, ms211, ms212, ms213, ms214, ms215, ms216, ms217, ms222, ms223, ms207, ms209. The genotype of PAO1 deduced from its genomic sequence is 4 8 7 12 5 9 5 3 4 3 2 2 4 7 6. Clones are defined as groups of isolates for which the genotype differs at a maximum of 2 VNTRs, which is similar to the criteria used to define MLST clonal complexes (1 allele difference out of 7). In the clustering analysis using the categorical coefficient (also called Hamming's distance) this corresponds to a range of 80-100 % similarity (cut-off) (Vu-Thien, Corbineau *et al.* 2007). Clustering analyses were performed using BioNumeric (Applied Maths, Ghent, Belgium).

MLST

MLST was performed following a previously published method (Curran, Jonas *et al.* 2004) in all the Romanian isolates and in selected isolates belonging to different MLVA clusters. The sequence type was identified according to the MLST database (<http://pubmlst.org/paeruginosa>).

Bacteriophages purification

The clinical *P. aeruginosa* strain LMG25194 from the BCCM collection (http://bccm.belspo.be/db/lmg_search_form.php) was used for isolating and enriching virulent bacteriophages from the Parisian wastewater system. Filtrated water samples and overnight culture of bacteria were mixed and incubated at 37°C for 24 hours with shaking to enrich in specific bacteriophages. At the end of incubation, 10µL of chloroform were added to the culture and the

lysate was spun down at 11,000 g for 5 minutes to remove bacterial cells and debris. The supernatant was subjected to 0.2 µm filtration to remove the residual bacterial cells. Dilutions of the enriched phage suspension were incubated with bacteria before adding 4mL soft agar (0.7%) Luria Broth (LB) medium and pouring immediately onto LB agar plates. Clear plaques, indicative of lytic phage growth, that formed on the plates after 24 hours incubation at 37°C were picked out for subsequent phage purification and amplification. The phages were then stored at 4°C in a suspension of LB broth.

Phage DNA purification and restriction fragment analysis

A *P. aeruginosa* overnight culture was infected at a multiplicity of infection of 1 phage for 1000 bacteria and incubated in LB broth for 8 hours at 37°C with shaking. Chloroform was added to the culture and the cell lysate was centrifuged at 4,000 g for 10 min at 4°C to remove cell debris. Phage particles were precipitated from culture supernatant in the presence of 10% polyethylene glycol (average molecular weight, 6,000) and 1M sodium chloride. After centrifugation at 9,000 g for 2 hours at 4°C, the pellet was dissolved in 5 mL phage buffer (10 mM MgSO₄, 10 mM Tris pH 7.6 and 1 mM EDTA) (Stenholm, Dalsgaard et Middelboe 2008). Phage DNA was purified from the phage suspension by phenol extraction, followed by ethanol precipitation. Three hundred ng of phage DNA was digested with endonucleases *Hind*III or *Bss*HII as described by the manufacturer (New England Biolabs) and visualized by electrophoresis in a 0.7% agarose gel.

Host range determination

The bacteriophages host ranges were determined across the 30 *P. aeruginosa* isolates from Narbonne hospital, 8 isolates from Percy hospital and 6 isolates from Korea. For this, 10⁹ bacterial cells were mixed with melted 0,7% agar LB medium and poured onto solid agar LB plates to make double layer agar plates. Susceptibility to phages was tested by spotting 10⁷ plaque-forming-units (PFU) onto the bacterial lawn. After allowing 20 min for the spots to be absorbed, the plates were inverted and incubated for 24 h at 37°C before recording the lysis stage (Postic et Finland 1961 ; Yang, Liang *et al.* 2010). Clear lysis zones were recorded as + whereas turbid zones reflecting low level of bacterial death were recorded as +/- . Susceptibility was also tested on selected isolates by

incubating phages and bacteria at a Multiplicity of infection (MOI) of 1 in liquid broth and recording bacterial lysis by measure of absorbance at OD600nm.

Results

Genetic diversity of MDR *P. aeruginosa* strains from two French hospitals.

In order to characterize the diversity of MDR strains circulating inside a single general hospital, thirty isolates collected during a period of 12 months in Narbonne hospital from 27 patients were investigated. The sample sources were urine, pus from abscess, removed arterial catheter, uretral, rectal, and respiratory (sputum, broncho-alveolar lavage) samples (Table S1). A majority of isolates from patients in ICU were considered as infections rather than colonizations. Two isolates (FrNa19, FrNa21) were recovered from patient PNa_19 at one month interval and three isolates were recovered from patient PNa_1, the first in 2010 (FrNa1) and two in 2011 (FrNa29 and FrNa30) at one month interval. The other isolates were from different patients. In the Percy hospital in Clamart, 10 MDR and 7 XDR isolates were recovered from different patients over a 10 months period in 2011 mostly from broncho-alveolar lavage and from urine. Resistance level to a panel of 10 antibiotics is shown in Table S2. Four strains (FrCl07, FrCl08, FrCl09, FrCl24) were resistant to all tested drugs except colistin.

The isolates were distributed into 17 MLVA genotypes, five of which containing more than one isolate (Figure 1). Several isolates from a given patient had the same genotype. Three genotypes differing at one or two VNTRs (ms207 and ms212) formed a clone (shown in red) which included 19 isolates from both hospitals. The other clusters contained three to five isolates from a single hospital reflecting outbreak episodes. Isolates in the five clusters showed the highest antibiotics-resistance levels.

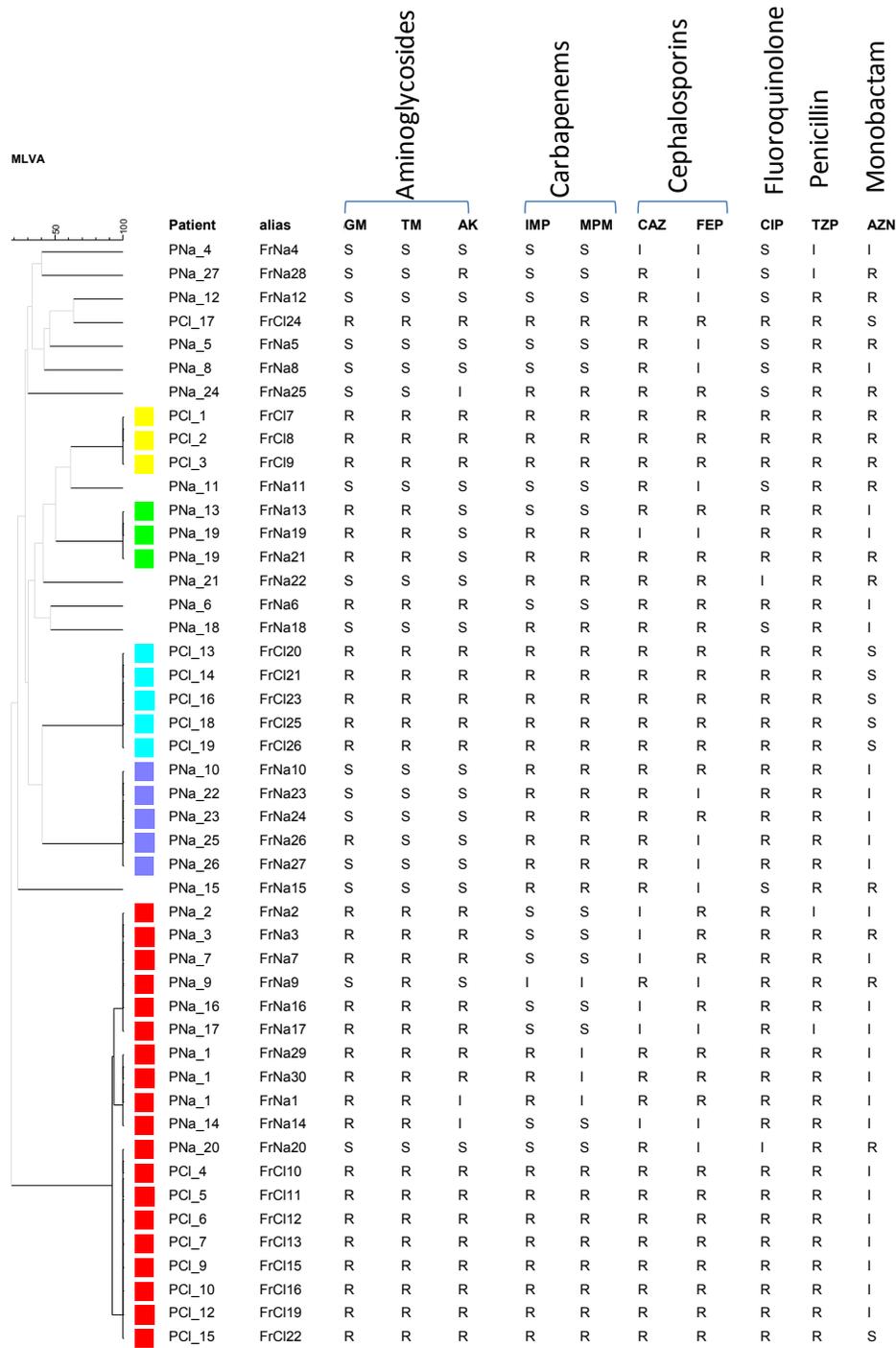


Figure 1: Clustering analysis of 47 isolates from Narbonne and Clamart hospitals.

The dendrogram was produced in BioNumerics using MLVA data. Clones defined with a 80% cut-off are shown with colors. Resistance to 10 antibiotics is shown on the right: R resistant, S susceptible, I intermediate. Gentamicin GM , Tobramycin TM, Amikacin AK, Imipenem IMP, Meropenem Mpn, Ceftazidime CAZ, Cefepime FEP, Ciprofloxacin CIP, Piperacillin-Tazobactam TZP, Aztreonam AZN.

We then performed the MLVA-typing of 70 MDR isolates from different hospitals in Korea, Romania and Hungary (Table S1 and Table S2 for the antibiotic susceptibility patterns) and compared them to the French isolates. Seven antibiotic-susceptible isolates from Hungary were included in the study as well as two reference strains, PAO1 and PA14. Three of the five previously observed clusters (shown with the same colors in Figure S1) included isolates from different countries, the larger one having 59 isolates: 19 from France, 2 from Hungary, 25 from Korea, 13 from Romania. MLVA distinguished 11 genotypes in this clone related to polymorphism at ms207, ms211, ms212 and ms214. MLST was performed on all the Romanian isolates and selected isolates belonging to major MLVA clusters. In the larger cluster all the MLST-typed isolates belonged to CC235 (13, 3 and 2 from Romania, France and Korea respectively were ST235). Three different β -lactamases were identified in this cluster; IMP-1, VIM-2 and GES1. In five other CC235 isolates (FrNa1, FrNa19, FrNa6, FrNa23, FrNa30) the resistance mechanism involved over-expression of AmpC cephalosporinase and alteration of OprD. Two additional clusters were identified as international clone CC111 (2 ST111 and 2 ST229 isolates) and CC175 (2 ST175 isolates). One isolate was ST308 and the last one ST560. None of the seven non-MDR isolates (Hu8, Hu11, Hu16, Hu17, Hu18, Hu19) clustered with CC235.

Isolation of lytic bacteriophages and susceptibility test.

In order to test whether phages could have *in vitro* activity against MDR *P. aeruginosa*, we isolated new lytic phages and tested their virulence against the 30 isolates from Narbonne hospital, 8 isolates from Percy hospital and 6 isolates from Korea, selected in the different clusters. To verify that the phages were indeed different we analysed the restriction map of A, B and C phage genomes following digestion with *HindIII* and *BssHII* enzymes (Figure 2).

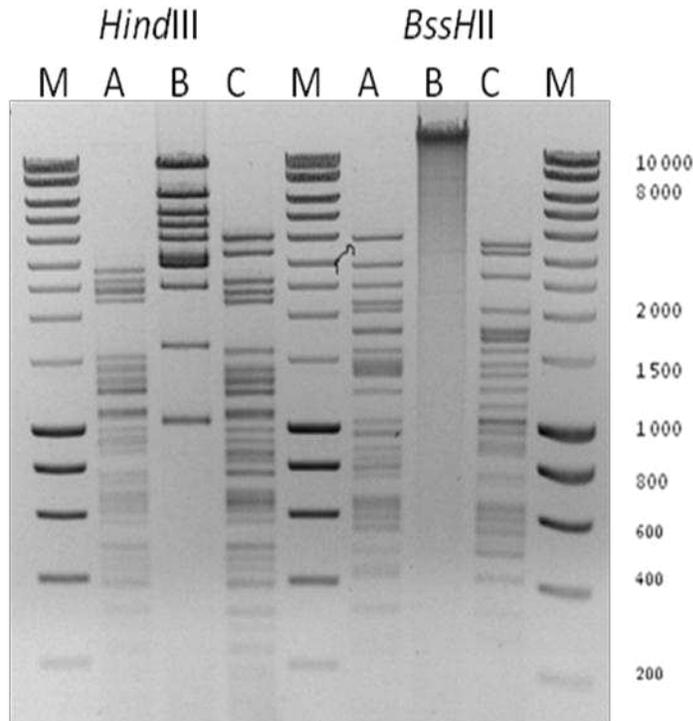


Figure 2: Restriction pattern of the three bacteriophages A, B and C. Genomic DNA digested by HindIII or BssHII was run on an agarose gel. M is the size marker.

The three profiles were clearly different, phages A and C showing more similarities which suggests that they belong to the same family. Table 1 shows the host range determination of the three phages, individually or combined in a cocktail. Six independent assays were performed and the table shows a synthesis of each experiment where (+) means that the strain is highly susceptible to phages while (+/-) correspond to an intermediate result. Out of 44 *P. aeruginosa* isolates, 42 (95.4%) displayed a high susceptibility to at least one phage, as well as to the cocktail. There was a correlation between the genotype and the susceptibility pattern in isolates of the two smaller clones (shown in blue and green in Figure 1), suggesting that they were rather stable. This is not the case for isolates belonging to the CC235 lineage in which a diversity of patterns was observed. Two isolates belonging to CC235, namely FrNa3 and FrNa9, were resistant to all three

phages (individually or as a cocktail), whereas other strains with the same MLVA genotype and originating from different hospitals and countries were susceptible to one to three phages.

Table 1: Susceptibility of 44 isolates to three lytic bacteriophages

Isolate	Clonal type	Phage A	Phage B	Phage C	Cocktail (A+B+C)
FrNa01	235	+/-	+/-	+	+
FrNa02	235	-	+/-	+	+
FrNa03	235	-	+/-	+/-	+/-
FrNa04		+	+	+	+
FrNa05		+	+	+/-	+
FrNa06		-	+	-	+
FrNa07	235	+/-	-	+	+
FrNa08		+/-	+	+/-	+
FrNa09	235	+/-	+/-	+/-	+/-
FrNa10	308	+	+	+	+
FrNa11		+/-	+	+/-	+
FrNa12		+/-	+	+/-	+
FrNa13	175	-	+	-	+
FrNa14	235	+	+/-	+	+
FrNa15		-	+	+/-	+
FrNa16	235	-	-	+	+
FrNa17	235	+/-	-	+	+
FrNa18		-	+	+/-	+
FrNa19	175	-	+	+/-	+
FrNa20		+	+	+	+
FrNa21	175	-	+	+/-	+
FrNa22		+/-	+	+	+
FrNa23	308	+	+	+	+
FrNa24		+	+	+	+
FrNa25		+	+	+/-	+
FrNa26	308	+	+	+	+
FrNa27	308	+	+	+/-	+
FrNa28		+	-	+	+
FrNa29	235	+/-	+	+/-	+
FrNa30	235	+/-	+	+	+
FrCl07	111	-	+	-	+
FrCl08	111	-	+	-	+
FrCl10	235	+	+	+	+
FrCl11	235	+	+	+	+
FrCl20		-	+	-	+
FtCl22	235	+	+	+	+
FrCl24		+/-	+	+/-	+
FrCl26		-	+	-	+
K6	560	-	+	-	+
K20	235	+	+	+	+
K23	235	+		+	+
K25		+	+	+	+
K32		-	+	-	+
K45	235	+	+/-	+	+

Discussion

Bacteriophages, natural killers of bacteria, may represent a new addition in the therapeutic arsenal to fight the ever increasing threat of antibiotic-resistant bacteria. Recent reviews discussed the applicability of phage therapy in the clinical settings (Kutateladze et Adamia 2010 ; Kutter, De Vos *et al.* 2010 ; Pirnay, De Vos *et al.* 2011). They emphasize the fact that topical (skin, ear, superficial and osteoarticular wounds) and oral (digestive tract) use of phages may be the most efficient but also suggested that acute or chronic respiratory infections, as observed in cystic fibrosis patients, might be treated using nebulizers. Well-designed randomized controlled trials using fully characterized single phage or phage cocktails with an adapted virulence spectrum, have yet to be implemented. Recent small-scale phage therapy trials against MDR- *P. aeruginosa* and MRSA infections have been performed in Western Europe and USA (Merabishvili, Pirnay *et al.* 2009 ; Rhoads, Wolcott *et al.* 2009 ; Wright, Hawkins *et al.* 2009). Moreover, an experimental study conducted on wild-type *P. fluorescens* strains recently showed that a combined synergistic antibiotic-phages treatment could prevent resistance evolution among native strains, but also could decrease significantly fitness of rare surviving bacterial populations (Comeau, Tetart *et al.* 2007 ; Zhang et Buckling 2012)

Our preliminary analysis of MDR *P. aeruginosa* susceptibility to lytic bacteriophages is very encouraging in that the large majority of isolates distributed in the 14 MLVA clusters and singletons were lysed by at least one among the three bacteriophages used in this study. Members of clone CC235 were highly represented on our collection (50% of MDR isolates), in excellent agreement with previous investigations (Maatallah, Cheriaa *et al.* 2011), as well as MDR isolates belonging to other international clonal complexes such as CC111 and CC175 (Cholley, Thouverez *et al.* 2011). A limit of our study is the fact that drug resistance of the tested international collection of *P. aeruginosa* isolates was evaluated using different methods and different breakpoint systems. We plan to perform a larger prospective assay on phage susceptibility of fully characterized MDR isolates and using additional lytic phages. Indeed, among the studied isolates, two were resistant to the three phages and they will be used in the future to isolate new lytic phages and to investigate mechanisms of phages resistance. Efficient therapeutic cocktails should

be able to lyse a majority of isolates of diverse origins and genetic backgrounds so that the chance to be active against a particular infection is high.

As part of a multi-track approach (Bush, Courvalin *et al.* 2011), a molecular epidemiological diagnosis, based on a systematic and networked genotyping of clinically relevant strains, could constitute a very promising – and necessary as well – step. The increasing occurrence of *P. aeruginosa* MDR strains, needs an increased research effort for alternative and innovating therapeutic solutions (e.g. phage therapy), optimizing current preventive strategies (hand-washing, isolation of colonized/infected patients).

Acknowledgments

This study was performed with the financial support of the association Vaincre La Mucoviscidose (Grant N° **2010/IC1020**). C. Esoh holds a fellowship of Agence Universitaire de la Francophonie. We thank Katy Jeannot at the Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques for analysing antibiotics resistance mechanisms.

Transparency declaration

JG and FP are employees of Pherecydes Pharma.

References

- Agodi, A., M. Barchitta, *et al.* (2007). "*Pseudomonas aeruginosa* carriage, colonization, and infection in ICU patients." Intensive Care Med **33**(7): 1155-1161.
- Bush, K., P. Courvalin, *et al.* (2011). "Tackling antibiotic resistance." Nat Rev Microbiol **9**(12): 894-896.
- Cholley, P., M. Thouverez, *et al.* (2011). "Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types." J Clin Microbiol **49**(7): 2578-2583.
- Comeau, A. M., F. Tetart, *et al.* (2007). "Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth." PLoS One **2**(8): e799.
- Curran, B., D. Jonas, *et al.* (2004). "Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*." J Clin Microbiol **42**(12): 5644-5649.

- Denamur, E., B. Picard, *et al.* (1993). "The absence of correlation between allozyme and *rrn* RFLP analysis indicates a high gene flow rate within human clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates." FEMS Microbiol Lett **110**(3): 275-280.
- Empel, J., K. Filczak, *et al.* (2007). "Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex." J Clin Microbiol **45**(9): 2829-2834.
- Falagas, M. E., I. A. Bliziotis, *et al.* (2005). "Outcome of infections due to pandrug-resistant (PDR) Gram-negative bacteria." BMC Infect Dis **5**: 24.
- Giske, C. G., B. Libisch, *et al.* (2006). "Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **44**(12): 4309-4315.
- Juan, C., L. Zamorano, *et al.* (2010). "Metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones." J Antimicrob Chemother **65**(3): 474-478.
- Kutateladze, M. et R. Adamia (2010). "Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics." Trends Biotechnol **28**(12): 591-595.
- Kutter, E., D. De Vos, *et al.* (2010). "Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections." Curr Pharm Biotechnol **11**(1): 69-86.
- Lee, Y. C., B. J. Ahn, *et al.* (2007). "Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to all antimicrobial agents, but susceptible to colistin, in Daegu, Korea." J Microbiol **45**(4): 358-363.
- Libisch, B., B. Balogh et M. Fuzi (2009). "Identification of two multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clonal lineages with a countrywide distribution in Hungary." Curr Microbiol **58**(2): 111-116.
- Libisch, B., J. Watine, *et al.* (2008). "Molecular typing indicates an important role for two international clonal complexes in dissemination of VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Hungary." Res Microbiol **159**(3): 162-168.
- Maatallah, M., J. Cheriaa, *et al.* (2011). "Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235." PLoS One **6**(10): e25617.
- Magiorakos, A. P., A. Srinivasan, *et al.* (2011). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance." Clin Microbiol Infect **18**: 268-281.
- Merabishvili, M., J. P. Pirnay, *et al.* (2009). "Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials." PLoS ONE **4**(3): e4944.
- Nakasone, I., T. Kinjo, *et al.* (2007). "Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the Advanced Expert System for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing." Diagn Microbiol Infect Dis **58**(2): 191-198.
- Nho, S. O., J. S. Jin, *et al.* (2008). "Dissemination of the blaIMP-1 and blaVIM-2 metallo-beta-lactamase genes among genetically unrelated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a South Korean hospital." Int J Antimicrob Agents **31**(6): 586-588.
- Pirnay, J. P., D. De Vos, *et al.* (2011). "The phage therapy paradigm: pret-a-porter or sur-mesure?" Pharm Res **28**(4): 934-937.

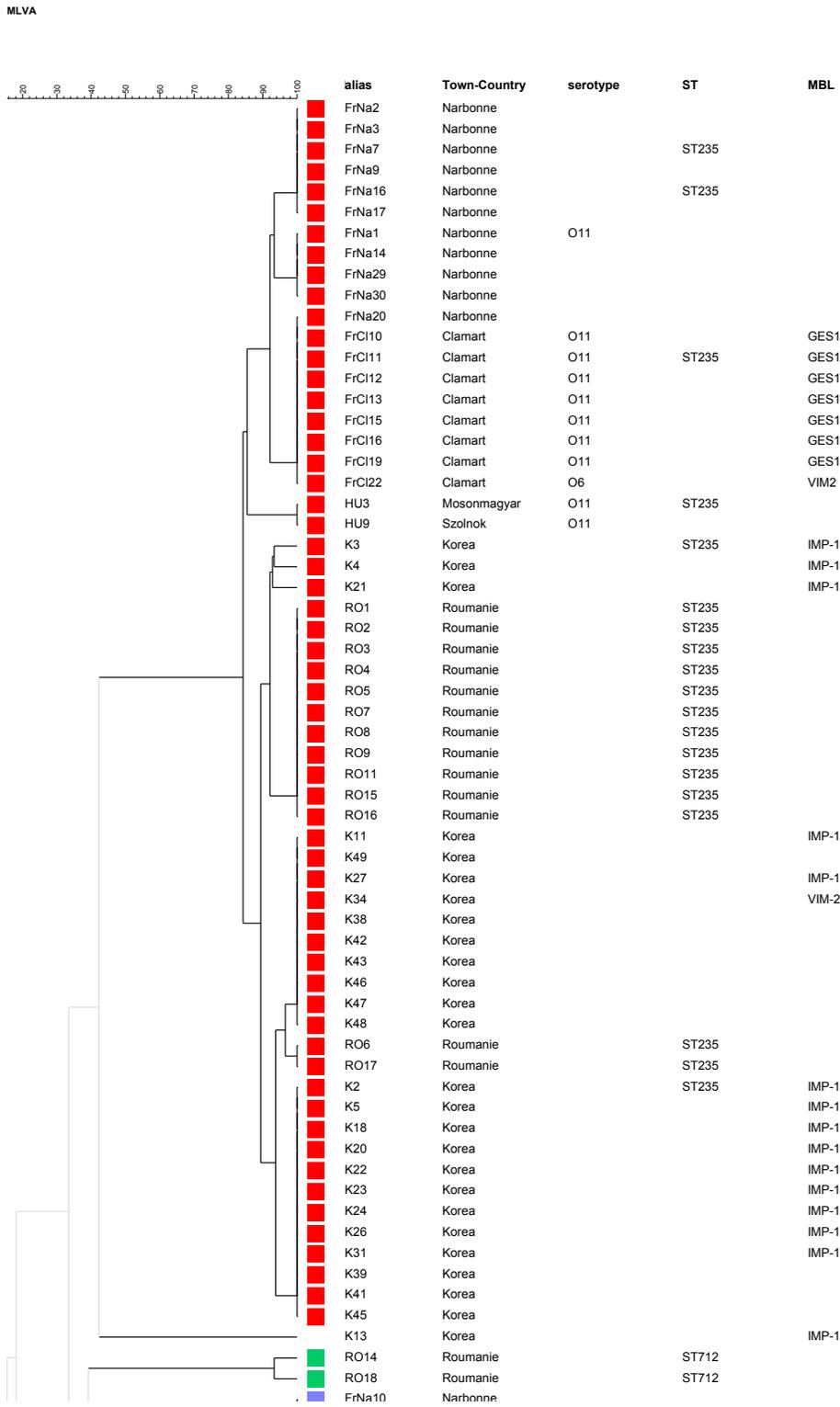
- Postic, B. et M. Finland (1961). "Observations on bacteriophage typing of *Pseudomonas aeruginosa*." J Clin Invest **40**: 2064-2075.
- Rhoads, D. D., R. D. Wolcott, *et al.* (2009). "Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial." J Wound Care **18**(6): 237-238, 240-233.
- Roberts, R. R., B. Hota, *et al.* (2009). "Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship." Clin Infect Dis **49**(8): 1175-1184.
- Samuelsen, O., M. A. Toleman, *et al.* (2010). "Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Norway and Sweden shows import of international clones and local clonal expansion." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 346-352.
- Sobral, D., P. Mariani-Kurkdjian, *et al.* (2012). "A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **31**(9): 2247-2256.
- Stenholm, A. R., I. Dalsgaard et M. Middelboe (2008). "Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*." Appl Environ Microbiol **74**(13): 4070-4078.
- Szmlka, A., B. Libisch, *et al.* (2009). "Virulence and antimicrobial resistance determinants of human pathogenic and commensal strains of *Pseudomonas aeruginosa*." Acta Microbiol Immunol Hung **56**(4): 399-402.
- Viedma, E., C. Juan, *et al.* (2009). "Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain." Antimicrob Agents Chemother **53**(11): 4930-4933.
- Vu-Thien, H., G. Corbineau, *et al.* (2007). "Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients." J Clin Microbiol **45**(10): 3175-3183.
- Wright, A., C. H. Hawkins, *et al.* (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.
- Yang, H., L. Liang, *et al.* (2010). "Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii*." BMC Microbiol **10**: 131.
- Zhang, Q.-G. et A. Buckling (2012). "Phages limit the evolution of bacterial antibiotics resistance in experimental microcosms." Evolutionary Applications.

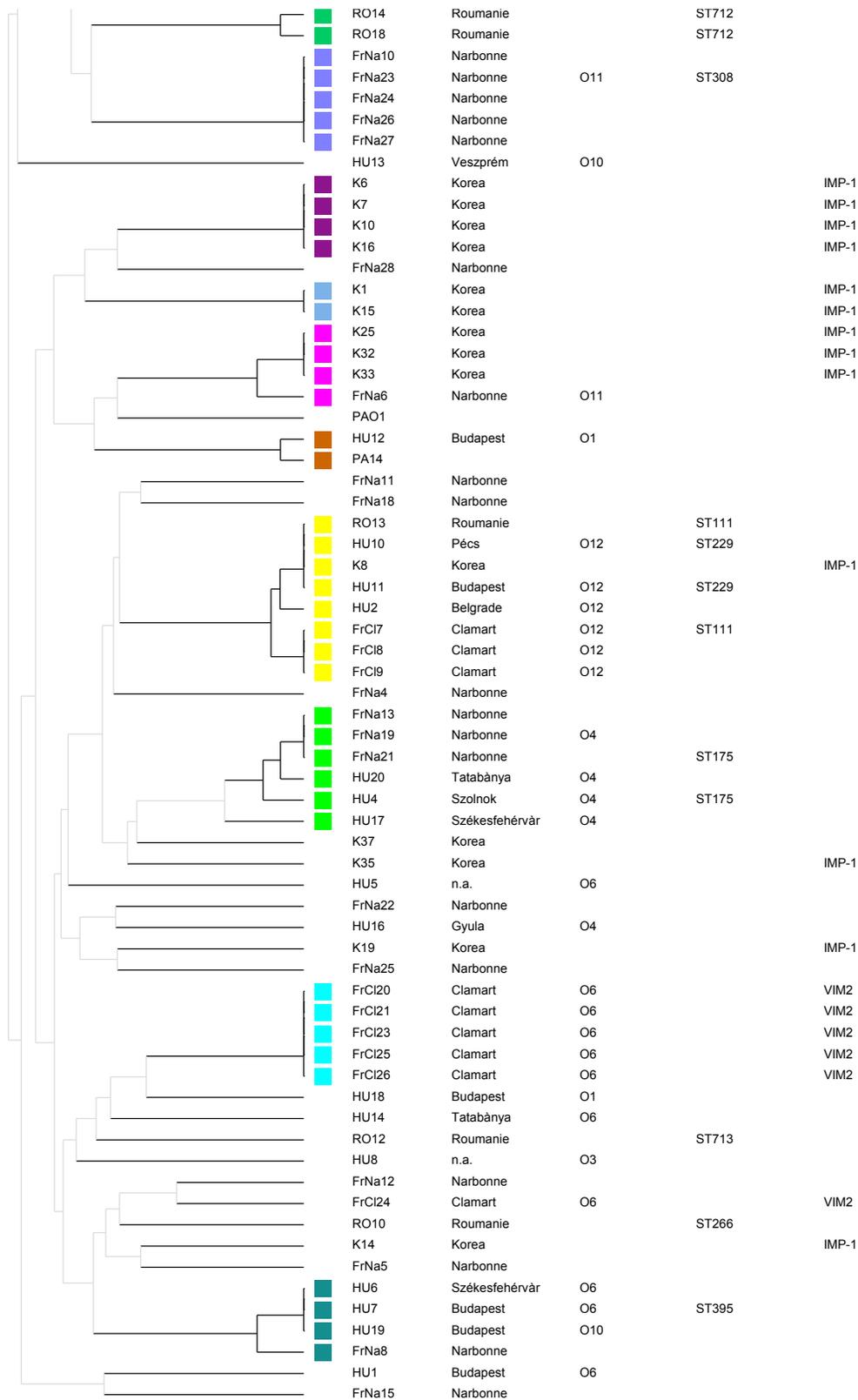
FIGURES ET TABLEAUX SUPPLEMENTAIRES DE L'ARTICLE 3

Table S1: Characteristics of the <i>P. aeruginosa</i> isolates								
Alias	Year	Origin	City	Country	Sample	Drug-resistance	ST	Ref
FrNa1	2010	Human	Narbonne	France	Catheter	XDR		
FrNa2	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa3	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa4	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa5	2010	Human	Narbonne	France	Urethral swab	MDR		
FrNa6	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa7	2010	Human	Narbonne	France	Catheter	MDR	ST235	
FrNa8	2010	Human	Narbonne	France	Catheter	MDR		
FrNa9	2010	Human	Narbonne	France	Catheter	XDR		
FrNa10	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa11	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa12	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa13	2010	Human	Narbonne	France	BAL	MDR		
FrNa14	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR		
FrNa15	2010	Human	Narbonne	France	BAL	MDR		
FrNa16	2010	Human	Narbonne	France	Urine	MDR	ST235	
FrNa17	2010	Human	Narbonne	France	Rectal swab	MDR		
FrNa18	2010	Human	Narbonne	France	PLE	MDR		
FrNa19	2010	Human	Narbonne	France	PLE	MDR		
FrNa20	2010	Human	Narbonne	France	PLE	MDR		
FrNa21	2010	Human	Narbonne	France	Pus	MDR	ST175	
FrNa22	2010	Human	Narbonne	France	Catheter	MDR		
FrNa23	2010	Human	Narbonne	France	PLE	MDR	ST308	
FrNa24	2010	Human	Narbonne	France	Pus	MDR		
FrNa25	2010	Human	Narbonne	France	Catheter	MDR		
FrNa26	2010	Human	Narbonne	France	PLE	MDR		
FrNa27	2010	Human	Narbonne	France	PLE	MDR		
FrNa28	2010	Human	Narbonne	France	PLE	MDR		
FrNa29	2011	Human	Narbonne	France	BAL	XDR		
FrNa30	2011	Human	Narbonne	France	BAL	XDR		
FrCl7	2011	Human	Clamart	France	Blood	XDR	ST111	
FrCl8	2011	Human	Clamart	France	BAL	XDR		
FrCl9	2011	Human	Clamart	France	Blood	XDR		
FrCl10	2011	Human	Clamart	France	Blood	MDR		
FrCl11	2011	Human	Clamart	France	Superficial pus	MDR	ST235	
FrCl12	2011	Human	Clamart	France	BAL	MDR		
FrCl13	2011	Human	Clamart	France	Bone biopsy	MDR		
FrCl15	2011	Human	Clamart	France	Superficial pus	MDR		
FrCl16	2011	Human	Clamart	France	Bone biopsy	MDR		
FrCl19	2011	Human	Clamart	France	Bone biopsy	MDR		
FrCl20	2011	Human	Clamart	France	Urine	MDR		
FrCl21	2011	Human	Clamart	France	Urine	MDR		
FrCl22	2011	Human	Clamart	France	Urine	MDR		
FrCl23	2011	Human	Clamart	France	Urine	MDR		
FrCl24	2011	Human	Clamart	France	Urine	XDR		
FrCl25	2011	Human	Clamart	France	Urine	MDR		
FrCl26	2011	Human	Clamart	France	Urine	MDR		
Ko1	2005	Human	Daegu	Korea	Wound swab	MDR		[1]
Ko2	2005	Human	Daegu	Korea	UN	MDR	ST235	[1]
Ko3	2006	Human	Daegu	Korea	Wound swab	MDR	ST235	[1]
Ko4	2006	Human	Daegu	Korea	Urine	MDR		[1]
Ko5	2006	Human	Daegu	Korea	Others	MDR		[1]
Ko6	2006	Human	Daegu	Korea	Blood	MDR	ST560	[1]
Ko7	2006	Human	Daegu	Korea	Wound swab	MDR		[1]
Ko8	2006	Human	Daegu	Korea	Sputum	MDR		[1]
Ko10	2006	Human	Daegu	Korea	Bile	XDR		[1]
Ko11	2005	Human	Daegu	Korea	UN	MDR		[1]
Ko13	2005	Human	Daegu	Korea	Wound swab	MDR		[1]

Table S2: Antibiotic resistance of the <i>P. aeruginosa</i> isolates											
Alias	GM	TM	AK	IMP	MPM	CAZ	FEP	CIP	TZP	AZN	Mechanism
FrNa1	R	R	I	R	I	R	R	R	R	I	AmpC, OprD
FrNa2	R	R	R	S	S	I	R	R	I	I	
FrNa3	R	R	R	S	S	I	R	R	R	R	
FrNa4	S	S	S	S	S	I	I	S	I	I	
FrNa5	S	S	S	S	S	R	I	S	R	R	
FrNa6	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	AmpC, OprD
FrNa7	R	R	R	S	S	I	R	R	R	I	
FrNa8	S	S	S	S	S	R	I	S	R	I	
FrNa9	S	R	S	I	I	R	I	R	R	R	
FrNa10	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	
FrNa11	S	S	S	S	S	R	I	S	R	R	
FrNa12	S	S	S	S	S	R	I	S	R	R	
FrNa13	R	R	S	S	S	R	R	R	R	I	
FrNa14	R	R	I	S	S	I	I	R	R	I	
FrNa15	S	S	S	R	R	R	I	S	R	R	
FrNa16	R	R	R	S	S	I	R	R	R	I	
FrNa17	R	R	R	S	S	I	I	R	I	I	
FrNa18	S	S	S	R	R	R	R	S	R	I	
FrNa19	R	R	S	R	R	I	I	R	R	I	AmpC
FrNa20	S	S	S	S	S	R	I	I	R	R	
FrNa21	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
FrNa22	S	S	S	R	R	R	R	I	R	R	
FrNa23	S	S	S	R	R	R	I	R	R	I	AmpC, OprD
FrNa24	S	S	S	R	R	R	R	R	R	I	
FrNa25	S	S	I	R	R	R	R	S	R	R	
FrNa26	R	S	S	R	R	R	I	R	R	I	
FrNa27	S	S	S	R	R	R	I	R	R	I	
FrNa28	S	S	R	S	S	R	I	S	I	R	
FrNa29	R	R	R	R	NT	R	R	R	R	I	AmpC, OprD
FrNa30	R	R	R	R	NT	R	R	R	R	I	AmpC, OprD
FrCl7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
FrCl8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
FrCl9	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
FrCl10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	GES1
FrCl11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	GES1
FrCl12	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	GES1
FrCl13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	GES1
FrCl15	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	GES1
FrCl16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	GES1
FrCl19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	GES1
FrCl20	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	VIM2
FrCl21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	VIM2
FrCl22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	VIM2
FrCl23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	VIM2
FrCl24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	VIM2
FrCl25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	VIM2
FrCl26	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	VIM2
Ko1	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	IMP-1
Ko2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	IMP-1
Ko3	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	IMP-1
Ko4	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	IMP-1
Ko5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	IMP-1
Ko6	R	s	S	R	R	R	R	S	R	S	IMP-1
Ko7	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	IMP-1
Ko8	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	IMP-1
Ko10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	IMP-1
Ko11	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	IMP-1
Ko13	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	IMP-1
Ko14	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	IMP-1

Figure S1: Clustering analysis of 117 isolates from 4 different countries





DISCUSSION
ET
PERSPECTIVES

3. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

3.1. Diversité des souches de *P. aeruginosa*

Par le passé les bactéries étaient caractérisées par leurs profils de sensibilité aux phages grâce à une technique appelée lysotypie, pour un suivi épidémiologique. L'important polymorphisme observé reflétait la grande diversité des souches bactériennes et des bactériophages. Mon travail de thèse s'est inscrit dans cette problématique en cherchant à analyser la sensibilité d'une sélection de souches bactériennes de génotypes divers, à une collection de phages correspondant à la majorité des genres connus. Pour isoler et caractériser les phages nous avons choisi d'utiliser des souches issues de patients mucoviscidosiques, sélectionnées sur la base de leur génotype MLVA parmi environ 350 souches provenant de différents centres hospitaliers en France. Certaines sont génétiquement proches des souches transmissibles PA14 et du clone C tandis que la majorité affiche des génotypes uniques. En effet l'espèce *P. aeruginosa* est décrite comme ayant une structure panmictique avec des clones épidémiques récemment appelées souches transmissibles. Les souches cliniques et environnementales sont génétiquement indistinguables, mais de plus en plus souvent des clones particulièrement adaptés aux voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose sont observés (van Mansfeld, Jongerden *et al.* 2010). Par ailleurs, il a été également montré que la virulence des souches transmissibles et sporadiques est globalement similaire contrairement à l'observation faite chez la souche la plus étudiée LES qui affiche une virulence assez significative. Cependant les clones persistants subissent une microévolution (Cramer, Klockgether *et al.* 2011) menant à la production d'alginate qui facilite la formation d'un biofilm (Hogardt et Heesemann 2012). Le biofilm constituant une protection contre l'agressivité de l'environnement, les souches de *P. aeruginosa* sont alors également en mesure de résister au traitement par les antibiotiques. De plus il a été démontré que différentes espèces bactériennes ainsi que des bactériophages vivent en communauté dans ces biofilms.

Il était donc intéressant d'étudier ce type de souches car celles-ci, quoique rarement résistantes à de multiples antibiotiques *in vitro*, montrent une grande variété de phénotypes et sont très difficiles à éradiquer augmentant le risque de mortalité chez les patients.

Par contraste nous avons observé dans une étude parallèle menée sur les souches de *P. aeruginosa* MDR issues de patients en réanimation, que plus de la moitié des souches appartiennent au complexe clonal CC235 (clone ST 235 et variant). Ce clone est le plus souvent associé à la production de Metallo-betalactamase (MBLs) en particulier les carbapémémases, ainsi qu'à la surexpression des pompes d'efflux et à l'altération ou la perte de la porine OprD impliquée dans la résistance aux carbapénèmes en particulier Imipénème et Méropénème qui sont le traitement de choix des infections à *P. aeruginosa* (Edalucci, Spinelli *et al.* 2008). Nous avons également observé des souches du clone CC111 répandu à travers le monde et responsable de la dissémination des gènes de production beta-lactamases diverses de particulièrement en Europe (Empel, Filczak *et al.* 2007 ; Maatallah, Cheriaa *et al.* 2011).

D'origine environnementale, les souches de *P. aeruginosa* dont celles issues de patients atteints de mucoviscidose, hébergent le plus souvent dans leur génome un ou plusieurs bactériophages intégrés sous forme de prophage qui contribuent significativement à leur diversification. Outre la conversion lysogénique qui induit des changements phénotypiques de l'hôte par l'expression de gènes du phage, le prophage protège également la bactérie contre la surinfection par un phage de même nature (Brussow, Canchaya et Hardt 2004). Nous avons constaté que plus de 90% des souches mucoviscidosiques analysées sont capables de libérer au moins un prophage actif (phage tempéré). Une étude complémentaire sera nécessaire pour déterminer si ceci pourrait expliquer les différences observées entre les souches génétiquement proches vis à vis de certains bactériophages testés. Par exemple, la présence du phage tempéré D3 de *P. aeruginosa* responsable de la séroconversion de souche O5 en O16 modifie les récepteurs phagiques LPS, rendant ainsi la bactérie résistante aux phages LPS-dépendants (Kuzio et Kropinski 1983).

3.2. Diversité des phages de *P. aeruginosa*

3.2.1. Les phages dérivés du Pyophage

Le Pyophage est un mélange de phages thérapeutiques, dirigé contre 5 espèces bactériennes responsables d'infections purulentes, et généralement appliqué de façon locale sur le site infectieux. Fréquemment utilisé en Géorgie et en Russie, ce cocktail de phages est disponible en pharmacie dans ces pays et l'on peut facilement s'en procurer sans prescription. Un certain nombre de malades en provenance des pays occidentaux auraient été traités avec le Pyophage. Cette préparation créée il y a près d'un siècle a constamment été enrichie de nouveaux phages et l'on ignore sa composition. Au cours de ma thèse j'ai cherché à analyser les phages du Pyophage dirigés contre *P. aeruginosa* sur une collection de souches issues de patients atteints de mucoviscidose. Parmi les dix phages isolés du Pyophage sur différentes souches, quatre montraient un profil de digestion enzymatique très similaire et ils formaient tous de très grosses plages sur PAO1 entourées d'un halo. Ces phages sont donc probablement des variants d'une même espèce et un seul, le phage 1-15_{pyo}, a été analysé en détail. Finalement six phages caudés nommés 1-15_{pyo}, 8-13_{pyo}, 2-10_{pyo}, 3-20_{pyo}, Tr60_{pyo}, et 1-14_{pyo} distribués au sein de quatre genres ont été sélectionnés sur la base de leur profil de digestion. Seul le phage 1-14_{pyo} est un myovirus. Il est apparenté au groupe PB-1 très répandu à travers le monde (Ceysens et Lavigne 2010) et possédant un spectre d'hôte assez large. Un phage de ce groupe est inclus dans le cocktail de phages thérapeutiques BFC-1 destiné à traiter les brûlés (Merabishvili, Pirnay *et al.* 2009). Les autres phages sont des Podovirus. Les phages 1-15_{pyo} et 8-13_{pyo} appartiennent respectivement aux genres Φ KMV et N4 tandis que 2-10_{pyo}, 3-20_{pyo}, Tr60_{pyo} sont apparentés au genre LUZ24.

La production par le phage 1-15_{pyo} de grosses plages de lyse entourées d'un halo, signe d'une activité dépolymérase capable de dégrader le biofilm bactérien, a été observée chez l'espèce Φ KMV (Glonti, Chanishvili et Taylor 2010). Ces phages ont généralement un génome relativement conservé. Malgré une origine géographique très diverse, certains d'entre eux présentent parfois jusqu'à 99% de similarité au niveau nucléotidique (Kulakov, Ksenzenko *et al.* 2009 ; Ceysens et Lavigne 2010 ; Ceysens, Glonti *et al.* 2011). Les phages PNM inclus dans le cocktail BFC-1, et LUZ19 utilisé sous forme d'un pulvérisateur de bactériophages lyophilisés en

poudre respirable pour lutter contre les infections bactériennes pulmonaires, appartiennent au genre Φ KMV (Merabishvili, Pirnay *et al.* 2009 ; Vandenneuvel, Singh *et al.* 2013).

Le phage 8-13_{pyo} apparenté à N4 présente une virulence très significative sur la majorité des souches qu'il infecte. Les phages semblables à N4 ont un cycle lytique obligatoire et utilisent leurs propres enzymes pour détourner la machinerie de l'hôte (Ceyssens, Brabban *et al.* 2010). Parmi les six phages isolés du Pyophage, trois appartiennent au genre représenté par LUZ24. Bien que leurs profils de digestion enzymatique par *EcoRI* et *HindIII* soient clairement différents, leurs spectres d'hôte sont très similaires mais on relève parfois des différences nettes sur quelques souches. Par exemple le phage Tr60_{pyo} se multiplie sur la souche C1-15 tandis que les phages 3-20_{pyo} et 2-10_{pyo} sont incapables de lyser celle-ci. De même, le phage 2-10_{pyo} infecte efficacement à de faibles concentrations la souche C2-10, mais sur cette souche le phage Tr60_{pyo} est moins virulent, et 3-20_{pyo} forme des plages troubles.

Une des caractéristiques assez distinctive des phages apparentés à LUZ24 est la capacité de former deux types de plages, troubles et claires, sur certaines souches notamment les souches C2-10, C3-20 et Tr60 de notre collection. Il peut être intéressant de noter que le genre représenté par LUZ24 est constitué de phages lytiques (Ceyssens, Hertveldt *et al.* 2008 ; Alemayehu, Casey *et al.* 2012) à l'exception de PaP3 qui bien que dépourvu de gènes classiquement responsables de lysogénéisation se sert de l'ARN de transfert (ARNt) pour s'intégrer au génome bactérien (Tan, Zhang *et al.* 2007).

En résumé, tous les phages identifiés dans le Pyophage appartiennent à des groupes de phages lytiques dont le cycle reproductif aboutit à la mort totale de la bactérie infectée. D'autres phages pourraient être présents mais en concentration trop faible pour former des plages visibles sur la collection de 11 souches de différents complexes clonaux, utilisée dans notre étude. Par exemple un phage proche de JG004 a été identifié dans le Pyophage sur une collection de souches issues d'enfants atteints de mucoviscidose de l'hôpital de Seattle aux USA par l'équipe d'Elisabeth Kutter (travaux non publiés).

Le spectre d'hôte des six phages testés sous forme d'un cocktail sur une large collection de souches est similaire à celui du Pyophage suggérant que ces phages sont représentatifs des phages

présents dans le lot de Pyophage analysé. De même les souches résistantes au Pyophage sont bien résistantes au cocktail de six phages ainsi qu'aux phages testés individuellement montrant que l'association de plusieurs phages n'influence pas leur activité. Cette observation a déjà été effectuée lors d'une étude expérimentale (Hall, De Vos *et al.* 2012). Le Pyophage donne une zone de lyse trouble sur la souche C5-12, suggérant l'existence de bactéries résistantes, tandis que seules des zones claires sont observées avec le cocktail de six phages même à de faibles concentrations. Parmi les phages dérivés du Pyophage, seuls les phages du genre LUZ24 sont capables de se multiplier sur la souche C5-2, ce qui suppose que la concentration des phages apparentés à LUZ24 est très faible dans le Pyophage. Ces phages sont instables et leur titre peut chuter de 80% après 9 mois de stockage à 4C° dans un tampon standard phage (Ceysens, Hertveldt *et al.* 2008). En revanche, le phage 1-15_{pyo} appartenant au genre Φ KMV est facile à produire avec un titre avoisinant 10⁷ PFU par plage et est très stable.

Aucun phage apparenté à ϕ KZ n'a été identifié dans le Pyophage. Ces phages sont inappropriés pour la phagothérapie car ils ont la capacité de s'intégrer dans le génome bactérien, à l'instar des phages tempérés, par un mécanisme qui semble dépendre de la concentration en phages (Krylov, Shaburova *et al.* 2012). De plus ces phages sont capables d'effectuer une transduction généralisée comme en témoigne la présence de gènes d'origine bactérienne dans leur génome (Mesyanzhinov, Robben *et al.* 2002 ; Hertveldt, Lavigne *et al.* 2005 ; Krylov, Shaburova *et al.* 2012). Malgré ces caractéristiques les phages ϕ KZ sont retrouvés dans de nombreuses préparations de phages thérapeutiques russes (Krylov, Shaburova *et al.* 2012).

Finalement, aucun phage appartenant à la famille des *Siphoviridae* n'a été détecté dans le Pyophage. Presque tous les Siphovirus infectant *P. aeruginosa* sont tempérés bien que récemment des phages à caractère lytique appartenant à cette famille aient été décrits (Karumidze, Thomas *et al.* 2012 ; Kim, Rahman *et al.* 2012). Ces phages auraient perdu au cours de leur évolution les gènes nécessaire à la lysogénisation de la bactérie. Même s'ils sont capables de faire un cycle lytique dans certaines circonstances, les phages tempérés ne sont pas recommandés pour la phagothérapie car ce sont d'importants vecteurs de transport de gènes entre les bactéries.

3.2.2. Phages nouvellement isolés

3.2.2.1. Limite des phages lytiques

La classification actuelle des phages par le Comité international de taxonomie des virus (ICTV) tient compte des caractéristiques génomiques plutôt que de la morphologie en raison de la disponibilité croissante des génomes de phages. Le génome des phages appartenant à une même espèce selon les méthodes anciennes de classification (morphologie, spectre d'hôte) affiche de fait des similarités significatives au niveau nucléotidique. Au sein d'un genre, les différentes espèces partagent la même organisation génomique et utilisent la même stratégie de réplication (Ceysens et Lavigne 2010) mais la similarité génétique interespèces peut être faible. Chez *P. aeruginosa* tous les phages isolés à travers le monde et décrits comme lytiques sont repartis au sein de 7 genres différents et appartiennent à la famille des *Myoviridae* et *Podoviridae*. Tous ces genres regroupent différentes espèces et leur nombre ne cesse d'augmenter (Ceysens et Lavigne 2010). Dans le but d'élargir la connaissance de cette diversité, nous avons recherché des phages dirigés contre *P. aeruginosa* dans les eaux usées à Orsay (France) et à Abidjan (Côte d'Ivoire). Cette dernière localité située en Afrique subsaharienne n'a jamais été explorée pour la présence de phages. Trente-deux phages ont été sélectionnés sur la base de leurs profils de digestion avec divers enzymes. En France deux phages 2-10_{Or} et 1-14_{Or} apparentés à l'espèce LUZ24 ont été isolés en utilisant les souches génétiquement éloignées C2-10 et C1-14 comme bactéries propagatrices. À l'instar des phages LUZ24 caractérisés dans le Pyophage, ces phages produisent simultanément des plages claires et troubles sur la souche C2-10. Ce comportement semble être typique du genre LUZ24 et pourrait servir à identifier rapidement les phages de ce groupe. Les phages p2-10_{Or} et p1-14_{Or} sont presque identiques au niveau génomique à l'exception d'un fragment de 2kpb délété dans le génome de p2-10_{Or} et de quelques mutations ponctuelles, ce qui suppose que ces phages proviennent du même réservoir. Le phage Ab22 isolé à Abidjan est également apparenté au genre LUZ24 montrant que ce genre, précédemment identifié en Europe et en Chine, est répandu à travers le monde (Tan, Zhang *et al.* 2007 ; Ceysens, Hertveldt *et al.* 2008 ; Alemayehu, Casey *et al.* 2012).

Les phages isolés à Abidjan sont distribués au sein de 6 genres. Les phages lytiques appartenant aux genres LUZ24, ϕ KMV, N4, PB-1, JG004 (PAK-P1) et KPP10 (PAK-P3) sont représentés

avec une prédominance des deux derniers. Douze phages y compris Ab02 dont le génome est entièrement séquencé et cinq phages représentés par Ab03 sont respectivement proches de JG004 et KPP10, tous deux morphologiquement identiques au phage *Salmonella* Felix O1 (Debarbieux, Leduc *et al.* 2010 ; Garbe, Bunk *et al.* 2011 ; Morello, Saussereau *et al.* 2011 ; Uchiyama, Rashel *et al.* 2012). Bien que morphologiquement similaires, les phages Ab03 (86kpb) et Ab02 (93kpb) sont très distants au niveau nucléotidique. Comme observé précédemment, certains produits de gènes sont similaires et l'arrangement des gènes est généralement conservé, ce qui suggère que les deux phages pourraient appartenir à deux espèces d'un même genre. Malgré des localisations géographiques très différentes, tous les génomes de phages lytiques sont relativement conservés à l'intérieur d'un même genre, avec parfois des ORFs qui ne présentent aucune homologie avec les bases de données disponibles (ORFans). Par exemple le gène de 312pb codant l'ORF07 du phage Ab02 est retrouvé dans le génome Ab01, tous deux provenant de Côte d'Ivoire. Ce gène est absent des génomes de JG004, PAK-P1 et PaP1 isolés dans d'autres parties du monde. Ces régions génomiques différentes peuvent être dues à des transferts horizontaux. Les protéines constituant la queue, principalement les fibres caudales qui interagissent directement avec les récepteurs bactériens affichent également de profondes variations entre phages proches, indicatif d'une adaptation locale nécessaire pour l'infection des hôtes spécifiques dans un environnement spécifique (Ceysens et Lavigne 2010). Par exemple le produit du gène de la queue ORF71 de Ab01 présente de fortes similarités au niveau protéique avec ceux des phages PaP1 (99%) et PAK-P1 (87%) respectivement isolés en Chine et en France mais de faibles similarités avec le phage JG004 (50%) isolé en Allemagne. La forte ressemblance entre les protéines caudales des phages Ab01 et PaP1 suppose que ces deux phages ont évolué dans un environnement similaire (homogène) malgré leur localisation géographique très différente. En revanche, le spectre d'hôte du phage JG004 pourrait être très différent de celui des phages appartenant au même genre bien qu'ils utilisent le même récepteur LPS. Une observation similaire est faite avec la protéine caudale du phage Ab05 qui présente jusqu'à 99% de similarité avec celle de PT5 et Tbilisi32 isolés en Géorgie mais est très différente chez d'autres phages Φ KMV très répandus à travers l'Europe de l'Ouest. Cette situation n'est toutefois pas la même pour les phages du genre PB-1, auquel appartient Ab27, phages à large spectre d'hôte principalement identifiés en Europe, et où la

protéine caudale est très conservée (99-96%). Ab27 infecte un grand nombre de bactéries résistantes au Pyophage, bien que le phage 1-14pyo appartenant au même genre, soit présent dans le Pyophage.

Tous les phages lytiques sont représentés sauf les phages géants regroupés au sein du genre ϕ KZ dont le génome fait 200-300kpb et qui ont été décrits principalement en Russie (Mesyanzhinov, Robben *et al.* 2002 ; Hertveldt, Lavigne *et al.* 2005 ; Krylov, Shaburova *et al.* 2012). Ceux-ci sont également absents dans une collection de 68 phages de *P. aeruginosa* isolés au Nouveau Mexique (Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012) suggérant qu'ils sont soit spécifiques d'un environnement soit très rares. Il pourrait également s'agir d'un problème technique lié à leur isolement car ces phages produisent des plages très petites et sont souvent négligés (Serwer, Hayes *et al.* 2007). Ceci pourrait également expliquer la très faible proportion des phages géants dans les bases de données telles que GenBank.

Toutefois malgré les localisations géographiques très différentes et un écosystème probablement spécifique, tous les phages lytiques isolés en Côte d'Ivoire appartiennent à des genres de phages connus. La structure panmictique de *P. aeruginosa* pourrait expliquer la nature des phages d'une part isolés en Côte d'Ivoire et d'autre part l'utilisation de souches issues de patients atteints de mucoviscidose en France. Des souches d'origine ivoirienne ou africaine permettraient peut être d'élargir la diversité des phages lytiques. Néanmoins, la nature des phages soutient l'hypothèse précédemment émise selon laquelle la diversité virale locale semble élevée, mais est globalement limitée par la migration des virus entre différents niches écologiques (Breitbart et Rohwer 2005).

3.2.2.2. Complexité des phages tempérés : structure mosaïque des génomes

Si la diversité des phages lytiques est très limitée celle des phages tempérés est différente. Plus de 60% des phages caudés (97% des bactériophages) décrits au microscope appartiennent à la famille des Siphovirus qui généralement sont des phages tempérés (Ceyssens et Lavigne 2010). Parmi les phages isolés à partir des eaux usées de l'environnement naturel et hospitalier d'Abidjan, sept sont tempérés, appartenant à 4 genres différents. Dans leur génome sont retrouvés des gènes responsables de la lysogénisation, parmi lesquels le répresseur *c*, l'intégrase, la transposase, l'excisionase et la recombinase. Le spectre d'hôte très restreint de ces phages et la formation de

petites plages de lyse plus ou moins claires laisse entrevoir le caractère tempéré des phages. Ceux-ci sont très spécifiques d'une à 2 souches sur une large collection de souches cliniques de *P. aeruginosa*, dont la majorité héberge au moins un prophage. L'incapacité des phages à se multiplier sur un grand nombre de souches peut en partie être liée à la présence de phages de même nature, protégeant les bactéries contre la surinfection (Hendrix 2002 ; Brussow, Canchaya et Hardt 2004).

Parmi les phages tempérés figure le phage Ab30 apparenté au genre D3112 qui regroupe des phages transposables infectant *P. aeruginosa* (Braid, Silhavy *et al.* 2004 ; Wang, Chu et Guttman 2004 ; Heo, Chung *et al.* 2007). Ce siphovirus affiche un profil de digestion enzymatique unique et en plus de la souche PA14, est capable de se reproduire sur PAO1 contrairement au phage D3112 (Wang, Chu et Guttman 2004). Cette différence de spectre d'hôte pourrait être due à des variations liées à la protéine de la queue et non à une exclusion de surinfection puisque la souche PAO1 possède uniquement dans son génome des pyocines, phages défectueux qui ressemblent à une queue phagique, et des phages filamenteux (Casjens 2003). De nombreux autres membres du genre D3112 ont été décrits et sont isolés à partir de souches cliniques et de prélèvements environnementaux. Certains d'entre eux comme le phage DMS3 sont capables d'effectuer une transduction généralisée entre souches (Budzik, Rosche *et al.* 2004) et d'altérer la mobilité et la formation de biofilms par les bactéries lysogènes, par l'intermédiaire du système CRISPRs-Cas (Zegans, Wagner *et al.* 2009). D'autres comportements particuliers sont liés à l'exclusion de surinfection. Alors qu'une lysogène pour MP22 peut être infectée par le phage D3112, le phage MP22 est incapable de se développer sur une lysogène pour D3112, indiquant le rôle d'autres gènes de D3112 dans l'exclusion de surinfection (Budzik, Rosche *et al.* 2004). Très récemment le gène "morron" gp15 du phage lambdaoid HK97 a été identifié comme protégeant la cellule hôte indépendamment de l'immunité répresseur (Cumby, Edwards *et al.* 2012). Un cas assez particulier du genre D3112 est le phage lytique PA1Ø dépourvu du gène répresseur *c* et capable de lyser en plus de *P. aeruginosa*, un grand nombre d'espèces bactériennes très éloignées (Kim, Rahman *et al.* 2012). À l'instar des phages D3112, le génome du phage Ab30 a une structure en mosaïque qui reflète une évolution via des échanges horizontaux de gènes.

Un autre phage unique est représenté par Ab26 dont le génome affiche des similarités avec PA73 et le phage lytique Kakheti25 (Karumidze, Thomas *et al.* 2012). En revanche, alors que le phage Ab26 est très spécifique, Kakheti25 est capable d'infecter plus de 140 parmi 200 souches cliniques de *P. aeruginosa* (Karumidze, Thomas *et al.* 2012). Le phage Kakheti25 est dépourvu de gènes responsables de lysogénéisation comparé au phage PA73 et Ab26, reflétant le rôle majeur de ces gènes dans la virulence du phage. Morphologiquement identiques aux phages D3112, les phages du genre PA73 partagent en commun la protéine de la morphogénèse de la tête avec les phages appartenant au genre YuA qui ont une tête allongée (Ceysens, Mesyanzhinov *et al.* 2008). Le phage Ab21 qui présente un profil de digestion enzymatique et un spectre d'hôte similaires à ceux des phages Ab18, Ab19 et Ab20 est morphologiquement identique au phage YuA avec une tête allongée. Bien que la taille de leur génome soit similaire (58kbp), le phage Ab21 est très distant au niveau nucléotidique de YuA et des phages associés M6 et MP1412 (Kwan, Liu *et al.* 2006 ; Bae, Chung *et al.* 2012). En revanche, ils partagent quelques produits de gènes, indiquant une même origine évolutive. Par conséquent, les quatre phages pourraient constituer une seconde espèce au sein du genre YuA. Comme observé précédemment, les ADNs des quatre phages sont résistants à de nombreuses endonucléases de restriction, notamment *EcoRI* et *HindIII* (Ceysens, Mesyanzhinov *et al.* 2008 ; Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012). Cette résistance au cours de l'infection phagique est attribuée à la présence dans le génome de la protéine anti-restriction ArdB d'origine plasmidique qui inhibe la restriction de type I (Ceysens, Mesyanzhinov *et al.* 2008). Parmi les phages d'Abidjan, y compris les phages lytiques, seuls les phages représentés par Ab21 sont capables de lyser la souche C50, une souche transmissible chez les patients et répandue à travers l'Europe. Ce résultat suggère que la souche C50 utilise comme mécanisme de défense à l'infection phagique un système de restriction/modification.

Dans le groupe des phages tempérés seul le phage Ab31 appartient à la famille des podovirus avec des fibres caudales similaires à celles du phage lambdaïde AF de *P. putida* (Cornelissen, Ceysens *et al.* 2012), morphotype jamais décrit chez les phages infectant *P. aeruginosa*. Le génome de Ab 31 (45 kpb) ne présente aucune similarité au niveau nucléotidique avec des phages connus, mais des similarités sont relevées au niveau protéique avec le phage PAJU2 (Uchiyama, Rashel *et al.* 2009) et le phage AF ainsi qu'avec des phages de plusieurs autres espèces bactériennes et des

produits de gènes d'origine bactérienne, démontrant une structure en mosaïque du génome. Les produits de gènes de répllication sont similaires à ceux du phage PAJU2 tandis que les protéines de structure du virion sont proches de celles du phage AF, ce qui suppose que le phage Ab31 soit un recombinant viable de ces deux phages façonné par transfert de blocs de gènes (Hendrix 2002 ; Casjens et Thuman-Commike 2011). Le phage PAJU2 dont le génome fait 35kpb est le seul phage apparenté au genre D3 (56kpb), un phage qui partage la même organisation génomique que le phage lambda (Kropinski 2000). Cette similarité avec le phage lambdaïde AF peut faciliter des échanges de grands fragments d'ADN par réassortiment via des recombinaisons homologues (Hendrix 2002 ; Casjens et Thuman-Commike 2011 ; Hatfull et Hendrix 2011).

Le phage AF de *P. putida* est associé grâce à ses fibres caudales à la production d'une activité exopolysaccharide (EPS) capable de dégrader le biofilm bactérien (Cornelissen, Ceysens *et al.* 2012). Sur la collection de souches de *P. aeruginosa* testées, seules les souches génétiquement proches PA14 et Tr60 sont lysées par le phage Ab31 sans former un halo, même après une longue durée d'incubation à 37°C et 30°C.

3.2.2.3. Distribution des phages : biogéographie des phages apparentés à JG004 ?

Les bactériophages sont des parasites obligatoires dont la reproduction nécessite la machinerie de l'hôte. Par conséquent, ils sont retrouvés partout dans la nature avec leur hôte, exerçant d'énormes forces écologiques et évolutives directement sur leur hôte (Thurber 2009). En utilisant les souches de *P. aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose, une large collection de phages distribués au sein de dix genres différents a été isolée sur cinq sites différents à Abidjan. Ces sites de prélèvement sont sans connexion et drainent les eaux usées humaines de la commune de Cocody et les eaux usées de l'environnement hospitalier de Cocody et Treichville. En octobre 2010 et novembre 2011, soit à un an d'intervalle, respectivement 21 et 9 phages ont été isolés. L'abondance, la diversité et la distribution des phages sont des paramètres importants qui définissent un écosystème (Thurber 2009). Les phages appartenant à la famille des myovirus sont les plus représentés avec 2/3 des phages isolés. La diversité et la distribution varient selon les sites bien que les mêmes bactéries aient été utilisées pour l'enrichissement. Les sites montrant le plus de diversité sont Indénié et Carrefour vie avec respectivement 6 et 5 genres de phages différents,

certaines phages étant restreints à un site unique. Pour les milieux hospitaliers, quatre genres différents ont été isolés au CHU de Cocody et seulement deux au CHU de Treichville, avec en commun la présence de phages apparentés aux phages PAK-P3 et KPP10 (Morello, Sausseureau *et al.* 2011 ; Uchiyama, Rashel *et al.* 2012). La déviation des eaux usées de certains services du CHU de Treichville vers d'autres canaux d'évacuation pourraient expliquer la faible diversité des phages. Seul le genre JG004 est retrouvé à Corniche bien que ce site soit relativement proche du site le plus hétérogène de l'Indénié démontrant que ceux-ci sont des écosystèmes différents. Certains phages, comme ceux apparentés à JG004 et KPP10, ont été retrouvés au cours des deux analyses, sur quatre des cinq sites analysés. Le site de l'indénié a été analysé par deux fois permettant d'obtenir respectivement quatre genres différents en 2010 et trois en 2011, avec le genre JG004 en commun. Ce myovirus est le plus représenté des phages et semble être endémique mais n'a pas été isolé au CHU Treichville, le site le plus éloigné des autres. Le second groupe de phages, proches de KPP10, comporte des myovirus également retrouvés sur tous les sites sauf la Corniche. Ces phages sont très spécifiques, ce qui pourrait expliquer leur faible fréquence comparée à celle des phages à large spectre d'hôte du genre JG004. Concernant la diversité et la distribution globale des phages, elle est différente de celle de la collection du Nouveau Mexique dont 40 sur 68 sont des siphovirus avec 20 phages du genre YuA. Seulement 1 phage du genre JG004 est présent dans cette large collection (Sepulveda-Robles, Kameyama et Guarneros 2012). L'absence de ce phage est d'autant plus frappante parmi 15 phages isolés dans 14 pays différents à travers quatre continents et évoluant au sein de 6 genres différents y compris les phages tempérés (Ceyssens, Noben *et al.* 2009). Il est possible que le genre JG004 ait réémergé après extinction puisqu'il a été décrit il y a plus d'un demi siècle dans la collection Lindberg (Ackermann, Cartier *et al.* 1988) et signalé récemment par Debarbieux et al (Debarbieux, Leduc *et al.* 2010). En Côte d'Ivoire, certains clones environnementaux de *P. aeruginosa* semblent être endémiques, expliquant la fréquence élevée du genre JG004 (Thurber 2009 ; Clokie, Millard *et al.* 2011).

Afin de connaître la distribution globale des phages de *P. aeruginosa*, de nouveaux sites devraient être analysés notamment dans d'autres communes d'Abidjan et d'autres villes de Côte d'Ivoire, voire dans certains pays limitrophes. La caractérisation génotypique des souches cliniques et

environnementales devrait permettre d'identifier les clones dominants de *P. aeruginosa* en Côte d'Ivoire.

3.2.2.4. Résistance aux phages : rôle du système CRISPRs-Cas

Quatre sur 50 souches de *P. aeruginosa* sont résistantes au Pyophage et à notre large collection de phages nouvellement isolés en Afrique et en France. Ces souches sont aussi résistantes à une collection de phages d'origines géographiques différentes et appartenant à d'autres genres. Parmi ces phages beaucoup utilisent les pilus de type IV ou le LPS comme récepteurs, des structures impliquées également dans la pathogénicité de la bactérie (Bucior, Pielage et Engel 2012). La perte des récepteurs par altération significative ou par surproduction d'exopolysaccharides tels que les alginates peut entraîner des résistances à l'infection phagique (Hyman et Abedon 2010 ; Labrie, Samson et Moineau 2010). L'existence d'un système de restriction particulier est également possible. Les phages comme Ab22, Ab23 et Ab24 initialement isolés sur les souches C8-14 et C8-20 sont incapables de se propager après réinfection supposant un mécanisme de résistance indépendant du récepteur. Ce mécanisme de défense pourrait également être utilisé par la souche C50 appartenant au clone C. Cette souche est résistante à tous les phages sauf aux phages du genre YUA qui possèdent la protéine ArdB inhibitrice de restriction (Ceysens, Mesyanzhinov *et al.* 2008).

Chez les souches testées, la présence d'un système CRISPR-Cas n'est pas associée à une résistance à un phage lytique particulier. Au contraire, les souches résistantes à de multiples phages lytiques ne possèdent pas de système CRISPR-Cas. Dans une étude publiée en 2011, l'analyse de la diversité des systèmes CRISPR-Cas chez *P. aeruginosa* a révélé que 132 spacers correspondaient à des séquences de bactériophages tempérés / prophages capables de s'insérer dans le chromosome de l'hôte; et non aux bactériophages lytiques de *P. aeruginosa* (Cady, White *et al.* 2011). Récemment, le rôle du CRISPR de type I-F (*Yersinia*) dans l'immunité de la souche *P. aeruginosa* PA14 contre certains phages tempérés, ainsi que des phages dépourvus des gènes de lysogénéisation a été démontré (Cady, Bondy-Denomy *et al.* 2012). Dans notre collection de souches, la majorité des spacers montrent des homologies avec des génomes de phages tempérés. Quelques uns montrent des similarités avec des séquences chromosomiques comme les pyocines et des gènes d'îlots de pathogénicité. Nous avons observé que la majorité des souches de *P.*

aeruginosa sont lysogènes et que l'activation spontanée des prophages est fréquente, comme indiqué précédemment. De manière très intéressante, il a été révélé dans le génome de certains phages tempérés la présence de gènes qui inhibent l'activité du système CRISPR-Cas (Bondy-Denomy, Pawluk *et al.* 2012). De plus une étude récente a montré l'existence d'un système CRISPR-Cas dans le génome de certains bactériophages de *V. cholerae* avec des spacers homologues à des ilots de pathogénicité bactériens (Seed, Lazinski *et al.* 2013). Pour comprendre le rôle du système CRISPR-Cas, il sera nécessaire d'explorer d'avantage sa fonction pendant la mise en place et le contrôle de la lysogénie

3.3. Phagothérapie : alternative efficace à l'antibiothérapie

3.3.1. Spectre d'hôte des phages : notion du genre et d'espèce de phage

L'ensemble des souches bactériennes sensibles à un phage donné définit le spectre d'hôte. Ce dernier est variable selon la nature du phage et est en partie influencé par l'environnement dans lequel le phage a évolué ; homogène ou hétérogène (présence d'une ou de plusieurs souches bactériennes). Les interactions co-évolutives entre phages et leurs hôtes correspondent à une adaptation des deux antagonistes. Certaines souches résistantes au Pyophage comme C7-12, C7-25, C9-6 sont lysées par les phages Ab27, Ab28 et Ab29 apparentés au genre PB-1 alors qu'un phage de ce genre est représenté dans le Pyophage, montrant les origines différentes de ces phages. Les trois phages bien que provenant des eaux usées d'une même localité présentent des variations de leur spectre d'hôte qui pourraient être liées à des modifications mineures dans leur génome ; insertion, délétion d'un fragment d'ADN ou mutation de nucléotides (Ceysens, Glonti *et al.* 2011). Ces variations sont également observées chez 12 et 5 phages respectivement apparentés à JG004 et à KPP10. Toutefois les phages Ab24 et Ab23 du groupe JG004 provenant d'un même site se distinguent des autres par leur incapacité à infecter les souches C7-6.

Les phages JG004 (93kpb) et KPP10 (88kpb) dont l'arrangement des gènes est globalement similaire ont un spectre très différent, l'un ayant un spectre d'hôte assez large et l'autre un spectre probablement très restreint. Seule la souche PAO1 est lysée par les phages du genre KPP10 parmi 25 souches, tandis que les phages JG004 infectent presque la moitié des souches testées. Une

observation similaire a été faite chez les phages du genre ϕ KMV. Alors que le phage LUZ19 infecte plus de 40 parmi 122 souches, seules deux souches sur les 122 sont lysées par le phage LKA1 (Ceysens, Noben *et al.* 2009). Les phages d'espèces différentes LUZ7 et LIT1 du genre N4 présentent aussi des spectres assez distincts (Ceysens, Noben *et al.* 2009 ; Ceysens et Lavigne 2010). Ces différences significatives pourraient être liées à la nature des récepteurs qui peut être le LPS ou les pilli de type IV, contrairement aux phages JG004 et KPP10 qui utilisent uniquement le LPS comme récepteur (Garbe, Bunk *et al.* 2011 ; Uchiyama, Rashel *et al.* 2012). Par conséquent, le spectre d'hôte des phages permet uniquement d'identifier les phages d'une même espèce car ceux-ci possèdent un grand nombre de gènes similaires.

3.3.2. Proposition d'un cocktail de phage thérapeutique pour un traitement efficace

Malgré des résultats encourageant, la thérapie par les phages est loin d'être une réalité en Europe notamment dans la zone de l'Union Européenne notamment en Belgique où les phages sont appliqués uniquement à titre compassionnel dans les cas désespérés (Verbeken, De Vos *et al.* 2007). Les phages sont plébiscités en raison de leur spécificité d'infection pour une espèce bactérienne donnée contrairement aux antibiotiques à large spectre qui détériorent la flore commensale de l'homme, pouvant favoriser de nouvelles infections bactériennes. Cette spécificité est parfois considérée comme un inconvénient car elle s'applique également au niveau de la souche. Par conséquent il est indispensable pour une phagothérapie efficace de pouvoir disposer d'une large collection de phages dirigés contre l'ensemble des souches d'une espèce donnée. Dans ce travail de thèse, des phages représentatifs de la diversité des phages lytiques, pouvant être appliqués en phagothérapie, ont été isolés en Côte d'Ivoire et en France. Ceux-ci affichent des spectres d'hôtes très variés, certains étant spécifiques tandis que d'autres ont un large spectre d'hôte. Les inconvénients associés à l'utilisation de phages à spectre d'hôte très restreint peuvent être résolus par l'élaboration d'un cocktail de plusieurs phages. Par exemple le cocktail de phage associant les six phages dérivés du Pyophage et deux phages nouvellement isolés 1-14_{Or} et Ab01 permet de cibler des souches précédemment résistantes au Pyophage. De même, dans une étude collaborative menée avec l'hôpital de Narbonne, nous avons montré que trois phages de la collection de la compagnie Pherecydes Pharma sont capables de lyser presque toutes les souches

issues d'un service de réanimation et résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques. La majorité des souches appartiennent aux complexes clonaux CC235 et CC111 largement répandus à travers le monde, plus particulièrement en Europe.

L'association de phages ciblant différentes souches et des récepteurs variés est souhaitée pour limiter l'apparition de bactéries résistantes. Les phages proches affichent un spectre quasi-similaire et il n'est pas nécessaire de les associer dans un même cocktail. Par contre, comme le spectre d'hôte des phages diffère d'un genre à un autre et d'une espèce à une autre au sein d'un même genre (Ceyssens, Noben *et al.* 2009), l'association de différents genres permet de cibler une large proportion de souches. Toutefois, les caractéristiques phénotypiques et génomiques des phages doivent être prises en compte lors de la conception d'un cocktail pour limiter d'éventuels échanges de gènes, entre phages et avec le génome bactérien, même si cet événement est rare chez les phages lytiques dont le cycle de reproduction aboutit à la mort bactérienne. Bien que les gènes puissent être échangés entre phages très éloignés infectant le même hôte, les génomes des phages d'une même espèce sont plus susceptibles d'effectuer des échanges car ils possèdent de nombreuses séquences de forte similarité.

Toutefois la présence de quelques gènes identiques chez des phages génétiquement éloignés peut entraîner les transferts d'un bloc de gènes mais ce type d'échanges est généralement observé chez les phages tempérés (Hendrix 2002 ; Casjens et Thuman-Commike 2011 ; Hatfull et Hendrix 2011). Enfin, certains phages peuvent échanger des fragments avec un prophage présent dans le génome bactérien.

Malgré une longue histoire évolutive estimée à deux milliards d'années, le génome des phages lytiques est dépourvu de gènes d'origine bactérienne à l'exception de celui du phage ϕ KZ capable d'effectuer une transduction généralisée et qui possède des gènes similaires à ceux de plusieurs bactéries pathogènes appartenant à différentes espèces (Mesyanzhinov, Robben *et al.* 2002 ; Hertveldt, Lavigne *et al.* 2005 ; Krylov, Shaburova *et al.* 2012).

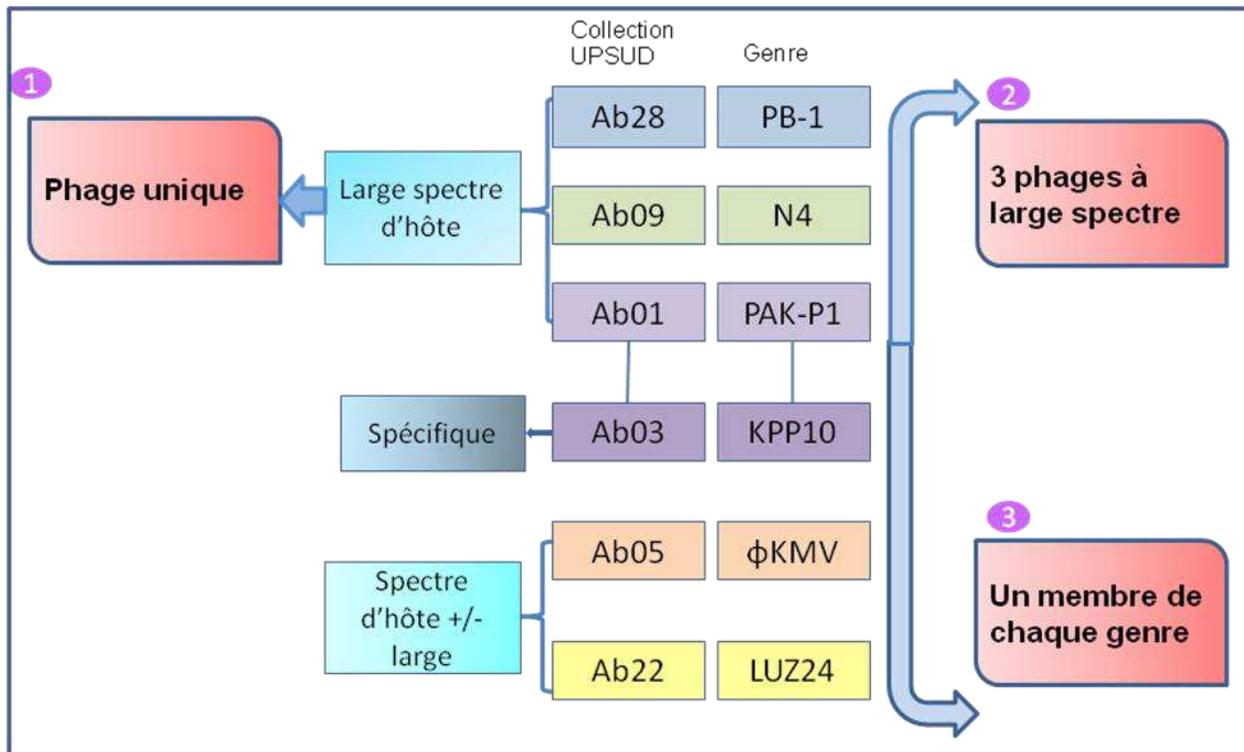


Figure 13 : Composition d'un cocktail de phage pour cibler une large proportion de souches de *P. aeruginosa* et minimiser également les risques de transfert de gènes.

Les phages apparentés aux genres JG004 (PAK-P1), PB-1 et N4 ont un large spectre, et leur combinaison pourrait cibler la majorité des souches testées. Néanmoins, certaines souches bactériennes comme C3-20, C5-12 et PA14 ne sont lysées que par les phages Ab22 et Ab05 appartenant respectivement aux genres LUZ24 et ΦKMV. Ces résultats suggèrent qu'au moins un membre de chaque genre devrait être représenté, y compris le phage spécifique Ab03, dans un cocktail de phages thérapeutiques (Figure 13). De même les phages de différentes espèces appartenant à un même genre affichent parfois des spectres de virulence très différents (Ceysens, Noben *et al.* 2009), et peuvent donc être associés dans un même cocktail sans risque d'échange de fragments d'ADN puisqu'ils ont peu ou pas d'hôte en commun. Avec notre collection, un cocktail de six phages peut permettre de lyser une large proportion de souches de *P. aeruginosa*. Une fraction significative de souches demeure résistante à tous les phages, ce qui nécessitera d'en isoler de nouveaux. Il est possible qu'un phage appartenant aux genres déjà connus soit efficace contre

les souches résistantes ou qu'un genre complètement nouveau qui pourrait utiliser d'autres récepteurs que le LPS ou les pilus de type IV soit isolé.

CONCLUSION

4. CONCLUSION

Les recherches conduites au cours de cette thèse constituaient un travail d'éclaireur sur l'utilisation des bactériophages en thérapie, sujet qui s'inscrivait dans une nouvelle thématique initiée au laboratoire. Ce projet a été mené avec succès dans les limites du champ d'action circonscrit car nous disposons désormais d'une large collection de bactériophages tempérés et lytiques dirigés contre *P. aeruginosa* et appartenant à dix genres différents. Les phages les plus originaux décrits ici sont des phages tempérés et proviennent de Côte d'Ivoire. Les résultats obtenus améliorent notre compréhension de la diversité des phages et nous aimerions voir se développer d'autres champs de recherche, tels que l'étude du lien évolutif des nouveaux phages avec ceux déjà connus.

Notre investigation a ainsi ouvert, dans le monde viral, une brèche sur la diversité des phages de *P. aeruginosa* dans certaines parties du monde, dans le cas présent en Côte d'Ivoire, pays qui n'a jamais été exploré pour la présence de bactériophages. La diversité des phages lytiques s'avère à la fois limitée en nombre et conservée verticalement au niveau génomique, tandis que celle des phages tempérés est très complexe dans une évolution principalement effectuée par échanges horizontaux de gènes. Néanmoins, une analyse génomique plus approfondie est souhaitée pour cerner l'évolution de certains phages lytiques retrouvés en grand nombre dans une même localité, notamment les phages ayant des ressemblances avec le phage JG004 (PAK-P1).

En outre, notre collection de phages renferme au moins un représentant des principaux phages lytiques appropriés pour la phagothérapie. Ces phages affichent des spectres d'hôtes assez variés, et la diversité de la bactérie *P. aeruginosa* nécessitera l'utilisation de cocktails pour cibler un grand nombre de souches de l'espèce. Ce travail a d'ailleurs été l'occasion d'étudier la composition du Pyophage, composition qui n'est pas publiée.

Une condition préalable à la réalisation formelle de la sécurité ou des essais d'efficacité est la caractérisation approfondie des génomes et les propriétés biologiques des phages candidats pour la phagothérapie. Par conséquent, la connaissance des paramètres biologique des phages lytiques

nouvellement isolés, telles que la stabilité en fonction du pH, la constante d'absorption, le temps de latence, le nombre de virions libéré par cellules est cruciale pour une application efficace des phages sous forme de cocktail.

Des essais préliminaires d'efficacité *in vitro* sur des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques et sur des souches de phénotype mucoïde sont très encourageants pour une utilisation efficace en phagothérapie. Néanmoins une partie non négligeable de souches bactériennes demeurent résistantes à tous les genres de phages existants, offrant des perspectives d'étude des mécanismes de résistance bactérienne à l'infection phagique. Les phages étant en perpétuelle co-évolution avec leur hôte, de nouveaux phages d'origine autre que les eaux usées viendront compléter les collections existantes.

MATERIEL
ET
METHODES

5. MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.1.1. Milieux de culture

Milieu LB (Luria Bertani)

Milieu gélosé LBA (Luria Bertani) + Agar

Milieu Minimum 63 (M63)

Tampon SM (Saline Magnesium)

Milieu gélosé Top Agar

Milieu 2YT (Yeast Tryptone)

Milieu gélose cétrimide

5.1.2. Souches bactériennes et phages

Les souches de *P. aeruginosa* ont été isolées chez des patients atteints de mucoviscidose, par différents collaborateurs dans les services de microbiologie de divers hôpitaux. Une autre collection est constituée de souches multi-résistantes issues du service de réanimation de l'hôpital de Narbonne à Montpellier. Les souches de références PAO1, PA14 proviennent de la collection de l'Institut Pasteur de Paris et le clone C est un cadeau de Ute Romling. La souche Tr60 a le même génotype MLVA et les mêmes CRISPRs que la souche PA14. La souche C50 appartient au clone C très répandu en Europe. Quant aux phages, ils proviennent de plusieurs localités géographiques très différentes. Des phages isolés en France et en Côte d'Ivoire ont fait l'objet de cette étude. Un échantillon de Pyophage, un cocktail de phages thérapeutiques, nous a été donné par Mzia Kutateladze de l'Institut Eliava en Géorgie. La nature des phages présents dans ce mélange est inconnue. Le Pr Krylov du laboratoire de génétique des bactériophages à Moscou (Russie) a testé une large collection de phages sur une sélection de souches de notre laboratoire. Nous avons également testé contre ces souches la virulence de phages isolés aux USA par le laboratoire de Betty Kutter de l'Université Evergreen à Olympia (Washington).

5.1.3. Génotypage par la méthode MLVA

Purification d'ADN bactérien de P. aeruginosa

L'extraction d'ADN a été effectuée par phénol/chloroforme. Une trentaine de colonies bactériennes est dispersée dans 500 µl de TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH8) par vortexage pour bien re-suspendre les bactéries. Pour la lyse, 500µl d'une solution contenant 1% de SDS, 20mM NaCl, 20mM Tris pH8, 20mM EDTA sont ajoutés à la suspension bactérienne puis mélangés par retournement du tube. Ensuite le lysat est traité avec 5µl d'ARNase (20mg/ml) puis laissé à température ambiante pendant 10 min. Les protéines sont dégradées par l'action de la protéinase K à une concentration finale de 100µg/ml et la préparation incubée au bain marie à 55°C pendant 2h. Le lysat peut ensuite être conservé à 4°C. Après la lyse bactérienne 600 µl du lysat sont transférés dans un nouveau tube, auquel sont ajoutés 100 µl de solution de NaCl 5M pour atteindre une concentration finale de 0,7M. Après mélange par agitation, sont ajoutés 40 µl d'une solution de CTAB/NaCl (10% CTAB dans 0,7M NaCl) puis le tube est incubé pendant 10 min à 65°C. L'étape d'extraction est réalisée par l'ajout de 750 µl de chloroforme dans chaque tube. Après avoir homogénéisé par agitation, une centrifugation est réalisée à 13000 rpm pendant 15 min à 15°C. La phase aqueuse est récupérée dans un nouveau tube et traitée avec 750 µl de phénol et centrifugée dans les mêmes conditions que la précédente. La phase aqueuse est à nouveau traitée avec le chloroforme pour éliminer les traces de phénol. L'ADN est précipité par ajout de 1400 µl d'éthanol absolu en retournant à plusieurs reprises le tube. Après centrifugation, deux lavages sont effectués avec de l'éthanol 70% et le culot est séché puis repris dans 200µl de TE pH8.

Alternativement la purification de l'ADN a été réalisée à l'aide du kit Qiagen (Dneasy R Tissue) selon les recommandations du fabricant. Environ 10 à 20 colonies sont prélevées et dissociées dans 200 µl de Tris 10mM, EDTA 1mM pH8, puis la suspension est centrifugée rapidement pour culotter les bactéries. Le surnageant est vidé et les bactéries sont lysées dans 180 µL de tampon ATL. Ensuite, les protéines sont dégradées avec l'action de la protéinase K puis l'ADN est purifié avec les solutions du kit. La concentration d'ADN est déterminée avec l'appareil Nanodrop.

Amplification des répétitions en tandem

Le MLVA est une technique de génotypage qui repose sur l'amplification par PCR de plusieurs locus VNTRs. L'amplification de 13 locus VNTR identifiés dans les génomes séquencés des souches PAO1 et PA14 de *P. aeruginosa* est réalisée par PCR. Les amorces oligonucléotidiques utilisés pour l'amplification dérivent des régions flanquantes 5'-3' de chaque locus VNTR (Vu-Thien, Corbinau *et al.* 2007). Les réactions PCR sont effectuées dans un volume final de 15 µl contenant : 5,5 µl H₂O, 1,5 µl tampon 10x, 3 µl betaine 5M, 1,5 µl d'amorce à 0,3µM, 1,5 µl dNTP 200µM, 0,2 µl de Taq polymérase à 5U/µl et 2 µl d'ADN (à 5 ng/µl). La betaine est utilisée pour l'amplification par PCR des génomes riches en G-C et facilite l'hybridation du brin d'ADN. Le programme de l'amplification est effectué comme suit : une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 mn suivie de 35 cycles (dénaturation 94°C 30s, hybridation 60 °C 30s, élongation 72°C, 45s) et une élongation finale à 72 °C pendant 10 min.

Pour la séparation des produits de PCR sur gel d'agarose, une goutte de 2µl de bleu de dépôt est ajoutée aux produits de PCR. Ensuite 2 µl de chaque échantillon sont déposés sur un gel d'agarose 2% pour tous les marqueurs à l'exception des marqueurs ms207 et ms209 qui ont été analysés sur un gel à 3% (les différences de taille des bandes sont nettement plus petites que celles des autres VNTRs). La migration est réalisée sur un gel de 20 cm à 8V/cm dans 0,5X TBE (Tris Borate EDTA). Les dépôts sont organisés de la manière suivante : un dépôt de marqueur de taille (DNA ladder 100pb ou 20pb), la souche de référence PA14 ou PAO1 et cinq échantillons à analyser.

Après la migration, le gel est coloré dans 0,5X TBE contenant 5 µl de Bromure d'ethidium (BET) pendant 30 minutes. Les bandes sont ensuite révélées sous rayons ultra violet et le gel est photographié. Le nombre de répétitions est calculé à partir des tailles des produits PCR obtenus. Le génotype d'une souche s'exprime en une série de 13 chiffres correspondant au nombre de répétitions à chacun des VNTRs analysés.

5.1.4. Etude du système CRISPR

Elle est effectuée par une amplification par PCR des locus CRISPR1, CRISPR2 type I-F (*Yersinia*), CRISPR2192 type I-E (*Escherichia*) et du gène *cas1* de *P. aeruginosa*. Les amorces oligonucléotiques utilisées dérivent des régions flanquantes 5'-3' de chaque locus. Les réactions ont lieu dans un volume final de 15µl. L'amplification est effectuée comme suit : une dénaturation initiale 94 °C 5 min, 35cycles (dénaturation 94 °C 30s, hybridation 60 °C 30s, hybridation 72 °C 60s min) et élongation finale à 72 °C pendant 10 min. La séparation et la révélation des bandes sont effectuées dans les mêmes conditions que pour la PCR du MLVA mais sur gel d'agarose de 1,5% et la migration est effectuée pendant une heure.

Pour le séquençage, la région du locus CRISPR1 du type I-F est amplifiée puis le produit PCR est purifié. L'amplification a lieu dans les mêmes conditions que précédemment dans un volume total de 45 µl soit 3 fois le volume final des amplifications habituelles d'analyse. Pour vérifier la qualité de l'amplification, 2 µl sont prélevés pour migration sur gel d'agarose après ajout d'une goutte de bleu de dépôt. Aux produits PCR, sont ajoutés 27 µl de PEG8000 20% NaCl 2,5 (0,6 volumes) puis le mélange est incubé à 37 °C pendant 10 minutes. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 10 minutes, le surnageant est éliminé par pipetage et le culot d'ADN est rincé avec 500 µl d'éthanol 80%. Une centrifugation est à nouveau réalisée, l'éthanol est éliminé et le culot séché est repris dans 20 µl d'H₂O. La quantité de l'ADN est évaluée par mesure au Nanodrop. Les produits PCR purifiés ont été envoyés à la société Eurofins-MWG biotech pour séquençage.

5.1.5. Isolement des phages

Isolement à partir du Pyophage

Une colonie pure est prélevée à partir d'une culture de *P. aeruginosa* sur boîte LBA et mise en culture dans 20 ml de milieu liquide LB. Après une nuit d'incubation à 37 °C une centrifugation est effectuée à 4000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et les bactéries sont concentrées 10 fois dans le milieu M63. Des concentrations différentes de Pyophage sont préparées dans le M63 supplémenté de 10 mM MgSO₄ ou tampon SM (saline magnésium).



Figure 14 : Sensibilité au pyophage de trois souches de *P. aeruginosa*

Par la suite, une infection des bactéries est effectuée avec chaque dilution de Pyophage. Quinze minutes après incubation de 50 μ l de bactéries concentrées avec 10 μ l de chaque dilution de Pyophage, 4ml de gélose molle (Top agar) sont ajoutées et immédiatement versés sur une boîte de gélose LBA. Après une nuit d'incubation à 37°C, les plages de lyses sont observées chez les souches dites sensibles et sont absentes chez les résistantes. Les plages de lyse correspondant chacune à un phage sont récupérées en fonction de leur taille (grosse, moyenne et petite), à l'aide d'une pipette en verre (Figure 14). Les phages sont conservés dans le milieu M63 supplémenté de chloroforme. Des dilutions décimales des phages isolés sont à nouveau effectuées dans 1 ml de M63 et 10 mM MgSO₄. Cependant on a pu remarquer qu'un même phage pouvait produire des plages de différentes tailles sur une même souche bactérienne. Une purification des phages isolés est effectuée par une série de réinfection de la bactérie hôte. Dix microlitres du phage non dilué sont striés sur une boîte LBA et après adsorption, 4 ml de Top agar contenant 50 μ l de bactéries concentrées est versé sur la boîte qui est ensuite incubée à 37°C toute une nuit. Cette étape de purification est répétée trois fois.

Isolement à partir des eaux usées

Pour isoler les phages à partir de prélèvements environnementaux, les souches bactériennes résistantes à divers phages d'origines différentes ont été utilisées comme hôte d'enrichissement (Figure 15). Dans un tube contenant 10 ml de milieu LB, 10 ml d'eau filtrée à l'aide d'un filtre

millipore de 0.45 μm sont incubés en présence de 1 ml de pré-culture bactérienne. Après 24h de culture à 37°C avec agitation, le surnageant est récupéré par centrifugation et 200 μl de chloroforme sont ajoutés pour éliminer les débris bactériens. La présence de phages est testée en striant 10 μl de surnageant sur milieu gélosé LBA sur lequel sont versés après absorption, 4 ml de gélose molle (0.7% d'agar) contenant 50 μl de culture bactérienne concentrée 10 fois dans la solution SM ou M63. Les plages claires sont récupérées puis purifiées par une série d'infection de la bactérie hôte. Souvent le tapis bactérien est réalisé à partir de top agar et 200 μl de culture bactérienne en phase stationnaire de croissance.



Figure 15 : Trois sites de prélèvement de la commune de Cocody; Carrefour vie (A), Corniche (B), Idenié (C)

5.1.6. Préparation d'un stock de phages

Dans le but d'obtenir un titre élevé de phages, 100-200 μl de culture bactérienne concentrée 10 fois dans un tampon de phage (SM ou M63) supplémenté de 10 mM de MgSO_4 sont infectés à partir d'une plage de lyse (phage) de 24h. Après 15min à température ambiante, 4ml de top agar (0,7% agar à 45°C) sont ajoutés au mélange phage-bactérie et versés immédiatement sur boîte de milieu gélosé frais. Après 6-8h d'incubation à 37°C, la gélose molle est récupérée par grattage dans 5ml de SM ou M63 supplémenté de chloroforme et laissée toute une nuit à 4°C. Le surnageant est récupéré par centrifugation à 4000 rpm pendant 10min et filtré avec un filtre 0,45 μm puis le stock est conservé à 4°C pour une durée d'un an au maximum. Pour une longue durée de conservation à -80°C, 500 μl de phages concentrés sont mélangés à 500 μl de glycérol

5.1.7. Purification de phage pour l'observation microscopique

Pour préparer les phages concentrés, des titres élevés de phages sont obtenus par amplification sur milieu solide (préparation de stock de phages). Quatre boîtes sont préparées pour chaque phage et la surcouche de gélose molle est reprise à la fin de solution SM ou de milieu M63. Dans le but d'éliminer totalement la gélose molle dans le surnageant deux centrifugations sont réalisées successivement et le surnageant transféré dans un nouveau tube. Les phages sont précipités par ajout de polyéthylène glycol PEG8000 à une concentration finale de 10% (2 g dans 20 ml). Après avoir homogénéisé par agitation, le mélange est laissé sur glace pendant 1h puis centrifugé à 10000 rpm pendant 20 min à 4°C. Le culot est repris dans 1 ml de SM ou M63 et l'extraction du PEG est effectuée avec 1 ml chloroforme. Cette étape est répétée 2 à 3 fois et la phase aqueuse contenant les bactériophages est diluée dans le tampon de phage pour atteindre un volume final de 10 ml. Après filtration à l'aide d'un filtre millipore de 0,45 µm, les phages sont transférés dans un tube Beckman (14×89mm) et concentrés par ultracentrifugation à 39000 rpm pendant 3h à 4°C (rotor Beckman SW41). La purification des phages est effectuée par lavage avec de l'acétate de l'ammonium (CH₃CO₂NH₄). Le culot de phage est repris dans 10 ml 0,1M CH₃CO₂NH₄ pH 7 et une ultracentrifugation est à nouveau effectuée. Cette étape est répétée une à deux fois. À la fin, le surnageant est soigneusement éliminé avec une pipette et le culot est repris avec 100-200 µl de 0,1M CH₃CO₂NH₄.

Pour l'observation en microscopie électronique, 5µl de phages concentrés sont déposés sur une grille en cuivre de 400 carreaux et laissé adsorber pendant 5min. Les phages sont fixés avec une goutte de 2% de potassium phosphotungstate (pH7) pendant 30s et l'excès est éliminé à l'aide d'un papier filtre. L'observation a été effectuée à la plateforme Imagif CNRS de Gif-sur-Ivette et au Centre Commun de Microscopie Electronique (CCME) de l'Université Paris-sud 11.

5.1.8. Isolement de prophages intégrés dans le génome bactérien

La présence de prophages intégrés dans le génome bactérien a été recherchée de façon spontanée ou par induction aux rayons ultraviolets (UV). Une culture bactérienne est réalisée à 37°C toute une nuit avec agitation à 180 rpm. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 10 min à 4°C, le surnageant est récupéré dans un nouveau tube et testé sur plusieurs souches bactériennes. Pour

l'induction par les UV, 5 ml de LB frais sont inoculés avec 100 µl d'une pré-culture bactérienne réalisée à 37°C toute une nuit. Après 3 heures de culture à 37°C avec agitation à 180 rpm (phase exponentielle de croissance, $OD_{600} = 0,2-0,4$), une centrifugation est effectuée pendant 10 min à température ambiante et le surnageant est éliminé. Le culot est resuspendu dans 5 ml de 0,1M $MgSO_4$ et transféré ensuite dans une boîte de Pétri stérile.

Les bactéries sont irradiées en mettant la boîte à environ 16 cm de la lampe UV pendant 20-30s et la préparation est transférée dans un tube contenant 5 ml de LB frais. La culture est incubée à 37°C au bain-marie avec agitation jusqu'à la chute de la densité optique OD_{600} . L'évolution de la culture peut être également suivie par mesure de l' OD_{600} chaque 45 min pendant 6H. Après centrifugation à 4000 rpm pendant 15 min à 4°C, le surnageant est récupéré dans un tube stérile et le pH neutralisé avec 0,1N NaOH, puis conservé à 4°C pour l'analyse. Les surnageants sont ensuite testés sur tapis bactérien en déposant 10µL sur tapis bactérien (tableau 3) et par la méthode des plages de lyse (figure 16).

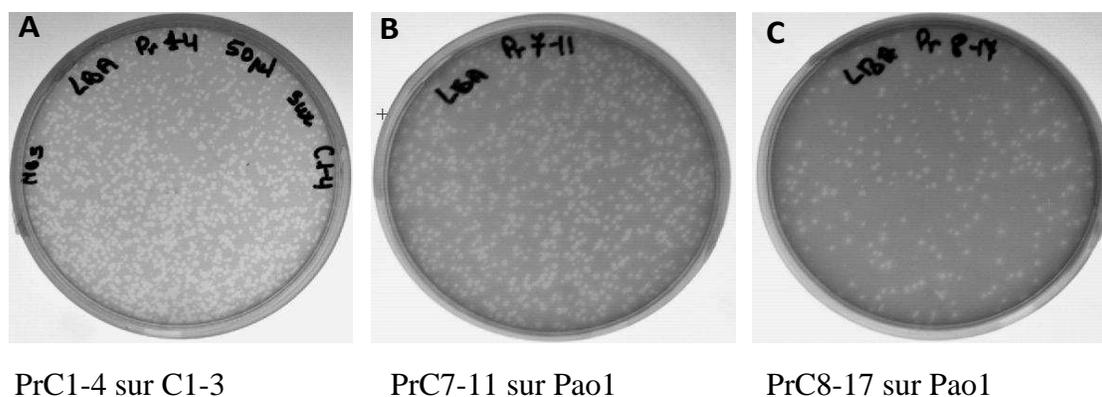


Figure 16 : Les plages de lyse obtenues à partir de surnageants de culture de *P. aeruginosa* (prophages actifs : phages tempérés). Le prophage de la souche C1-4 (PrC1-14) capable de lyser la souche C1-3 est activé de façon spontanée (A). Les prophages PrC7-11 et PrC8-17 (B et C), tous deux infectant la souche PAO1 sont obtenus par irradiation des souches C7-11 et C8-17 respectivement.

Tableau 3 : Identification des prophages intégrés dans le génome des souches de *P. aeruginosa* issues de patients de mucoviscidose

Surnageants												
Souches	SPao1	SPa14	S1-3	S1-4	S3-20	S7-6	S7-11*	S7-12	S7-25	S8-12	S8-17*	S8-20
Pao1	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Pa14	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C1-3	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
C1-4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C3-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-6	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7-11	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
C7-12	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
C7-25	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
C8-12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C8-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Légende : Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* appartenant au même génotype MLVA sont représentées par la même couleur. Les surnageants obtenus par irradiations des bactéries sont marqués par un astérisque. – et + indiquent respectivement absence et présence de zone de lyse sur le tapis bactérien. Les surnageants testés sur leurs propres bactéries sont négatifs (bleu en diagonale).

5.1.9. Spectre d'hôte des phages

Le spectre de virulence des phages et la morphologie des plages de lyse sont respectivement déterminés par la méthode des spots et celle de la double couche (plage de lyse). Pour le spectre d'hôte des phages, une culture bactérienne est réalisée dans le milieu LB (Lysogeny or Luria Broth) à 37°C avec agitation à 180 rpm pendant une nuit. Les bactéries sont récupérées par centrifugation à 4000 rpm à 4°C pendant 10 minutes et sont concentrées 10 fois dans une solution SM (0.58% NaCl, 0.2% MgSO₄ 7 H₂O, 1.0 M Tris-HCl pH 7.5, et 0.01% gélatine) ou dans le milieu minimum 63 (M63), supplémenté de 10mM de MgSO₄. Environnementalement 50µl de cellules bactériennes concentrées sont ajoutées à 4ml de gélose molle (0.7% agar) et versées immédiatement sur milieu solide LB. Après solidification de la gélose molle, 10µl de phages purifiés (titre $\geq 10^9$ PFU) sont déposés sur le tapis bactérien. Une fois la suspension phagique absorbée, une incubation est réalisée à 37°C toute la nuit. Pour confirmer la sensibilité des bactéries aux phages, une série de dilution est réalisée et 10µl de chaque dilution sont mélangés avec 50µl de bactéries. Après 15 minutes à température ambiante, 4 ml de top agar à 45°C sont ajoutés et versés sur milieu gélosé LB puis incubé à 37°C. Alternativement, 10µl de phages non dilués sont déposés sur milieu LBA en faisant des stries de moins en moins serrées et 4ml de gélose molle contenant 50 µl de bactéries sont versés à la surface puis incubés toute une nuit à 37°C.

5.1.10. Préparation rapide de l'ADN phagique

Elle se fait d'abord par une amplification des phages sur la souche bactérienne sensible au phage en question. À cet effet, 10⁹ bactéries sont infectées avec 10⁶ phages. Un tapis du mélange est réalisé sur boîte fraîche de LBA avec 4 ml de gélose molle. Après 6 heures d'incubation à 37 °C, les boîtes sont recouvertes de 5ml de tampon froid constitué de 10 mM Tris et 10mM MgSO₄ puis laissées au froid toute la nuit. Après avoir prélevé 4 ml de la solution contenant les phages, une dégradation des ARN est effectuée par ajout de 5µl de ARNase (50µg/ml). Alternativement, 4 ml de stock de phage sont utilisés pour la purification d'ADN. Après 15 minutes, les phages sont lysés avec successivement 0,4 ml de 0,5 M EDTA ; 0,2 ml de Tris pH 7,5 2 M et 0,2 ml de

SDS 10% puis 10µl de diéthylpyrocarbonate (DEPC). La préparation est ensuite mélangée par agitation des tubes. Ceux-ci sont ouverts puis mis à 65 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement dans la glace, 1ml d'acétate de potassium 5M est ajouté. Les tubes sont laissés dans la glace pendant 1 heure. Une centrifugation est effectuée à 12000G pendant 10 minutes. Au surnageant obtenu, 11 ml d'éthanol absolu sont ajoutés pour la précipitation à -20 °C pendant 1 heure. Une seconde centrifugation est réalisée pendant 20 minutes. Le surnageant est éliminé, le culot est lavé à l'éthanol 70%, puis séché et repris dans 0,4ml de 10 mM Tris pH 7,5 1 mM EDTA. Les concentrations sont déterminées au NanoDrop^R pour la digestion enzymatique.

Environ 4 µg d'ADN phagique sont soumis à la digestion par différentes enzymes de restriction. L'incubation a lieu à 37 °C toute la nuit. Pour la séparation des produits digérés, une goutte de 2µl de bleu de dépôt est ajoutée aux produits de digestion. Ensuite les échantillons sont déposés sur gel d'agarose 1%. La migration est réalisée pendant 6 heures. Le gel est ensuite coloré dans du TBE 0,5X contenant du Bromure d'éthidium (BET). Les bandes sont visualisées à la lumière UV.

5.1.1. Séquençage du génome complet des phages

Le séquençage du génome entier des bactériophages a été réalisé par la technologie Illumina à la plateforme de IMAGiF du CNRS (Illumina analyser Iix) et à la société Baseclear en Hollande. Des fragments d'environ 300pb sont générés mécaniquement, et des séquences ou « reads » de 75pb sont produits avec l'approche « *Paired End* ». Le logiciel BioNumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgique) a été utilisé pour l'assemblage et l'annotation des génomes. L'assemblage *de novo* est effectué à l'aide de deux algorithmes Velvet et Ray implémentés dans la rubrique “ *Power Assembly*” afin de produire des contigs. Un seul contig est obtenu, et la distribution des reads est analysée le long de ce contig. Le génome des phages proches est identifié par alignement via GenBank/NCBI. Pour l'annotation, les extrémités du génome sont recherchées par rapport aux phages les plus proches au niveau nucléotidique. Dans certains cas, un pic élevé de reads détecté sur le contig marque le début de la séquence du génome du phage.

5.1.2. Clonage des fragments d'ADN et purification des clones

Environ 0,5 µg d'ADN de chaque phage est utilisé pour une digestion partielle par l'enzyme *Sau3A*. Après 1 heure à 37 °C, la digestion est stoppée par une incubation à 65 °C pendant 15 minutes. Pour l'insertion des fragments dans le vecteur, un mélange de 5µl du produit de digestion et 0,5 µl du plasmide pBluescript digéré par l'enzyme *BamHI* ainsi que 1 µl de ligase (T4 DNA) est effectué. Le plasmide pBluescript possède un gène de résistance à l'ampicilline et a une taille de 2961 pb. L'enzyme *BamHI* coupe au niveau du gène *Lac Z* du vecteur. Après une nuit à température ambiante, 5 µl du vecteur recombiné sont utilisés pour la transformation de 100 µl de cellules bactériennes *E. coli* DH5α1 compétentes. Pour se faire, le mélange bactérie-vecteur est déposé sur glace pendant 20 minutes puis 5 minutes à 37 °C. Par la suite, 1 ml de LB est ajouté et les bactéries sont incubées à 37 °C pendant 1 heure. Sur une boîte LBA supplémentée d'ampicilline, 100µl de cellules transformées sont étalées en présence de 50µl de Xgal et 25 µl d'IPTG. La vérification de la transformation est faite à l'aide du crible blanc/ bleu après incubation des bactéries à 37 °C toute une nuit. Les bactéries qui possèdent le plasmide sans insert sont bleues (le Xgal hydrolysé par la β-galactosidase donne un précipité bleu) par contre celles avec un insert inactivant le gène *LacZ* forment des colonies blanches.

Les colonies blanches sont récupérées puis mises en culture dans 2 ml de milieu 2YT. Après incubation à 37 °C toute la nuit avec agitation, la culture est centrifugée brièvement puis une grande partie de surnageant est éliminée en gardant environ 50 à 100 µl. Un mélange au vortex est effectué puis les bactéries sont lysés par ajout de 300 µl de TE (10mM Tris, 1 mM EDTA), de SDS 1 % et de 0,1 M NaOH. Après mélange par agitation, sont ajoutés 150 µl de 1 M NaAc (acétate de sodium) puis une centrifugation est effectuée à 12000 rpm pendant 3 minutes. Le surnageant est précipité par 0,9 ml d'éthanol absolu froid (-20 °C) puis centrifugé à 12000 rpm pendant 2 minutes. L'éthanol est éliminé puis le culot est lavé à l'éthanol 70% froid (- 20 °C). Le culot est séché puis repris dans 20 µl de TE additionné d'ARNase. Pour vérifier la présence d'un insert dans le vecteur une digestion est effectuée par *XbaI* et *EcoRI* qui encadrent le site de clonage.

BIBLIOGRAPHIE

6. BIBLIOGRAPHIE

- Aaron, S. D., W. Ferris, *et al.* (2002). "Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis." J Clin Microbiol **40**(11): 4172-4179.
- Abedon, S. T., S. J. Kuhl, *et al.* (2011). "Phage treatment of human infections." Bacteriophage **1**(2): 66-85.
- Abedon, S. T. et C. Thomas-Abedon (2010). "Phage therapy pharmacology." Curr Pharm Biotechnol **11**(1): 28-47.
- Abuladze, T., M. Li, *et al.* (2008). "Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7." Appl Environ Microbiol **74**(20): 6230-6238.
- Ackermann, H. W. (2007). "5500 Phages examined in the electron microscope." Arch Virol **152**(2): 227-243.
- Ackermann, H. W. (2012). "Bacteriophage electron microscopy." Adv Virus Res **82**: 1-32.
- Ackermann, H. W., C. Cartier, *et al.* (1988). "Morphology of *Pseudomonas aeruginosa* typing phages of the Lindberg set." Ann Inst Pasteur Virol **139**(4): 389-404.
- Adriaenssens, E. M., J. Van Vaerenbergh, *et al.* (2012). "T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by '*Dickeya solani*'." PLoS One **7**(3): e33227.
- Ajayi, T., L. R. Allmond, *et al.* (2003). "Single-nucleotide-polymorphism mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion toxins for development of a diagnostic multiplex PCR system." J Clin Microbiol **41**(8): 3526-3531.
- Alemayehu, D., P. G. Casey, *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.
- Bae, H. W., I. Y. Chung, *et al.* (2012). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* siphophage MP1412." J Virol **86**(17): 9537.
- Baker, M. L., W. Jiang, *et al.* (2005). "Common ancestry of herpesviruses and tailed DNA bacteriophages." J Virol **79**(23): 14967-14970.
- Barrangou, R., C. Fremaux, *et al.* (2007). "CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes." Science **315**(5819): 1709-1712.
- Battle, S. E., J. Rello et A. R. Hauser (2009). "Genomic islands of *Pseudomonas aeruginosa*." FEMS Microbiol Lett **290**(1): 70-78.
- Bedi, M. S., V. Verma et S. Chhibber (2009). "Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055." World Journal of Microbiology & Biotechnology **25**(7): 1145-1151.
- Benson, S. D., J. K. Bamford, *et al.* (2004). "Does common architecture reveal a viral lineage spanning all three domains of life?" Mol Cell **16**(5): 673-685.

- Bolotin, A., B. Quinquis, *et al.* (2005). "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin." Microbiology **151**(Pt 8): 2551-2561.
- Bondy-Denomy, J., A. Pawluk, *et al.* (2012). "Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system." Nature.
- Bouvier, T. et P. A. del Giorgio (2007). "Key role of selective viral-induced mortality in determining marine bacterial community composition." Environ Microbiol **9**(2): 287-297.
- Braid, M. D., J. L. Silhavy, *et al.* (2004). "Complete genomic sequence of bacteriophage B3, a Mu-like phage of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **186**(19): 6560-6574.
- Breitbart, M., B. Felts, *et al.* (2004). "Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community." Proc Biol Sci **271**(1539): 565-574.
- Breitbart, M., I. Hewson, *et al.* (2003). "Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces." J Bacteriol **185**(20): 6220-6223.
- Breitbart, M., J. H. Miyake et F. Rohwer (2004). "Global distribution of nearly identical phage-encoded DNA sequences." FEMS Microbiol Lett **236**(2): 249-256.
- Breitbart, M. et F. Rohwer (2005). "Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?" Trends Microbiol **13**(6): 278-284.
- Breitbart, M. et F. Rohwer (2005). "Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing." Biotechniques **39**(5): 729-736.
- Breitbart, M., P. Salamon, *et al.* (2002). "Genomic analysis of uncultured marine viral communities." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14250-14255.
- Brouns, S. J., M. M. Jore, *et al.* (2008). "Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes." Science **321**(5891): 960-964.
- Brovko, L. Y., H. Anany et M. W. Griffiths (2012). "Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment." Adv Food Nutr Res **67**: 241-288.
- Brussow, H. (2005). "Phage therapy: the *Escherichia coli* experience." Microbiology **151**(Pt 7): 2133-2140.
- Brussow, H. (2012). "What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine?" Virology.
- Brussow, H., C. Canchaya et W. D. Hardt (2004). "Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion." Microbiol Mol Biol Rev **68**(3): 560-602, table of contents.
- Brussow, H. et R. W. Hendrix (2002). "Phage genomics: small is beautiful." Cell **108**(1): 13-16.
- Bucior, I., J. F. Pielage et J. N. Engel (2012). "*Pseudomonas aeruginosa* pili and flagella mediate distinct binding and signaling events at the apical and basolateral surface of airway epithelium." PLoS Pathog **8**(4): e1002616.
- Buckling, A. et P. B. Rainey (2002). "Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage." Proc Biol Sci **269**(1494): 931-936.
- Budzik, J. M., W. A. Rosche, *et al.* (2004). "Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14." J Bacteriol **186**(10): 3270-3273.

- Busby, B., D. M. Kristensen et E. V. Koonin (2012). "Contribution of phage-derived genomic islands to the virulence of facultative bacterial pathogens." Environ Microbiol.
- Byrne, M. et A. M. Kropinski (2005). "The genome of the *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing bacteriophage F116." Gene **346**: 187-194.
- Cady, K. C., J. Bondy-Denomy, et al. (2012). "The CRISPR/Cas Adaptive Immune System of *Pseudomonas aeruginosa* Mediates Resistance to Naturally Occurring and Engineered Phages." J Bacteriol **194**(21): 5728-5738.
- Cady, K. C., A. S. White, et al. (2011). "Prevalence, conservation and functional analysis of *Yersinia* and *Escherichia* CRISPR regions in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates." Microbiology **157**(Pt 2): 430-437.
- Carlton, R. M., W. H. Noordman, et al. (2005). "Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application." Regul Toxicol Pharmacol **43**(3): 301-312.
- Casjens, S. (2003). "Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?" Mol Microbiol **49**(2): 277-300.
- Casjens, S. R. et P. A. Thuman-Commike (2011). "Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly." Virology **411**(2): 393-415.
- Ceyssens, P. J., A. Brabban, et al. (2010). "Molecular and physiological analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the "N4-like viruses"." Virology **405**(1): 26-30.
- Ceyssens, P. J., T. Glonti, et al. (2011). "Phenotypic and genotypic variations within a single bacteriophage species." Virology **8**: 134.
- Ceyssens, P. J., K. Hertveldt, et al. (2008). "The intron-containing genome of the lytic *Pseudomonas* phage LUZ24 resembles the temperate phage PaP3." Virology **377**(2): 233-238.
- Ceyssens, P. J. et R. Lavigne (2010). "Bacteriophages of *Pseudomonas*." Future Microbiol **5**(7): 1041-1055.
- Ceyssens, P. J., R. Lavigne, et al. (2006). "Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phages LKD16 and LKA1: establishment of the phiKMV subgroup within the T7 supergroup." J Bacteriol **188**(19): 6924-6931.
- Ceyssens, P. J., V. Mesyanzhinov, et al. (2008). "The genome and structural proteome of YuA, a new *Pseudomonas aeruginosa* phage resembling M6." J Bacteriol **190**(4): 1429-1435.
- Ceyssens, P. J., K. Miroshnikov, et al. (2009). "Comparative analysis of the widespread and conserved PB1-like viruses infecting *Pseudomonas aeruginosa*." Environ Microbiol **11**(11): 2874-2883.
- Ceyssens, P. J., J. P. Noben, et al. (2009). "Survey of *Pseudomonas aeruginosa* and its phages: de novo peptide sequencing as a novel tool to assess the diversity of worldwide collected viruses." Environ Microbiol.
- Chenard, C. et C. A. Suttle (2008). "Phylogenetic diversity of sequences of cyanophage photosynthetic gene *psbA* in marine and freshwaters." Appl Environ Microbiol **74**(17): 5317-5324.

- Chibani-Chennoufi, S., A. Bruttin, *et al.* (2004). "Phage-host interaction: an ecological perspective." J Bacteriol **186**(12): 3677-3686.
- Chiou, C. S., H. Y. Li, *et al.* (2010). "Identification of prophage gene z2389 in Escherichia coli EDL933 encoding a DNA cytosine methyltransferase for full protection of NotI sites." Int J Med Microbiol **300**(5): 296-303.
- Claverie, J. M., H. Ogata, *et al.* (2006). "Mimivirus and the emerging concept of "giant" virus." Virus Res **117**(1): 133-144.
- Clokie, M. R., A. D. Millard, *et al.* (2011). "Phages in nature." Bacteriophage **1**(1): 31-45.
- Comeau, A. M., F. Tetart, *et al.* (2007). "Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth." PLoS One **2**(8): e799.
- Cornelissen, A., P. J. Ceysens, *et al.* (2012). "Identification of EPS-degrading activity within the tail spikes of the novel *Pseudomonas putida* phage AF." Virology.
- Cornelissen, A., P. J. Ceysens, *et al.* (2011). "The T7-related *Pseudomonas putida* phage phi15 displays virion-associated biofilm degradation properties." PLoS One **6**(4): e18597.
- Cramer, N., J. Klockgether, *et al.* (2011). "Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs." Environ Microbiol **13**(7): 1690-1704.
- Culley, A. I., A. S. Lang et C. A. Suttle (2006). "Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities." Science **312**(5781): 1795-1798.
- Cumby, N., A. M. Edwards, *et al.* (2012). "The bacteriophage HK97 gp15 moron element encodes a novel superinfection exclusion protein." J Bacteriol **194**(18): 5012-5019.
- Curran, B., D. Jonas, *et al.* (2004). "Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*." J Clin Microbiol **42**(12): 5644-5649.
- d' Hérelle, F. (1917). "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques." Compte Rendu de l'Académie des Sciences **165**(11): 374-375.
- Danovaro, R., C. Corinaldesi, *et al.* (2011). "Marine viruses and global climate change." FEMS Microbiol Rev **35**(6): 993-1034.
- Davidson, I. W., C. J. Lawson et I. W. Sutherland (1977). "An alginate lysate from *Azotobacter vinelandii* phage." J Gen Microbiol **98**(1): 223-229.
- Debarbieux, L., D. Leduc, *et al.* (2010). "Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections." J Infect Dis **201**(7): 1096-1104.
- Deveau, H., J. E. Garneau et S. Moineau (2010). "CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions." Annu Rev Microbiol **64**: 475-493.
- Drenkard, E. et F. M. Ausubel (2002). "*Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation." Nature **416**(6882): 740-743.
- Dublanchet, A. et E. Fruciano (2008). "[A short history of phage therapy]." Med Mal Infect **38**(8): 415-420.
- Edalucci, E., R. Spinelli, *et al.* (2008). "Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*." Clin Microbiol Infect **14**(1): 88-90.
- Edgar, R., N. Friedman, *et al.* (2012). "Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes." Appl Environ Microbiol **78**(3): 744-751.

- Empel, J., K. Filczak, *et al.* (2007). "Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex." J Clin Microbiol **45**(9): 2829-2834.
- Faruque, S. M. et J. J. Mekalanos (2012). "Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*." Virulence **3**(7).
- Faruque, S. M., I. B. Naser, *et al.* (2005). "Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(5): 1702-1707.
- Flores, C. O., S. Valverde et J. S. Weitz (2012). "Multi-scale structure and geographic drivers of cross-infection within marine bacteria and phages." ISME J.
- Fortuna, W., R. Miedzybrodzki, *et al.* (2008). "Bacteriophage therapy in children: facts and prospects." Med Sci Monit **14**(8): RA126-132.
- Fothergill, J. L., M. J. Walshaw et C. Winstanley (2012). "Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections." Eur Respir J **40**(1): 227-238.
- Fu, W., T. Forster, *et al.* (2010). "Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 397-404.
- Fuller, N. J., W. H. Wilson, *et al.* (1998). "Occurrence of a sequence in marine cyanophages similar to that of T4 g20 and its application to PCR-based detection and quantification techniques." Appl Environ Microbiol **64**(6): 2051-2060.
- Garbe, J., B. Bunk, *et al.* (2011). "Sequencing and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004." BMC Microbiol **11**: 102.
- Garbe, J., A. Wesche, *et al.* (2010). "Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions." BMC Microbiol **10**: 301.
- Garcia-Castillo, M., R. Del Campo, *et al.* (2011). "Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals." J Clin Microbiol **49**(8): 2905-2910.
- Girlich, D., T. Naas et P. Nordmann (2004). "Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **48**(6): 2043-2048.
- Giske, C. G., B. Libisch, *et al.* (2006). "Establishing clonal relationships between VIM-1-like metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from four European countries by multilocus sequence typing." J Clin Microbiol **44**(12): 4309-4315.
- Glonti, T., N. Chanishvili et P. W. Taylor (2010). "Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginate acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." J Appl Microbiol **108**(2): 695-702.
- Greer, G. G. (2005). "Bacteriophage control of foodborne bacteriat." J Food Prot **68**(5): 1102-1111.
- Grissa, I., G. Vergnaud et C. Pourcel (2007). "CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats." Nucleic Acids Res **35**(Web Server issue): W52-57.

- Guenther, S., O. Herzig, *et al.* (2012). "Biocontrol of *Salmonella Typhimurium* in RTE foods with the virulent bacteriophage FO1-E2." Int J Food Microbiol **154**(1-2): 66-72.
- Guenther, S., D. Huwyler, *et al.* (2009). "Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods." Appl Environ Microbiol **75**(1): 93-100.
- Hadas, H., M. Einav, *et al.* (1997). "Bacteriophage T4 development depends on the physiology of its host *Escherichia coli*." Microbiology **143 (Pt 1)**: 179-185.
- Hafiane, A. et M. Ravaoarino (2008). "[Various typing methods of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients]." Med Mal Infect **38**(5): 238-247.
- Hall, A. R., D. De Vos, *et al.* (2012). "Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in wax moth larvae." Appl Environ Microbiol **78**(16): 5646-5652.
- Hanlon, G. W., S. P. Denyer, *et al.* (2001). "Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms." Appl Environ Microbiol **67**(6): 2746-2753.
- Hatfull, G. F. (2008). "Bacteriophage genomics." Curr Opin Microbiol **11**(5): 447-453.
- Hatfull, G. F. et R. W. Hendrix (2011). "Bacteriophages and their genomes." Curr Opin Virol **1**(4): 298-303.
- Hauser, R., S. Blasche, *et al.* (2012). "Bacteriophage protein-protein interactions." Adv Virus Res **83**: 219-298.
- Hayashi, T., T. Baba, *et al.* (1990). "Phage-conversion of cytotoxin production in *Pseudomonas aeruginosa*." Mol Microbiol **4**(10): 1703-1709.
- Hayashi, T., K. Makino, *et al.* (2001). "Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12." DNA Res **8**(1): 11-22.
- Hendrix, R. W. (2002). "Bacteriophages: evolution of the majority." Theor Popul Biol **61**(4): 471-480.
- Heo, Y. J., I. Y. Chung, *et al.* (2007). "Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22." Microbiology **153**(Pt 9): 2885-2895.
- Heo, Y. J., Y. R. Lee, *et al.* (2009). "Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and *Drosophila melanogaster*." Antimicrob Agents Chemother **53**(6): 2469-2474.
- Hertveldt, K., R. Lavigne, *et al.* (2005). "Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages." J Mol Biol **354**(3): 536-545.
- Hogardt, M. et J. Heesemann (2012). "Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a Chronic Pathogen of the Cystic Fibrosis Lung." Curr Top Microbiol Immunol.
- Holck, A. et J. Berg (2009). "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures." Appl Environ Microbiol **75**(21): 6944-6946.
- Hyman, P. et S. T. Abedon (2010). "Bacteriophage host range and bacterial resistance." Adv Appl Microbiol **70**: 217-248.

- Ishino, Y., H. Shinagawa, *et al.* (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product." J Bacteriol **169**(12): 5429-5433.
- Jelsbak, L., H. K. Johansen, *et al.* (2007). "Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients." Infect Immun **75**(5): 2214-2224.
- Jeltsch, A. (2002). "Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases." Chembiochem **3**(4): 274-293.
- Jeltsch, A. et A. Pingoud (1996). "Horizontal gene transfer contributes to the wide distribution and evolution of type II restriction-modification systems." J Mol Evol **42**(2): 91-96.
- Juhala, R. J., M. E. Ford, *et al.* (2000). "Genomic sequences of bacteriophages HK97 and HK022: pervasive genetic mosaicism in the lambdoid bacteriophages." J Mol Biol **299**(1): 27-51.
- Karumidze, N., J. A. Thomas, *et al.* (2012). "Characterization of lytic *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages via biological properties and genomic sequences." Appl Microbiol Biotechnol **94**(6): 1609-1617.
- Kidd, T. J., S. R. Ritchie, *et al.* (2012). "*Pseudomonas aeruginosa* Exhibits Frequent Recombination, but Only a Limited Association between Genotype and Ecological Setting." PLoS One **7**(9): e44199.
- Kim, M. S., K. E. Cha et H. Myung (2012). "Complete genome of *Pseudomonas aeruginosa* phage PA26." J Virol **86**(18): 10244.
- Kim, S., M. Rahman, *et al.* (2012). "*Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PA10 requires type IV pili for infection and shows broad bactericidal and biofilm removal activities." Appl Environ Microbiol **78**(17): 6380-6385.
- Kirby, A. E. (2012). "Synergistic action of gentamicin and bacteriophage in a continuous culture population of *Staphylococcus aureus*." PLoS One **7**(11): e51017.
- Koskella, B., D. M. Lin, *et al.* (2012). "The costs of evolving resistance in heterogeneous parasite environments." Proc Biol Sci **279**(1735): 1896-1903.
- Koskella, B., J. N. Thompson, *et al.* (2011). "Local biotic environment shapes the spatial scale of bacteriophage adaptation to bacteria." Am Nat **177**(4): 440-451.
- Kropinski, A. M. (2000). "Sequence of the genome of the temperate, serotype-converting, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage D3." J Bacteriol **182**(21): 6066-6074.
- Krueger, A. P., T. Cohn et et al. (1948). "Observations on the effect of penicillin on the reaction between phage and staphylococci." J Gen Physiol **31**(6): 477-488.
- Krupovic, M. et D. H. Bamford (2008). "Virus evolution: how far does the double beta-barrel viral lineage extend?" Nat Rev Microbiol **6**(12): 941-948.
- Krupovic, M. et D. H. Bamford (2010). "Order to the viral universe." J Virol **84**(24): 12476-12479.
- Krupovic, M., P. Forterre et D. H. Bamford (2010). "Comparative analysis of the mosaic genomes of tailed archaeal viruses and proviruses suggests common themes for virion architecture and assembly with tailed viruses of bacteria." J Mol Biol **397**(1): 144-160.
- Krylov, S. V., E. A. Pletneva, *et al.* (2011). "[Genome instability of *Pseudomonas aeruginosa* phages of the EL species: examination of virulent mutants]." Genetika **47**(2): 183-189.

- Krylov, V., E. Pleteneva, *et al.* (2003). "Myoviridae bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: a long and complex evolutionary pathway." Res Microbiol **154**(4): 269-275.
- Krylov, V., O. Shaburova, *et al.* (2012). "A genetic approach to the development of new therapeutic phages to fight *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections." Viruses **5**(1): 15-53.
- Kulakov, L. A., V. N. Ksenzenko, *et al.* (2009). "Genomes of "phiKMV-like viruses" of *Pseudomonas aeruginosa* contain localized single-strand interruptions." Virology **391**(1): 1-4.
- Kutateladze, M. et R. Adamia (2008). "Phage therapy experience at the Eliava Institute." Med Mal Infect **38**(8): 426-430.
- Kutateladze, M. et R. Adamia (2010). "Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics." Trends Biotechnol **28**(12): 591-595.
- Kutter, E., D. De Vos, *et al.* (2010). "Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections." Curr Pharm Biotechnol **11**(1): 69-86.
- Kuzio, J. et A. M. Kropinski (1983). "O-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by bacteriophage D3." J Bacteriol **155**(1): 203-212.
- Kwan, T., J. Liu, *et al.* (2006). "Comparative genomic analysis of 18 *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages." J Bacteriol **188**(3): 1184-1187.
- Labonte, J. M., K. E. Reid et C. A. Suttle (2009). "Phylogenetic analysis indicates evolutionary diversity and environmental segregation of marine podovirus DNA polymerase gene sequences." Appl Environ Microbiol **75**(11): 3634-3640.
- Labrie, S. J., J. E. Samson et S. Moineau (2010). "Bacteriophage resistance mechanisms." Nat Rev Microbiol **8**(5): 317-327.
- Lavigne, R., M. V. Burkal'tseva, *et al.* (2003). "The genome of bacteriophage phiKMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa*." Virology **312**(1): 49-59.
- Lee, B., J. A. Haagensen, *et al.* (2005). "Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis." J Clin Microbiol **43**(10): 5247-5255.
- Lee, D. G., J. M. Urbach, *et al.* (2006). "Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial." Genome Biol **7**(10): R90.
- Legendre, M., D. Arslan, *et al.* (2012). "Genomics of Megavirus and the elusive fourth domain of Life." Commun Integr Biol **5**(1): 102-106.
- Levin, B. R. et J. J. Bull (2004). "Population and evolutionary dynamics of phage therapy." Nat Rev Microbiol **2**(2): 166-173.
- Li, Z., M. R. Kosorok, *et al.* (2005). "Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis." Jama **293**(5): 581-588.
- Lindberg, R. B. et R. L. Latta (1974). "Phage typing of *Pseudomonas aeruginosa*: clinical and epidemiologic considerations." J Infect Dis **130 Suppl**(0): S33-42.
- Linnerborg, M., A. Weintraub, *et al.* (2001). "Depolymerization of the capsular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by a lyase associated with the bacteriophage JA1." Carbohydr Res **333**(4): 263-269.

- Loc-Carrillo, C. et S. T. Abedon (2011). "Pros and cons of phage therapy." Bacteriophage **1**(2): 111-114.
- Lohr, J. E., F. Chen et R. T. Hill (2005). "Genomic analysis of bacteriophage PhiJL001: insights into its interaction with a sponge-associated alpha-proteobacterium." Appl Environ Microbiol **71**(3): 1598-1609.
- Maatallah, M., J. Cheriaa, *et al.* (2011). "Population structure of *Pseudomonas aeruginosa* from five Mediterranean countries: evidence for frequent recombination and epidemic occurrence of CC235." PLoS One **6**(10): e25617.
- Mahenthiralingam, E., P. Vandamme, *et al.* (2001). "Infection with *Burkholderia cepacia* complex genomovars in patients with cystic fibrosis: virulent transmissible strains of genomovar III can replace *Burkholderia multivorans*." Clin Infect Dis **33**(9): 1469-1475.
- Maiques, E., C. Ubeda, *et al.* (2006). "beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **188**(7): 2726-2729.
- Makarova, K. S., N. V. Grishin, *et al.* (2006). "A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action." Biol Direct **1**: 7.
- Makarova, K. S., D. H. Haft, *et al.* (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." Nat Rev Microbiol **9**(6): 467-477.
- Marraffini, L. A. et E. J. Sontheimer (2010). "CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea." Nat Rev Genet **11**(3): 181-190.
- Marston, M. F., F. J. Pierciey, Jr., *et al.* (2012). "Rapid diversification of coevolving marine *Synechococcus* and a virus." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(12): 4544-4549.
- Maura, D. et L. Debarbieux (2011). "Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine." Appl Microbiol Biotechnol **90**(3): 851-859.
- McVay, C. S., M. Velasquez et J. A. Fralick (2007). "Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model." Antimicrob Agents Chemother **51**(6): 1934-1938.
- Mead, P. S., L. Slutsker, *et al.* (1999). "Food-related illness and death in the united states reply to dr. hedberg." Emerg Infect Dis **5**(6): 841-842.
- Mena, A., E. E. Smith, *et al.* (2008). "Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation." J Bacteriol **190**(24): 7910-7917.
- Merabishvili, M., J. P. Pirnay, *et al.* (2009). "Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials." PLoS ONE **4**(3): e4944.
- Mesyanzhinov, V. V., J. Robben, *et al.* (2002). "The genome of bacteriophage phiKZ of *Pseudomonas aeruginosa*." J Mol Biol **317**(1): 1-19.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, *et al.* (2009). "Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system." Microbiology **155**(Pt 3): 733-740.
- Morales, G., L. Wiehlmann, *et al.* (2004). "Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping." J Bacteriol **186**(13): 4228-4237.

- Moreira, D. et P. Lopez-Garcia (2009). "Ten reasons to exclude viruses from the tree of life." Nat Rev Microbiol **7**(4): 306-311.
- Morello, E., E. Sausseureau, *et al.* (2011). "Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention." PLoS One **6**(2): e16963.
- Mott, L. S., J. Park, *et al.* (2012). "Progression of early structural lung disease in young children with cystic fibrosis assessed using CT." Thorax **67**(6): 509-516.
- Muller, C., P. Plesiat et K. Jeannot (2011). "A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*." Antimicrob Agents Chemother **55**(3): 1211-1221.
- Mulvey, M. R., D. A. Boyd, *et al.* (2006). "The genetics of *Salmonella* genomic island 1." Microbes Infect **8**(7): 1915-1922.
- Nelson, D., R. Schuch, *et al.* (2006). "PlyC: a multimeric bacteriophage lysin." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10765-10770.
- Nelson, D. C., M. Schmelcher, *et al.* (2012). "Endolysins as antimicrobials." Adv Virus Res **83**: 299-365.
- O'Toole, G. A. et R. Kolter (1998). "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development." Mol Microbiol **30**(2): 295-304.
- Onteniente, L., S. Brisse, *et al.* (2003). "Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing." J Clin Microbiol **41**(11): 4991-4997.
- Pal, C., M. D. Macia, *et al.* (2007). "Coevolution with viruses drives the evolution of bacterial mutation rates." Nature **450**(7172): 1079-1081.
- Paterson, S., T. Vogwill, *et al.* (2010). "Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution." Nature **464**(7286): 275-278.
- Pingoud, A., M. Fuxreiter, *et al.* (2005). "Type II restriction endonucleases: structure and mechanism." Cell Mol Life Sci **62**(6): 685-707.
- Pingoud, A. et A. Jeltsch (1997). "Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases." Eur J Biochem **246**(1): 1-22.
- Pirnay, J. P., F. Bilocq, *et al.* (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited." PLoS One **4**(11): e7740.
- Pourcel, C., G. Salvignol et G. Vergnaud (2005). "CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies." Microbiology **151**(Pt 3): 653-663.
- Rahme, L. G., F. M. Ausubel, *et al.* (2000). "Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8815-8821.
- Rao, V. B. et M. Feiss (2008). "The bacteriophage DNA packaging motor." Annu Rev Genet **42**: 647-681.
- Raoult, D., S. Audic, *et al.* (2004). "The 1.2-megabase genome sequence of Mimivirus." Science **306**(5700): 1344-1350.
- Raoult, D. et P. Forterre (2008). "Redefining viruses: lessons from Mimivirus." Nat Rev Microbiol **6**(4): 315-319.

- Rhoads, D. D., R. D. Wolcott, *et al.* (2009). "Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial." J Wound Care **18**(6): 237-238, 240-233.
- Rohwer, F. et R. Edwards (2002). "The Phage Proteomic Tree: a genome-based taxonomy for phage." J Bacteriol **184**(16): 4529-4535.
- Romling, U., A. Kader, *et al.* (2005). "Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients." Environ Microbiol **7**(7): 1029-1038.
- Roucourt, B. et R. Lavigne (2009). "The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome." Environ Microbiol **11**(11): 2789-2805.
- Ryan, E. M., M. Y. Alkawareek, *et al.* (2012). "Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro." FEMS Immunol Med Microbiol **65**(2): 395-398.
- Santos, S. B., C. M. Carvalho, *et al.* (2009). "The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique." BMC Microbiol **9**: 148.
- Saussereau, E. et L. Debarbieux (2012). "Bacteriophages in the experimental treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice." Adv Virus Res **83**: 123-141.
- Schmelcher, M., D. M. Donovan et M. J. Loessner (2012). "Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials." Future Microbiol **7**: 1147-1171.
- Schmelcher, M., A. M. Powell, *et al.* (2012). "Chimeric phage lysins act synergistically with lysostaphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands." Appl Environ Microbiol **78**(7): 2297-2305.
- Seed, K. D., D. W. Lazinski, *et al.* (2013). "A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity." Nature **494**(7438): 489-491.
- Sepulveda-Robles, O., L. Kameyama et G. Guarneros (2012). "High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages." Appl Environ Microbiol **78**(12): 4510-4515.
- Serwer, P., S. J. Hayes, *et al.* (2007). "Propagating the missing bacteriophages: a large bacteriophage in a new class." Virology **4**: 21.
- Shin, H., J. H. Lee, *et al.* (2012). "Receptor Diversity and Host Interaction of Bacteriophages Infecting *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*." PLoS One **7**(8): e43392.
- Short, C. M. et C. A. Suttle (2005). "Nearly identical bacteriophage structural gene sequences are widely distributed in both marine and freshwater environments." Appl Environ Microbiol **71**(1): 480-486.
- Singh, A., D. Arutyunov, *et al.* (2012). "Bacteriophage based probes for pathogen detection." Analyst **137**(15): 3405-3421.
- Skiena, S. S. (2001). "Designing better phages." Bioinformatics **17 Suppl 1**: S253-261.
- Smith, E. E., D. G. Buckley, *et al.* (2006). "Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(22): 8487-8492.
- Smith, H. W. et M. B. Huggins (1983). "Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs." J Gen Microbiol **129**(8): 2659-2675.

- Smith, J. M., N. H. Smith, *et al.* (1993). "How clonal are bacteria?" Proc Natl Acad Sci U S A **90**(10): 4384-4388.
- Smith, S. G., V. Mahon, *et al.* (2007). "A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression." FEMS Microbiol Lett **273**(1): 1-11.
- Sobral, D., P. Mariani-Kurkdjian, *et al.* (2012). "A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients." Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
- Sorek, R., V. Kunin et P. Hugenholtz (2008). "CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea." Nat Rev Microbiol **6**(3): 181-186.
- Strateva, T. et D. Yordanov (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance." J Med Microbiol **58**(Pt 9): 1133-1148.
- Suerbaum, S., J. M. Smith, *et al.* (1998). "Free recombination within *Helicobacter pylori*." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12619-12624.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze et J. G. Morris, Jr. (2001). "Bacteriophage therapy." Antimicrob Agents Chemother **45**(3): 649-659.
- Sullivan, M. B., M. L. Coleman, *et al.* (2008). "Portal protein diversity and phage ecology." Environ Microbiol **10**(10): 2810-2823.
- Summers, W. C. (2001). "Bacteriophage therapy." Annu Rev Microbiol **55**: 437-451.
- Sutherland, I. W., K. A. Hughes, *et al.* (2004). "The interaction of phage and biofilms." FEMS Microbiol Lett **232**(1): 1-6.
- Suttle, C. A. (2005). "Viruses in the sea." Nature **437**(7057): 356-361.
- Suttle, C. A. (2007). "Marine viruses--major players in the global ecosystem." Nat Rev Microbiol **5**(10): 801-812.
- Szczepankowska, A. (2012). "Role of CRISPR/cas system in the development of bacteriophage resistance." Adv Virus Res **82**: 289-338.
- Tan, Y., K. Zhang, *et al.* (2007). "Whole genome sequencing of a novel temperate bacteriophage of *P. aeruginosa*: evidence of tRNA gene mediating integration of the phage genome into the host bacterial chromosome." Cell Microbiol **9**(2): 479-491.
- Tavares, P., S. Zinn-Justin et E. V. Orlova (2012). "Genome gating in tailed bacteriophage capsids." Adv Exp Med Biol **726**: 585-600.
- Taylor, G. K. et B. L. Stoddard (2012). "Structural, functional and evolutionary relationships between homing endonucleases and proteins from their host organisms." Nucleic Acids Res **40**(12): 5189-5200.
- Thomas, R., L. Berdjeb, *et al.* (2011). "Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny versus lysis) in Lake Bourget (France)." Environ Microbiol **13**(3): 616-630.
- Thurber, R. V. (2009). "Current insights into phage biodiversity and biogeography." Curr Opin Microbiol **12**(5): 582-587.
- Toock, M. R. et D. T. Dryden (2005). "The biology of restriction and anti-restriction." Curr Opin Microbiol **8**(4): 466-472.

- Uchiyama, J., M. Rashel, *et al.* (2009). "Characteristics of a novel *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, PAJU2, which is genetically related to bacteriophage D3." Virus Res **139**(1): 131-134.
- Uchiyama, J., M. Rashel, *et al.* (2012). "Genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage KPP10." Arch Virol **157**(4): 733-738.
- van der Oost, J., M. M. Jore, *et al.* (2009). "CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes." Trends Biochem Sci **34**(8): 401-407.
- van Mansfeld, R., I. Jongerden, *et al.* (2010). "The population genetics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity." PLoS One **5**(10): e13482.
- Vandenheuvel, D., A. Singh, *et al.* (2013). "Feasibility of spray drying bacteriophages into respirable powders to combat pulmonary bacterial infections." Eur J Pharm Biopharm.
- Vander Byl, C. et A. M. Kropinski (2000). "Sequence of the genome of *Salmonella* bacteriophage P22." J Bacteriol **182**(22): 6472-6481.
- Verbeken, G., D. De Vos, *et al.* (2007). "European regulatory conundrum of phage therapy." Future Microbiol **2**(5): 485-491.
- Vergnaud, G. et C. Pourcel (2009). "Multiple locus variable number of tandem repeats analysis." Methods Mol Biol **551**: 141-158.
- Vos, M., P. J. Birkett, *et al.* (2009). "Local adaptation of bacteriophages to their bacterial hosts in soil." Science **325**(5942): 833.
- Vos, P., R. Hogers, *et al.* (1995). "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting." Nucleic Acids Res **23**(21): 4407-4414.
- Vu-Thien, H., G. Corbineau, *et al.* (2007). "Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients." J Clin Microbiol **45**(10): 3175-3183.
- Wang, P. W., L. Chu et D. S. Guttman (2004). "Complete sequence and evolutionary genomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112." J Bacteriol **186**(2): 400-410.
- Watanabe, R., T. Matsumoto, *et al.* (2007). "Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice." Antimicrob Agents Chemother **51**(2): 446-452.
- Weinbauer, M. G. et F. Rassoulzadegan (2004). "Are viruses driving microbial diversification and diversity?" Environ Microbiol **6**(1): 1-11.
- Wiehlmann, L., G. Wagner, *et al.* (2007). "Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 8101-8106.
- Williamson, K. E., M. Radosevich et K. E. Wommack (2005). "Abundance and diversity of viruses in six Delaware soils." Appl Environ Microbiol **71**(6): 3119-3125.
- Winstanley, C., M. G. Langille, *et al.* (2009). "Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*." Genome Res **19**(1): 12-23.

- Wolfgang, M. C., B. R. Kulasekara, *et al.* (2003). "Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8484-8489.
- Wright, A., C. H. Hawkins, *et al.* (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.
- Yeates, T. O., C. A. Kerfeld, *et al.* (2008). "Protein-based organelles in bacteria: carboxysomes and related microcompartments." Nat Rev Microbiol **6**(9): 681-691.
- Yin, Y. et D. Fischer (2008). "Identification and investigation of ORFans in the viral world." BMC Genomics **9**: 24.
- Zaleski, P., M. Wojciechowski et A. Piekarowicz (2005). "The role of Dam methylation in phase variation of *Haemophilus influenzae* genes involved in defence against phage infection." Microbiology **151**(Pt 10): 3361-3369.
- Zavilgelskii, G. V., V. Kotova et S. M. Rastorguev (2011). "[Antimodification activity of the ArdA and Ocr proteins]." Genetika **47**(2): 159-167.
- Zegans, M. E., J. C. Wagner, *et al.* (2009). "Interaction between bacteriophage DMS3 and host CRISPR region inhibits group behaviors of *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **191**(1): 210-219.
- Zhang, Q. G. et A. Buckling (2012). "Phages limit the evolution of bacterial antibiotic resistance in experimental microcosms." Evol Appl **5**(6): 575-582.
- Zhao, W. H. et Z. Q. Hu (2010). "Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*." Crit Rev Microbiol **36**(3): 245-258.
- Zhao, Y., K. Wang, *et al.* (2009). "Genome sequences of two novel phages infecting marine roseobacters." Environ Microbiol **11**(8): 2055-2064.

ANNEXES

7. ANNEXES

Tableau 4 : Sensibilité des souches de *P. aeruginosa* à 6 phages isolés aux USA

Phages>	PEV1	PEV2	C52	N1	N13	A ₁ 146a1
Souches						
Pa01	c+	c++	t+	c+	trace	-
C50	-	t+	t++	t+	-	-
Sch	c+++	c+++	c++	c+++	c++	c+++
C1-11	t++	-	trace	-	t+	-
C5-2	-	-	trace	-	-	t+
C7-6	-	-	-	-	-	-
C7-12	c+	-	trace	-	-	-
C7-25	c++	-	t++	-	-	-
C726	c++	trace	t++	t+	-	-
C8-7	trace	-	-	-	-	-
C8-14	-	-	-	-	t+	-
C8-15	-	-	-	-	-	-
C8-19	-	-	-	-	trace	-
C8-20	-	-	-	-	-	-
C9-2	-	-	-	-	-	-
C9-5	t+	-	-	t+	t+	t+
C9-6	-	-	-	-	-	-
C10-1	-	trace	-	-	-	-
C10-4	t+	t++	-	t+	trace	-
C10-5	-	t++	-	t++	t+	trace

NOTES: "t" - plage trouble; "c" - plage claire; "trace" - très faible croissance; "-" - Absence de croissance; "+" - niveau de croissance.

Les souches génétiquement identiques sont représentées par une même couleur.

Tableau 5: Sensibilité des souches de *P. aeruginosa* à trois genres de phages d'origine Russe

phages>	B3	PM 105	PM 69	JB 19	PM 116	PB1	SN	5/2	9/3	Ser	Che 2/2	Φ44	OΦ
	Phages transposables					PB1-like phages				phiKZ-like phages			
Souches													
PAO1	t ++	t ++	t ++	t ++	t ++	c +++	c +++	c +++	c +++	t +	t +	t +	t ++
Sch	t ++	t ++	-	trace	-	t +	t ++	-	-	-	-	-	-
7-25	t ++	t ++	t ++	t ++	t ++	c +++	c +++	c +++	c +++	t +	t +	trace	trace
2-10	t +	t +	-	t ++	-	t +++	c ++	t ++	t ++	t +	t +	-	trace
8-20	-	trace	-	trace	-	t ++		t +	t +	t +	t +	-	trace
7-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	trace
1-14	t ++	-	t +	t +	-	c ++	c ++	c ++	c ++	t +	t +	t +	t +
5-2	t +	-	t +	t +	-	c ++	c ++	c ++	c ++	t +	t +	-	t +
9-6	-	-	-	trace	trace	c +++	c +++	c +++	c +++	trace	trace	trace	-
8-14	-	-	trace	non fait	t +	t +++	t +++	t +++	t +++	trace	trace	-	-
9-11	-	trace	-	t +	-	c ++	c ++	c ++	c ++	t +	t +	t +	-

Résumé

L'utilisation de virus de bactéries ou bactériophages pourrait être un complément efficace à l'antibiothérapie. Mon travail a porté sur la caractérisation de bactériophages dirigés contre l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste responsable d'infections des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose.

J'ai tout d'abord déterminé la sensibilité des souches mucoviscidosiques au Pyophage (un cocktail de phages thérapeutiques Géorgien) et identifié six phages lytiques de quatre genres différents. Environ 15% des souches sont résistantes au Pyophage. Ensuite, en utilisant les souches cliniques multi-résistantes aux phages comme bactérie d'enrichissement, 32 phages ont été obtenus à partir des eaux usées de France et Côte d'Ivoire. Tous les phages analysés sont caudés et distribués au sein de dix genres parmi lesquels six exclusivement lytiques. J'ai identifié des souches bactériennes qui demeurent insensibles à tous les phages. J'ai montré que le système CRISPRs-Cas n'est pas associé à la résistance des souches aux phages lytiques.

Abstract

The use of viruses of bacteria commonly called bacteriophages could constitute an efficient complement to antibiotics. During my PhD, I have characterized phages infecting the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, responsible for lung infections in cystic fibrosis patients.

Firstly, I investigated the efficiency of Pyophage (a cocktail of phages therapeutic Georgian) on clinical *P. aeruginosa* strains and recovered six lytic phages from four different genus. The Pyophage appears to be unactive on approximately 15% of clinical strains. Secondly, and using multi-phages resistant strains as enrichment bacteria, 32 phages were isolated from waste water of France and Côte d'Ivoire. All phages are tailed and distributed within ten different genus including six exclusively lytic. I identified bacterial strains which remain insensitive to all phages. I also demonstrated that the CRISPRs-cas system plays no role in the resistance of strains to lytic phages.