

Mémoire de Maîtrise en médecine n°2545

**Phages anti-*Pseudomonas aeruginosa* pour le  
traitement des plaies brûlées infectées.  
Evaluation *in vitro* et résultats préliminaires  
de la mise au point d'un modèle *ex vivo*.**

**Anti-*Pseudomonas aeruginosa* phages for the  
treatment of infected burn wounds.  
In vitro evaluation and preliminary results in  
the setting-up of an *ex vivo* model.**

**Etudiant**

Karim Al-Dourobi

**Tuteur**

Dr Yok-Ai Que, MD-PhD

Service de médecine intensive adulte, CHUV

**Co-tuteurs**

Mme Shawna McCallin & Dr Gregory Resch, PhD

Département de microbiologie fondamentale, DMF-UNIL

**Experte**

Pr Lee Ann Laurent-Applegate, PhD

Unité de thérapie cellulaire, CHUV

Lausanne, janvier 2016

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	iii
<b>Summary</b> .....	iv
<b>1. Introduction</b> .....	1
1.1. Contexte.....	1
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	1
1.3. La phagothérapie .....	2
1.4. Les bactériophages .....	2
1.5. L'étude et la caractérisation des phages .....	3
1.6. Les protéines fluorescentes.....	4
1.7. La peau .....	5
<b>2. Matériel et méthodes</b> .....	6
2.1. Conditions de croissance et de conservation bactérienne.....	6
2.2. Amplification et titration des phages.....	6
2.3. Analyse du spectre d'activité des phages du cocktail.....	7
2.3.1. <i>Observation des plaques de lyse et des spectres d'hôtes</i> .....	7
2.3.2. <i>Mesure de croissances bactériennes sur 24 h sous pression bactéricide</i> .....	7
2.4. Production de souches de <i>P. aeruginosa</i> bioluminescentes pour analyse microscopique de l'interaction bactérienne avec la peau dans un modèle <i>ex vivo</i> .....	8
2.5. Culture <i>ex vivo</i> de peau humaine et tests préliminaires.....	9
2.5.1. <i>Préparation et évaluation de la viabilité des échantillons</i> .....	9
2.5.2. <i>Microscopie et immunohistochimie des échantillons : appréciation ex vivo des bactéries fluorescentes</i> .....	10
<b>3. Résultats</b> .....	11
3.1. Analyse du spectre d'activité des phages du cocktail.....	11
3.1.1. <i>Observation des plaques de lyse et des spectres d'hôtes</i> .....	11
3.1.2. <i>Mesure de croissances bactériennes sur 24 h sous pression bactéricide</i> .....	12
3.2. Production de souches de <i>P. aeruginosa</i> bioluminescentes pour analyse microscopique de l'interaction bactérienne avec la peau dans un modèle <i>ex vivo</i> .....	17
3.3. Culture <i>ex vivo</i> de peau humaine et tests préliminaires.....	19
3.3.1. <i>Préparation et évaluation de la viabilité des échantillons</i> .....	19
3.3.2. <i>Microscopie et immunohistochimie des échantillons : appréciation ex vivo des bactéries fluorescente</i> .....	20
<b>4. Discussion</b> .....	21
<b>5. Conclusion et perspectives</b> .....	25
<b>Remerciements – Bibliographie – Annexes</b> (cf. document annexe)	

## Résumé

---

Les bactériophages sont des virus spécifiques aux bactéries. Ils ont été découverts au début du 20<sup>ème</sup> siècle en France. Les premières études les concernant comme thérapie pour les infections bactériennes ont été conduites par Felix D'Hérelle à l'Institut Pasteur à Paris en collaboration avec George Eliava, un scientifique géorgien. Lorsque la pénicilline est apparue sur le marché dans les années 1930, les phages furent oubliés des pays de l'Ouest. Parallèlement, les pays de l'ancienne Union Soviétique ont continué à investiguer le potentiel de la phagothérapie. L'augmentation des résistances aux antibiotiques parmi les espèces bactériennes a ramené la considération des phages comme substituts ou compléments à la thérapie classique en Occident. Ce travail s'inscrit dans un large projet européen multicentrique intitulé PhagoBurn ([www.phagoburn.eu](http://www.phagoburn.eu)) auquel participent le CHUV et l'UNIL. Les principaux buts de ce travail de Master étaient :

1. de tester un cocktail de phages fourni par Pherecydes Pharma© contre des souches de l'une des plus préoccupantes bactéries multi-résistantes (BMR): *Pseudomonas aeruginosa*,
2. de contribuer à la mise au point d'un modèle *ex vivo* de peau brûlée infectée permettant l'étude, dans des conditions au plus proche de la réalité, de l'efficacité et de l'innocuité (impact sur le microbiome commensal) de la phagothérapie ainsi que de la dynamique des interactions phages-hôtes (apparition de résistances bactériennes aux phages par exemple).

13 phages fournis séparément ont été amplifiés avec une méthode de culture en double couche. La capacité lytique de chaque phage a été testée *in vitro* en appliquant en goutte le virus sur les souches PAO1 et PA14 cultivées en tapis dans des boîtes de Petri et dans des cultures liquides. Les résultats ont montré une différence de susceptibilité aux phages entre les souches. Ce fait s'explique par les propriétés intrinsèques des bactéries et des virus : les premières possèdent un arsenal varié de facteurs de résistance tandis que les seconds se lient uniquement sur des récepteurs très spécifiques. Par contraste à une thérapie monophagique, le cocktail apparaît être efficace, prévenant l'expansion des bactéries *in vitro* sans pour autant tuer le germe en totalité. *In vivo*, une phagothérapie combinée avec les défenses de l'hôte ou les antibiotiques pourrait offrir une voie pour éliminer la source de l'infection entièrement. Evidemment, cette assomption a besoin de plus d'études pour être confirmée.

Trois souches de *P. aeruginosa* (PAO1, PAO1.B5 et PA14) ont été transfectées avec le plasmide pUX-BF13 et les gènes GFP-2 et mCherry par des techniques classiques d'électroporation.

La collaboration avec le groupe de la Professeure Applegate et avec le Service de Chirurgie Plastique du CHUV a permis d'acquérir des échantillons humains. La première étape a été d'établir un modèle *ex vivo* qui permette l'application de souches fluorescentes de *P. aeruginosa* et l'observation, au travers de la microscopie et de l'immunohistochimie (IHC), du pattern de croissance et du comportement. Une contamination périphérique a souvent eu lieu sur les échantillons de peau qui a été attribuée soit aux champignons, soit aux souches bactériennes inoculées dans le contexte expérimental. Le processus de nettoyage et de préparation des échantillons, l'épaisseur de la peau, les conditions de culture, l'équipement et la stérilité des incubateurs sont autant de facteurs qui ont pu jouer un rôle dans les contaminations rencontrées. La microscopie de la peau a révélé une autofluorescence dans le spectre vert qui chevauchait le signal de GFP-2. Il a été décidé alors d'essayer les futures expériences avec les cellules mCherry. L'IHC n'a pas donné de résultat car les coupes histologiques ont été détruites dans le procédé de préparation. Le manque de temps a entravé les tentatives de modélisation.

Ce travail jette un regard global sur une approche nouvellement ravivée pour traiter les infections bactériennes. Le développement de la connaissance en matière de génomiques et de nouvelles technologies, comme l'imagerie cellulaire, donnent des perspectives non négligeables à la phagothérapie, spécialement dans un contexte d'une expansion mondiale de bactéries BMR.

Mots-clés : Bactériophages, PhagoBurn, *Pseudomonas aeruginosa*, fluorescence, peau

---

## Summary

---

Bacteriophages are viruses that are specific to bacteria. They were discovered in the beginning of the 20<sup>th</sup> century in France. The first studies about them as a therapy for bacterial infections were conducted by Felix D'Hérelle at Institut Pasteur in Paris in collaboration with George Eliava, a Georgian scientist. When penicillin, appeared on the market in the 1930s, phages were forgotten in Western countries. In parallel, the countries of the former Soviet Union continued to investigate the potential of the phagotherapy. The rise of antibiotic resistance among bacterial species has brought back the consideration of phages as substitutes or complements to classic therapy in the Occident. This work falls in a wide multicentric European project called PhagoBurn ([www.phagoburn.eu](http://www.phagoburn.eu)) involving the CHUV and UNIL. The main goals of this Master thesis were:

1. to test a phage cocktail provided by Pherecydes Pharma© against strains of one of the most worrying multi-drug resistant (MDR) bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*,
2. to contribute on the setting-up of an *ex vivo* model of burned infected human skin allowing the study, in conditions as close to reality, of the efficacy and safety (impact on commensal microbiome) of phage therapy as well as the dynamic of interactions phages-hosts (occurrence of bacterial resistance to such phage for example).

13 phages provided separately were amplified with a double layer method. The lytic capacity of each phage was tested by dropping each virus on PAO1 and PA14 strains cultivated in lawn in Petri dishes and in liquid cultures. The results showed a difference of susceptibility to phages between the strains. This fact is explain by the intrinsic properties of both bacteria and viruses: the first possess a various arsenal of resistance factors while the seconds only bind on very specific receptors. In contrast to a monophage therapy, the cocktail appears to be effective, preventing the expansion of the bacteria *in vitro* without actually killing the germs in totality. *In vivo*, a phage therapy combined with the host defenses or the antibiotics may offer a way to eliminate entirely the source of infection. Obviously, this assumption needs more studies to be confirmed.

Three strains of *P. aeruginosa* (PAO1, PAO1.B5 and PA14) were transfected with the plasmid pUX-BF13 and the genes GFP-2 and mCherry by classic electroporation technics.

The collaboration with Professor Applegate's group and the Plastic Surgery Department of CHUV permitted to acquire human samples. The first step was to establish an *ex vivo* model that allows the application of fluorescent *P. aeruginosa* strains and the observation, through microscopy and immunohistochemistry (IHC), of growth pattern and behavior. Peripheral contamination often occurred on skin samples which was attributed either to fungi or to bacterial strains inoculated in the experimental context. The process of cleaning and prepping the samples, the thickness of the skin, the culture conditions, the equipment and the sterility of the incubators are all of the factors that may have played a role in the contaminations encountered. Microscopy of the skin revealed an autofluorescence in the green spectra that overlapped the signal of GFP-2. It was then decided to try further experiment with the mCherry cells. The IHC didn't give any result because the histological slides were destroyed in the process of preparation. The lack of time prevented attempts of modelisation.

This work casts a global look on a newly revived approach to treat bacterial infections. The development of knowledge in matter of genomics and new technologies, like cell imaging, give none negligible prospects to phage therapy, especially in a context of worldwide expanse of MDR bacteria.

Keywords: Bacteriophages, PhagoBurn, *Pseudomonas aeruginosa*, fluorescence, skin

## 1. Introduction

---

Ce projet s'inscrit dans un essai clinique qui a obtenu un financement européen dans le cadre du 7<sup>ème</sup> Programme Cadre de Recherche et Développement (Programme Santé). Cet essai clinique, intitulé PhagoBurn ([www.phagoburn.eu](http://www.phagoburn.eu)), est un projet collaboratif lancé le 1<sup>er</sup> juin 2013 pour une durée de 36 mois. Coordonné par le Ministère de la Défense française (Service de santé des Armées – Hôpital d'instruction des armées Percy, Clamart, France) en collaboration avec la PME Pherecydes Pharma©, Romainville, France, PhagoBurn rassemble 11 autres centres de grands brûlés internationaux dont le CHUV.

L'objectif de l'étude PhagoBurn est d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de la phagothérapie dans le traitement des infections cutanées à *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients grands brûlés.

Ce travail annexe s'intéresse plus particulièrement au potentiel des phages comme alternative à l'antibiotique pour le traitement de plaies infectées par *P. aeruginosa*. Il a été développé dans le cadre de l'initiation de la mise en place d'un modèle *ex vivo* de peau brûlée infectée qui pourrait représenter un outil très intéressant permettant l'étude, au plus proche de la réalité, de nombreux paramètres dont la maîtrise est indispensable dans le cadre d'une application rationnelle de la phagothérapie (dynamique de l'interaction phages-hôtes, apparition de résistances, impact sur le microbiome commensal, par exemple).

### 1.1. Contexte

La résistance aux antibiotiques conventionnels a augmenté significativement au cours de la dernière décennie (1, 2) et ne cesse de croître. Cette augmentation traduit l'apparition de souches bactériennes multi-résistantes (BMR) ou à résistance étendue (XDR) telle que *P. aeruginosa*, un germe opportuniste (3-5) causant la majorité des infections nosocomiales (4) et dont l'importance clinique ne cesse de s'amplifier (6). De plus, les souches BMR sont à l'origine de nombreux échecs thérapeutiques (7) ce qui augmentent significativement la mortalité et la morbidité chez les patients atteints (4).

Malheureusement, les industries pharmaceutiques se sont détournées de la recherche de nouveaux antibiotiques au profit de médicaments plus rentables (8). Ainsi, la réserve de molécules thérapeutiques, spécialement pour les bactéries Gram-négatifs, est quasiment épuisée (9, 10).

### 1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* était déjà connue pour sa faible susceptibilité aux antibiotiques (11, 12) et sa présence en milieu hospitalier (8) peut s'avérer terrible chez des patients immunocompromis comme les grands brûlés, provoquant pneumonies et infections (1, 3, 5, 13-15). Ce pathogène est doté d'un grand génome (>6 Mb) qui lui confère plusieurs mécanismes pathogéniques et régulateurs lui permettant de s'adapter à des environnements hostiles (2, 4, 12). Il est une des étiologies majeures engageant le pronostic vital chez les brûlés dont la peau présente une faille physique et immunologique, les infections étant responsables de près de 50% de la mortalité par brûlure (6, 10, 16, 17).

### 1.3. La phagothérapie

En 1917, Felix d'Hérelle est l'un des premiers à étudier de manière systématique une entité capable de combattre la dysenterie qui sévissait alors en France (18). Il a ainsi découvert le bactériophage ou phage, un virus naturel qui interagit uniquement avec les bactéries car il est dépendant du système de répllication procaryotique (4, 19, 20) et épargne ainsi les cellules eucaryotes d'effet secondaire direct (21-23). Tôt après, en 1919 (4, 24), les premiers essais de phagothérapie ont été initiés chez l'humain (6) sans montrer d'évènements aderses sérieux (4, 10, 25, 26). Il semble que les quelques effets secondaires répertoriés (poussées de fièvre majoritairement) étaient liés soit à la présence de peptone dans les milieux de culture utilisés à l'époque soit à la présence résiduelle d'endotoxines libérées par les souches bactériennes utilisées en production (20, 24, 25).

La découverte de la pénicilline autour des années 1930 (6) a rapidement entraîné le déclin de l'intérêt pour la phagothérapie en Occident. Malgré cela, l'histoire a fait que la phagothérapie a persisté et s'est surtout développée dans les pays de l'ancienne Union Soviétique (ex-URSS) où des cocktails de phages ont fait leurs preuves sur des milliers de patients et y sont enregistrés comme médicaments depuis des décades (19, 24, 26, 27). La Pologne et la République de Géorgie notamment possèdent des connaissances plus détaillées et la phagothérapie est devenue routinière, utilisée pour la thérapeutique et pour la prophylaxie (6, 9, 28). L'institut Eliava de Tbilisi, en République de Géorgie, a commencé à rassembler les divers rapports mais une grande partie des travaux s'est perdue (26) au fil du temps. Ce manque de documentations scientifiques explique l'absence d'intérêt des pays de l'Ouest (22, 28, 29), plus basés sur une philosophie Evidence Based Medicine (EBM), définie par Sackett (30) comme l'intégration de l'expertise clinique individuelle avec les meilleures évidences cliniques externes issues de recherches systématiques.

Toutefois, l'avènement des antibiotiques ne laissait pas présager alors l'apparition de résistances constatées aujourd'hui. L'amplification du phénomène, pourtant pressenti par A. Fleming (Prix Nobel en physiologie ou médecine, 1945), est due, d'une part, à l'ignorance initiale du potentiel de transmission inter-souches ainsi qu'inter-espèces de divers facteurs de résistances et, d'autre part, à l'utilisation excessive et souvent inadaptée des médicaments (7).

C'est ainsi que, depuis la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, la communauté scientifique occidentale reconsidère la phagothérapie comme une solution réaliste à mettre en œuvre dans la stratégie globale visant à enrayer le cercle vicieux de la résistance aux antibiotiques (21, 24).

### 1.4. Les bactériophages

Les bactériophages (ou phages) sont ubiquitaires dans la nature et l'être-humain est porteur d'un nombre important de particules virales, la majorité étant des bactériophages (31). Il existe deux types de phages dits lytiques et tempérés (lysogéniques) (9), ces derniers représentant la minorité des phages (20%) (21). Tandis que les lytiques peuvent jouer un rôle prédominant en se liant de manière irréversible et spécifique à son hôte (32) et en le détruisant, les phages lysogéniques peuvent enrichir le génome de la bactérie et augmenter ainsi sa résistance aux antibiotiques et son adaptation au stress (33). Les prophages sont un exemple de bactériophages tempérés qui se sont intégrés dans le génome bactérien au cours du temps par un processus de lysogénisation (34). Ce procédé peut conférer aux bactéries hôtes une immunité à l'infection par d'autres phages et une modification de la pathogénicité (23, 24) tout en assurant la dissémination du prophage au sein de la population bactérienne (35). Ainsi, les prophages possèdent deux cycles : un latent ou dormant, intracellulaire (chromosomique) et un lytique (36, 37). Lorsque les souches bactériennes porteuses, dites lysogéniques (i.e. capable de générer la lyse), sont soumises à certains stress comme l'endommagement de l'ADN ou que la survie

des virus est menacée d'une quelconque manière, les phages tempérés rentrent dans un cycle lytique, appelé phase d'induction, qui conduit à la destruction cellulaire et à la production de progénitures capables de diffuser, d'infecter et de lyser les bactéries non lysogéniques présentes dans la culture conduisant à la formation de lysats (34, 36-38). Ces interactions attribuent aux phages un rôle de moteur naturel d'évolution bactérienne (3, 23) et leur permettent d'évoluer avec leurs hôtes par un principe de co-évolution antagoniste (4, 17, 32).

Les virus lytiques et tempérés ont longtemps été considérés comme absolument distincts, une des différences majeures les opposant étant la présence ou non d'une intégrase (8). Aujourd'hui, certaines études affirment que certains phages lytiques possèdent des ressemblances avec les tempérés et peuvent également enrichir le génome bactérien (3, 24). Ainsi, comme avancé par Krylov V. *et al* (3), il ne peut plus être affirmé que les phages lytiques utilisés en thérapeutique soient absolument sans danger pour l'environnement, le patient et la flore endogène. Il est impératif de n'utiliser que des phages dont l'action lysogénique, si minime soit-elle, est absolument exclue (28). Ces phages sont dits alors obligatoirement lytique (20).

Les phages lytiques sont auto-répliquatifs et, en même temps, auto-limités : la multiplication de la bactérie hôte amène les phages spécifiques, par une propriété unique, à se multiplier conjointement et, inversement, la diminution du nombre de bactéries conduit à la disparition de ces phages (20, 24, 29, 39), éliminés par le système immunitaire du patient et la clearance naturelle de l'organisme (6). Ainsi, en théorie et contrairement aux antibiotiques, une seule dose de phages pourrait suffire à combattre une infection (8, 20). La toxicité des antibiotiques, qui nécessite une certaine concentration plasmatique pour agir, n'est, à ce jour, pas mise en évidence chez les phages lytiques, caractérisés par une toxicité inhérente extrêmement faible (6, 20). En effet, ces virus sont extraordinairement hôte-spécifiques, c'est-à-dire qu'ils n'interagissent qu'avec un spectre plus ou moins étroit d'espèces et de souches bactériennes évitant la majeure partie de la flore endogène du patient (6, 20, 24, 28). Il a été démontré que ces virus peuvent tuer des bactéries qui sont résistantes à un large spectre d'antibiotiques récents (6, 20) et même être, parfois, plus efficaces pour traiter certaines infections humaines (25), totalement immunisés aux résistances médicamenteuses (9, 10).

#### 1.5. L'étude et la caractérisation des phages

L'étude et la caractérisation des phages passent par l'observation du spectre lytique et des plaques (plages) de lyse. La croissance sur plaque est la méthode la plus ancienne servant ces buts mais reste d'aujourd'hui la méthode centrale (40) afin de notamment confirmer l'absence ou la présence de virus (41), auquel cas il est possible d'avancer que la souche bactérienne est sensible au virus en question. Ce dernier point est d'ailleurs contesté. En effet, l'absence d'une plage de lyse ne démontre pas avec certitude que la souche bactérienne est totalement invulnérable aux virus et encore moins qu'aucun phage n'est présent dans la culture (34, 40). En effet, une période de latence (temps de lyse) du phage trop longue, autrement dit le temps dont le virus a besoin pour se répliquer dans la cellule hôte, ou un trop faible burst size (production de phages par bactérie) influencent grandement la visibilité et la taille de la plaque de lyse sans pour autant exclure une infection (40, 42).

La morphologie de la plaque s'apprécie par plusieurs critères comme sa clarté ou, a contrario, sa turbidité, sa forme, sa taille et ses bords (nets ou flous). Une plaque totalement claire est le signe d'une lyse bactérienne « totale » par les phages (40) tandis qu'une turbidité traduit la présence de cellules non lysées (43) et parle en défaveur d'un grand potentiel d'infectivité (12). Ceci peut s'expliquer, pour certaines bactéries, par des mécanismes de défenses qui préviennent l'infection ou bien encore, pour certains virus, par une période de latence trop longue qui permet aux cellules non touchées de rentrer en phase stationnaire, moment auquel l'adsorption des phages devient moindre, voire nulle.

La forme de la plaque est généralement ronde : le premier phage à infecter une cellule lyse cette dernière qui diffuse alors dans toutes les directions, amenant ainsi les cellules alentours à faire de même. A l'exception des plaques de lyse de quelques phages comme celles du T7, elles vont toutes se délimiter d'elles-mêmes avec l'atteinte de la phase stationnaire bactérienne (40, 41) qui va prévenir la propagation virale. Un changement dans la forme habituelle d'une plaque pour un phage donné peut indiquer l'apparition d'une mutation chez ce dernier (41). La taille de la plage de lyse est dépendante de quatre facteurs principaux : la diffusion des phages dans le milieu, le taux d'adsorbance, la période de latence et, relativement, le burst size (41).

La diffusion est fonction de deux choses (40) : les caractères propres du phage en question, comme sa morphologie (41), et le milieu. Logiquement, un grand virus tend à être plus rapidement ralenti qu'un petit dans l'environnement. De plus, un milieu dense, à l'inverse de poreux ou fluide, est beaucoup moins prompt à la diffusion d'éléments. Aussi, un gel d'agarose trop sec ou trop mince diminue la diffusion, corrélée positivement à la taille de la plage (35, 41).

L'adsorbance des phages, c'est-à-dire leur capacité à se lier aux récepteurs de surface bactériens comme les pili (12), dépend de la densité bactérienne, de celle du milieu et de la constante d'adsorption du phage (40). Un délai d'adsorbance trop long ou une densité du milieu élevée donneront de petites plaques. A l'inverse, une densité bactérienne ou une constante d'adsorbance élevées offriront de grandes plages de lyse. Ceci dit, un taux d'adsorbance trop élevé avec beaucoup de phages par cellule ou une haute densité bactérienne au départ, qui aura tendance à atteindre une phase stationnaire globale plus rapidement, diminueront la taille des plaques (40, 41). De plus, il est nécessaire que la concentration de récepteurs soit optimale (18) et qu'ils soient dans une conformation spatiale spécifique afin que l'interaction phages-hôtes ait lieu. La variabilité environnementale et les facteurs physiologiques de *P. aeruginosa* affectent cette liaison et génèrent ainsi les différents morphotypes constatés (12).

La période de latence est intrinsèque à chaque type de phages : certains se reproduisent vite et d'autres beaucoup plus lentement. La période de latence est corrélée positivement au burst size (41, 44) : un temps de lyse long va automatiquement augmenter le taux de production intracellulaire de phages et le contraire pour un temps court. Cela dit, autant un temps de latence trop long que court ne sont pas idéaux (41). Dans le premier cas, le burst size sera en effet important, mais le temps que les virus se reproduisent permet aux bactéries en croissance qui ne sont pas encore infectées d'atteindre leur phase stationnaire. Le milieu de culture également devient plus dur, limitant la diffusion par la suite. Si le temps de lyse est court, le burst size est alors réduit, amenant à une faible adsorbance virale et à une contamination bactérienne limitée.

Le burst size per se ne semble pas avoir une conséquence directe et majeure sur la taille de la plaque à moins qu'il soit vraiment faible (<10 phages/cellules) (41), auquel cas il impacte négativement sur la taille (40). Ceci peut s'expliquer par le caractère du phage, dont l'efficacité n'est pas tellement dépendante du nombre mais de la spécificité.

## 1.6. Les protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes (fluorescent proteins, FPs), appelées également fluorochromes, sont des instruments essentiels pour l'imagerie cellulaire et l'étude du vivant (45-48). De manière sommaire, leur fonctionnement repose sur un principe d'excitation-émission (49), c'est-à-dire qu'une source de lumière ou un laser révèlent leur fluorescence (50). Sur le plan moléculaire, cette dernière résulte de l'oxydation, en principe par du dioxygène (O<sub>2</sub>), d'acides aminés qui conduit à des systèmes conjugués par délocalisation d'électrons (49). Chaque FP est excitée dans un spectre de longueurs d'onde donné et émet une fluorescence à des longueurs d'onde propres (49). De ce fait, pour optimiser la



visualisation sous appareils, il est important d'utiliser des filtres appropriés avec des longueurs d'onde d'excitation/émission spécifiques aux fluorochromes (51). Ces protéines appartiennent à différentes catégories selon leurs propriétés photophysiques, les principales étant la photoactivation (i. e. émission fluorescente en présence d'UV ou de violet visible), la photoconversion et le photoswitching (non discutés en détails) (49). Le photobleaching traduit une perte de fluorescence (52).

La Green Fluorescent Protein (GFP) est extraite à la base d'une méduse, *Aequorea victoria* (45, 49, 53). Elle est très bien caractérisée aujourd'hui (54) et s'est prouvée être un outil indispensable d'imagerie cellulaire. Elle a été étudiée et modifiée par mutagenèse pour acquérir notamment plus de photostabilité, de luminescence et de solubilité (46, 49, 53). GFP, comme d'autres FP, présente plusieurs avantages dont le fait qu'elle n'a pas besoin d'être fixée ou préparée de quelque manière afin d'être visualisable dans le système d'intérêt, elle n'est destructive ni envers l'environnement ni envers la cellule et ne nécessite pas de substrat ou de réserve énergétique pour émettre (45, 53, 55). En revanche, un faible taux d'oxygène ou un pH acide en diminuent fortement le signal. Ceci explique le fait que les bactéries à tendance anaérobie et fermentative comme beaucoup de Gram-positifs ne sont pas tellement étudiées à l'aide de ce biomarqueur, préféré alors pour l'examen des Gram-négatifs (54). La molécule mCherry (« m » pour monomère) est dérivée de mRed Fluorescent Protein (mRFP), ce dernier étant le descendant d'un tétramère fluorescent, DsRed2, obtenu par mutagenèse de la molécule originale, DsRed, isolée d'une anémone de mer, la *Discosoma striata* (49). Le fluorochrome mRFP1 était l'un des premiers monomères à émettre dans le spectre rouge. Les molécules monomériques, à l'inverse des tétramériques, s'intègrent facilement dans les systèmes cibles (49) comme des bactéries. Cela dit, l'intensité de leur émission est généralement amoindrie, celle de mRFP1 représentant le 25% de DsRed2 (49). La FP mCherry fait partie d'une série de monomères appelés les mFruits dont elle est un membre très attrayant de par ses riches propriétés photophysiques.

## 1.7. La peau

La peau est le plus grand organe de corps, comptant pour 15% du poids total chez l'adulte. Elle exerce de multiples fonctions vitales et protège contre les agressions de l'environnement grâce à une organisation élaborée de structures. Elle est divisée en trois couches principales (de la surface à la profondeur) : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (56). Leurs épaisseurs diffèrent significativement selon la localisation anatomique (56, 57). L'épiderme, composé majoritairement de kératinocytes, est lui-même subdivisé en quatre couches successives (de la profondeur à la surface) : basale ou germinative, squameuse ou épineuse, granulaire et cornée (57). La couche germinative repose sur une membrane basale constituée notamment de collagène de type IV, indicateur de son intégrité (58).

Le derme sous-jacent est critique pour la maintenance et la régulation de l'épiderme et est séparé de celui-ci par la jonction dermo-épidermique (JDE), véritable interface mécanique et biologique pour les échanges de nutriments et autres métabolites (56). Le derme est un filet fibreux composé majoritairement de collagène (de type I surtout) et de fibres élastiques dans lequel s'immiscent des réseaux nerveux et vasculaire. La population du derme consiste en fibroblastes, macrophages, mastocytes ainsi que diverses cellules issues du sang telles que lymphocytes et plasmocytes (56, 57). Au travers de ces deux couches, la peau héberge une multitude de récepteurs tels que les cellules de Merkel ou bien les corpuscules de Wagner-Meissner et de Pacini qui répondent aux différents stimuli sensoriels (56). Les glandes sudoripares et sébacées sont les appendices de l'épiderme et sont connectées à sa surface tout en étant localisées dans le derme et l'hypoderme (56).

L'hypoderme, appelé aussi graisse subcutanée ou panniculus adiposus, est composé d'adipocytes surtout. C'est un lieu de réserve énergétique pour le corps et de conversion enzymatique pour les hormones (57).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Conditions de croissance et de conservation bactérienne

Les souches bactériennes (Tableau 2.1) ont été cultivées sur des plaques au sang (Columbia, 5% sang de mouton). Pour chaque stock, une colonie bactérienne isolée, prélevée à l'aide d'une anse, a été inoculée dans 10 ml de BD™ Tryptic Soy Broth (TSB) et laissée une nuit (overnight, ON) à l'étuve (37 °C, 220 rpm). Le lendemain, 1 ml de chaque ON a été pipeté dans des tubes en polypropylène conçus pour la cryopréservation [Thermo Fisher©, Scientific Inc., Nalgene™, référence (REF) 5000-1020] auxquels 200 µl de glycérol 80% ont été préalablement rajoutés. Les cultures bactériennes glycérolées ont été stockées à -80°C.

**Tableau 2.1.** Liste des espèces et des souches utilisées

Espèces	Souches	Sources/Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10, 28, 74, 83, 102, 112, 123, 141, 165, 198, 206, 214, 219, 224, 247, 253, 274, 392, 393, 395, 398, 401, 2062, 3292 PA7, PA14, PAO1, PAO1-P <sup>1</sup> , PAT2, CHA, TIC, LESB58, UR1156	DMF UNIL <sup>3</sup>
	PAO1.B5	UNIGE <sup>4</sup>
	MI1105 0395, MI1109 2312, MI1119 0828, MI1125 2044	Infections en milieu hospitalier <sup>5</sup>
<i>Escherichia coli</i>	DH5α <sup>2</sup>	DMF UNIL <sup>3</sup>

<sup>1</sup>PAO1-Pherecydes : souche non utilisée ultérieurement car elle présentait une contamination lors de manipulations préliminaires. <sup>2</sup>Souches obtenues en trois exemplaires (plasmide pUX-BF-13 et plasmides codant les protéines GFP-2 et mCherry). <sup>3</sup>Department of Microbiology Fundamental Université de Lausanne. <sup>4</sup>Karl Perron, Unité de microbiologie, Université de Genève. <sup>5</sup>Souches cliniques provenant de patients.

### 2.2. Amplification et titration des phages

Afin d'amplifier les 13 phages du cocktail (Pherecydes Pharma©), une méthode de culture en double couche décrite dans la littérature (39, 59) a été choisie et adaptée. Brièvement, 100 µl d'une culture ON de *P. aeruginosa* PAO1 (PAO1) ont été distribués dans des tubes en polypropylène à fond rond (BD Falcon™, REF 352059) puis 10 µl de chaque phage ont été ajoutés séparément. 4 ml de TSB agar mou (TSB avec agar 0.7%, conservé à 50°C, TSB soft) ont été ajoutés dans tous les tubes avant d'être coulés immédiatement sur des plaques Tryptic Soy Agar (TSA). Après polymérisation, les boîtes de Petri ont été placées à l'étuve (37 °C) ON.

Le lendemain, la couche supérieure de TSB soft contenant les bactéries et les phages a été prélevée à l'aide d'une pipette Pasteur en verre coudée, déposée dans un tube en polypropylène à fond rond contenant des billes en verre et vortexée quelques secondes avant d'être centrifugée [4000 rpm, 10 min, T°C ambiante (room temperature, RT)]. Le surnageant a été filtré (0.45 µm) dans un nouveau tube complété avec 3 ml de tampon SM (5.8 g NaCl, 2 g MgSO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O, 50 ml Tris-HCl pH 7.5). Les solutions de phages obtenues ainsi ont été conservées à 4°C.

Pour la titration, toutes les solutions stocks de phages élaborées préalablement ont été diluées à  $10^{-5}$ ,  $10^{-7}$  et  $10^{-9}$  puis coulées avec 200  $\mu$ l d'ON de PAO1 et 4 ml de TSB soft sur plaques TSA. Le comptage des plages de lyse de chaque phage a été effectué et mesuré en Plaque-Forming Units par millilitre (PFU/ml). Dans le but de stabiliser et d'homogénéiser leurs titres respectifs à  $10^7$  PFU/ml, les phages ont été pipetés selon leurs concentrations distinctives dans des tubes Eppendorf de 5 ml (Eppendorf AG, REF 0030119401) et dilués avec du NaCl 0.9% pour obtenir un volume total de 3 ml (Annexe A.2). Les tubes ont été conservés à 4°C.

### 2.3. Analyse du spectre d'activité des phages du cocktail

#### 2.3.1. Observation des plaques de lyse et des spectres d'hôtes

Toutes les souches (Tableau 2.1) ont été mises en ON. Le jour suivant, 200  $\mu$ l de chaque bactérie ont été coulés sur des plaques TSA avec 4 ml de TSB soft et laissées à RT 30 min afin de polymériser. 2  $\mu$ l de chaque phage ( $10^7$  PFU/ml) ont été déposés en goutte à la surface des boîtes. Après 30 min à RT, les boîtes ont été placées à 37°C ON.

Les observations des plaques sont relevées dans un tableau et les pourcentages des spectres d'hôtes calculés sont présentés dans un histogramme réalisé avec le logiciel GraphPad Prism© v.6.05 (GraphPad Software©, Inc.). Cette expérience a été réalisée en triplicats à une semaine d'intervalle.

#### 2.3.2. Mesure de croissances bactériennes sur 24 h sous pression bactéricide

Afin d'avoir une multiplicité d'infection (rapport de la concentration de phages sur la concentration de bactéries, Multiplicity Of Infection, MOI) de 1.0, les ON des souches PAO1 et *P. aeruginosa* PA14 (PA14), initialement à  $10^9$  Colony Forming Units (CFU)/ml (expériences préliminaires), ont été diluées à  $10^7$  CFU/ml et à  $10^6$  CFU/ml dans 10 ml de NaCl 0.9%. 150  $\mu$ l de chaque dilution ont été mélangés dans des rapports de volume et de concentration 1:1 avec les phages individuels ( $10^7$  PFU/ml) et le cocktail ( $10^6$  PFU/ml, concentration approximative déduite de la réunion de 100  $\mu$ l de chacun des 13 phages pour un volume total de 1.3 ml).

De plus, deux contrôles négatifs ont été réalisés. Le premier contrôle était le tampon SM seul dans lequel les phages amplifiés ont été stockés (11). Le deuxième était constitué des surnageants obtenus après culture liquide des souches de PAO1 et PA14 sans ajout de bactériophages et en utilisant le même protocole de centrifugation et de filtration que celui de la préparation des lysats bactériens lors de l'amplification des phages. Les contrôles ont aussi été mélangés dans un rapport de volume 1:1.

Les mesures ont été effectuées avec le lecteur de plaque 96 puits automatisé Tecan Infinite® 200 Pro (Tecan Trading© AG) et l'application Tecan i-control© v.1.10.4.0 Les résultats ont été interprétés avec le logiciel GraphPad Prism v.6.05 et présentés dans un graphique sur la base d'un modèle non linéaire (one phase exponential decay).

Les puits de la microplaque (BD Falcon™, REF 353910) ont été chargés de manière identique en triplicats (Annexe A.3). Des mesures d'OD<sub>600nm</sub> ont été prises toutes les cinq min pendant 24 h sous agitation à 300 rpm et 37°C.

#### 2.4. Production de souches de *P. aeruginosa* bioluminescentes pour analyse microscopique de l'interaction bactérienne avec la peau dans un modèle *ex vivo*

Les souches de *P. aeruginosa* ont été transfectées avec les plasmides codant pour les FPs GFP-2 (pics d'excitation/émission : 488/507 nm) et mCherry (pics d'excitation/émission : 587/610 nm) (49).

Afin de pouvoir réaliser la transfection de plasmides, des ON des souches PAO1, PAO1.B5 et PA14 ont été préparées de manière à rendre les cellules compétentes (c). Les bactéries ont été cultivées dans 20 ml de Luria Broth (LB) (180 rpm, 43°C) puis centrifugées (4000 rpm, 10 min, 4°C). Les surnageants ont été jetés et les culots cellulaires ont été resuspendus dans 20 ml de MOPS [3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid]-glycérol 15% froid (4°C) et centrifugés (4000 rpm, 10 min, 4°C). Les surnageants ont été éliminés et la manipulation a été répétée une seconde fois selon le protocole décrit ci-dessus. Les culots bactériens ont été mélangés avec 5 ml de MOPS-glycérol froid puis transférés dans des tubes de 15 ml (BD Falcon™, REF 352096) avant d'être centrifugés une dernière fois. Les cellules électro-compétentes obtenues ont été resuspendues dans 0.5 ml de MOPS-glycérol froid puis aliquotées en échantillons de 40 µl dans des tubes Eppendorf 1.5 ml (Eppendorf AG, REF 0030120086). Les aliquots ont été cryogénisés avec de l'azote liquide et conservés à -80°C.

Le plasmide pUX-BF13 et les plasmides codant pour GFP-2 et mCherry contenus dans des souches DH5α d'*E. coli* ont été fournies par le DMF. Le plasmide pUX-BF13 portait le gène helper afin de faciliter l'incorporation plasmidique et le gène de résistance à la gentamycine (Gm<sup>r</sup>). Le Gm<sup>r</sup> permettait de sélectionner des cellules transformées (versus normales) sur boîtes de Petri contenant un milieu LB supplémenté de Gm à 50 µg/ml.

Afin de purifier les plasmides, le kit QIAprep Spin miniprep de Qiagen© a été utilisé (Hilden, Germany, REF 27104). Les ON des souches DH5α ont été centrifugés (4000 rpm, 5 min, RT). Les culots de cellules ont été resuspendus dans 250 µl de buffer P1 puis transvasés dans des tubes Eppendorf. Après ajout de 250 µl de buffer P2, les tubes ont été mélangés en inversant à la main vigoureusement. Cette manipulation a été répétée après adjonction de 350 µl de buffer N3. Après centrifugation (13000 rpm, 15 min, RT), les surnageants ont été transférés dans une QIAprep Spin Column composée d'un filtre et d'un tube de rétention. Les colonnes ont été centrifugées (13000 rpm, 1 min, RT) et le contenu des tubes de rétention éliminé. Les colonnes ont été lavées avec l'ajout de 750 µl de buffer PE puis centrifugées deux fois (13000 rpm, 1 min, RT puis 13000 rpm, 2 min, RT). Après avoir placé les colonnes dans des Eppendorfs propres, les plasmides ont été élués avec 30 µl d'eau stérile par centrifugation (13000 rpm, 1 min, RT). La concentration d'ADN [ng/µl] dans les éluats obtenus a été mesurée à l'aide du NanoDrop® (Thermo Fisher©, Scientific Inc., Witec ag©, Lucerne) et le logiciel NanoDrop 1000 v.3.8.0. La pureté des échantillons, i.e. les ratios d'absorbance 260/280 et 260/230, indiquant les contaminations par des protéines ou des molécules organiques, respectivement, a été relevée.

Les cellules compétentes et les plasmides ont été déposés sur glace directement après être sortis du congélateur (-80°C et -20°C, respectivement). Le plasmide pUX-BF13 seul ou avec l'un des plasmides fluorescents (ratio 3 :1) ont été mélangés dans des tubes Eppendorf à chacune des trois types de cellules compétentes (Annexe A.4) et les mélanges déposés dans des cuvettes d'électroporation maintenues sur glace.

L'électroporation, effectuée à 2.5 kV dans un Gene Pulseur™ (Bio-Rad Laboratories©, Inc.) était suivie immédiatement par l'ajout de 1 ml de Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) dans les cuvettes. Au fur et à mesure, les cuvettes choquées étaient directement remises sur glace. Une fois la manipulation terminée, le contenu des cuvettes a été transvasé dans des tubes en polypropylène à fond rond et placé à l'étuve pour 1 h à 220 rpm et 37°C. 100 µl de chaque cuvette ont été étalés en

duplicats sur LB-Gm puis incubés ON à 37°C. Les plus grosses colonies de chaque souche ont été repiquées sur plaque, le milieu étant toujours LB-Gm, et incubées ON à 37°C. Les plaques LB-Gm repiquées ont été soumises à un spectrophotomètre 45 W (modèle ECX-F20, Witec ag©, Lucerne) excitant dans le spectre de l'ultraviolet (UV)-violet visible (longueurs d'onde approximatives : 100-400 nm) afin d'observer une éventuelle fluorescence bactérienne. Pour confirmer la transformation des bactéries, les cellules ont également été observées sous le microscope à fluorescence (ZEISS©) et les images acquises via le logiciel AxioVision (ZEISS©). Pour ce faire, les bactéries transformées ont été prélevées depuis les plaques LB-Gm à l'aide d'une anse et resuspendues dans 1 ml d'eau stérile. Des lames de verre ont été préparées afin de stabiliser le mouvement bactérien et d'égaliser le plan pour la microscopie (49). Pour cela, un moule en silicone troué a été déposé sur une première lame. 700 µl d'une solution eau-agarose 1% a été déposée dans le trou du moule prévu à cet effet. Une deuxième lame en verre a été déposée sur la première en prenant garde de ne pas faire de bulle d'air et le tout a été laissé à RT 10 min. afin de sécher. La lame supérieure et le moule en silicone ont été retirés ne laissant que le gel nouvellement formé sur la lame inférieure. Une goutte de 5 µl de bactéries éluées a été déposée sur le gel et une lamelle en verre a été placée au-dessus.

Les images ont été acquises sous contraste de phase (Ph) ainsi que sous les filtres DsRed et GFP (longueurs d'onde approximatives excitation/réception : 558/583 nm et 488/507 nm (49), respectivement) et traitées avec le logiciel ImageJ v.1.49g pour être visualisables.

## 2.5. Culture *ex vivo* de peau humaine et tests préliminaires

### 2.5.1. Préparation et évaluation de la viabilité des échantillons

Les échantillons de peau humaine ont été fournis par le Service de Chirurgie Plastique du CHUV et traités en collaboration avec le groupe de la Professeure Lee Ann Laurent-Applegate (Unité de Thérapie Régénérative, Département de Médecine Musculosquelettique, CHUV).

A la réception du morceau de peau, un nettoyage minutieux de la graisse hypodermale était effectué en laissant en place une couche de derme superficiel et d'épiderme. L'opération était effectuée en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire. Le morceau de peau était placé dans une boîte de Petri de 14 cm de diamètre (Thermo Fisher©, Scientific Inc., Sterilin™, REF 501V) et le tissu adipeux était enlevé à l'aide de scalpels jetables, de pinces et de grattoirs pour cellules. La peau nettoyée était transférée dans une nouvelle boîte de Petri. La surface de travail était nettoyée (éthanol 90%) et les gants stériles étaient changés. Par la suite, le protocole cité par Coolen N.A. *et al* (58) a été appliqué en effectuant quelques changements. En résumé, le morceau de peau était découpé à l'aide d'un scalpel en échantillons d'environ 2x2 cm qui étaient placés individuellement dans des boîtes de Petri de 6 cm de diamètre (Thermo Fisher©, Scientific Inc., Sterilin™, REF 123) contenant du Phosphate Buffered Saline-Penicillin/Streptomycin 1% (PBS-Pen/Strep 1%) (Gibco™). L'opération était pratiquée deux fois afin d'optimiser le lavage et l'imprégnation d'antibiotiques. Les échantillons étaient ensuite mis dans de nouvelles boîtes de Petri de 6 cm de diamètre et environ 3 ml de Dulbecco's Modified Eagle Medium + 10% Fetal Bovine Serum desactivated + 1% L-Glutamin (DMEM + 10% FBS + 1% L-Glut) (Gibco™) étaient ajoutés. Le milieu de culture était versé à l'aide d'une pipette jaugée stérile en prenant garde que le niveau du liquide ne dépasse pas la surface de l'épiderme. Les échantillons étaient finalement placés dans un incubateur (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) et surveillés pour contaminations une fois par jour, notamment à l'aide d'un indicateur de pH contenu dans le DMEM, le rouge de phénol, qui permettait de mettre en évidence une acidification en ternissant le milieu de culture. Ce dernier était changé une fois tous les deux jours.

### 2.5.2. Microscopie et immunohistochimie des échantillons : appréciation *ex vivo* des bactéries fluorescentes

Afin d'observer le comportement de *P. aeruginosa* en contact avec de la peau humaine saine, une souche PAO1-GFP-2 a été utilisée. L'ON réalisée dans 10 ml de LB (220 rpm, 37 °C) a été centrifugée (4000 rpm, 10 min, RT) puis lavée deux fois avec du PBS 1x (0.01 mol/l). Les bactéries ont été ensuite suspendues dans 10 ml de NaCl 0.9% stérile. Une goutte de 1.5 µl de la suspension a été déposée au centre d'un échantillon de peau préparé selon le protocole décrit ci-dessus et le tout incubé ON à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>. Le lendemain, des images au microscope à fluorescence (modèle DFC3000 G, Leica Microsystems©) ont été acquises.

Pour obtenir des images immunohistochimiques, une ON (OD<sub>600nm</sub> 0.7) de PAO1-B5-mCherry a été lavée deux fois dans du PBS 1x. Trois échantillons de peau ont été inoculés avec 5 µl d'ON et deux avec du PBS 1x comme contrôles négatifs.

En vue d'obtenir des coupes histologiques, les échantillons de peau infectés ont été fixés sous hotte dans 15 ml de PBS 1x contenant du paraformaldéhyde (PAF) 4% dans des tubes en polypropylène de 50 ml à fond conique (BD Falcon™, REF 0030122151) à 4 h, 10 h et 24 h post-inoculation. Les contrôles négatifs ont été fixés à 0 h et à 24 h post-inoculation. Les pièces ont été laissées ainsi en ON à 4°C.

Par la suite, les échantillons ont été progressivement sédimentés dans du PBS 1x avec 10% puis 20% de sucrose et déposés dans des moules en plastique 25x20x5 mm à usage unique conçus pour la cryopréservation (Kalttek S.R.L., Padova, Italie). Une fois recouverts d'Optimal Cutting Temperature (O.C.T., Tissue-Tek®) les échantillons ont été cryogénisés avec de l'azote liquide (-80°C). Les préparations ont été amenées à Epalinges sur glace sèche (-20°C) afin d'être découpées à l'aide d'un microtome cryostat rotatif semi-automatique (CryoStar™) en coupes transversales de 10 et 20 µm. Les lames ont été directement reposés sur glace sèche après découpe. La dernière étape consistait au marquage immunohistochimique (IHC) avec des anticorps anti-mCherry pour révéler la localisation des bactéries sur les coupes (étape discutée plus loin).

### 3. Résultats

#### 3.1. Analyse du spectre d'activité des phages du cocktail

##### 3.1.1. Observation des plaques de lyse et des spectres d'hôtes

Comme décrit précédemment (35), une disparité nette de la susceptibilité des souches bactériennes aux 13 phages est mise en évidence (Tableau 3.1.1.1). Par exemple, la souche 10 présente une sensibilité relative tandis que la 83 est sensible à quasiment tous les phages (84.6%). La souche 141 est totalement insensible à l'exception du phage 5. La souche 253 montre des plaques turbides pour tous les phages du cocktail. A noter que PAO1 et PAT2 sont sensibles à tous les phages et que PA14 est affecté par 10/13 virus. Finalement, à l'exception des souches 10 et 253, des plages de lyse claires (témoignant d'une lyse efficace) sont observées sur toutes les souches par au moins un phage.

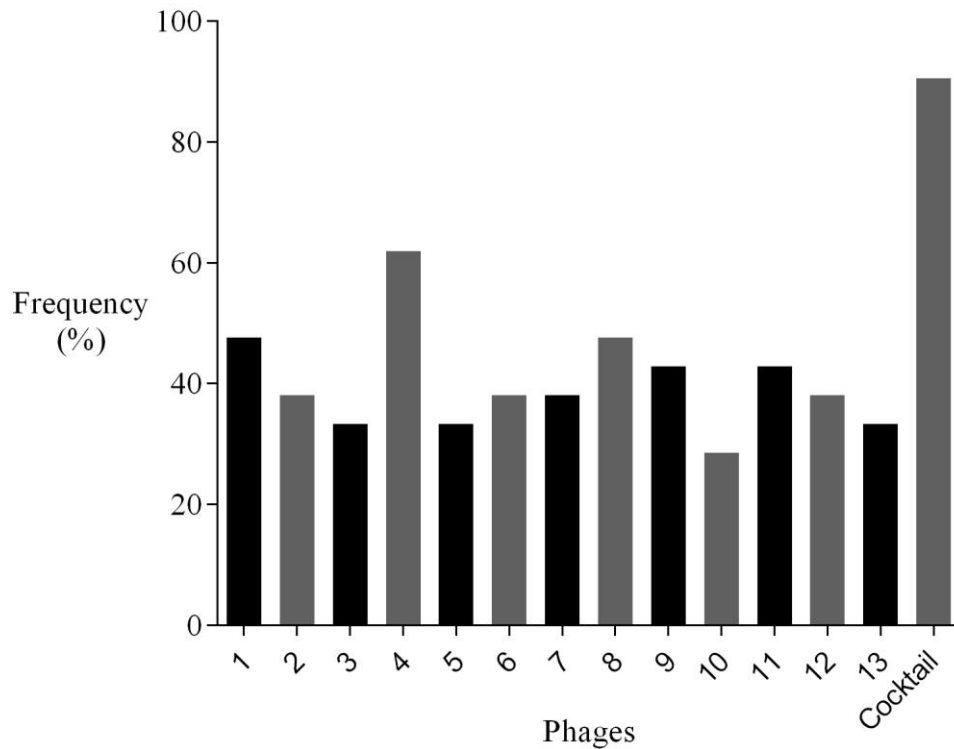
L'histogramme (Figure 3.1.1.1) témoigne d'une distribution variée du spectre lytique des phages. La majorité des virus de ce cocktail présentent un potentiel infectieux sur environ 40% des souches testées. Le phage 4 est celui qui possède le spectre lytique le plus large (62%), à l'inverse du 10 qui est doté d'un spectre bien plus étroit (29%). A relever que le cocktail conçu par Pherecydes Pharma couvre approximativement 90% des 21 souches testées.

Certaines souches (Tableau 3.1.1.2) n'ont pas pu être analysées plus en détail. Elles ont présentées des réactions différentes à celles attendues suite à l'application des phages. En effet, les tapis bactériens ne présentaient pas de plage de lyse concrètement identifiable et les bactéries arboraient des phénotypes particuliers.

**Tableau 3.1.1.1.** Plaques de lyse

Souches	10	83	123	141	165	206	214	253	392	395	401	2062	PA14	PAO1	PAT2	TIC	LESB58	MI1105 0395	MI1109 2312	MI1119 0828	MI1125 2044
phi1	-	T	T	-	+	+	+	T	+	T	+	+	-	+	+	T	T	T	T	+	+
phi2	-	+	+	-	-	-	NA	T	+	T	-	T	-	+	+	-	NA	+	+	T	+
phi3	T	+	-	T	-	-	NA	T	+	+	NA	T	+	+	+	T	+	NA	T	T	T
phi4	T	+	+	-	+	+	+	T	+	T	+	+	+	+	+	NA	-	T	T	+	+
phi5	T	+	-	+	-	-	T	T	T	T	+	NA	T	+	+	NA	T	+	+	T	-
phi6	T	+	+	-	-	-	+	T	-	+	+	T	+	+	+	T	T	NA	T	NA	-
phi7	T	+	T	T	-	T	T	T	+	+	+	NA	+	+	+	NA	T	T	T	+	T
phi8	T	+	T	-	+	-	T	T	+	+	+	+	+	+	+	T	+	T	T	T	T
phi9	-	+	-	-	+	-	-	T	-	+	+	+	+	+	+	NA	T	T	+	T	T
phi10	T	+	-	-	-	-	+	T	NA	-	+	NA	-	+	+	NA	T	T	+	T	T
phi11	-	+	+	-	NA	+	NA	T	NA	-	+	T	+	+	+	NA	T	+	+	T	T
phi12	T	+	+	-	NA	-	+	T	NA	NA	+	T	+	+	+	+	T	NA	NA	T	T
phi13	T	T	-	-	+	T	+	T	+	NA	NA	NA	T	+	+	NA	NA	NA	NA	+	+

Résumé de résultats obtenus sur trois observations. Les numéros de la colonne de gauche correspondent aux phages individuels (phi) et la ligne du haut aux souches bactériennes sur lesquelles ils ont été testés. + : claire, - : pas de plaque, T : turbide, NA : non analysable ou résultats différents lors de tests répétitifs.



**Figure 3.1.1.1.** Histogramme du spectre lytique propre à chaque phage.  
Le nombre de souches sensibles est exprimé en pourcentage du nombre total de souches testées.

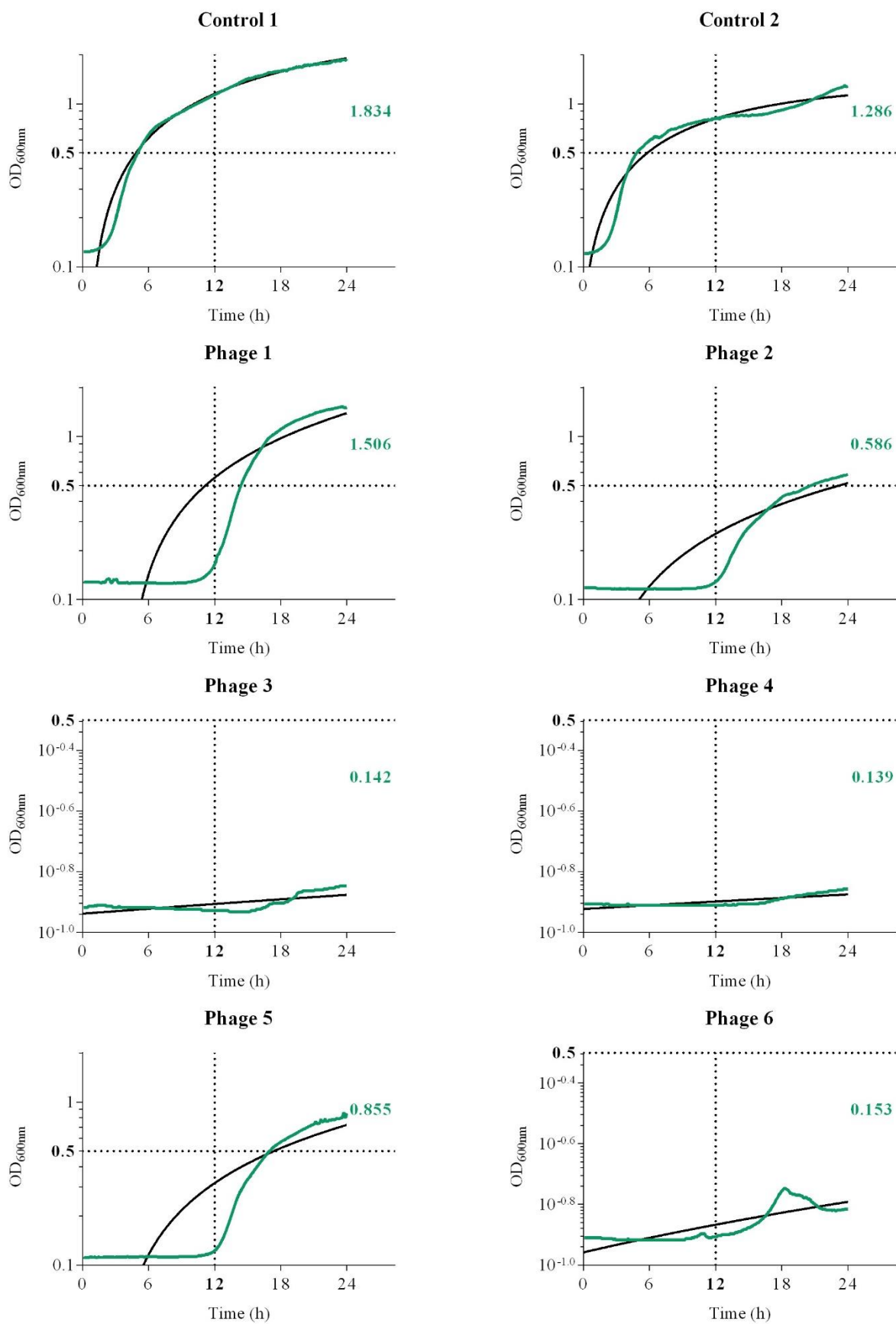
**Tableau 3.1.1.2.** Souches présentant des difficultés d'analyse

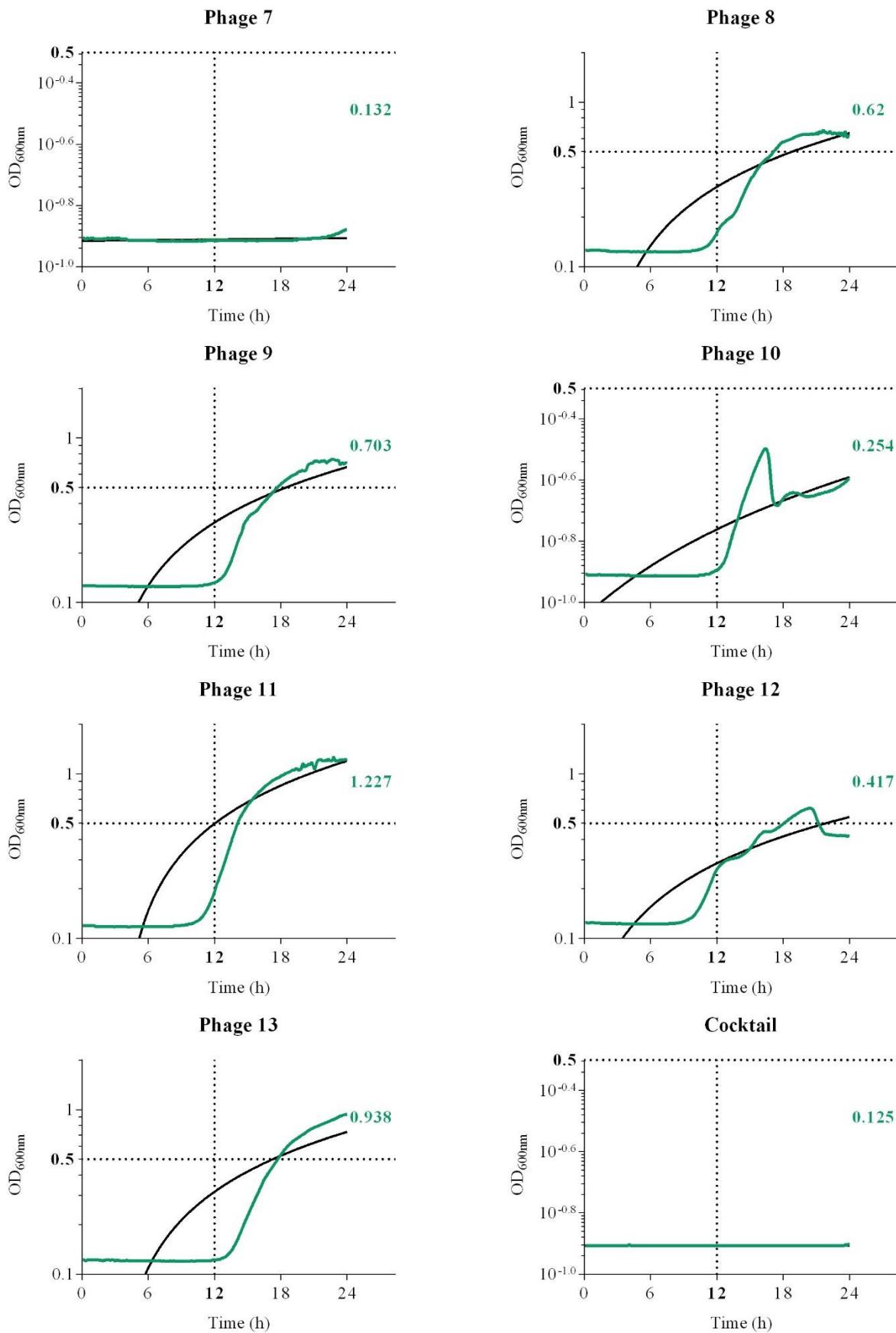
Souches	Remarques
28	Pigmentation brune diffuse
224, PA7	Aucune plaque de lyse évidente, quelques points clairs épars
74, 102, 112, 198, 247, 274, 393	Plaques de lyse en dehors des zones de drop
219, 398, 3292, CHA	Réaction mucoïde
UR1156	Plaque de couleur rouge avec odeur rance
PAO1.B5	Souche non disponible au moment de l'expérience

### 3.1.2. Mesure de croissances bactériennes sur 24 h sous pression bactéricide

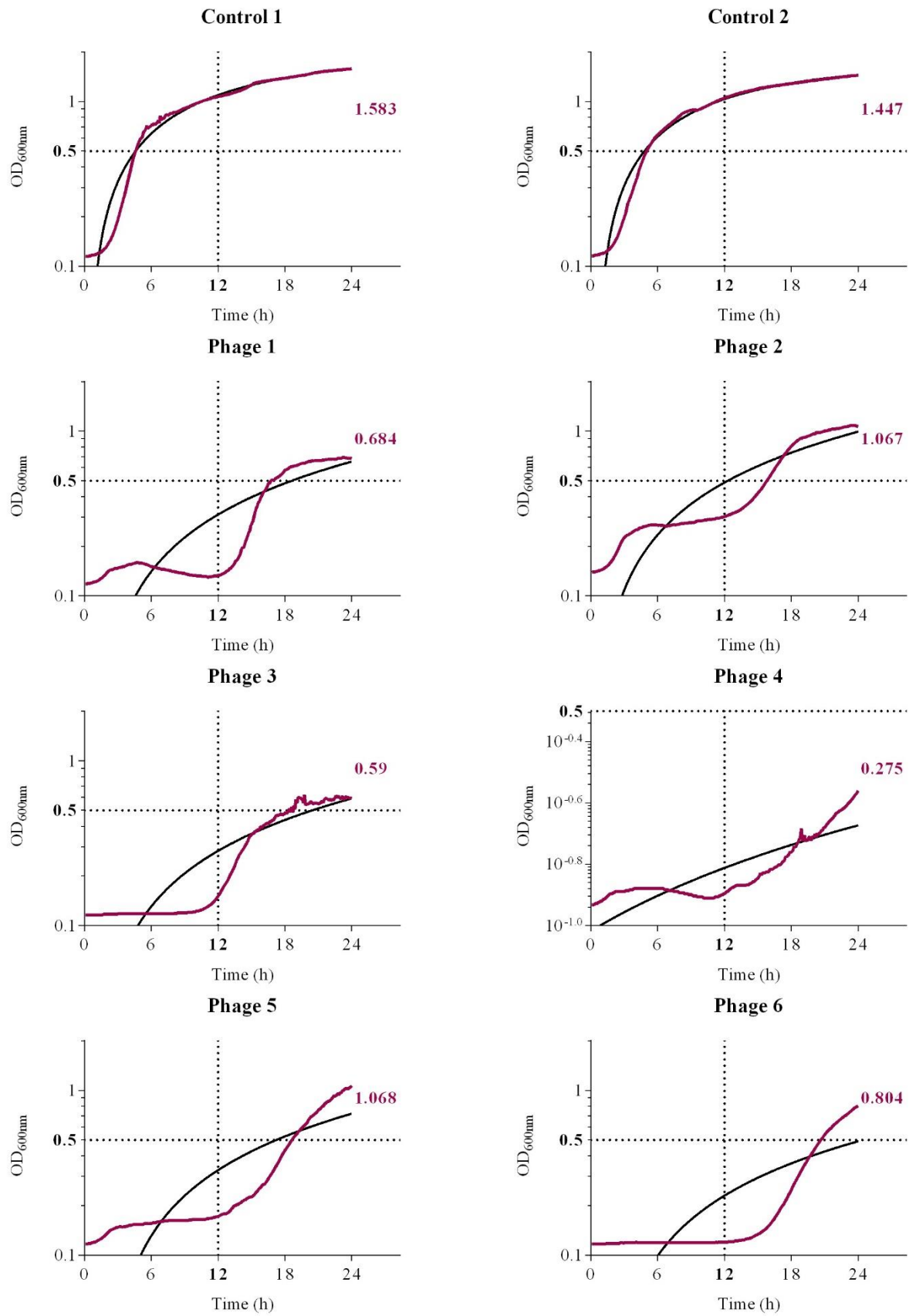
Les courbes de croissance (Figures 3.1.2.1 et 3.1.2.2, pour PAO1 et PA14, respectivement) sont significativement différentes selon que les bactéries sont soumises aux contrôles (tampon SM buffer et surnageants sans phage) ou aux phages. Effectivement, le début de la phase exponentielle de croissance est bien plus précoce pour les contrôles et cela indépendamment de la souche considérée (2 h versus 12 h, pour les contrôles et environ 12 h pour les groupes phages). Cependant, alors que la souche PAO1 n'arrive pas à se développer en présence des phages 3, 4, 6, 7 et du cocktail, la souche PA14 n'est affectée durablement dans sa croissance que par le cocktail. Finalement, les courbes avec cocktail frappent de par leurs similarités entre les deux souches. Elles ne présentent pas de réel potentiel exponentiel et semblent relativement stables au cours du temps de mesure.

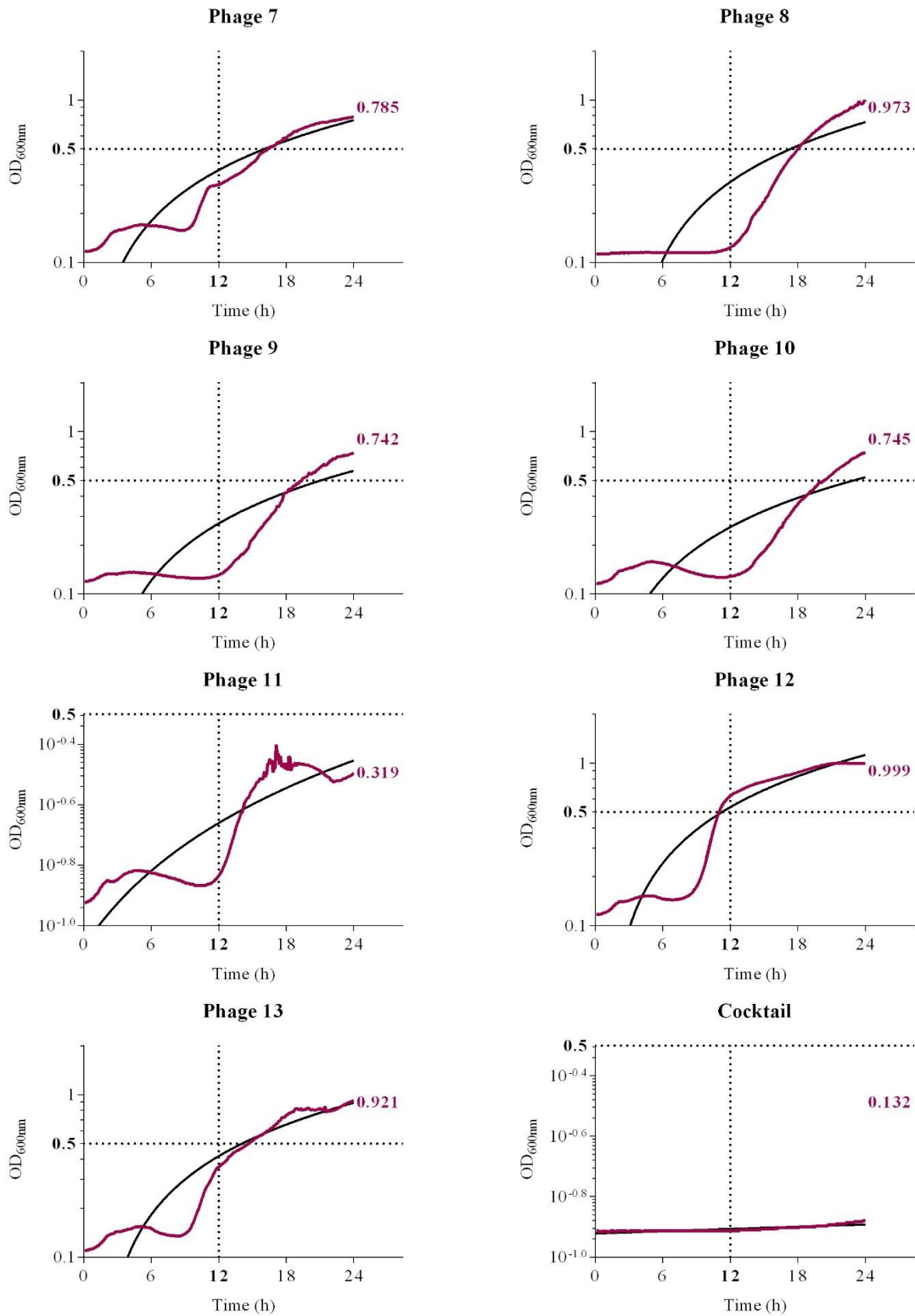






**Figure 3.1.2.1.** Croissance *in vitro* de PAO1 avec contrôles et avec phages. L'axe Y retrouve les valeurs d'absorbance (OD<sub>600nm</sub>) notées en anti-log lorsqu'elles se situent entre 0.1 et 2.0 et en puissance de 10 lorsqu'elles n'excèdent pas 0.5. Les traits-tillés représentent 0.5 nm d'absorbance sur l'axe Y et +12 h post-incubation sur l'axe X. Les courbes turquoise et noires illustrent la croissance bactérienne et la tendance de celle-ci, respectivement. Les chiffres turquoise indiquent l'OD<sub>600nm</sub> dans les puits à Time = 24 h (fin de l'expérience). Control 1 : SM buffer. Control 2 : surnageant. Cocktail : les 13 phages ensemble.





**Figure 3.1.2.2.** Croissance *in vitro* de PA14 avec contrôles et avec phages. L'axe Y retrouve les valeurs d'absorbance ( $OD_{600nm}$ ) notées en anti-log lorsqu'elles se situent entre 0.1 et 2.0 et en puissance de 10 lorsqu'elles n'excèdent pas 0.5. Les traits-tillés représentent 0.5 nm d'absorbance sur l'axe Y et +12 h post-incubation sur l'axe X. Les courbes fuchsia et noires illustrent la croissance bactérienne et la tendance de celle-ci, respectivement. Les chiffres fuchsia indiquent l' $OD_{600nm}$  dans les puits à Time = 24 h (fin de l'expérience). Control 1 : SM buffer. Control 2 : surnageant. Cocktail : les 13 phages ensemble.

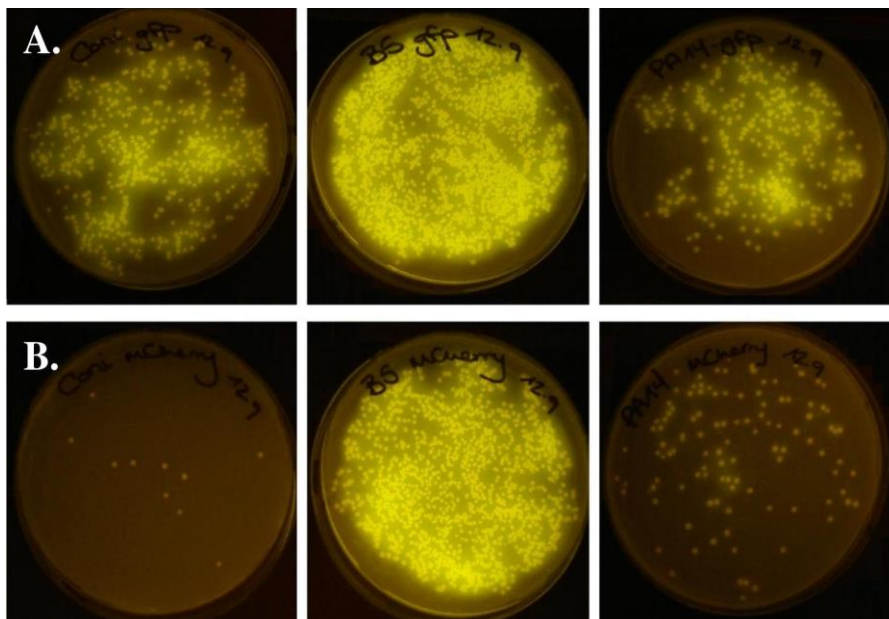
### 3.2. Production de souches de *P. aeruginosa* bioluminescentes pour analyse microscopique de l'interaction bactérienne avec la peau dans un modèle *ex vivo*

Les résultats de l'extraction de plasmides sont montrés dans le Tableau 3.2.1. Les concentrations et les rapports de pureté sont tout à fait satisfaisants ( $260/280 = 1.8$  : pur pour ADN.  $260/280 = 2.0$  : pur pour ARN.  $260/230 = 2.0-2.2$  : pur pour acides nucléiques, Thermo Scientific®, NanoDrop Products). Comme le montre la Figure 3.2.1, la spectrofluoroscopie UV montre une fluorescence des colonies transformées contenant les FPs contrairement aux contrôles négatifs, transfectés uniquement avec le plasmide pUX-BF13 (résultats non montrés pour cette technique, voir contrôles négatifs en microscopie à fluorescence, Figures 3.2.2 et 3.2.3). De plus, pour un même intervalle de longueurs d'onde UV (100-400 nm), le rendu de luminescence entre les deux FPs est légèrement différent (couleur légèrement rosée pour les mCherry, Figure 3.2.1.B).

La Figure 3.2.2 montre plus précisément l'expression de la fluorescence dans les souches PA14-c-mCherry, PAO1-c-mCherry et PAO1.B5-c-mCherry en comparaison des contrôles non transformés. Bien que des résultats encourageants aient été observés sous spectrofluoroscopie UV (Figure 3.2.1.B), les transformants GFP-2 n'ont pas donné de résultats concluants sous microscopie à fluorescence comme le montre la Figure 3.2.3. Effectivement, une fluorescence très faible a été observée pour les trois souches (résultats non montrés pour PAO1.B5-c-GFP-2 et PA14-c-GFP-2).

**Tableau 3.2.1.** Résultats de la purification de plasmides.

Plasmide	Concentration [ng/μL]	Ratio 260/280	Ratio 260/230
pUX-BF13	206.2	1.7	1.78
GFP-2	456.7	1.87	2.26
mCherry	228.4	1.91	2.02

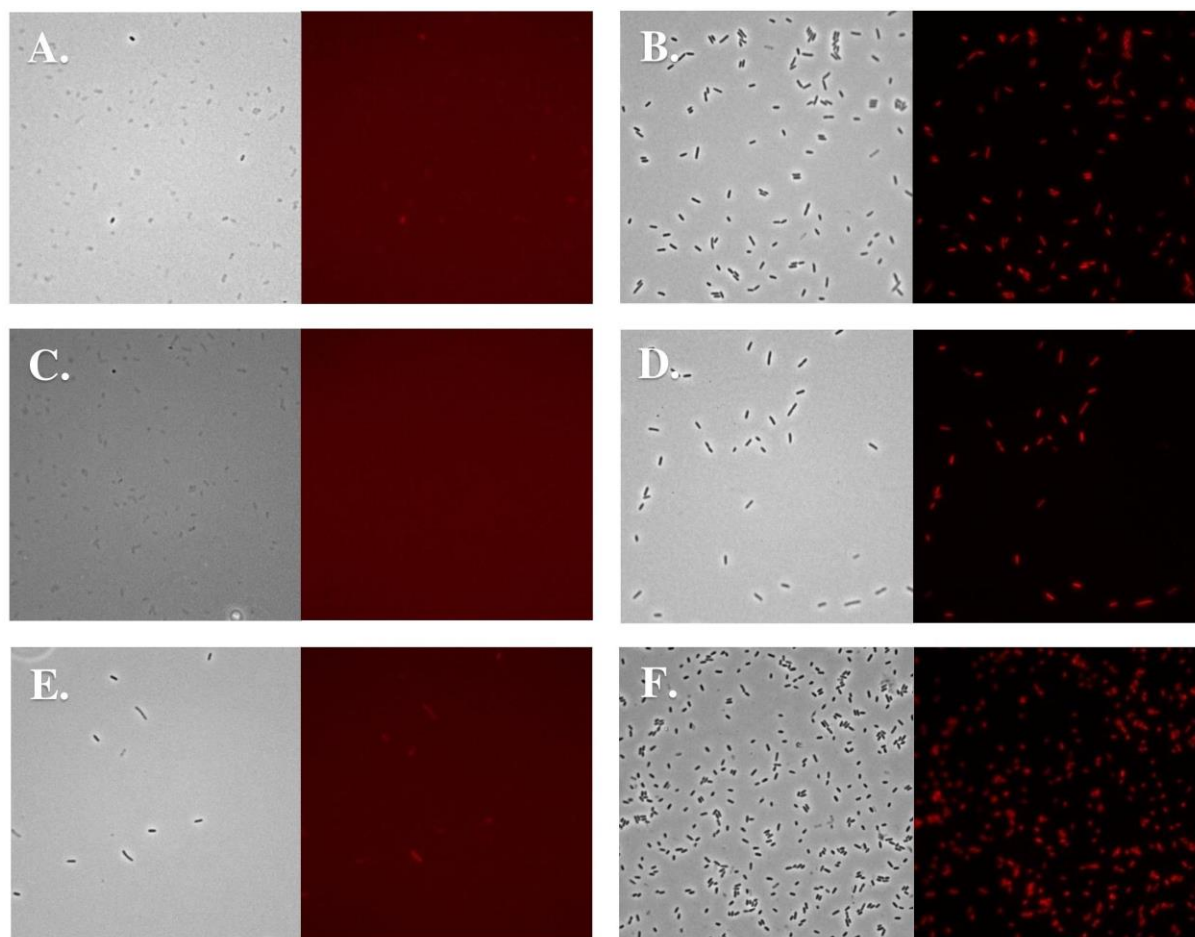


**Figure 3.2.1.** Spectrofluoroscopie des transformations.

**A.** De gauche à droite, PAO1-c-GFP-2, PAO1.B5-c-GFP-2, PA14-c-GFP-2.

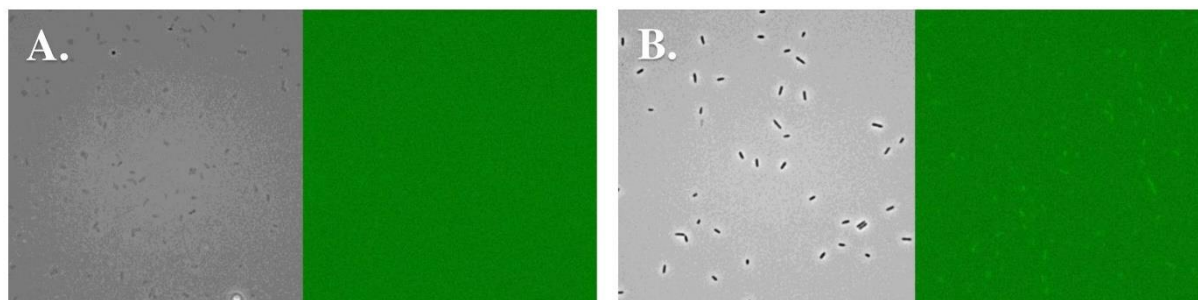
**B.** De gauche à droite, PAO1-c-mCherry, PAO1.B5-c-mCherry, PA14-c-mCherry.





**Figure 3.2.2.** Microscopie à fluorescence des transformations mCherry.

Acquisition Ph (à gauche) et DsRed (à droite) **A.** de PA14 WT, **B.** de PA14-c mCherry, **C.** de PAO1 WT, **D.** de PAO1-c mCherry, **E.** de PAO1.B5 WT et **F.** de PAO1.B5-c mCherry.



**Figure 3.2.3.** Microscopie à fluorescence des transformations GFP-2. Acquisitions Ph (à gauche) et GFP (à droite) **A.** de PAO1 WT et **B.** de PAO1-c GFP-2 (deux spots différents de la même lame)

### 3.3. Culture *ex vivo* de peau humaine et tests préliminaires

#### 3.3.1. Préparation et évaluation de la viabilité des échantillons

Des échantillons de peau ont été acquis par quatre fois dans le temps imparti. La provenance de la peau et les résultats obtenus sont résumées de manière succincte dans le Tableau 3.3.1.1. De manière récurrente, une contamination de la peau s'est présentée initialement à la périphérie de l'échantillon (Annexe A.5). Le processus infectieux et nécrotique a été laissé par plusieurs fois se dérouler. Au final, le constat a toujours été le même : un détachement net de l'épiderme du derme sous-jacent. Ce phénomène a été également décrit par Coolen N.A. *et al* (58).

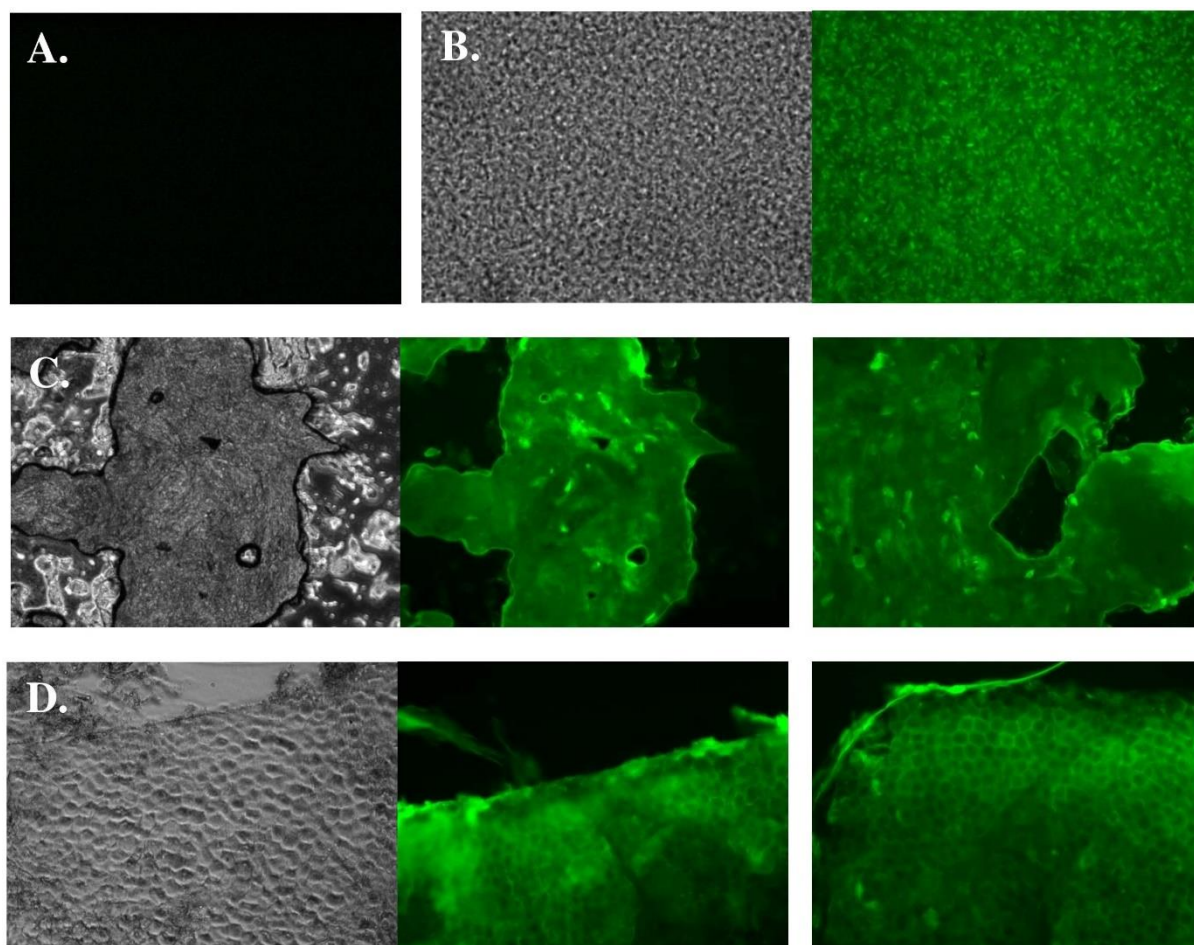
**Tableau 3.3.1.1.** Résumé des essais menés

Essais	Remarques particulières	Observations
Essai n°1 : abdominoplastie	La peau a été prédécoupée en salle d'opération, la majeure partie du pannicule adipeux laissée en place.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pas de contamination observée le jour suivant l'application du protocole.</li> <li>2. Contamination observée à la périphérie des échantillons au jour 5.</li> </ol>
Essai n°2 : abdominoplastie	Le morceau de peau a été divisé en deux et gardé ON à Epalinges dans du DMEM sans supplément.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La plupart des échantillons été contaminés le jour suivant l'application du protocole.</li> <li>2. Certains milieux de culture ont pris une couleur jaune.</li> </ol>
Essai n°3 : mammoplastie	La peau était fine sans pannicule adipeux.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Les échantillons été contaminés le jour suivant l'application du protocole.</li> <li>2. La périphérie de la peau a été recouverte par le milieu de culture.</li> </ol>
Essai n°4 : abdominoplastie	La peau a été nettoyée et découpée au CHUV dans des conditions non stériles. Les petites boîtes de Petri ont été enfermées dans des plus grandes avant d'être placées dans l'incubateur.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pas de contamination observée le jour suivant l'application du protocole.</li> <li>2. Le milieu de culture se retrouvait par endroit sur les échantillons de peau.</li> </ol>

### 3.3.2. Microscopie et immunohistochimie des échantillons : appréciation *ex vivo* des bactéries fluorescente

La Figure 3.3.2.1 expose les acquisitions de la peau et de la souche PAO1-c GFP-2 obtenues au microscope à fluorescence. Le milieu de culture n'a pas montré de signal luminescent à l'inverse des bactéries dont la fluorescence est confirmée. Les cellules et le tissu épithéliaux affichent une fluorescence spontanée dont la nuance se rapproche fortement de celle des bactéries GFP-2. Il n'a pas été possible d'isoler une zone particulière qui aurait pu montrer *P. aeruginosa* en contact étroit avec l'épithélium.

En ce qui concerne l'immunohistochimie, un protocole inadapté construit pour des sections de paraffine a servi de base et il en a résulté une destruction progressive et totale du tissu fixé sur lame. Brièvement, les échantillons ont été réhydratés avec de l'eau distillée puis lavée une fois rapidement puis deux fois pendant 5 min dans du PBS 1x. Elles ont été ensuite immergées durant 10 min dans du PBS 1x concentré avec du Triton X-100 0.1%. Après, les lames ont été déposées au microonde (10 min, 600 W) dans un bain de Tris-EDTA (pH 9.0). A la sortie de l'appareil, elles ont été lavées avec du PBS 1x (une fois rapidement puis deux fois 5 min). Les préparations ont finalement été plongées dans du PBS 1x avec du Bovine Serum Albumin (BSA) 1% 30 min. Cette dernière étape a conclu la manipulation, la majorité du tissu s'étant détachée de la lame. Par manque de temps et de ressources, l'expérience n'a pas été réitérée.



**Figure 3.3.2.1.** Microscopie à fluorescence de PAO1-c GFP-2 et de la peau.

**A.** Acquisition GFP du milieu de culture (DMEM + 10% FBS + 1% L-Glut).

Acquisitions Ph et GFP **B.** de PAO1-c GFP-2, **C.** d'une cellule épithéliale et **D.** du tissu épithélial.



## 4. Discussion

---

Ce travail confirme une première observation faite précédemment dans diverses études, des phages dirigés contre une même espèce bactérienne possèdent des spectres d'hôtes plus ou moins larges (23, 28). Cette observation, à elle seule, suffit à expliquer l'un des intérêts à développer des cocktails de bactériophages couvrant une plus large proportion de souches circulantes qu'une préparation monophagique. Effectivement, le bactériophage au plus large spectre dans ce travail (phage 4) ne couvrait « que » 62% des souches testées alors que le cocktail Pherecydes en touchait plus de 90% (Figure 3.1.1.1). Ce point est particulièrement crucial dans le cadre du développement d'essais cliniques modernes nécessitant d'inclure un nombre important de patients. Effectivement, plus la préparation de phages utilisée couvre de souches, plus les chances d'inclure des patients sont grandes. Ainsi, l'étude *in vitro* du spectre d'hôtes est importante avant tout essai clinique afin d'assembler au mieux les cocktails et cette étude confirme le bien-fondé de l'assemblage fourni par Pherecydes Pharma. Cependant, cette observation n'enlève en rien le potentiel intérêt de la monophagothérapie dans le cadre d'une médecine personnalisée.

Une autre observation très importante est le fait qu'en dehors de deux souches (10 et 253), la totalité était lysée efficacement (plages de lyse claire) par un phage ou plus. Cela suggère que dans le cadre de la mise en place d'une banque de bactériophages, il est attendu à ce que, dans la majorité des cas, un phage efficace puisse être fourni au clinicien. De plus, il est intéressant de relever que des BMR (voir souches cliniques du Tableau 3.1.1.1) insensibles à un ensemble d'antibiotiques dont la colistine étaient sensibles à plus d'un phage du cocktail. Ceci pose la question du potentiel traitement de sauvetage qu'aurait pu représenter le cocktail de phages pour le patient grand brûlé décédé en raison d'une infection de plaie devenue systémique par la souche de *P. aeruginosa* MI1125 2044. Cependant, les résultats démontrent également que, potentiellement, des bactéries intrinsèquement résistantes à la grande majorité des phages disponibles circulent (souche 141 par exemple). Cette observation confirme celle faite par Pherecydes Pharma qui rapporte un taux de 4% de résistants sur une collection de >600 souches pour le cocktail. Ceci est d'ailleurs valable pour d'autres espèces bactériennes : à ce jour, il n'a pas été possible d'isoler de phage actif contre la souche USA300 de *Staphylococcus aureus* (DMF, UNIL). Ainsi, tout comme l'antibiothérapie, la phagothérapie a ses limites qui sont confirmées dans ce travail et représente, à ce titre, une thérapie complémentaire et non pas alternative.

En parallèle de la résistance intrinsèque démontrée par l'absence de plages de lyse, la sélection naturelle de clones ayant acquis des résistances par mutation spontanée sous la pression de sélection des phages semble être universelle comme le démontre les résultats en culture liquide des souches PAO1 et PA14. Leur utilisation présente en effet plusieurs avantages. D'abord, la plupart des laboratoires utilisent un nombre limité de souches de *P. aeruginosa* dont PAO1 et PA14 (60). La première est devenue une référence tant au niveau de son génome, totalement séquencé, que par le fait qu'elle est utilisée depuis de nombreuses années (60). La deuxième est un isolat clinique humain qui possède un large spectre infectieux. Plus virulente que PAO1 (61, 62), elle est capable d'infecter de nombreux hôtes et environnements. Elle a notamment servi dans des modèles de brûlure sur les souris (60). Leur emploi trouve raison car ce sont des souches cliniques à l'origine très bien caractérisées aujourd'hui (13, 60, 61), également utilisées pour l'isolement de phages (15). Après, le phénotype mucoïde serait inexistant chez PAO1 et PA14, leurs biofilms n'étant pas nécessairement dotés d'alginate (63). Ceci accroît certainement la capacité d'infectivité des phages. De plus, les souches non mucoïdes sont prédominantes dans la nature (63), d'où un intérêt de plus à les étudier. Finalement, les

souches PAO1 présentées en laboratoire seraient exemptes de prophages (3), entités capables d'interférer grandement dans les manipulations.

Comme souhaité, les contrôles négatifs des expériences conduites dans ce travail ne semblent pas avoir de phage, laissant la croissance des bactéries se dérouler, a priori, normalement. Le timing et la route d'administration ainsi que la concentration initiale et le type de phages sont connus pour avoir un effet (17, 18, 39). Par exemple, des virus rajoutés trop vite dans une culture risquent de se dégrader à cause de leur stabilité intrinsèque vis-à-vis du milieu avant de pouvoir infecter car le taux de bactéries est encore insuffisant (39, 64). Dans cette expérience, les phages ont été administrés tout de suite avec une MOI de 1.0 même si, généralement, un nombre supérieur de phages est recommandé pour une bonne propagation infectieuse (4). Cela dit, il est supposé qu'une MOI initialement haute, à moins qu'elle soit très significative (i.e. de l'ordre de 100-1000), n'influence pas tant au bout du compte sur l'efficacité des phages (8). Pour compléter la manipulation, il aurait pu être essayé d'administrer les phages à différents temps afin de juger de leur efficacité en fonction de la maturation bactérienne.

Dans la majorité des cas, une « repousse » bactérienne a lieu aux environs de 12 h. Ce phénomène, très largement décrit dans la littérature (8, 11, 22), traduit l'émergence et l'expansion de clones porteurs de mutations acquises (11, 22). Ceci est surtout vrai pour les souches de *P. aeruginosa*, versatiles et capables d'opérer des mutations rapides de leurs récepteurs (4) et d'enclencher leurs divers mécanismes de résistance comme de diminuer la virulence ou de créer un biofilm (8, 9, 12). Ceci dit, d'autres études *in vitro* (21, 22) ont montré que les phages peuvent subir une sélection naturelle qui amène à l'émergence d'une population virale hétérogène dans le but de s'adapter et de contrecarrer les résistances bactériennes. Il est très intéressant d'observer que cette repousse ne s'opère pas sur la durée considérée (24 h) en présence du cocktail des 13 phages. Ce résultat soutient un second intérêt des cocktails avancés précédemment qui serait de prévenir l'apparition de clones résistants (11) et d'opérer ainsi un biocontrôle (22), c'est-à-dire de descendre et de garder le taux de bactéries assez bas et de manière stable. Il a été prouvé que les phages n'ont pas la même efficacité *in vitro* et *in vivo* (21, 39) et il n'était pas attendu à ce que les phages éliminent la totalité des bactéries au vu de leurs caractéristiques. Ainsi, une alliance avec effet additif ou synergique entre les virus et le système immunitaire du patient ou les antibiotiques est tout à fait concevable (65), les phages ne montrant pas d'interaction directe avec les médicaments (4, 19, 23). À noter qu'il n'est pas exclu que trop de phages dans un cocktail mène à des effets collatéraux (« bystander effect », i. e. un impact sur des microorganismes non ciblés à la base comme la flore endogène). Ceci dit, ces effets seraient très probablement moins importants qu'avec des antibiotiques (25, 28).

Finalement, il a été montré que l'ajout successif de phages présentant des spectres d'hôtes différents et donc, potentiellement, des mécanismes différents, diminuait le taux de résistance bactérienne (28, 66, 67). Ceci s'explique par le fait qu'il est très rare (la fréquence de mutation étant très faible) pour une bactérie d'acquérir plusieurs mutations modifiant plusieurs cibles (récepteurs par exemple) indispensables à l'infection par plusieurs phages. Dans le laboratoire (DMF, UNIL), des fréquences de mutations de l'ordre de  $10^{-8}$  ont été déterminées pour certains mutants PAO1. Ceci signifie que l'accumulation de deux mutations à la même fréquence ne se produit que dans un clone sur  $10^{16}$ . En partant d'une concentration moyenne de  $10^9$  CFU/ml dans une culture bactérienne ON, un double-mutant dans  $10^7$  ml pourrait potentiellement être observé. Au vu de cette quantité, les expériences réalisées ici dans 300  $\mu$ l ne permettent sans doute pas de voir apparaître des bactéries présentant plusieurs mutations acquises et qui résisteraient à tous les phages du cocktail. Néanmoins, la possibilité d'émergence de tels mutants ne peut jamais être exclue.

Les phénotypes présentés dans le Tableau 3.1.1.2 ainsi que les thématiques de la fluorescence et de l'imagerie cellulaire (Chapitre 3.2) sont discutés en annexe, les résultats obtenus ne concernant pas directement les objectifs de ce travail.

La mise au point d'un modèle de peau *ex vivo* s'est heurtée à deux problèmes principaux : la disponibilité des échantillons et la contamination. L'utilisation de peaux animales aurait peut-être fourni une disponibilité plus importante. Les rongeurs sont parmi les plus utilisés dans l'établissement de modèles, comme atteste la littérature (17, 25, 58). Cela dit, en matière de réparation de plaie, ces animaux utilisent un processus dit de contraction tandis que la peau de porc et d'humain passent par un processus de restauration (58).

Dans le contexte de Phagoburn, qui intéresse la brûlure comme lésion chez l'Homme, un modèle *ex vivo* de peau humaine, au plus proche de la réalité, semble être l'idéal pour l'étude de la contamination et du soin. De plus, un tel modèle respecte parfaitement la règle des trois R à savoir : substitution, réduction et amélioration (Replacment, Reduction, Refinement, respectivement, NC3Rs Gibbs Building©). Malgré tout, quelle que soit l'origine animale des modèles, la plupart manque invariablement de divers cellules et facteurs systémiques (58) ce qui compromet l'étude du microbiote et du microbiome (i. e. collection de microorganismes et de génomes microbiens dans un environnement défini, respectivement) (31).

La contamination pouvait survenir en pré- comme en post-inoculation bactérienne malgré une application rigoureuse du protocole de préparation et de lavage. Quant aux conditions de conservations des échantillons, le transport entre les différents incubateurs et les salles de culture cellulaire, partagés par ailleurs au sein du laboratoire, n'était pas optimal et a contribué à augmenter le risque de contamination. Afin de contourner ce problème, les plus petites boîtes de Petri ont été renfermées dans des plus grandes, ce qui a permis d'en diminuer le taux, notamment fongique, les premiers jours suivant la préparation et le lavage des échantillons. Cela dit, une contamination périphérique survenait fréquemment à partir du troisième jour sur les modèles inoculés avec *P. aeruginosa*. Cette bactérie est une des rares à conférer un pouvoir motile à ses pili, sans compter que les Gram-négatifs sont dotés d'une flagelle caractéristique qui assure leur mobilité (2). Ceci peut expliquer que les bactéries inoculées sur la peau se meuvent sur la surface épithéliale en direction du milieu de culture, riche en nutriments, et contaminent ainsi la périphérie de l'échantillon. Des précautions particulières, comme le fait d'éviter d'immerger les bords de l'épiderme dans le milieu, se sont montrées insuffisantes dans la plupart des cas. Peut-être que des échantillons de plus grande taille auraient été plus adaptés au modèle. De plus, l'incorporation de matrices de collagène comme support aurait pu servir comme couche supplémentaire pour éviter la contamination épidermique. En effet, le collagène est maintenant utilisé depuis de nombreuses années pour une multitude d'applications biomédicales et il peut être envisagé de l'employer comme matrice pour des systèmes de culture cellulaire (55, 68). Par contre, un tel modèle se verrait également limité si le milieu venait à être contaminé car *P. aeruginosa* a déjà démontré sa capacité à dégrader le collagène via ses diverses protéases (69, 70).

Le derme est critique pour la maintenance et la régulation de l'épiderme et l'épaisseur laissée en place va jouer un rôle dans la survie des échantillons. La destruction de différentes structures et fibres de collagène lors de la préparation peut expliquer en partie la mauvaise évolution des échantillons.

Sur la Figure 3.2.2, le milieu de culture ne montre pas de signal, ce qui indique, qu'a priori, il n'était pas contaminé par les bactéries GFP-2 ou d'autres éléments fluorescents. Dans la plupart des organes, la peau ne faisant pas exception, les cellules expriment une autofluorescence spontanée, surtout dans le spectre visible (71). Les molécules responsables vont de simples métabolites à des composants structurels comme le collagène et l'élastine. En effet, ces deux derniers possèdent des longueurs d'onde d'excitation/émission de 470-520/442 nm (55, 71) (pour rappel, les pics d'excitation/émission de GFP : 488/507 nm). Ainsi, la peau fluoresce volontiers dans le spectre vert et contamine ainsi le signal de GFP. Ce fait peut potentiellement limiter l'utilisation de cette FP comme attestent les images de la Figure 3.2.2 par chevauchement de fluorescence (48, 71). D'ailleurs, de nombreux articles cités par Hoffman R.M. (48) relatent les obstacles quant à l'utilisation de GFP comme le fait qu'elle peut être

utilisée uniquement pour l'observation de phénomènes superficiels et que l'autofluorescence dans la fenêtre spectrale du bleu-vert résulte en un ratio signal/bruit faible, ce d'autant que les longueurs d'onde sont courtes (i.e. 300-600 nm). Ceci dit, à l'aide d'instrumentation et de divers techniques (48, 55), il est possible de contrecarrer ces limitations. Ci-dessous est présentée une liste non-exhaustive et simplifiée de quelques techniques qui peuvent permettre de différencier et d'isoler la fluorescence de GFP de celle du tissu. Plus de précisions sur le sujet sont traitées dans la littérature (55, 71). D'abord, l'utilisation de filtres appropriés pour l'excitation en question peut permettre d'annihiler l'autofluorescence (48, 55). Après, il existe des techniques dites de séparation. La dual-wavelength differential fluorescence correction correspond à de l'imagerie spectrale (71) et exploite le fait que le spectre entre l'excitation et l'émission de l'autofluorescence est plus large que celui de GFP. Ainsi, pour discriminer les deux émissions, il est possible d'utiliser, soit deux longueurs d'onde pour exciter et capter le signal d'une seule, soit exciter avec une longueur d'onde et mesurer la double émission. La fluorescence polarization est basée sur l'observation que GFP produit une fluorescence polarisée (i.e. que les photons du champ électrique sont alignés dans une même direction) lorsqu'excitée par une lumière plane polarisée. Ce qui est intéressant avec cette technique, ce qu'elle repose sur une propriété de la lumière autre que la longueur d'onde et permet ainsi de différencier l'autofluorescence de GFP lorsque celles-ci ont des propriétés spectrales très similaires. Finalement, on peut encore mentionner l'utilisation de logiciels d'analyse d'images afin d'ajuster en post-acquisition. L'autofluorescence diminue dans les longueurs d'onde se rapprochant du spectre rouge (49). Subséquemment et bien que la détection de la fluorescence est moins bonne que pour GFP, l'utilisation de FPs telles que mCherry peut s'avérer très pratique pour de multiples applications (46), y compris celles entreprises dans ce travail. En outre, plus les longueurs d'onde sont grandes et plus elles permettent d'effectuer une imagerie de profondeur (49), ce qui est un avantage supplémentaire pour les descendantes de DsRed. L'échec de l'IHC s'explique en grande partie par l'usage d'un protocole inadapté. L'utilisation du PAF 4% et la sédimentation dans le sucrose étaient tout à fait justifiées. Le PAF est utilisé depuis longtemps maintenant afin de fixer le tissu (72, 73) en bloquant les procédés enzymatiques et l'autolyse cellulaire. Il permet, en liant les protéines les unes avec les autres, de créer une matrice insoluble qui piège les acides nucléiques ainsi que les composés glucidiques et lipidiques. Ces derniers ne sont pas altérés chimiquement avant plusieurs semaines d'immersion dans le produit (72) alors qu'il suffit de 24 h au PAF pour lier les protéines ensemble. Le fait de laisser le PAF en ON à 4°C (versus RT) ne semble pas être un facteur déterminant pour la morphologie cellulaire ou pour l'IHC (73). Le sucrose extrait l'eau des échantillons afin de prévenir la formation de cristaux de glace lors de la congélation qui abîmeraient les cellules du tissu. L'étape de la réhydratation est importante car une fixation excessive de l'échantillon peut résulter en un masquage des épitopes et en bruits non spécifiques (R&D Systems©, Inc., Bio-Techne) lors de l'application d'anticorps. Toujours dans ce même but, le Tris-EDTA a été utilisé pour délier les protéines et c'est probablement cette étape qui a été fatale aux tissus. Ce détergent peut se montrer très agressif envers les sections issues du cryostat qui y sont beaucoup plus sensibles que celles embaumées dans de la paraffine. Afin d'éviter l'endommagement, il aurait été nécessaire de raccourcir le temps d'incubation à 2-5 min (R&D Systems©, Inc., Bio-Techne).

Si le temps et les ressources l'avaient permis, un protocole utilisant des lames recouvertes de gélatine (gelatin-coated slide) aurait été expérimenté. Les sources (R&D Systems©, Inc., Bio-Techne) expliquent qu'après le découpage au cryostat des échantillons fixés dans l'O.C.T., il est avisé de déposer le produit sur des lames enveloppées dans un composant adhésif dont il en existe plusieurs variétés, la gélatine étant le plus souvent utilisée pour l'histologie. Après séchage (30 min, 37°C), la section de tissu est plus assurée d'être retenue sur la lame lors du lavage et de la préparation au marquage IHC.

## 5. Conclusion et perspectives

---

Ce travail a mis en évidence l'efficacité *in vitro* des phages sur deux souches bactériennes de *P. aeruginosa* connue pour ses multirésistances aux antibiotiques. Il s'inscrit en ce sens dans bon nombre d'études qui arrivent aux mêmes conclusions (8, 21, 28, 39) et notamment dans le cadre du projet européen multicentrique Phagoburn. La phagothérapie est seulement aux prémices de sa compréhension et de son application d'où le besoin de multiplier les travaux sur des modèles de plus en plus intégratifs de la complexité du vivant et de l'interaction phage-bactérie. Ce deuxième point représente l'un des défis majeurs à relever aujourd'hui et peut s'appuyer sur le développement continu d'outils tels que la génomique. La mise au point de modèles représentatifs, stables et standardisés se heurte à des difficultés nombreuses et variées qui découlent surtout de la pathologie étudiée ainsi que des voies d'inoculation bactérienne et d'administration phagique.

Les expériences menées ici ambitionnaient d'amener des concepts supplémentaires et complémentaires à la littérature sur la question à l'aide d'échantillons de peau humaine. Ceci est un élément considéré comme pertinent dans le cadre de la phagothérapie et de Phagoburn qui, au bout du compte, visent à soigner les infections bactériennes de patients.

L'établissement d'un modèle de peau humaine *ex vivo* pourrait offrir une toute nouvelle voie pour l'étude du microbiome et du microbiote tout en respectant la règle des trois R. Néanmoins, il s'avère très difficile de contrer les nombreuses limitations de tels concepts qui, au final, ne représentent qu'une réalité partielle. En effet, ce type de modèle manque principalement de facteurs systémiques et d'un système immunitaire propre qui jouent un rôle certain dans la viabilité de la peau ainsi que dans les processus infectieux et de guérison. A contrario, les modèles animaux offrent une caractérisation assez objective de ces processus *in vivo* tout en permettant une application topique qu'intraveineuse des microorganismes d'intérêt et restent, en ce sens et malgré tout, une optique absolument pertinente et valable pour l'exploration des points traités dans ce travail.

Les progrès de l'imagerie cellulaire et du marquage IHC des éléments étudiés poussent à réfléchir sur une utilisation plus optimale et adaptée des nombreux FPs et anticorps dans les modèles conceptualisés. Dans le cas d'expériences qui porte sur le mouvement infectieux dans des échantillons de peau *ex vivo*, des installations spéciales du microscope et de la culture peuvent être imaginées afin de pouvoir observer la progression en temps réel. De plus, ces dispositions n'excluent aucunement une combinaison avec une IHC périodique. Ainsi, les éventuelles informations apportées dans ce cadre semblent essentielles à la compréhension de nombreux objets discutés ici. Par extension, l'application d'un traitement (phages ou antibiotiques) dans un tel modèle pourrait permettre, entre autres, des analyses qualitatives et semi-quantitatives des remaniements tissulaires et de l'efficacité thérapeutique, respectivement, cette dernière intéressant spécialement Phagoburn.

Ainsi et malgré la publication croissante d'études dans le domaine des phages et de la phagothérapie, d'innombrables pistes restent encore à explorer tant au niveau des interactions entre les virus et les bactéries qu'au niveau des modèles d'étude pertinents et informatifs. Les évidences acquises à ce jour confirment le potentiel complémentaire des phages pour le traitement d'infections bactériennes et la capacité des virus à combattre des souches devenues résistantes aux antibiotiques. Finalement, une étude menée par Selezska *et al.* (15) a montré que les souches cliniques de *P. aeruginosa* tendent à être particulièrement susceptibles à la lyse par les phages, offrant des perspectives futures encourageantes ainsi qu'une place légitime et nécessaire aujourd'hui à la phagothérapie et à des projets tels que Phagoburn.