

Remerciements

Je remercie Mme Shawna McCallin et Dr Gregory Resch qui m'ont suivi lors de la réalisation de ce travail, pour l'opportunité qu'ils m'ont offerte en me prenant sous leurs ailes ainsi que pour leurs pertinents conseils et corrections. J'aimerais aussi remercier tout particulièrement Mme Marlyse Giddey pour l'initiation aux techniques de laboratoire ainsi que pour ses recommandations et explications avisées. Mes remerciements vont également à Mme Lye Paillard, Mr Nicolas Imperiali, Mme Paris Jafari, Mr Andrej Al-Dourobi, Mr José Entenza, Mr Peter Kupferschmied et toutes les personnes du DMF et du CHUV pour leur aide précieuse. Finalement, je remercie Pr Lee Ann Laurent-Applegate et Dr Yok-Ai Que pour leur temps et leur expertise en tant que membres du comité de ma défense de travail de Master.

Références

1. Hauser AR, Ozer EA. *Pseudomonas aeruginosa*. Nat Rev Micro. 2011.
2. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect. 2006 Feb; 36(2):78–91.
3. Krylov V, Pleteneva E, Shaburova O, Bourkaltseva M, Krylov S, Chesnokova E, et al. Common Preconditions for Safe Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Advances in Microbiology. 2014; 04(12):766–73.
4. Pirnay J-P, Verbeken G, Rose T, Jennes S, Zizi M, Huys I, et al. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. Future Virology. 2012 Apr; 7(4):379–90.
5. Arora BS. Incidence of Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Burn Patients and Environment of Teaching Institution. Journal of Clinical and Diagnostic Research [Internet]. 2014 [cited 2015 Nov 20]
6. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, et al. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. Current pharmaceutical biotechnology. 2010;11(1):69–86.
7. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science. 1994 Apr 15; 264(5157):375–82.
8. Vieira A, Silva YJ, Cunha A, Gomes NCM, Ackermann H-W, Almeida A. Phage therapy to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* skin infections: *in vitro* and *ex vivo* experiments. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Nov; 31(11):3241–9.
9. Harper DR, Morales S. Bacteriophage therapy: practicability and clinical need meet in the multidrug-resistance era. Future Microbiology. 2012 Jul; 7(7):797–9.
10. Rose T, Verbeken G, Vos DD, Merabishvili M, Vanechoutte M, Lavigne R, et al. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps. Int J Burns Trauma. 2014 Oct 26;4(2):66–73.
11. Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. Res Microbiol. 2011 Oct; 162(8):798–806.
12. Chibeu A, Ceysens P-J, Hertveldt K, Volckaert G, Cornelis P, Matthijs S, et al. The adsorption of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage ϕ KMV is dependent on expression regulation of type IV pili genes. FEMS Microbiology Letters. 2009 Jul;296(2):210–8.
13. Budzik JM, Rosche WA, Rietsch A, O'Toole GA. Isolation and Characterization of a Generalized Transducing Phage for *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14. J Bacteriol. 2004 May 15;186(10):3270–3.
14. Estahbanati HK, Kashani PP, Ghanaatpisheh F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. Burns. 2002;28(4):340-8.
15. Selezska K, Kazmierczak M, Müsken M, Garbe J, Schobert M, Häussler S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure: Environmental *P. aeruginosa* population structure. Environmental Microbiology. 2012 Aug; 14(8):1952–67.
16. Mayhall CG. The epidemiology of burn wound infections: then and now. Clin Infect Dis. 2003 Aug 15;37(4):543–50.
17. McVay CS, Velasquez M, Fralick JA. Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Mouse Burn Wound Model. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007 Jun 1;51(6):1934–8.

18. Feihl J-P. La thérapeutique des staphylococcies par le bactériophage. Thèse, Cornaz; 1949.1-31.
19. Verbeken G, Pirnay J-P, De Vos D, Jennes S, Zizi M, Lavigne R, et al. Optimizing the European Regulatory Framework for Sustainable Bacteriophage Therapy in Human Medicine. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2012 Jun;60(3):161–72.
20. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*. 2011 Mar;1(2):111–4.
21. Debarbieux L. La phagothérapie expérimentale à l'aube du XXI^{ème} siècle. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2008 Aug;38(8):421–5.
22. Pirnay J-P, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chanishvili N, Vaneechoutte M, et al. The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure? *Pharm Res*. 2011 Apr; 28(4):934–7.
23. Zhang C, Li W, Liu W, Zou L, Yan C, Lu K, et al. T4-Like Phage Bp7, a Potential Antimicrobial Agent for Controlling Drug-Resistant *Escherichia coli* in Chickens. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013 Sep 15;79(18):5559–65.
24. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011 Mar;1(2):66–85.
25. Golkar Z. Experimental Phage Therapy on Multiple Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice. *Journal of Antivirals & Antiretrovirals* [Internet]. 2013 [cited 2015 Jul 26]; 05(06). Avl. from: <http://www.omicsonline.org/experimental-phage-therapy-on-multiple-drug-resistant-pseudomonas-aeruginosa-infection-in-mice-jaa.S10-005.php?aid=21493>
26. McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, Sultana S, Berger B, Huq S, et al. Safety analysis of a Russian phage cocktail: From MetaGenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology*. 2013 Sep; 443(2):187–96.
27. Brüssow H. What is needed for phage therapy to become a reality in Western medicine? *Virology*. 2012 Dec; 434(2):138–42.
28. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*. 2013 Jun; 8(6):769–83.
29. Brüssow H. Editorial Commentary: Phage Therapy: Quo Vadis? *Clin Infect Dis*. 2014 Feb 15; 58(4):535–6.
30. Sackett DL. Evidence-based medicine. *Seminars in Perinatology*. 1997 Feb;21(1):3–5.
31. Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet*. 2012 Jan;13(1):47–58.
32. Buckling A, Rainey PB. Antagonistic coevolution between a bacterium and a bacteriophage. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 2002;269(1494):931–6.
33. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins JJ. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*. 2013 Jul 11;499(7457):219–22.
34. Kurtböke I. Bacteriophages. InTech; 2012.
35. Don PA, Van Den Ende M. A preliminary study of the bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Hygiene*. 1950; 48(02):196–214.
36. Griffiths AJ, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC, Griffiths AJ, Gelbart WM, et al. *Modern Genetic Analysis*. W. H. Freeman; 1999.
37. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004 May 1;28(2):127–81.
38. Grath SM, Sinderen D van. *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press; 2007. 355.
39. Tsonos J, Oosterik LH, Tuntufye HN, Klumpp J, Butaye P, De Greve H, et al. A cocktail of *in vitro* efficient phages is not a guarantee for *in vivo* therapeutic results against avian colibacillosis. *Vet Microbiol*. 2014 Jul 16;171(3-4):470–9.

40. Abedon S, Yin J. Bacteriophage Plaques: Theory and Analysis. In: Clokie MJ, Kropinski A, editors. Bacteriophages [Internet]. Humana Press; 2009 [cited 2015 Nov 17]. p. 161–74. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_17
41. Gallet R, Kannoly S, Wang N. Effects of bacteriophage traits on plaque formation. BMC microbiology. 2011; 11(1):181.
42. Onodera K. Molecular Biology and Biotechnology of Bacteriophage. In: Endo I, Nagamune T, editors. Nano/Micro Biotechnology [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009 [cited 2015 Nov 20]. p. 17–43. Avl. from: http://link.springer.com/10.1007/10_2008_46
43. Nollet LML, Toldrá F. Handbook of dairy foods analysis [Internet]. CRC Press; 2009 [cited 2015 Nov 17]. Available from: http://mastermilk.com/uploads/biblio/handbook_of_dairy_foods_analysis.pdf
44. Abedon ST. Thinking about microcolonies as phage targets. Bacteriophage. 2012 Jul; 2(3):200–4.
45. Bloemberg GV, O'Toole GA, Lugtenberg BJ, Kolter R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas spp.* Applied and Environmental Microbiology. 1997; 63(11):4543–51.
46. Jakobs S, Subramaniam V, Schönle A, Jovin TM, Hell SW. EFGP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. FEBS Lett. 2000 Aug 18;479(3):131–5.
47. Lagendijk EL, Validov S, Lamers GEM, Weert SD, Bloemberg GV. Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization *in vitro* and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. FEMS Microbiology Letters. 2010 Apr 1;305(1):81–90.
48. Hoffman RM. Use of GFP for *in vivo* imaging: concepts and misconceptions. In: Savitsky AP, Campbell RE, Hoffman RM, editors. 2008; p. 68680E–68680E–7.
49. Day RN, Davidson MW. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. Chemical Society Reviews. 2009;38(10):2887.
50. Jensen EC. Use of fluorescent probes: their effect on cell biology and limitations. The Anatomical Record. 2012;295(12):2031–6.
51. Torrado M, Iglesias R, Mikhailov A. Detection of protein interactions based on GFP fragment complementation by fluorescence microscopy and spectrofluorometry. BioTechniques. 2008 Jan; 44(1):70–4.
52. Żurek-Biesiada D, Waligórski P, Dobrucki JW. UV-induced Spectral Shift and Protonation of DNA Fluorescent Dye Hoechst 33258. Journal of Fluorescence. 2014 Nov;24(6):1791–801.
53. Tombolini R, Unge A, Davey ME, de Bruijn FJ, Jansson JK. Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 1997 Jan 1;22(1):17–28.
54. Hansen MC, Palmer RJ, Udsen C, White DC, Molin S. Assessment of GFP fluorescence in cells of *Streptococcus gordonii* under conditions of low pH and low oxygen concentration. Microbiology. 2001; 147(5):1383–91.
55. Billinton N, Knight AW. Seeing the Wood through the Trees: A Review of Techniques for Distinguishing Green Fluorescent Protein from Endogenous Autofluorescence. Analytical Biochemistry. 2001 Apr;291(2):175–97.
56. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. Eur J Dermatol. 2002 Aug; 12(4):390–399; quiz 400–401.
57. Kolarsick PA, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. Journal of the Dermatology Nurses' Association. 2011; 3(4):203–13.
58. Coolen NA, Vlig M, van den Bogaerd AJ, Middelkoop E, Ulrich MMW. Development of an *in vitro* burn wound model. Wound Repair Regen. 2008 Aug; 16(4):559–67.
59. Adams MH. Bacteriophages. Interscience Publishers; 1959. 618.

60. Kukavica-Ibrulj I, Bragonzi A, Paroni M, Winstanley C, Sanschagrín F, O'Toole GA, et al. *In Vivo* Growth of *Pseudomonas aeruginosa* Strains PAO1 and PA14 and the Hypervirulent Strain LESB58 in a Rat Model of Chronic Lung Infection. *Journal of Bacteriology*. 2008 Apr 15;190(8):2804–13.
61. Harrison EM, Carter MEK, Luck S, Ou H-Y, He X, Deng Z, et al. Pathogenicity Islands PAPI-1 and PAPI-2 Contribute Individually and Synergistically to the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14. *Infect Immun*. 2010 Apr 1;78(4):1437–46.
62. Jones C, Hachani A, Manoli E, Filloux A. An rhs Gene linked to the Second Type VI Secretion Cluster Is a Feature of the *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA14. *J Bacteriol*. 2014 Feb 15; 196(4):800–10.
63. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, et al. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(13):7907–12.
64. Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Feb;2(2):166–73.
65. Huys I, Vaneechoutte M, Verbeken G, Debarbieux L. Key issues in phage therapy: a report of a dedicated workshop at the Viruses of Microbes II meeting. *Res Microbiol*. 2013 Sep; 164(7):806–10.
66. Gu J, Liu X, Li Y, Han W, Lei L, Yang Y, et al. A Method for Generation Phage Cocktail with Great Therapeutic Potential. *PLoS ONE*. 2012 Mar 1;7(3):e31698.
67. Fischer S, Kittler S, Klein G, Glünder G. Impact of a Single Phage and a Phage Cocktail Application in Broilers on Reduction of *Campylobacter jejuni* and Development of Resistance. *PLoS ONE*. 2013 Oct 21;8(10):e78543.
68. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001 Jun 19; 221(1–2):1–22.
69. Hao J-L, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H, Nishida T. Effect of Galardin on Collagen Degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Experimental Eye Research*. 1999 Dec; 69(6):595–601.
70. Heck LW, Morihara K, McRae WB, Miller EJ. Specific cleavage of human type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect Immun*. 1986 Jan 1;51(1):115–8.
71. Tam JM, Upadhyay R, Pittet MJ, Weissleder R, Mahmood U. Improved *in vivo* whole-animal detection limits of green fluorescent protein-expressing tumor lines by spectral fluorescence imaging. *Molecular imaging*. 2007; 6(4):269–76.
72. John AK. Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Microscopy Today*. 2000; 00-1 pp. 8-12.
73. Bussolati G, Annaratone L, Medico E, D'Armento G, Sapino A. Formalin Fixation at Low Temperature Better Preserves Nucleic Acid Integrity. *PLoS ONE*. 2011 Jun 15; 6(6):e21043.
74. Roy PH, Tetu SG, Larouche A, Elbourne L, Tremblay S, Ren Q, et al. Complete Genome Sequence of the Multiresistant Taxonomic Outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS ONE*. 2010 Jan 22;5(1):e8842.
75. Bodilis J, Ghysels B, Osayande J, Matthijs S, Pirnay J-P, Denayer S, et al. Distribution and evolution of ferripyoverdine receptors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*. 2009 Aug 1; 11(8):2123–35.
76. Pedersen SS, Høiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*. 1992; 47(1):6–13.

77. Anastassiou ED, Mintzas AC, Kounavis C, Dimitracopoulos G. Alginate production by clinical nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of clinical Microbiology*. 1987;25(4):656–9.
78. Garbe J, Wesche A, Bunk B, Kazmierczak M, Selezska K, Rohde C, et al. Characterization of JG024, a *Pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC microbiology*. 2010;10(1):301.
79. Ogunnariwo J, Hamilton-Miller JMT. Brown-and red-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*: differentiation between melanin and pyorubrin. *Journal of medical microbiology*. 1975;8(1):199–203.
80. Wahba AH. Pyrorubrin-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol*. 1965 Mar; 13:291–2.
81. Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004 Jul 1;48(7):2659–64.
82. Elowitz MB, Surette MG, Wolf P-E, Stock J, Leibler S. Photoactivation turns green fluorescent protein red. *Current Biology*. 1997; 7(10):809–12.
83. Wüstner D, Solanko LM, Lund FW, Sage D, Schroll HJ, Lomholt MA. Quantitative fluorescence loss in photobleaching for analysis of protein transport and aggregation. *BMC bioinformatics*. 2012;13(1):296.
84. Miyawaki A, Sawano A, Kogure T. Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2003 [cited 2015 Nov 22]; Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.391.8450&rep=rep1&type=pdf>
85. Lowder M, Unge A, Maraha N, Jansson JK, Swiggett J, Oliver JD. Effect of Starvation and the Viable-but-Nonculturable State on Green Fluorescent Protein (GFP) Fluorescence in GFP-Tagged *Pseudomonas fluorescens* A506. *Applied and environmental microbiology*. 2000; 66(8):3160–5.
86. Burch CR, Stock JPP. Phase-Contrast Microscopy. *J Sci Instrum*. 1942;19(5):71.
87. Good NE, et al. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry* 1966;5(2), 467-477.
88. Phagoburn.eu. Phagoburn: Evaluation of phage therapy for the treatment of burn wound infections [Internet]. [cited 3 August 2015]. Available from: <http://www.phagoburn.eu/>
89. Pherecydes-pharma.com. Pherecydes Pharma [Internet]. [cited 3 August 2015]. Available from: <http://www.pherecydes-pharma.com/>
90. Evergreen.edu. Evergreen Phage Lab | Home of the biennial Evergreen International Phage Biology Meeting [Internet]. [cited 11 August 2015]. Available from: <http://www.evergreen.edu/phage>
91. Phagetherapycenter.com. *Pseudomonas aeruginosa* Infection - Treatment [Internet]. [cited 22 August 2015]. Available from: http://www.phagetherapycenter.com/pii/PatientServlet?command=static_pseudomonas
92. Schaechter.asmblog.org. Small Things Considered: Are Phages the Answer? [Internet]. [cited 6 November 2015]. Available from: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2012/04/are-phages-the-answer.html>
93. Sci.sdsu.edu. Phage (aka bacteriophage or bacterial viruses) [Internet]. [cited 6 November 2015]. Available from: <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/phage>
94. Archaealviruses.org. Stephen T. Abedon, Ph.D. [Internet]. [cited 12 November 2015]. Available from: <http://www.archaealviruses.org/abedon/>

95. Encyclopedia Britannica. Ultraviolet radiation | physics [Internet]. 2014 [cited 17 November 2015]. Available from: <http://www.britannica.com/science/ultraviolet-radiation>
96. Rndsystems.com. ICC/IHC Protocols: R&D Systems [Internet]. [cited 27 November 2015]. Available from: <https://www.rndsystems.com/protocol-types/iccihc-protocols>
97. Sigma-Aldrich. Europe [Internet]. 2015 [cited 30 December 2015]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/europe.html>
98. Agarscientific.com. OCT compound :: Agar Scientific [Internet]. [cited 30 December 2015]. Available from: <http://www.agarscientific.com/oct-compound.html>
99. Abcam.com. IHC protocol for paraffin, frozen and free floating sections [Internet]. 2015 [cited 30 December 2015]. Available from: <http://www.abcam.com/protocols/immunostaining-paraffin-frozen-free-floating-protocol>
100. Nc3rs.org.uk. The 3Rs [Internet]. [cited 11 January 2016]. Available from: <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>
101. Nobelprize.org. Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin [Internet]. [cited 12 January 2016]. Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html

Annexes

A.1. Discussion et commentaires supplémentaires.

Le Tableau 3.1.1.2 cite des souches qui ont présenté une réaction différente à celle attendue suite à l'application des phages. La souche 28 a présenté un phénotype inexpliqué dans la littérature consultée sous forme de pigmentation brune diffuse et ceci à chaque reproduction de la manipulation. Il n'est pas impensable qu'une contamination soit à l'origine de ce constat.

Les souches 224 et PA7 présentaient une très faible sensibilité aux phages. Des études (74, 75) décrivent la souche clinique PA7 comme une entité taxonomiquement éloignée des autres avec seulement environ 95% de similarité génétique. Ceci est compatible avec les résultats, notamment lorsque la spécificité des phages pour l'hôte est prise en compte. Ainsi, les plages de lyse qui se présentaient en dehors des zones de drop sous forme de plaques et de points clairs ont été attribuées à une concentration de phages trop faible tout en sachant que toutes les souches ont été soumises aux mêmes titres viraux (107 PFU/ml) et que, pour la plupart d'entre-elles, de la lyse bactérienne a pu être constaté pour au moins un phage de manière évidente. De ce fait et au vu du peu de sensibilité aux phages du cocktail, il aurait fallu une concentration plus élevée de virus pour lyser efficacement les souches 224 et PA7.

Les plaques de lyse en dehors des zones de drop (souches 74, 102, 112, 198, 247, 274 et 393) pourraient être attribuées à la présence de prophages. Ces derniers auraient été probablement libérés suite au stress induit par l'application des phages lytiques Pherecydes. L'expérience conduite dans ce travail aurait pu bénéficier d'un test sur la collection bactérienne en la soumettant à de la mitomycine C ou à de la lumière UV (8, 19, 34, 43) afin d'induire les prophages des souches lysogéniques.

La forme mucoïde prise par les souches 219, 398, 3292 et CHA s'observe à l'œil nu, les plaques étant composées d'une espèce de dépôt visqueux et aqueux (76). Ce phénotype est dû à la sécrétion importante d'un exopolysaccharide (EPS) fonctionnant comme une adhésine, l'alginate (2). En effet, lorsque les souches mucoïdes sont comparées aux non mucoïdes, c'est le seul produit bactérien qui est retrouvé en excès chez les premières sans pour autant être absent chez les secondes (76, 77). La sécrétion d'alginate à des taux variables serait une propriété propre à toutes les souches de *P. aeruginosa* (77). Cet EPS diminuerait le métabolisme et la toxicité des souches mucoïdes, les rendant moins immunogène en leur faisant perdre certains éléments comme le lipopolysaccharide (LPS) (12, 15, 76, 77), typique des Gram négatifs ou le flagelle (2). De plus, la présentation sous forme d'un gel dense diminuerait la diffusion des phages lytiques (3). Ainsi, l'alginate inhiberait l'infectivité des phages et ce, d'autant plus lorsqu'elle est produite en excès (78).

Finalement, la souche UR1156 qui présentait une couleur rouge-brun accompagnée d'une odeur rance très caractéristique, la littérature (79, 80) en révèle deux cas de figures principaux. Il peut s'agir d'une des souches qui produisent occasionnellement des pigments appelés pyorubrine et pyomélanine, connus pour donner cet aspect particulier à la culture. Cela dit, l'oxydation et l'acidification de la pyocyanine, métabolite à pigment bleu sécrété par certaines souches (2), peuvent également donner une teinte de la sorte à la culture (79). Il est intéressant de préciser que la fréquence de souches dites rouge parmi les spécimens isolés en clinique est faible et que la majorité de ces souches résultent d'infections urinaires (79, 80).

Une étude faite par Jakobs S. et al (46) sur des cellules d'*E. coli* a démontré que DsRed a un temps de maturation plus long avant d'être pleinement exprimé, rappelant les résultats obtenus dans ce travail avec les souches de *P. aeruginosa*. En effet, après la transformation, le premier constat sous spectrofluoroscopie (Figure 3.2.1) était que les cellules mCherry exprimaient du vert à l'inverse du rouge attendu. Cette même étude a démontré par électrophorèse que l'apparition de la protéine DsRed dans la bactérie est suivie bien après par celle de la fluorescence (environ 20 h). Ce laps de temps traduit la

maturation de la protéine dans la cellule qui, par ailleurs, passe par un stade intermédiaire où l'émission se fait principalement dans le spectre du vert (49). Au vu de l'origine de mCherry, on peut supposer que la fluorescence verte observée ici est due à la maturation du fluorochrome dans la bactérie. Cela dit, le contrôle des boîtes de Petri les jours suivant la transformation toujours sous spectrofluoroscopie n'a pas montré de changement net de couleur. De plus, l'excitation UV (100-400 nm) n'est pas idéale pour révéler une fluorescence rouge (pic d'excitation de mCherry : 587 nm) (49). Une différence d'intensité de la fluorescence sous spectre UV entre les cellules GFP-2 et mCherry est relevée, les deuxièmes étant moins lumineuses que les premières. L'intensité est une caractéristique intrinsèque du plasmide qui peut être plus ou moins fluorescent (53). Aussi, les photomultiplicateurs (i. e. capteurs de photons) utilisés comme détecteurs dans le spectrophotomètre, tout comme l'œil humain, capte difficilement les longueurs d'onde longues typiques des dérivés DsRed (46). Il peut être encore noté que mCherry a une brillance intrinsèque d'environ 50% moindre à celle de GFP. Malgré l'existence d'autres FPs du spectre rouge telles que mRFP1 ou mStrawberry, mCherry est doté d'une photostabilité qui est préférée dans l'imagerie cellulaire (47, 49).

Les acquisitions d'images au microscope à fluorescence (Figure 3.2.2) par contraste de phase et filtre DsRed nous permettent de comparer et de discriminer les cellules marquées des non marquées sans pour autant fournir de critère morphologique pour la différenciation des espèces. Il est important de faire le constat d'une absence de fluorescence des cellules non marquées et du milieu (45). Les transformations mCherry effectuées dans ce travail semblent être en adéquation avec ce principe. En ce qui concerne les résultats obtenus avec le plasmide GFP-2 (Figure 3.2.3), plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Premièrement, la stabilité intrinsèque du plasmide n'est pas toujours suffisante selon les applications et des ajustements peuvent être nécessaires afin de le faire fonctionner correctement (45, 53). La variabilité d'expression des plasmides dans les différentes espèces et les facteurs du milieu jouent un rôle dans l'expression de la fluorescence (45, 49, 50, 54). Ainsi, un milieu pauvre en oxygène ou très acide peut l'atténuer considérablement (50, 81), *P. aeruginosa* possédant deux voies principales d'anaérobiose (81) : la dénitrification et la fermentation d'arginine. Le plasmide peut aussi rentrer en interférence avec d'autres éléments fluorescents bactériens ou environnementaux (45).

Deuxièmement, les propriétés photophysiques des FPs sont souvent très complexes et peuvent impliquer des phases distinctes d'émission et de non émission (dark states) (49). Un des premiers phénomènes de photoswitching (i. e. que la FP possède un mode on/off selon des illuminations spécifiques) a été reporté chez une protéine GFP (49). Ceci peut expliquer le résultat obtenu. Une autre explication se base sur le phénomène de photobleaching, propriété exploitée pour divers types d'études (82-84). Cela dit, cet effet n'était pas recherché ici. L'exposition à des UV peut provoquer l'extinction de la fluorescence de colorants (52) comme de plasmides tels que GFP (53, 85), par ailleurs affecté également par une exposition à haute température (50, 85). Ainsi, les conditions de croissance cellulaire (incubation à 37°C) et, surtout, le fait que les cellules marquées GFP-2 ont d'abord été observées sous rayons UV, la microscopie ayant été réalisée à distance de trois jours, donnent des causes plausibles à ce qui a été constaté.

Beaucoup de FPs de la nouvelle génération possèdent une fluorescence très forte et peuvent être détectées avec une exposition minimale des cellules vivantes à l'illumination (48, 49). L'imagerie cellulaire à l'aide de FPs donne beaucoup d'espoir pour le futur, notamment dans le domaine du marquage dichromatique avec un chevauchement de luminescence négligeable (46, 48).

A.2. Tableau résumant les titres initiaux des phages et les volumes pipetés en vue de stabilisation.

Phages individuels (phi)	Titre initial [$\times 10^7$ PFU/ml]	Volume pipeté [μ l]
phi1	13	230.8
phi2	300	10
phi3	9000	0.33
phi4	19	157.9
phi5	14000	0.22
phi6	155	19.35
phi7	52	57.7
phi8	264	11.36
phi9	30	100
phi10	116	25.9
phi11	25	120
phi12	112	26.8
phi13	165	18.2

La première colonne décrit le numéro du phage. Les lignes pour chaque phage représentent leur titre initial (obtenu après comptage des plaques de lyse) et le volume pipeté dans 3 ml de NaCl 0.9% (titre final pour tous les phages : 10^7 PFU/ml).

A.3. Tableau explicatif du contenu des puits.

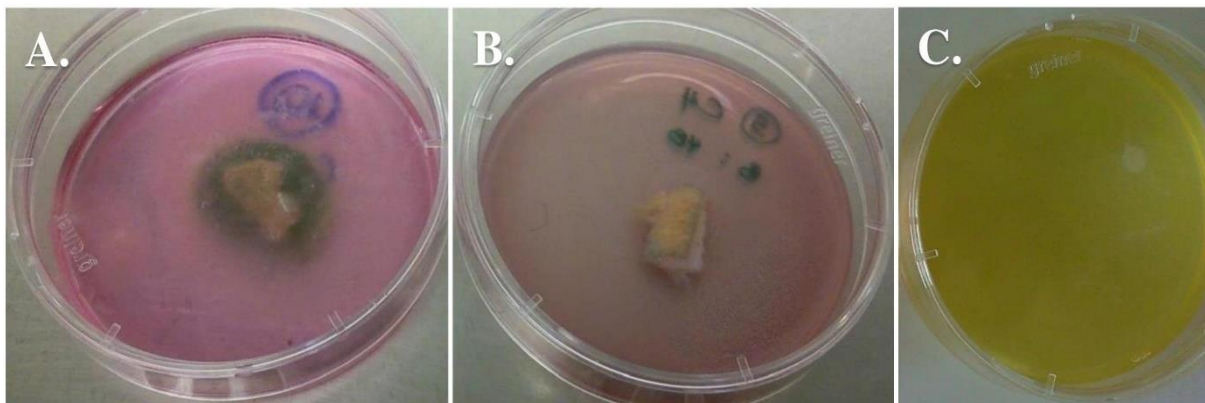
Souches bactériennes	Adjonction : phages ou contrôles négatifs
150 μ L de l'ON PAO1 à 10^7 CFU/mL	150 μ L de chaque phage (1 à 13) à 10^7 PFU/mL 150 μ L de SM buffer (Control 1) 150 μ L de surnageant (Control 2)
150 μ L de l'ON PAO1 à 10^6 CFU/mL	150 μ L du cocktail de phages Pherecydes à 10^6 PFU/mL
150 μ L de l'ON PA14 à 10^7 CFU/mL	150 μ L de chaque phage (1 à 13) à 10^7 PFU/mL 150 μ L de SM buffer (Control 1) 150 μ L de surnageant (Control 2)
150 μ L de l'ON PA14 à 10^6 CFU/mL	150 μ L du cocktail de phages Pherecydes à 10^6 PFU/mL

A.4. Tableau listant les transformations exécutées.

Bactéries compétentes (c)	Plasmides et gènes incorporés
PAO1-c	pUX-BF13 (contrôle négatif), pUX-BF13 et GFP-2 (3 :1), pUX-BF13 et mCherry (3 :1)
PAO1.B5-c	pUX-BF13 (contrôle négatif), pUX-BF13 et GFP-2 (3 :1), pUX-BF13 et mCherry (3 :1)
PA14-c	pUX-BF13 (contrôle négatif), pUX-BF13 et GFP-2 (3 :1), pUX-BF13 et mCherry (3 :1)

Le plasmide pUX-BF13 a été pipeté dans un rapport 3 :1 vis-à-vis des plasmides contenant les gènes de fluorescence.

A.5. Figure montrant les types de contaminations rencontrées.



Contaminations périphériques **A.** fongique et **B.** bactérienne. **C.** Milieu jaune acétique.

Les différentes couleurs indiquent un changement de pH du milieu grâce au rouge de phénol. L'alcalinisation (**A**) se traduit par une couleur rose-violacée qui peut être retrouvée lors de contamination fongique (hypothèse : libération d'ammonium dans le milieu). L'acidification (**B** et **C**) se montre par le ternissement du DMEM qui, à l'extrême, devient jaune.

A.6. Lexique détaillant quelques termes utilisés.

Termes	Définitions
Bovine Serum Albumin (BSA)	Utilisé pour de nombreuses applications biochimiques pour sa stabilité et son manque d'interférence avec les réactions biologiques. Il peut être employé pour bloquer les immunoglobulines non spécifiques lors de l'IHC (Sigma-Aldrich Co.©).
Contraste de phase (ph)	Défini par le fait que le microscope capte les changements de phase d'une onde passant au travers d'un échantillon non homogène (86). Ainsi, lorsqu'une matière, comme une bactérie, est traversée par une onde, cette dernière change sa phase, c'est-à-dire que sa longueur se voit modifiée. Ces changements de longueurs dessinent alors la forme.
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Modification du Basal Medium Eagle (BME) avec des concentrations en acides aminés (aa) et vitamines quadruplées. La formule originale contient 1000 mg/l de glucose et a été utilisée au départ pour la culture de cellules embryonnaires de souris. Par la suite, il a été développé et ajusté pour servir de milieu à différents types de cultures cellulaires, notamment avec la mise au point de DMEM très riche en glucose. La combinaison avec de la L-glutamine (aa essentiel) fournit une source d'énergie supplémentaire majeure au milieu de culture (Sigma-Aldrich Co.©).
Fetal Bovine Serum (FBS)	Supplément qui fournit un vaste étalage de fonctions pour les milieux de culture. Il délivre des nutriments, des facteurs de croissance et d'attachement et protège contre les dommages oxydatifs et l'apoptose (Sigma-Aldrich Co.©).
MOPS-glycérol	Tampon développé par Good NE <i>et al.</i> (87) qui répond à certains critères spécifiques dont un effet limité sur les réactions biochimiques, une stabilité enzymatique et hydrolytique ainsi que des changements minimaux selon les températures et les concentrations. Le glycérol joue un rôle de cryoprotecteur en abaissant la température pour le passage à l'état de glace.
Optimal Cutting Temperature (O.C.T.)	Mélange hydrosoluble de glycols et de résines qui fournit une matrice adaptée pour la section au cryostat à des températures inférieures à 10°C. Il a été développé et optimisé spécialement pour l'expérimentation IHC (Agar Scientific, Elektron Technology©).
Tris-EDTA	Les tampons tris sont utilisés largement en biologie moléculaire et cellulaire pour des procédés tels qu'extraction et purification de protéines et d'acides nucléiques. Le tris-EDTA (pH 8-9) peut également servir comme tampon de lavage (Sigma-Aldrich Co.©).
Triton™ X-100	Détergent et surfactant fréquemment utilisé dans les applications biochimiques pour solubiliser les protéines. Il est non ionique et non dénaturant. Il peut être employé pour réduire la tension de surface afin que les réactifs puissent couvrir toute la section de tissu avec facilité. Il permet également de diminuer le marquage non spécifique lors de l'IHC (Sigma-Aldrich Co.©, Abcam plc.©).