HAL
open science

Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à Pseudomonas aeruginosa dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité

Emilie Saussereau

To cite this version:

Emilie Saussereau. Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à Pseudomonas aeruginosa dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité. Pneumologie et système respiratoire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66461 . tel-00836178

HAL Id: tel-00836178

https://theses.hal.science/tel-00836178

Submitted on 20 Jun 2013

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

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

Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie et Physiopathologie

Spécialité Physiologie

Présentée par
Emilie SAUSSEREAU

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Utilisation des bactériophages comme thérapie lors d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans le cadre de la mucoviscidose : efficacité et innocuité

Soutenance le 18 Octobre 2012, devant le jury composé de :

Pr. Jacques TEULON	Président
Pr. Isabelle FAJAC	Rapporteur
Pr. Mario VANEECHOUTTE	Rapporteur
Pr. Jean-Michel SALLENAVE	Examinateur
Pr. Isabelle SERMET-GAUDELUS	Directeur de thèse
Dr. Laurent DEBARBIEUX	Directeur de thèse

Remerciements

Je remercie sincèrement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail de thèse et à l'élaboration de ce mémoire.

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux rapporteurs, Mario Vaneechoutte et Isabelle Fajac, pour l'intérêt qu'ils témoignent envers mon travail en acceptant de lire et évaluer ce manuscrit. Je remercie également Jacques Teulon d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse et Jean-Michel Sallenave qui a accepté d'examiner mon travail.

Je remercie Aleksander Edelman, en premier lieu pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire mais aussi pour m'avoir guidé dans ce projet. Merci pour votre soutient et toute l'attention que vous avez porté à mon travail au cours de ces trois années et demi.

Je remercie Patrick Forterre pour m'avoir également accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie profondément Isabelle Sermet, ma directrice de thèse, pour l'enthousiasme avec lequel elle a encadré ce travail. Merci pour les précieux conseils que vous m'avez apportez au fil de ces trois années et demi ainsi que pour m'avoir fait partager votre expérience enrichissante.

J'adresse également un profond remerciement à Laurent Debarbieux, mon co-directeur de thèse, sans qui ce projet n'aurait pas vu le jour. Merci pour la richesse de nos échanges et toute l'aide que vous m'avez apportée.

Vous avez placé votre confiance en moi et ensemble m'avez guidé dans ce projet me permettant de le mener à bien.

Tout au long de ces années, j'ai pu travailler dans une ambiance particulièrement agréable grâce à tous les membres de l'équipe Edelman ...

Merci à Anna, Baya, Chiara, Fatna, Gabrielle, Janine, Nathalie, Naziha, Mairead, Mario et Thao pour votre bonne humeur et tous vos conseils.

Je remercie aussi Danielle et Maryvonne pour m'avoir acceptée et supportée dans leur bureau malgré les altercations que j'ai pu avoir avec mon ordinateur ! Merci pour votre patience mais aussi pour tous vos conseils avisés.

Un merci chaleureux à Sandra, Nabila, Julien et Diane-Lore. Je n'oublierai pas tous les moments que l'on a partagé ensemble, aussi bien les crises de rires que toutes nos conversations pour refaire le monde et surtout le labo !

J'aimerais spécialement remercier Delphine qui a partagé avec moi de nombreuses galères d'électrophy' mais aussi beaucoup de bons moments aussi bien au labo qu'à l'extérieur ! Merci de m'avoir écoutée et remonté le moral dans les moments où ça allait moins bien.

Un merci particulier à Ludo, sans toi ces trois dernières années n'auraient pas été les mêmes...

Merci aussi aux « petits nouveaux » ! A tous ceux qui ont quitté le labo et en particulier Siradiou pour l'aide tu m'as apportée. A ceux aussi qui sont restés, la relève est assurée !

... merci à tous pour le soutien que vous m'avez témoigné.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'unité BMGE, Alexis, Ana, Camille, Carole, Chloé, David, Emmanuelle, Guennadi, Kasie, Malvina, Mart, Mery, Nicole, Nuno, Pierre, Simonetta, Soizick, Sukhi, Tessa et Tomo, pour l'accueil qu'ils m'ont réservé, pour leur gentillesse ainsi que pour les conseils et le soutien qu'ils m'ont apporté.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement Marine, Matthieu, Eric et Damien pour tous nos échanges scientifiques ... et ceux qui l'étaient moins, pour votre bonne humeur et pour toute l'aide et le soutien que vous m'avez apporté à différents moments de ma thèse.

Je remercie l'association Vaincre La Mucoviscidose d'avoir soutenu ce projet.

Je remercie aussi toutes les personnes des animaleries du site Necker et de l'Institut Pasteur ainsi que les techniciennes qui facilitent quotidiennement notre travail.

Je remercie tout particulièrement Noémie pour m'avoir soutenue depuis le début et m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin. Nous avons partagé ensemble nos doutes et nos craintes et c'est maintenant le moment d'être récompenser pour tout ce travail ... bientôt ton tour !

Je remercie également Elo et Ade pour leur soutien permanent.

Merci à toutes les trois pour votre amitié sincère

Je terminerai en remerciant chaleureusement les membres de ma famille, en particulier ma grand-mère, mon frère et mon père qui me soutiennent depuis toujours. Je remercie mes parents de m'avoir permis de poursuivre mes études.

Je remercie spécialement ma mère, c'est grâce à elle qu'aujourd'hui je suis arrivée jusqu'ici. Si tu me vois, j'espère que tu es fière de moi.

A ma maman

Table des matières

***Abréviations*……..……1**

***Résumé*……..……4**

***Abstract*……..5**

***Liste des figures*……6**

***Liste des tables*…….....8**

***Avant Propos* 10**

***Introduction bibliographique*..... 13**

I. La mucoviscidose (CF pour Cystic Fibrosis)..... 13

A. Histoire de la mucoviscidose 13

B. La protéine CFTR 14

1. Structure 14
2. Localisation 14
3. Fonctionnement du canal CFTR 15
4. Les mutations retrouvées sur le gène CFTR 16

C. CFTR : Protéine multifonctionnelle de l'épithélium 18

1. Physiologie de l'épithélium 18
2. CFTR : canal chlorure 20
3. CFTR : transporteur « multi-moléculaire » 21
4. CFTR : protéine régulatrice 23
5. Protéine CFTR mutée : conséquences sur le transport ionique 25

D. Les symptômes de la maladie..... *26*

1. Les atteintes gastro-intestinales..... 26
2. Les atteintes du système reproducteur 27
3. Les atteintes des voies respiratoires 27
   a) L'épithélium respiratoire normal..... 27
   b) L'épithélium respiratoire dans le contexte de la mucoviscidose 28
      (1) La clairance mucociliaire 28
      (2) Les infections pulmonaires..... 29
      (3) Les symptômes cliniques..... 31

E. Les Traitements..... 33

1. Les traitements symptomatiques 33
2. L'antibiothérapie contre *P. aeruginosa*..... 34
   a) La primo-infection 34
   b) L'infection chronique..... 34
3. Les nouvelles thérapies 34

a) Les molécules ciblant les origines de la maladie 34
b) La thérapie génique 38
F. Le diagnostic de la maladie 39
1. Dépistage néonatal 39
2. Le test de la sueur 39
3. Exploration fonctionnelle du transport ionique par mesure de la différence de potentiel (ddp) nasale..... 40
a) Origine du potentiel transépithélial 40
b) Technique de mesure de la ddp nasale 44
G. Le modèle murin de mucoviscidose 45
1. Caractéristiques du modèle 45
2. La mesure de ddp chez la souris 49
II. L'infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose 52
A. Généralités sur la bactérie *52*
B. La pathogénèse pulmonaire *53*
1. Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* 53
a) Les facteurs de virulence de surface 53
b) Les facteurs de virulence sécrétés 55
(1) Le système de sécrétion de type III 55
(2) Le système de sécrétion de type II 55
(3) Le système de sécrétion de type VI 55
(4) Les sidérophores 56
(5) Les rhamnolipides 56
(6) Les lectines 56
c) La mucoïdie 57
d) La formation de biofilm 58
e) Régulation des facteurs de virulence 59
(1) Les systèmes à deux composants 59
(2) Le quorum sensing 60
2. La plasticité génétique de *P. aeruginosa* 60
3. La réponse immunitaire contre *P. aeruginosa* chez les patients CF 63
4. Les effets de *P. aeruginosa* sur le transport ionique 65
C. La réponse de P. aeruginosa *aux antibiotiques* 69
1. Les mécanismes de résistances 69
2. *P. aeruginosa* : une bactérie multi-résistante 70
3. Les nouvelles pistes de traitements 71
III. L'utilisation des bactériophages contre l'infection à *P. aeruginosa* 73
A. Biologie des bactériophages 73
1. La classification des bactériophages 73
2. Structure des virions caudés 75

3. Cycle infectieux des bactériophages caudés 76
a) Cycle lytique 76
b) Cycle lysogénique 78
B. Importance écologique des bactériophages 79
C. Applications des bactériophages 81
1. Application en biologie moléculaire 81
2. Application dans l'industrie agro-alimentaire 81
3. Applications thérapeutiques pour l'homme 83
a) Historique de la phagothérapie 83
(1) La découverte des bactériophages 83
(2) Les premières applications thérapeutiques 84
(3) L'extension mondiale 85
(4) La phagothérapie décline mais persiste 87
(5) Le renouveau de la phagothérapie 87
b) Points forts et points faibles des bactériophages pour le traitement des infections chez l'homme 88
(1) Les avantages 88
(a) L'activité des bactériophages sur les biofilms 88
(b) L'omniprésence des bactériophages 89
(c) La distribution des bactériophages dans l'organisme 89
(2) Les inconvénients 89
(a) Le mode de préparation des bactériophages 89
(b) La reconnaissance des bactériophages par le système immunitaire 89
(3) Les propriétés conférant avantages et inconvénients 90
(a) La nature virale des bactériophages 90
(b) La spécificité des bactériophages 92
(c) L'action bactéricide 92
c) Les bactériophages de *P. aeruginosa* 92
d) Les traitements d'infections expérimentales 96
(1) Les septicémies 96
(2) Les infections intestinales 96
(3) Les infections cutanées 97
(4) Les infections pulmonaires 97
e) Les essais cliniques 102
(1) La phagothérapie humaine en Europe de l'est 102
(2) La phagothérapie humaine en Europe occidentale 103
(3) La phagothérapie chez les patients CF 103
f) L'innocuité d'un traitement thérapeutique par bactériophages 104
(1) Origine possible d'effets secondaires 104
(2) Activité immuno-modulatrice des bactériophages 105
(3) L'innocuité dans des modèles expérimentaux 105

(4) L'innocuité chez l'Homme 106

***Objectifs du travail* 107**

***Travail Expérimental* 111**

***Matériels et méthodes* 113**

I. Souches bactériennes et conditions de croissance 113

II. Isolement et préparation des bactériophages de CHA 113

III. Caractérisation des bactériophages de CHA 114

IV. Modèle murin de mucoviscidose 115

V. Infection pulmonaire et traitement par bactériophage 115

A. L'infection par la souche CHA de P. aeruginosa 115

B. Le traitement par bactériophages 115

C. Les lavages broncho-alvéolaires 115

VI. Formation et quantification de biofilms 116

VII. Culture des cellules MHS 117

A. Culture en routine 117

B. Culture pour la stimulation par les bactériophages 117

VIII. Dosages ELISA des facteurs de l'inflammation 118

IX. Mesure de la différence de potentiel (ddp) 118

X. Test de l'efficacité des bactériophages sur les bactéries présentes dans les expectorations de patients CF 119

A. Numération des bactéries présentes dans les expectorations 119

B. Evaluation de l'infection des bactéries par les bactériophages dans les échantillons 119

C. Détection, dans les expectorations, de bactériophages efficaces sur les 4 souches de référence utilisées... 120

D. Détermination de la sensibilité des souches de P. aeruginosa aux bactériophages du cocktail 120

XI. Considérations éthiques 122

XII. Analyses Statistiques 122

***Résultats expérimentaux* 123**

I. Les bactériophages utilisés dans l'étude 123

A. Les bactériophages spécifiques de la souche PAK de P. aeruginosa 123

B. Adaptation du bactériophage PAK-P3 à la souche CHA 123

C. Bactériophages spécifiques de la souche CHA de P. aeruginosa 124

1. Isolement des bactériophages de CHA 124
2. Spectre d'hôte des bactériophages de CHA 124
3. Cinétique de lyse des bactériophages infectant la souche CHA 126
4. Observation des bactériophages C1A1A et Co1A1A en microscopie électronique 126

D. Les bactériophages LBL3, ΦKZ et LUZ19 127

E. Comparaison de l'EFP des 10 bactériophages utilisés 127

II. Efficacité des bactériophages à réduire un biofilm formé par la souche CHA de *P. aeruginosa, in vitro* 128

III. Efficacité d'un traitement par bactériophages dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa* 130

A. Effet curatif du bactériophage P3-CHA chez la souris de type sauvage 130

B. Effet curatif du bactériophage P3-CHA chez la souris cftr $^{-/-}$ 131

IV. Innocuité des bactériophages sur différents modèles *in vitro* et *in vivo* 132

A. Pureté des préparations de bactériophages 132

B. L'inflammation induite par différents bactériophages 133

1. Induction de l'inflammation par les bactériophages sur une lignée cellulaire pulmonaire 133
2. Réponse inflammatoire dans des lavages broncho-alvéolaires de souris 134
   a) Dosage de facteurs de l'inflammation par ELISA 134
   b) Dénombrement de neutrophiles 137

C. L'influence des bactériophages sur le transport ionique 137

1. Mise au point de la technique de mesure de différence de potentiel (ddp) nasale chez la souris 137
2. Exploration du transport ionique dans le contexte d'une d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* et / ou d'un traitement par bactériophages 142
   a) Etude de souris WT 143
   b) Etude d'un modèle murin de mucoviscidose 145

V. Evaluation de la capacité des bactériophages à infecter des souches de *P. aeruginosa* au sein même d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose 148

A. Le choix du cocktail de bactériophages 148

B. Faisabilité de la méthode 149

C. Sensibilité aux bactériophages des souches de P. aeruginosa *présentes dans les expectorations* 151

D. Optimisation du protocole 152

E. Détermination de la présence de bactériophages dans les expectorations des patients 153

F. Protocole final 153

***Discussion*..... 155**

***Référence bibliographique*..... 169**

***Annexes*..... 211**

Article 1 213

Article 2 223

Article 3 247

Article 4 263

Article 5 285

Abréviations

4-PBA : Sodium 4-phenylbutyrate

Å : Ångström soit 10^{-10} mètre

ABC : ATP Binding Cassette

ADH : Arginine déshydrogénase

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine di-phosphate

ANSES : L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNm : Acide RiboNucléique messager

ATP : Adénosine triphosphate

C.H.U. : Centre Hospitalier Universitaire

CaCC ou CLCA : canaux chlorure calcium-dependant

c-di-GMP : di-guanosine monophosphate cyclique

CF : Cystic Fibrosis

CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

cfu : colony forming unit

Cl^- : ion chlorure

COX : cyclooxygénase

CPX : 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

ddp : différence de potentiel

DIDS : Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate

DMMB : di-methyl-méthylène blue

DO : densité optique

DPC : Diphenylamine-2-carboxylic acid

ENaC : Epithelial sodium Channel

F508-del-CFTR : CFTR dont le gène porte une délétion de la phénylalanine en position 508

FDA : food and drug administration

FRET : Fluorescent Resonance Energy Transfer

G551D-CFTR : protéine CFTR portant une substitution de la glycine en position 551 par l'aspartate

GlyH-101 : N-(2-naphthalenyl)-[(3,5-dibromo-2,4-dihydroxyphenyl)methylene]glycine hydrazide

HLA : human leucocyte antigen

IL : interleukine

INF-γ : interféron gamma

Inh-172 : thiazolidone

IPSCs : induced pluripotent stem cells

KC : Kératinocyte-derived Cytokine

L : litre

LDC : Lysine décarboxylase

MDR : Multi-Drug Resistant

mL : millilitre

MOI : Multiplicity Of Infection

Mpb : millions de paires de bases

Na^+ : ion sodium

NBD : Nucleotide ATP-binding Domain

nm : nanomètre

ODC : Ornithine décarboxylase

OmpC : Outer Membrane Protein C

ORCC : Outwardly Rectifying Chloride Channel

ORL : Oto-rhino-laryngologique

PAMPs : pathogen associated molecular patterns

PBS : Phosphate Buffer Saline

pfu : plaque forming unit

pH : potentiel Hydrogène

PKA : Protéine kinase A

PKC : Protéine kinase C

PLA : phospholipase

PMN : polymorphonucléaires neutrophiles

pS : picoSiemens

RE : reticulum endoplasmique

ROS : Reactive oxygen species

STAS : Sulfate Transporter Anti-Sigma

SVF : Serum de Veau Fœtal

TDA : Tryptophane désaminase

TIR : Trypsin Immuno-Réactive

TLR : Toll Like Receptor

TN : Tris-NaCl (50 mM-150 mM)

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

UV : ultra-violet

VRAC : volume regulated anion channel

WT : wild type

XTT : 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Résumé

Les infections pulmonaires chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* sont la principale cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose. La répétition des traitements antibiotiques entraîne, chez ces patients, une émergence de souches bactériennes résistantes à plusieurs antibiotiques. Face à ce phénomène préoccupant, de nouvelles approches doivent être envisagées. L'utilisation des bactériophages (virus infectant uniquement les bactéries) pour cibler les pathogènes bactériens semble être l'une des approches les plus prometteuses.

L'efficacité de la phagothérapie semble démontrée de par son utilisation en Europe de l'Est depuis des décennies et par les récents résultats obtenus sur des modèles expérimentaux. Cependant, la possibilité de son utilisation chez des patients atteints de mucoviscidose n'a pas encore fait l'objet d'études approfondies.

Dans un premier temps, nous avons montré que les bactériophages sont capables de traiter avec succès une infection pulmonaire létale, provoquée par une souche de *P. aeruginosa* isolée d'un patient atteint de mucoviscidose, dans un modèle murin WT et de mucoviscidose (*cftr*$^{-/-}$). L'efficacité de différents bactériophages à réduire, *in vitro*, un biofilm formé par *P. aeruginosa* a également été démontrée.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'impact sur le plan physiologique, d'un traitement par bactériophages. La réponse inflammatoire induite par les bactériophages, dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*, s'est révélée quasiment négligeable. Nous avons ensuite mis au point la technique de mesure de différence de potentiel (ddp) nasale chez la souris afin de pouvoir étudier le transport ionique transépithélial, paramètre fondamental de la mucoviscidose. Les valeurs de ddp obtenues en dehors de toute infection ont permis de déterminer des normes pour les souris de type sauvage et *cftr*$^{-/-}$. Les mesures obtenues en présence de bactériophages ne sont pas significativement différentes par rapport à ces normes, démontrant ainsi un aspect de leur innocuité. Par contre, en condition d'infection, le transport du chlorure et du sodium est affecté, révélant un nouvel aspect potentiel de la pathogénicité de cet organisme.

Enfin, dans le but de développer cette approche vers des essais cliniques nous avons mis au point une méthode permettant d'évaluer la capacité des bactériophages à infecter des bactéries au sein d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose.

Au terme de ce travail nous aurons apporté des résultats scientifiques concrets qui permettront de mieux appréhender les conditions nécessaires au développement de futurs essais cliniques afin d'apporter aux patients atteints de mucoviscidose, un traitement sûr et efficace.

Mots clés : mucoviscidose, *P. aeruginosa*, phagothérapie, transport ionique, différence de potentiel nasale, souris *cftr*$^{-/-}$, biofilm, inflammation, expectorations

Ce travail a été réalisé en collaboration entre deux équipes de recherche :
- l'unité Biologie Moléculaire du Gêne chez les Extrêmophiles, Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, 75015 Paris
- l'unité INSERM 845 Equipe « Canalopathies épithéliales : la mucoviscidose et autres maladies », Faculté de médecine Parie Descartes-site Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris

Abstract

Bacteriophages Therapy to treat* Pseudomonas aeruginosa *infections in Cystic Fibrosis: efficacy and safety

Mortality in cystic fibrosis (CF) patients is mainly caused by *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. Repetitive antibiotic treatments lead to the emergence of multi-resistant strains calling for new therapeutic strategies. One of the most promising approach seems to be the use of bacteriophages which are viruses targeting bacteria. In Eastern Europe successful human treatments with bacteriophages are ongoing since decades, while in Western Europe the interest for phage therapy is still weak. Notably, no data are available on the potential application of bacteriophages to treat pulmonary infections in CF patients.

In this study, we first demonstrated in WT and cystic fibrosis mice model ($cftr^{-/-}$) that bacteriophages were able to treat a lethal pulmonary infection caused by a *P. aeruginosa* strain which was isolated from a CF patient. We also studied the efficacy of different bacteriophages to reduce *in vitro* a *P. aeruginosa* biofilm.

In a second time, we evaluate the impact of bacteriophage treatments on some physiological functions involved during pulmonary infection in CF patients. On one hand, inflammation induced by bacteriophages was found to be negligible in different models *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, the transepithelial ion transport, a crucial function in cystic fibrosis, was evaluated by measuring the nasal potential difference (npd) in mice. Reference npd values were obtained for WT and $cftr^{-/-}$ mice in order to assess the reliability of our technique. In addition, when mice were treated with bacteriophages npd values did not differ from the reference ones, demonstrating an aspect of bacteriophages safety. When mice were infected by *P. aeruginosa*, chloride and sodium transports were altered revealing another aspect of its pathogenicity.

Finally, in order to develop this therapeutic approach towards clinical trials, we successfully developed a protocol for the evaluation of bacteriophages ability to infect bacteria within sputum of cystic fibrosis patients.

Our work focusing on both safety and efficacy of bacteriophages treatments in a CF context should contribute to the future developments of clinical trials.

Key words: cystic fibrosis, *P. aeruginosa*, phage therapy, ion transport, nasal potential difference, $cftr^{-/-}$ mice, biofilm, inflammation, sputum

This work was realized in collaboration between two research groups:
- Unity Biologie Moléculaire du Gêne chez les Extrêmophiles, Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, 75015 Paris
- Unity INSERM 845 Equipe « Canalopathies épithéliales : la mucoviscidose et autres maladies », Faculté de médecine Parie Descartes-site Necker, 156, rue de Vaugirard, 75015 Paris

Liste des Figures

Figure 1: Représentation schématique de la structure de la protéine CFTR……..…14
Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement du canal CFTR……..…15
Figure 3 : Les 6 classes de mutations du gène CFTR en fonction des mécanismes moléculaires à l'origine du dysfonctionnement de la protéine……...……...16
Figure 4 : Localisation par immunofluorescence de CFTR wild type et F508del dans des cultures primaires de cellules épithéliales humaines différenciées……...……...17
Figure 5 : Transport du chlorure, sodium et potassium au niveau de l'épithélium sécrétoire..20
Figure 6 : Régulation du transport ionique par CFTR……..22
Figure 7 : Conséquence du dysfonctionnement de transport ionique sur la clairance mucociliaire dans la mucoviscidose…….29
Figure 8 : Germes respiratoires par tranche d'âge en 2010…….31
Figure 9 : Fonction respiratoire en fonction de l'âge……32
Figure 10 : Prédiction de l'âge de survie médian des patients en fonction de leur année de naissance……...33
Figure 11 : Organigramme du dépistage de la mucoviscidose……40
Figure 12 : Exemple de mesure de ddp nasale chez un sujet sain et un patient atteint de mucoviscidose……...45
Figure 13 : Génération de souris génétiquement invalidées……48
Figure 14 : Exemple de mesure de ddp nasale chez la souris WT et dans deux modèles de souris CF……..……..……51
Figure 15 : Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram négatives……53
Figure 16 : Etapes de la formation d'un biofilm……...59
Figure 17 : Modes de transfert de gènes horizontaux……...62
Figure 18 : Schéma des facteurs de virulence de surface cellulaire de *P. aeruginosa*…….65
Figure 19 : Morphologie des 3 familles de *Caudovirales*……75
Figure 20 : Représentation schématique des principales étapes du cycle infectieux des bactériophages……76
Figure 21 : Dynamiques des populations de bactéries et de bactériophages coexistant……...80
Figure 22 : Photographie pendant l'âge d'or de la phagothérapie……...……....86
Figure 23 : Efficacité de 5 bactériophages à former des plages de lyse sur une souche de *P. aeruginosa* issue de primo-infection par rapport à la souche CHA……..…114
Figure 24 : Système de mesure de la différence de potentiel nasale chez la souris……....118

Figure 25 : Exemple d'un test de la sensibilité aux bactériophages de 8 colonies isolées….121
Figure 26 : Cinétique de lyse pour les bactériophages Co1A1A, C1A1A et S1A1A…….126
Figure 27 : Photographies des bactériophages C1A1A et Co1A1A en microscopie électronique……..……127
Figure 28 : Dégradation d'un biofilm de *P. aeruginosa* par différents bactériophages….…129
Figure 29 : Suivie de la survie et du poids de souris CF infectée et traiter par bactériophages.……132
Figure 30 : Dosage de 3 cytokines pro-inflammatoires dans les surnageant de culture de cellules MHS stimulées par 4 bactériophages……..134
Figure 31 : Dosage de cytokines pro-inflammatoires et de la prostaglandine PGE-2 dans des lavages broncho-alvéolaires de souris en conditions d'infection et/ou de traitement.....136
Figure 32 : Répétabilité entre deux mesures de ddp chez la souris B6 ;129……...…140
Figure 33 : Mesure de ddp dans 3 conditions d'infection pulmonaire et/ou traitement par bactériophages chez la souris WT……144
Figure 34 : Mesure de ddp dans 3 conditions d'infection pulmonaire et/ou traitement par bactériophages chez la souris *cftr*$^{-/-}$……..147

Liste des Tables

Table 1 : Synthèse des molécules pharmacologiques en cours d'étude……...…35

Table 2 : Lois et équations régissant le transport des ions au travers d'une membrane ….....42

Table 3 : Effets de l'infection par *P. aeruginosa* sur le transport ionique……...…66

Table 4 : Prévalence de la résistance des souches de *P. aeruginosa* chez les patients CF…...71

Table 5 : Propriétés des différentes familles de virus de procaryotes…….....74

Table 6 : Résistances bactériennes en fonction des étapes du cycle réplicatif viral et adaptation en retour des bactériophages…...…….91

Table 7 : Tableau récapitulatif des 64 bactériophages de *P. aeruginosa* dont le génome est séquencé et référencé dans la GenBank……...……93

Table 8 : Etudes menées sur le traitement par les bactériophages d'infections à *P. aeruginosa* chez la souris……...…….99

Table 9 : Récapitulatif des souches de référence pour chacun des 10 bactériophages utilisés durant l'étude……..120

Table 10 : Spectre d'hôte des treize bactériophages isolés sur la souche CHA….…….125

Table 11 : Rapport d'efficacité des 10 bactériophages de l'étude……..128

Table 12 : Concentration d'endotoxines dans les préparations de bactériophages utilisées lors des expériences portant sur l'innocuité……133

Table 13 : Valeurs standard de ddp pour les 5 paramètres chez les souris B6;129 et FVB....139

Table 14 : Valeurs définissant la variabilité intra-animal entre 2 mesures de ddp répétées...141

Table 15 : Analyse de la représentation de Bland et Altman pour 3 paramètres de ddp chez des souris WT infectées et/ou traitées……..143

Table 16 : Analyse de la représentation de Bland et Altman pour 3 paramètres de ddp chez des souris *cftr*$^{-/-}$ infectées et/ou traitées……146

Table 17 : Analyse des différences entre les mesures de ddp réalisées avant et après infection / traitement chez la souris *cftr*$^{-/-}$……146

Table 18 : Spectre d'hôte des 5 bactériophages isolés sur la souche PAK……149

Table 19 : Quantification des bactéries dans les échantillons après 2h30 d'incubation avec le cocktail de bactériophages…… ..150

Table 20 : Quantification des bactériophages du cocktail dans les échantillons après une incubation de 2h30.……..150

Table 21 : Sensibilité des clones de *P. aeruginosa* isolé des échantillons 1 et 2 aux bactériophages du cocktail……...151

Table 22 : Quantification des bactéries dans les échantillons en fonction du temps d'incubation avec le cocktail de bactériophages……..152
Table 23 : Quantification des bactériophages dans les échantillons en fonction du temps d'incubation…….…….153

Avant propos

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques dans la population caucasienne. Elle est liée à différentes mutations du gène *cftr* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) codant un canal anionique (CFTR). Cette protéine est non seulement le principal canal chlorure de l'épithélium mais elle régule aussi d'autre canaux ioniques. Le dysfonctionnement de la protéine CFTR entraine ainsi des perturbations du transport de fluide, notamment au niveau des poumons, conduisant à un épaississement du liquide de surface des voies aériennes. Cet épais mucus devient alors un micro-environnement favorable au développement de micro-organismes, en particulier *Pseudomonas aeruginosa*. Ainsi, environ 80 % des patients sont infectés de façon chronique par cette bactérie. Ces dernières années, l'efficacité des traitements antibiotiques chez ces patients décline en raison de l'émergence de souches de *P. aeruginosa* résistantes à de multiples antibiotiques. De nouvelles approches sont à envisager et parmi celles-ci je me suis intéressée à la phagothérapie.

Découverts au début du XXème siècle, les bactériophages, virus lysant les bactéries, ont été rapidement utilisés pour traiter des infections bactériennes chez l'homme. Cependant pour plusieurs raisons et notamment la découverte des antibiotiques, ce type de traitement s'est peu développé en Europe occidentale. Son efficacité semble pourtant établie chez l'homme car ce traitement est régulièrement employé depuis des décennies dans certains pays de l'Europe de l'Est. Cependant ces utilisations thérapeutiques sont très peu documentées et ne répondent pas à la règlementation médicale actuellement en vigueur en Europe occidentale. Il apparait donc nécessaire de fournir un effort en recherche pour apporter les évidences scientifiques qui permettront de mieux discerner dans quelles situations médicales il sera possible d'utiliser les bactériophages. C'est ainsi que ces dernières années, l'étude de l'application thérapeutique des bactériophages a fait l'objet d'un regain d'intérêt au niveau international. Un nombre croissant de publications rapporte des succès de traitement d'infections par les bactériophages dans différents modèles animaux. Cependant, aucune donnée expérimentale n'est disponible tant sur l'efficacité que sur l'innocuité d'un tel traitement dans le contexte particulier de la mucoviscidose.

Mon travail de thèse avait pour objectif d'évaluer l'efficacité d'un traitement par bactériophages dans des modèles se rapprochant de l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose ainsi que d'en évaluer l'innocuité sur des fonctions physiologiques clés pour ces patients.

Afin d'introduire les résultats expérimentaux, ce manuscrit comprend, en première partie, une introduction bibliographique divisée en trois chapitres. Le premier chapitre présente la pathogénèse de la mucoviscidose, son diagnostique ainsi que les traitements actuels de cette maladie. Dans le second chapitre, sont exposées les particularités de *P. aeruginosa* qui conduisent à l'établissement d'une infection chronique, de plus en plus fréquemment par des souches multi-résistantes aux antibiotiques, chez les patients atteints de mucoviscidose. Le dernier chapitre est consacré à la présentation des bactériophages, leur biologie, leur importance écologique ainsi que leur utilisation thérapeutique.

La seconde partie du mémoire présente le travail expérimental réalisé au cours de cette thèse. Après avoir détaillé les techniques et les différents bactériophages utilisés au cours de cette étude, je présente les résultats obtenus sur l'efficacité des bactériophages (i) pour traiter une infection pulmonaire dans un modèle de mucoviscidose ainsi que (ii) pour réduire un biofilm formé *in vitro*. Sont ensuite exposés les résultats concernant la réponse inflammatoire induite par un traitement avec des bactériophages ainsi que leur influence sur les transports ioniques. Dans cette partie est aussi présentée la mise au point de la technique de mesure de la différence de potentiel nasale (ddp), nécessaire à l'étude du transport ionique. Pour terminer, je présente la mise au point d'une méthode permettant d'étudier l'efficacité d'un cocktail de bactériophages à infecter des souches de *P. aeruginosa,* au sein d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose.

S'articulant autour de la perspective de leur utilisation thérapeutique pour ces patients, une discussion des résultats obtenus constitue la troisième partie du mémoire.

Ce mémoire se clôture sur une partie annexe, comportant 5 articles. Le premier article, publié, correspond à une étude préliminaire à mon travail de thèse et qui a permis la mise en place de celui-ci. Le deuxième article, soumis, constitue une partie des résultats de ce travail de thèse et est présenté dans la partie du manuscrit correspondante. La technique de mesure de ddp que j'ai mise au point a permis de réaliser une partie de l'étude constituant le troisième article. Les deux derniers articles sont des revues. La première, publiée dans « Advances in virus research », traite de l'efficacité de la phagothérapie dans différents modèles expérimentaux d'infections à *P. aeruginosa.* La seconde, publiée dans « Archives de pédiatrie » met l'accent sur l'importance des interactions protéiques autour de la protéine CFTR pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Introduction Bibliographique

I. La mucoviscidose (CF pour Cystic Fibrosis)

A. Histoire de la mucoviscidose

Les premières évocations de la maladie remontent au Moyen âge et pendant plusieurs siècles les enfants atteints de mucoviscidose sont décrits comme ensorcelés, comme en témoigne ce dicton du XVIIème siècle : « Malheur à l'enfant qui laisse un goût de sel lorsqu'on l'embrasse sur le front : on lui a jeté un sort et il mourra bientôt ! ». En 1606, Juan Alonzo y de los Ruyzes de Fontecha, professeur de médecine à Alcalá de Henares, écrit que les enfants ensorcelés ont la particularité d'avoir le front salé (Fontecha, 1606). A la même époque Pieter Pauw, premier professeur d'anatomie de l'université de Leyde aux Pays-Bas, rapporte à propos de l'autopsie d'une fillette de 11 ans ensorcelée, qu'une atteinte pancréatique est à l'origine de la mort. Cependant, ce n'est qu'au début du XXème siècle que les premières associations entre pathologie pancréatique et iléus méconial (Landsteiner, 1905) ou atteintes pulmonaires (Garrod & Hurtley, 1913; Wilson & DuBois, 1923) sont décrites. Une thèse dirigée par Guido Fanconi, pédiatre suisse, différenciera en 1936 l'association fibrose kystique du pancréas et bronchectasies, de la maladie cœliaque jusqu'alors confondue avec la mucoviscidose (Fanconi *et al.*, 1936). En 1938, la maladie est réellement décrite comme une entité pathologique regroupant les différentes atteintes et est nommée « cystic fibrosis of the pancreas » par Dorothy Andersen qui suggère quelques années plus tard le caractère héréditaire et le mode de transmission récessif de la maladie (Andersen, 1938; Andersen & Hodges, 1946). Dix ans plus tard, à l'occasion de la canicule qui touche l'est des Etats Unis, Paul Di Sant'Agnese, médecin hospitalier, remarque que les enfants atteints de mucoviscidose sont particulièrement affectés et meurent par déshydratation. Il montre que cette déshydratation découle d'une anormalité de concentration du chlorure de sodium et de potassium dans la sueur de ces patients (Di Sant'Agnese *et al.*, 1953). Cette observation permettra la mise au point, six ans plus tard, du test de la sueur, test qui demeure actuellement le plus fiable pour détecter la maladie (Gibson & Cooke, 1959). L'origine biochimique de la mucoviscidose est précisée en 1981 par Knowles qui remarque que le potentiel transépithélial, mesuré au niveau de l'épithélium nasal des patients atteints de mucoviscidose, est largement plus électronégatif que celui des sujets sains (Knowles *et al.*, 1981), puis par Quinton en 1983, qui démontre que cette électronégativité accrue provient d'une faible perméabilité de l'épithélium aux ions chlorures (Quinton, 1983; Quinton & Bijman, 1983). En 1985, le locus du gène responsable de la maladie est localisé sur le bras long du chromosome 7 en 7q31 (Tsui *et al.*, 1985). Le gène sera précisément identifié et cloné en 1989 par un groupe

canadien qui nommera ce gène *CFTR* pour Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

B. La protéine CFTR

1. Structure

Le gène *CFTR,* d'une longueur de 190 kb, comporte 27 exons (Ellsworth *et al.*, 2000). Il code une protéine de 1480 acides aminés, Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR), qui appartient à la famille des ABC transporteurs. Elle est composée de deux motifs répétés chacun contenant un domaine hydrophobe transmembranaire constitué de six hélices α et une région hydrophile susceptible de lier l'ATP appelée NBD pour Nucleotide ATP-binding Domain. Ces deux motifs sont reliés entre eux par un domaine régulateur (R) cytoplasmique contenant de nombreux résidus chargés et comportant la majorité des sites consensus de phosphorylation par la protéine kinase A et C (Sheppard & Welsh, 1999). CFTR demeure, à ce jour, la seule protéine ABC transporteur comportant un domaine R (Figure 1).

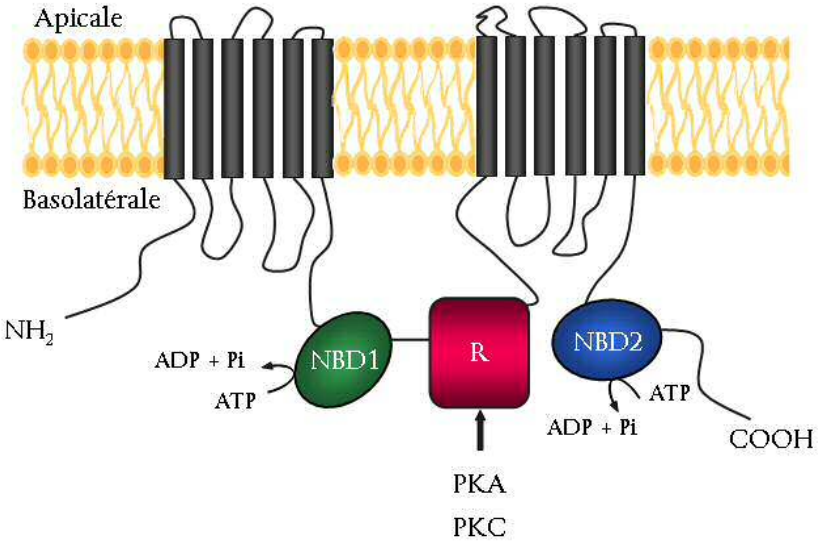


Figure 1: Représentation schématique de la structure de la protéine CFTR

NBD : nucleotide binding domains liant l'ATP ; R : domaine régulateur contenant les principaux sites de phosphorylation ; PKA : protéine kinase A ; PKC : protéine kinase C
Adapté d'après (Devidas & Guggino, 1997).

2. Localisation

La protéine CFTR est principalement localisée à la membrane apicale des cellules des épithéliums. Elle est retrouvée de manière abondante dans les glandes sudoripares, les canaux pancréatiques et biliaires, les cryptes intestinales et l'arbre trachéo-bronchique. De manière

discordante avec le phénotype de la maladie observé chez les patients, elle est très exprimée dans les tubules rénaux et peu au niveau pulmonaire (Crawford *et al.*, 1991).

3. Fonctionnement du canal CFTR

CFTR est un canal anionique de faible conductance (7 à 10 pS) avec la perméabilité sélective suivante : $I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > HCO_3^- >$ formate > acetate (Linsdell *et al.*, 1997). Au niveau des cellules épithéliales, le transport des ions Cl^- se fait principalement via CFTR (Morris & Frizzell, 1994). Il est AMPc-dépendant et son activité est finement régulée par la balance des activités kinases et phosphatases au sein de la cellule (Sheppard & Welsh, 1999). Le processus débute avec la phosphorylation de résidus sérines du domaine R par la protéine kinase A et/ou la protéine kinase C. Cette phosphorylation introduit des charges négatives permettant la fixation de l'ATP sur les domaines NBD1 et NBD2. Cette fixation de l'ATP favorise la formation d'un dimère NBD1-NBD2 en tête à queue. L'hydrolyse de l'ATP fixée au domaine NBD2 est très rapide comparée à celle du domaine NBD1, celle-ci restant fixée plusieurs minutes. Au moment de l'hydrolyse de l'ATP du domaine NBD2, l'énergie libérée va permettre l'ouverture du canal. Les anions, qui se sont s'accumulés aux extrémités du canal chargées positivement, diffusent alors passivement au niveau du pore de CFTR dans le sens du gradient électrochimique. A la fin de l'hydrolyse, le phosphate inorganique ainsi que l'ADP sont libérés ce qui a pour conséquence de déstabiliser le dimère NBD1-NBD2 entraînant la fermeture du canal. L'ATP du domaine NBD1 restant fixée plusieurs minutes, de nombreux cycle d'ouverture-fermeture-ouverture ont lieu, avec l'hydrolyse d'une molécule d'ATP au niveau du domaine NBD2 à chaque cycle (Figure 2) (Gadsby *et al.*, 2006).

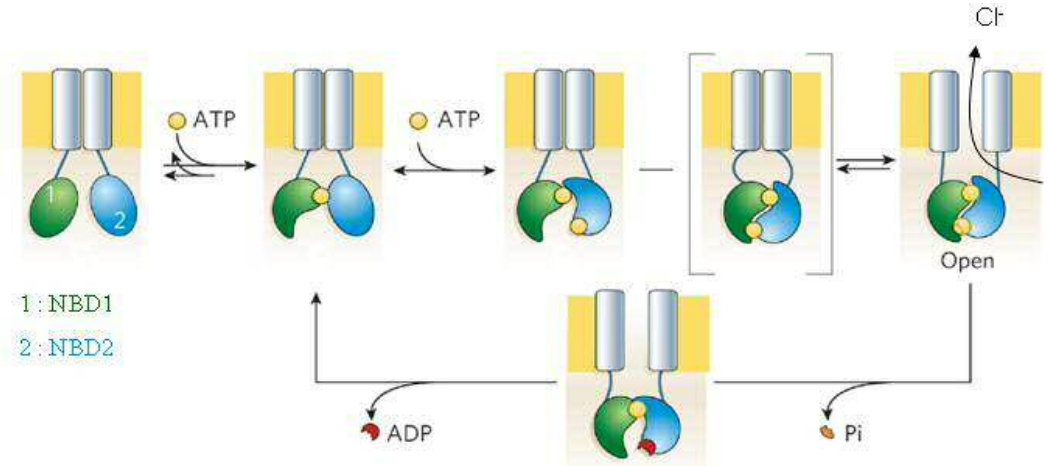


Figure 2 : Représentation schématique du fonctionnement du canal CFTR

Le domaine R est volontairement omis. L'hydrolyse de l'ATP (rond jaune) au niveau du domaine NBD2 permet l'ouverture du canal et ainsi la sortie d'ions chlorure. Adapté d'après (Gadsby *et al.*, 2006).

4. Les mutations retrouvées sur le gène CFTR

Un grand nombre de mutations dans le gène CFTR sont responsables de la mucoviscidose. A ce jour, 1910 mutations sur le gène CFTR ont été répertoriées dans la base de données Cystic Fibrosis Mutation Database (http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html). Parmi celles-ci, 14 % correspondent à un polymorphisme et n'ont pas de conséquences cliniques, 40 % sont des mutations faux-sens, 16 % correspondent à des micro-insertions ou délétions provoquant un décalage du cadre de lecture, 12 % sont des mutations causant un défaut d'épissage de l'ARNm et 8 % sont des mutations non-sens. La fréquence des mutations dans la population varie en fonction de la localisation géographique et de l'origine ethnique, avec une répartition différente pour chaque mutation (Casals *et al.*, 1992; Estivill *et al.*, 1997; Estivill *et al.*, 1989; Lucotte *et al.*, 1991; Southern *et al.*, 2007). Par exemple, l'incidence de la mutation F508del-CFTR est croissante dans le sens Afrique du Nord vers les pays nordiques de l'Europe et c'est l'inverse pour la mutation N1303K (Estivill *et al.*, 1997). Aujourd'hui, on distingue 6 classes de mutations en fonction des conséquences induites sur la protéine (Figure 3).

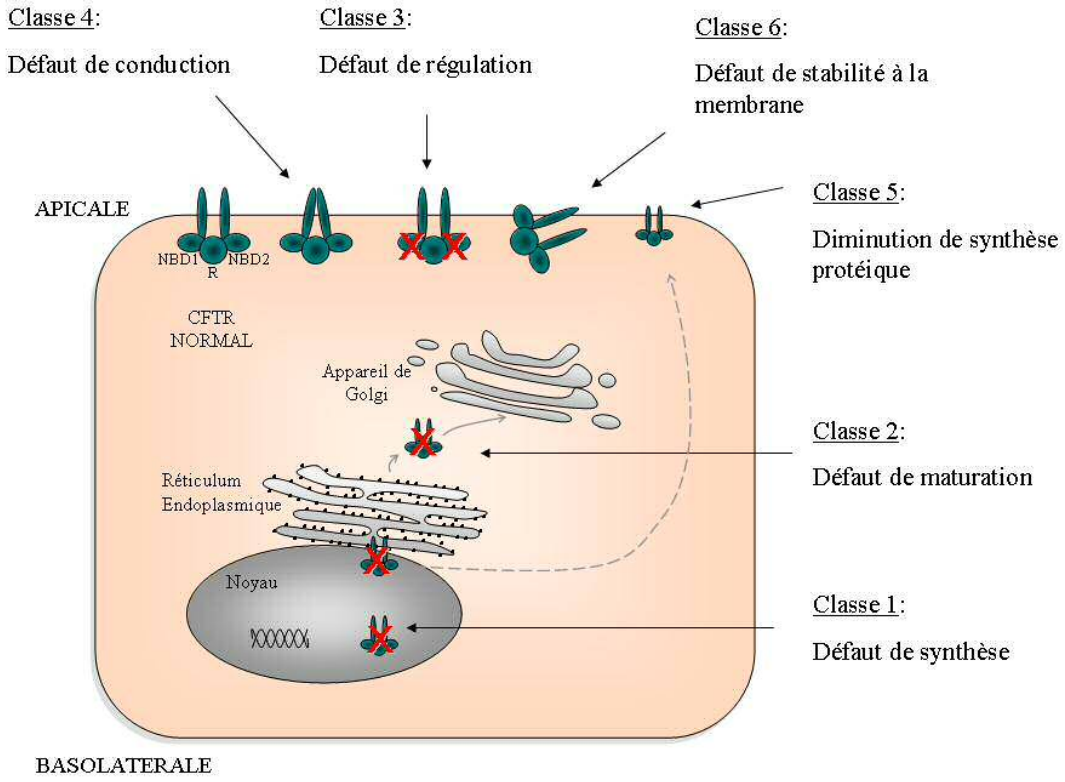


Figure 3 : Les 6 classes de mutations du gène CFTR en fonction des mécanismes moléculaires à l'origine du dysfonctionnement de la protéine

- Classe 1 : ce sont souvent des mutations provoquant un épissage anormal ou la survenue d'un codon stop prématuré. Elles entraînent ainsi une absence de synthèse de protéine.
- Classe 2 : ces mutations provoquent un défaut de maturation. La protéine anormalement repliée va être précocement dégradée par le protéasome et n'est présente qu'en très faible quantité à la membrane apicale des cellules. La délétion d'une phénylalanine en position 508 (F508del-CFTR) est la mutation la plus fréquemment retrouvée (~ 70 % des mutations) et près de 90 % des patients atteints de mucoviscidose sont porteurs d'au moins une copie de cette mutation (Figure 4) (Kerem *et al.*, 1989).

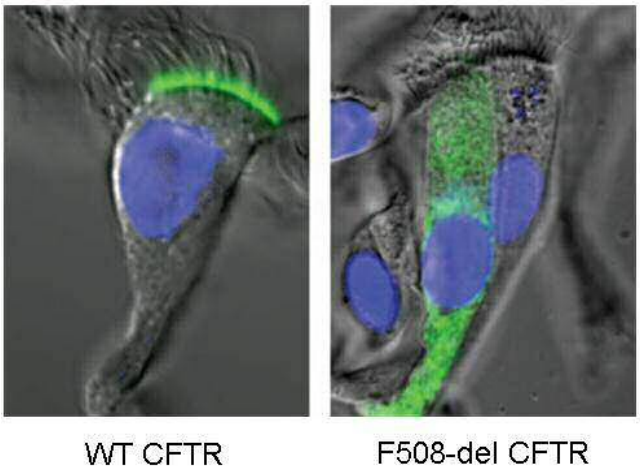


Figure 4 : Localisation par immunofluorescence de CFTR wild type et F508del-CFTR dans des cultures primaires de cellules épithéliales humaines différenciées

Les noyaux sont marqués en bleu. La protéine CFTR wild type est présente à la membrane apicale des cellules ciliées contrairement à la protéine F508del-CFTR (marqué en vert). D'après (Riordan, 2008).

- Classe 3 : les mutations appartenant à cette classe ont pour conséquence un défaut de régulation du canal CFTR, souvent par altération de la phosphorylation du domaine R ou altération de la liaison/l'hydrolyse de l'ATP au niveau des domaines NBD.
- Classe 4 : dans ce cas de mutation, c'est la sélectivité, la durée d'ouverture ou la conductance du canal qui est affectée. Elles sont principalement retrouvées dans les régions codant les domaines transmembranaires de la protéine (Sheppard *et al.*, 1993).

- Classe 5 : ces mutations induisent une diminution de la synthèse de la protéine par diminution de la stabilité des ARNm.
- Classe 6 : ces mutations résultent en une troncature de la partie C-terminale de la protéine provoquant une demi-vie membranaire courte (Haardt *et al.*, 1999).

Les mutations entraînant une absence de la protéine CFTR fonctionnelle ont généralement des conséquences cliniques plus sévères, cependant le phénotype dépend du patient et de son environnement. De grandes disparités cliniques sont observées pour une même mutation chez différents individus (Rowntree & Harris, 2003).

C. CFTR : Protéine multifonctionnelle de l'épithélium

1. Physiologie de l'épithélium

L'épithélium constitue la barrière entre la lumière d'un organe et le tissu conjonctif sous-jacent duquel il est séparé par la lame basale. Il est composé de cellules polarisées associées entre elles grâce à des jonctions de 3 types :

- **jonctions serrées** : elles s'établissent au pôle apical des cellules épithéliales polarisées. Elles sont formées par différentes protéines, notamment les occludines et les claudines, autour desquelles les membranes plasmiques des 2 cellules adjacentes fusionnent. Ces jonctions permettent l'étanchéité entre la lumière et la lame basale de l'épithélium, empêchant la diffusion vers la lumière des nutriments absorbés par l'épithélium ou la pénétration de micro-organismes. Ces jonctions laissent passer sélectivement certaines petites molécules comme l'eau ou les ions, c'est le transport paracellulaire. Cependant ce passage paracellulaire est contrôlé, notamment par les claudines, et des mutations sur les gènes codant ces protéines provoquent un transport paracellulaire dérégulé aboutissant à diverses pathologies (Marchiando *et al.*, 2010).
- **jonctions communicantes** : également appelées jonctions gap par anglicisme. Elles sont constituées de protéines appelées connexines qui s'associent en hexamères pour former un canal appelé connexon. Situées entre 2 cellules, elles permettent le passage d'un cytoplasme à l'autre de petites molécules (ions, peptides). L'ouverture de ces connexons est contrôlée par différents facteurs comme le pH, la concentration en Ca^{2+} ou en AMPc (http://www.chups.jussieu.fr/).
- **jonction d'ancrage** : également appelées jonctions adhérentes. Elles regroupent entre autres les desmosomes et les hémi-desmosomes. Composés de filaments intermédiaires ou d'actine, les premiers relient le cytosquelette des cellules entre elles

alors que les seconds relient le cytosquelette des cellules à la matrice extracellulaire. Ils assurent une cohésion mécanique de l'épithélium (http://www.chups.jussieu.fr/).

Le maintien de l'homéostasie est assuré par les échanges ioniques au travers de l'épithélium. Ces échanges trans-épithéliaux s'effectuent par voie paracellulaire (au travers des jonctions serrées) ou par voie trans-cellulaire au travers de canaux, transporteurs et pompes :

- **les canaux** : ils assurent un transport passif facilité dans le sens du gradient électrochimique de l'espèce considéré. Ces canaux sont plus ou moins sélectifs vis-à-vis des différents ions et leur conformation varie entre un état ouvert et un état fermé en fonction de divers paramètres (pH, concentrations en AMPc ou en Ca^{2+}). Ils peuvent transporter entre 10^7 et 10^9 molécules par seconde. CFTR appartient à cette catégorie.
- **les pompes** : il s'agit d'un transport actif primaire qui nécessite l'hydrolyse d'ATP. Elles permettent le transport d'ions contre leur gradient électrochimique à raison de 10^3 à 10^4 ions par secondes.
- **les transporteurs** : ils permettent le transport simultané et dépendant de deux solutés. Les solutés peuvent être transférés dans le même sens, il est alors question de symports ou co-transporteurs, ou dans le sens opposé, il s'agit alors d'antiports ou échangeurs. C'est un transport secondairement actif qui utilise l'énergie d'un gradient ionique engendré par le transport actif d'une pompe. Il permet le transport d'environ 10^5-10^8 molécules par seconde.

La direction du flux ionique à travers l'épithélium résulte des transports actifs et passifs des différents ions, en particulier des ions sodium, chlorure et potassium. Au niveau de l'épithélium respiratoire, le sodium est sécrété basalement par la pompe Na^+/K^+ ATPase entraînant au niveau apical, par le gradient électrochimique ainsi créé, l'absorption du sodium vers l'intérieur de la cellule, absorption effectuée par le canal ENaC. En raison du principe d'électroneutralité, ce mouvement trans-cellulaire du sodium s'accompagne d'un transfert par voie paracellulaire d'ions chlorure. Le co-transporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$, situé à la membrane basolatérale permet l'absorption d'ions chlorure, couplés aux ions sodium et potassium. Les ions potassium sont recyclés à travers la membrane basolatérale par un canal potassium et les ions sodium par la pompe Na^+/K^+ ATPase. Les ions chlorure sont quant à eux sécrétés à la membrane apicale par différents canaux, principalement CFTR et secondairement ORCC

ainsi que différents canaux chlorure calcium-dépendant tel que TMEM16A ; dans une moindre mesure, ce rôle est aussi assuré par des canaux chlorure pH-, voltage- ou volume-dépendants (Toczylowska – Mamińska & Dolowy, 2012). Ce transport trans-cellulaire des ions chlorure du pôle basolatéral vers le pôle apical des cellules épithéliales est accompagné d'un transfert paracellulaire d'ions sodium. Ainsi l'homéostasie est maintenue dans un système favorisant une absorption active du sodium, qui entraîne l'eau suivant le principe de l'osmose, et une sécrétion active et régulée du chlorure, modérant l'absorption d'eau (Figure 5).

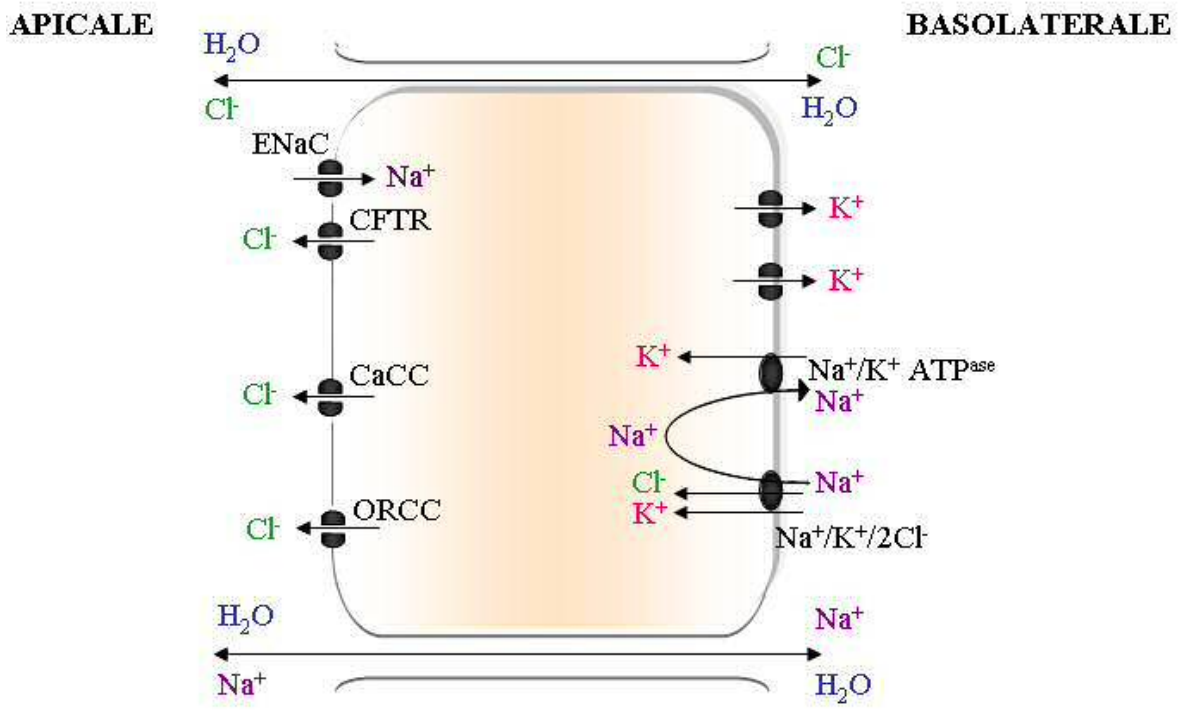


Figure 5 : Transport du chlorure, sodium et potassium au niveau de l'épithélium sécrétoire

La pompe Na^+/K^+ ATP^{ase} joue un rôle moteur, engendrant l'absorption de sodium (Na^+) à la membrane apicale par le canal ENaC couplé à un transport paracellulaire des ions chlorure (Cl^-). La sécrétion des ions Cl^- intracellulaire à la membrane apicale est assurée par de multiples canaux, dont le principal est CFTR. Par osmose, ces transports ioniques sont accompagnés d'un transport d'eau.

2. CFTR : canal chlorure

C'est à Toronto, Canada, que l'activité canal chlorure de CFTR a été démontrée au début des années 90 par Christine E. Bear et ses collaborateurs. Après suggestion par cette équipe que CFTR était un canal anionique régulé par l'AMPc, une conductance chlorure

AMPc dépendante est observée dans des modèles non épithéliaux exprimant CFTR (Bear *et al.*, 1991; Kartner *et al.*, 1991; Rommens *et al.*, 1991). Cette hypothèse sera rapidement confirmée puisque l'équipe purifiera la protéine pour l'incorporer dans des protéoliposomes, assimilable à un système de membrane artificielle, et observera de nouveau cette activité démontrant que CFTR est bien un canal chlorure de faible conductance régulée par l'AMPc (Bear *et al.*, 1992).

3. CFTR : transporteur « multi-moléculaire »

En plus de sa fonction de canal chlorure, CFTR est capable de transporter diverses molécules. En premier lieu, il est aujourd'hui démontré que CFTR sécrète les ions bicarbonate au niveau des épithéliums (Devor *et al.*, 1999; Welsh & Smith, 2001). Néanmoins, cette sécrétion est étroitement liée à celle des ions chlorure, le canal CFTR ayant une sélectivité Cl^-/HCO_3^- dynamique qui dépend de la concentration extracellulaire des ions chlorure (Shcheynikov *et al.*, 2004). La perméabilité aux ions bicarbonate est alors augmentée dans le cas d'une faible concentration luminale d'ion chlorure.

D'autre part, CFTR est perméable au glutathion sous sa forme réduite, γ-glutamyl-cysteinyl-glycine (GSH), et de manière moins importante, sous sa forme oxydée (GSSG). Ce transport s'effectue de manière unidirectionnelle dans le sens du compartiment intracellulaire vers le compartiment extracellulaire (Linsdell & Hanrahan, 1998).

Une fonction plus controversée de CFTR est le transport de l'ATP (Cantiello *et al.*, 1998; Reisin *et al.*, 1994). Cette hypothèse est contestée par d'autres groupes qui ne retrouvent pas d'activité canal ATP associée à la protéine CFTR lors de mesures fonctionnelles sur différents modèles (Grygorczyk *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1996). Il est d'ailleurs peu probable, compte tenu du diamètre de son pore estimé à 5.3 Å, que CFTR puisse être perméable à cette molécule dont les dimensions sont comprises entre 7.65 x 9.23 x 18.71 Å pour la forme protonée et 7.30 x 9.43 x 18.40 Å pour la forme ionisée (Linsdell *et al.*, 1997). En revanche, plusieurs études suggèrent que CFTR serait étroitement associé à une conductance ATP, dans le sens de l'externalisation, qui se ferait par une voie distincte (Pasyk & Foskett, 1997; Schwiebert *et al.*, 1995; Sugita *et al.*, 1998). Enfin, de manière plus anecdotique, il a été montré que CFTR pourrait transporter l'eau et l'urée (Hasegawa *et al.*, 1992).

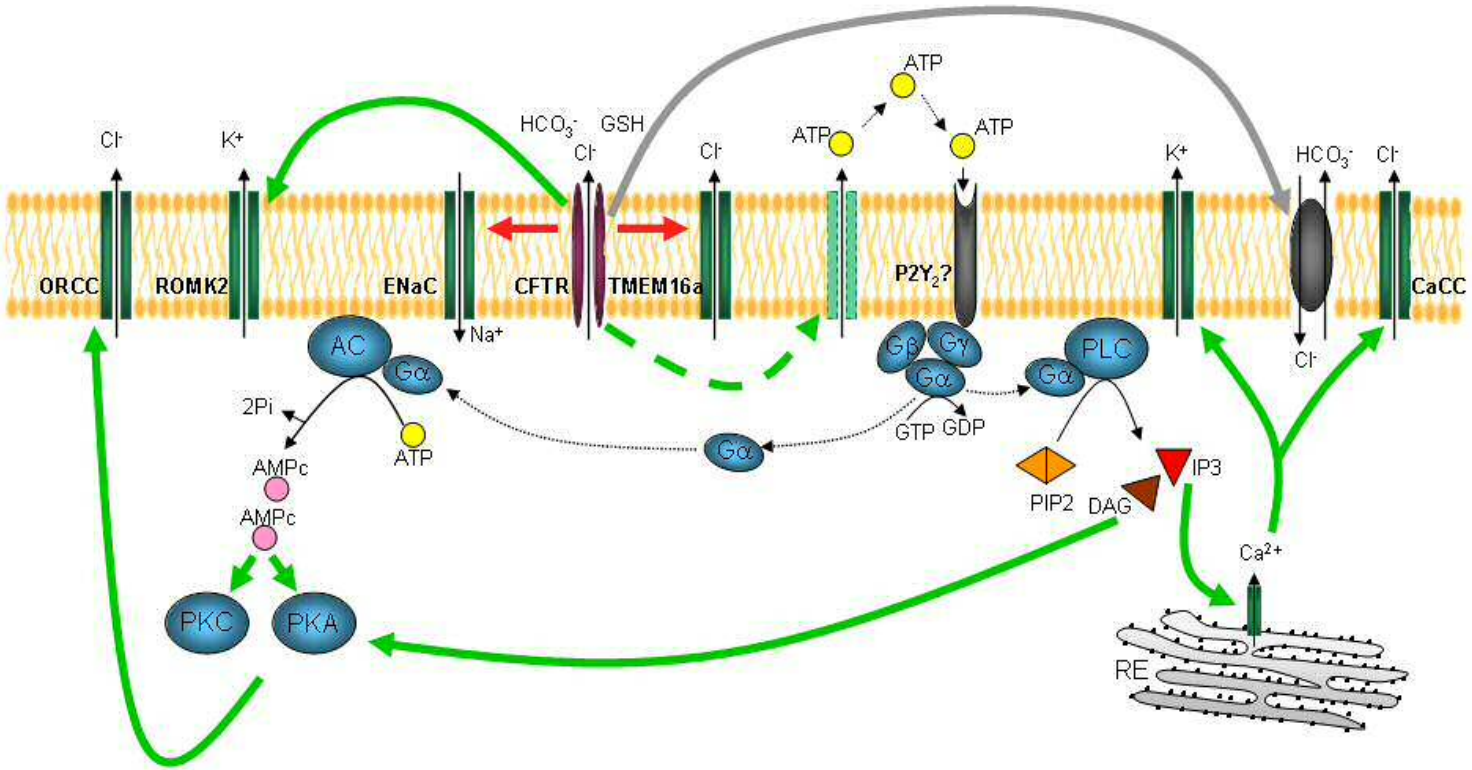


Figure 6 : Régulation du transport ionique par CFTR

CFTR inhibe (rouge) certains canaux comme ENaC et en active (vert) d'autres comme ORCC ou certains CaCC. La nature de la régulation des échangeurs Cl^-/HCO_3^- est encore mal définie (gris). La sécrétion de l'ATP dépendante de CFTR n'est pas clairement démontrée mais semble faire intervenir un autre canal (pointillés). De cette sécrétion d'ATP dépend une cascade de réactions avec l'activation de récepteurs purinergiques ($P2Y_2$) couplés aux protéines G (G pour "Guanine nucleotide binding proteins"). *L'activation des protéines G va permettre la synthèse d'inositol-triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) par la phospholipase C (PLC) à partir de phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP2) mais également l'activation de l'adénylate cyclase (AC) qui permet l'augmentation AMPc. Le DAG ainsi que l'AMPc vont permettre l'activation des protéines kinases A et C (PKA et PKC) qui active les canaux ORCC et CFTR. L'IP3, en se liant aux canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE), augmente la concentration du calcium provoquant l'activation de canaux potassique ou chlorure calcium-dépendant.*

4. CFTR : protéine régulatrice

CFTR est un acteur majeur au sein de l'épithélium qui, en plus de son activité canal, exerce une activité régulatrice sur de nombreux autres canaux ioniques et transporteurs (Figure 6) :

- Le canal ENaC : c'est le canal responsable de l'absorption du sodium au niveau apicale de l'épithélium. D'abord montrée dans un modèle de cellules épithéliales rénales, l'inhibition du canal ENaC par CFTR a ensuite été montrée dans l'épithélium des voies respiratoires et le colon (Mall *et al.*, 1998; Mall *et al.*, 1999; Stutts *et al.*, 1995). Le mécanisme mis en jeu est encore controversé. Certains proposent que cette inhibition soit, en partie ou en totalité, simplement dépendante de la concentration en ions chlorure dans le cytosol, et donc assujettie à la régulation du transport du chlorure par CFTR ou non (Bachhuber *et al.*, 2005). Cependant, d'autres mécanismes ont été avancés parmi lesquels l'hypothèse que l'inhibition d'ENaC se ferait via les filaments d'actine du cytosquelette (Berdiev *et al.*, 1996; Schwiebert *et al.*, 1999). Néanmoins, le mécanisme d'inhibition d'ENaC par CFTR aujourd'hui le plus apprécié repose sur une interaction directe entre les deux protéines via le domaine NBD1 de CFTR (Berdiev *et al.*, 2007; Berdiev *et al.*, 2009; Kunzelmann *et al.*, 1997; Schreiber *et al.*, 1999).

- Le canal ORCC : c'est un canal chlorure à rectification sortante situé à la membrane apicale des cellules épithéliales. CFTR exercerait une régulation positive sur ce canal dans les cellules épithéliales bronchiques (Egan *et al.*, 1992). Un mécanisme de régulation au travers d'un signal autocrine faisant intervenir l'ATP a été proposé (Schwiebert *et al.*, 1995; Schwiebert *et al.*, 1999; Stutts *et al.*, 1992; Stutts *et al.*, 1994).

- Les canaux chlorure calcium-dépendant (CaCC ou CLCA) : ces canaux sont présent à la membrane apicale de nombreux épithéliums (Hartzell *et al.*, 2005). Il a été démontré dans différents modèles (cellules endothéliales d'artère pulmonaire bovine, cellules acinaires des glandes salivaires et cellules épithéliales bronchiques) que l'activation de CFTR était corrélée à l'inhibition du courant chlorure calcium-dépendant (Kunzelmann *et al.*, 1997; Ousingsawat *et al.*, 2011; Perez-Cornejo & Arreola, 2004; Wei *et al.*, 1999). C'est en 2008 qu'est identifié le principal canal responsable du transport chlorure calcium-dépendant, TMEM16A, par 3 groupes

distincts (Caputo *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Très récemment, le groupe de Karl Kunzelmann a démontré que l'expression et l'activation de CFTR respectivement atténue et annule l'activité de TMEM16A (Ousingsawat *et al.*, 2011). Le mécanisme d'interaction entre ces deux canaux semblerait être direct faisant intervenir la partie C-terminale du domaine R de CFTR (Wei *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001). Parallèlement, CFTR pourrait aussi à l'inverse stimuler le canal CLCA3, un CaCC secondaire, probablement par un mécanisme dépendant des protéines G (Brouillard *et al.*, 2005; Hartzell *et al.*, 2005).

- Les canaux chlorure volume-dépendant : cette autre catégorie de canaux, moins étudiée, semble également modulée par CFTR. En effet, Vennekens et ses collaborateurs ont montré que l'expression de CFTR, indépendamment de son activation, diminuait le courant chlorure volume-sensible dans 2 types cellulaires différents (Vennekens *et al.*, 1999).

- Les échangeurs Cl^-/HCO_3^- : en plus de son propre rôle de canal Cl^- et $HCO3^-$, CFTR régule le transport de ces ions par d'autres protéines, en particulier les échangeurs de la famille SLC26 (Chang *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 1999). La nature de cette régulation est encore mal définie mais il semblerait qu'elle nécessite une interaction entre le domaine R de CFTR et le domaine C-terminal « Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist » (STAS) de SLC26 (Bertrand *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2009; Ko *et al.*, 2002; Shcheynikov *et al.*, 2006; Shcheynikov *et al.*, 2008; Stewart *et al.*, 2009).

- Autres régulations : CFTR est reconnue pour être une protéine d'interaction et à ce titre elle régule encore d'autres canaux et transporteurs. Parmi eux, les canaux potassiques qui ont un rôle crucial pour le maintient de la balance Na^+/Cl^- dans l'épithélium en raison des forces conductrices qu'ils induisent. D'une part les canaux Kir (K^+ inwardly rectifying potassium channel) et notamment le canal ROMK, qui sont des canaux ATP-dépendant, semblent être altérés par CFTR (Loussouarn *et al.*, 1996; McNicholas *et al.*, 1997; Schwiebert *et al.*, 1999). D'autre part, les canaux potassique calcium-dépendant pourraient être indirectement modulés par CFTR. Encore de nombreuses autres régulations, liées au transport ionique, par CFTR ont été montrées telles que la diminution d'expression et de fonction du co-transporteur sodium/phosphate type 2a ou l'activation de l'aquaporine 3 (Bakouh *et al.*, 2012; Schreiber *et al.*, 1999; Schreiber *et al.*, 2000).

5. Protéine CFTR mutée : conséquences sur le transport ionique

En faisant la synthèse de tous les rôles tenus par CFTR, il est aisé de concevoir à quel point son absence ou son dysfonctionnement est lourd de conséquences. En effet, dans la mucoviscidose, tous les transports ioniques assurés ou régulés par CFTR décrits ci-dessus sont perturbés, à commencer par le transport du chlorure. CFTR étant lui-même le principal canal chlorure des épithéliums sécrétoires et régulant positivement le canal ORCC et certains CaCC, son absence ou dysfonctionnement entraînera une diminution de la sécrétion des ions chlorure à la membrane apicale. En parallèle, il a été montré que les patients atteints de mucoviscidose présentaient une augmentation de la sécrétion de chlorure calcium-dépendant (Grubb *et al.*, 1994; Tarran *et al.*, 2002). Cela est probablement dû à l'inhibition exercé par CFTR sur le principal CaCC, TMEM16A. Cette régulation n'ayant pas lieu dans un épithélium CF, TMEM16A tendrait à réguler la sécrétion du chlorure dans la maladie. A cette moindre sécrétion de chlorure, vient s'ajouter une hyperabsorption du sodium à la membrane apicale par le canal ENaC, CFTR n'y exerçant plus de régulation négative. Ce dérèglement a été observé, au niveau des épithéliums des patients atteints de mucoviscidose, dès le début de la caractérisation de la maladie (Knowles *et al.*, 1981; Mall *et al.*, 1998; Stutts *et al.*, 1995). Aujourd'hui, il est de plus en plus admis que cette augmentation de l'absorption du sodium est un facteur clé dans la genèse de la maladie (Mall, 2009). En effet, l'hyperabsorption du sodium dans les épithéliums semble prépondérante sur la diminution de sécrétion des ions chlorure. Les travaux réalisés dans un modèle murin de surexpression d'ENaC montrent que ces souris présentent une atteinte pulmonaire semblable à la mucoviscidose, phénotype qui n'est pas retrouvé chez les souris invalidées pour le gène *CFTR* (Mall *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2011). Cette hyperabsorption du sodium va entraîner une absorption passive d'ions chlorure, s'ajoutant à leur déficit de sécrétion ; il en résulte une hyperabsorption de NaCl. Ces altérations sont par ailleurs accentuées par la perturbation des transports potassiques, les flux des trois ions au travers de l'épithélium étant indissociables (Schwiebert *et al.*, 1999).

D'autre part, CFTR semble critique dans le transport des ions bicarbonate, transport effectué par lui-même et par les échangeurs SLC26 qu'il régule, ces ions étant absents dans les fluides pancréatiques des patients CF (Kopelman *et al.*, 1988). Les ions bicarbonate ayant un rôle tampon, le pH des liquides recouvrant les épithéliums en serait affecté.

CFTR étant perméable au glutathion, le dernier dysfonctionnement ionique majeur est la diminution de la sécrétion de glutathion réduit dans les liquides extracellulaires recouvrant les épithéliums (Gao *et al.*, 1999). Le glutathion réduit est un antioxydant majeur qui est normalement présent en grande quantité dans ces liquides, environ 430 µM au niveau

pulmonaire soit 140 fois plus que dans le plasma (Cantin *et al.*, 1987). Il doit permettre la détoxification des radicaux libres oxygénés (ROS) par réaction d'oxydoréduction. Dans le cas de la mucoviscidose, le taux de glutathion réduit dans le milieu extracellulaire ne représente que 5 à 10 % du taux normal dans les voies aériennes, ce qui engendre la non-élimination des ROS qui vont alors provoquer un stress oxydant (Ntimbane *et al.*, 2009).

Il est à noter que ne sont abordés ici que les partenaires du transport ionique de CFTR et les dysfonctionnements qui découlent de leurs interactions. CFTR interagit aussi avec d'autres protéines liées à l'inflammation par exemple. Bien que la majeure partie des symptômes découlent des dysfonctionnements du transport ionique, il serait nécessaire de prendre en compte l'ensemble de l'interactome de CFTR pour obtenir une vision globale de ses fonctions et expliquer l'ensemble de la physiopathologie (Edelman *et al.*, 2009; Mehta, 2005).

D. Les symptômes de la maladie

1. Les atteintes gastro-intestinales

Dans la mucoviscidose, l'hyperabsorption de NaCl décrite précédemment va entraîner, par le principe d'osmose, une hyperabsorption d'eau. Les sécrétions seront donc déshydratées, augmentant ainsi leur viscosité. Ces sécrétions, en plus d'une viscosité augmentée, sont aussi plus acides en raison des altérations de transport des ions bicarbonates. Ces dysfonctionnements entraînent de multiples symptômes gastro-intestinaux. Ainsi, chez les patients CF, les sécrétions biliaires acides précipitent ce qui, associé à une haute viscosité, entraîne une obstruction des conduits hépatiques pouvant provoquer une cirrhose biliaire. De la même manière, les protéines précipitent dans les sécrétions pancréatiques aboutissant à une obstruction des conduits pancréatiques, des lésions puis une fibrose conduisant à une insuffisance pancréatique exocrine. Cela induit une malabsorption des graisses et des vitamines en raison d'une mauvaise sécrétion des enzymes (lipases, trypsine et chymotrypsine), participant à divers symptômes chez le patient comme la malnutrition. Les lésions pancréatiques sont aussi à l'origine de la dégradation des cellules β des îlots de Langerhans générant un diabète chez 20 % de ces patients. Les mutations de CFTR conduisant à une absence de transport des ions bicarbonates sont associées à des insuffisances pancréatiques sévères alors qu'il est observé une suffisance pancréatique lors de mutations conduisant seulement à une diminution de ce transport. La déshydratation du bol fécal est également responsable d'obstructions intestinales distales à l'âge adulte mais aussi chez le

nouveau-né, appelé iléus méconial (non-évacuation des premières selles) (Choi *et al.*, 2001; Marelich & Cross, 1996; Wilschanski & Durie, 2007).

2. Les atteintes du système reproducteur

S'ajoute, à ces manifestations gastro-intestinales, une infertilité qui touche les patients de sexe masculin. Elle est due à l'obstruction et la dégénérescence du canal déférent, reliant l'épididyme au canal éjaculateur qui rejoint l'urètre.

3. Les atteintes des voies respiratoires

a) L'épithélium respiratoire normal

L'épithélium respiratoire recouvre les voies aériennes supérieures et inférieures (des fosses nasales aux alvéoles). Au niveau trachéo-bronchique, sont retrouvés 4 principaux types cellulaires :

- les cellules ciliées : elles sont majoritaires, de forme prismatique. Leur pôle apical est riche en mitochondries permettant de fournir l'énergie nécessaire au battement des 250 à 300 cils présents à leur surface (Postiaux & Paupe, 2003). CFTR s'exprime majoritairement dans ces cellules.
- les cellules caliciformes : elles sont environ 5 fois moins nombreuses que les cellules ciliées. Leur pôle apical est dilaté et contient de nombreuses vacuoles de sécrétion renfermant entre autres des mucines et des IgA sécrétoires, celles-ci constituant la première ligne de défense au niveau des sécrétions contre les bactéries et les virus (Goodman *et al.*, 1981; Verdugo, 1990).
- les cellules intermédiaires : elles sont minoritaires, fusiformes, non ciliées et non sécrétoires.
- les cellules basales : elles sont triangulaires, ancrées à la lame basale de l'épithélium.

Au cours d'une vie, en moyenne 300 millions de litres d'air, contenant pathogènes et molécules toxiques, seront filtrés par les poumons. L'épithélium respiratoire tient donc un rôle crucial de défense qui lui est conféré par 3 principales propriétés : être jointif grâce aux jonctions intercellulaires (GAP, d'ancrage, serrées cf. paragraphe I.C.1), posséder une réponse immunitaire et être recouvert d'un liquide de surface. Ce liquide visqueux est composé de deux phases : le liquide périciliaire et la phase gel. Le liquide périciliaire est principalement composé d'eau et d'ions. C'est la teneur en sels qui régule son volume par osmose. La phase gel située au dessus de la phase périciliaire est riche en mucines qui sont des glycoprotéines

filamenteuses de haut poids moléculaire. Elles créent entre elles des ponts disulfures formant un polymère visco-élastique.

La visco-élasticité du réseau confère au liquide de surface une défense de l'épithélium en deux temps. Premièrement les bactéries sont piégées par la viscosité et neutralisées par les mucines qui adhérent aux adhésines bactériennes (Ramphal *et al.*, 1996; Trivier *et al.*, 1997). De plus des défensines, peptides antimicrobiens, sont sécrétées par les neutrophiles (α-défensines) et par les cellules épithéliales (β-défensines) (Lehrer *et al.*, 1993; Zhao *et al.*, 1996). Deuxièmement, la visco-élasticité de la phase gel permet la clairance mucociliaire (Puchelle *et al.*, 1987). Les cils, baignés par le liquide périciliaire, ont leur pointe dans la phase gel lorsqu'ils sont étirés. A ce moment, par une propulsion en avant, la pointe des cils fait progresser la phase gel élastique vers la trachée. Les cils se replient ensuite dans le liquide périciliaire pour reprendre leur position initiale. Leur battement est coordonné, à raison d'environ 1000 par minute. La toux contribue, en plus de la clairance mucociliaire, à l'évacuation du mucus contenant les pathogènes et les toxiques (Postiaux & Paupe, 2003).

b) L'épithélium respiratoire dans le contexte de la mucoviscidose

(1) La clairance mucociliaire

Dans le cas de cette maladie, la clairance mucociliaire est ralentie (Figure 7). Premièrement le liquide périciliaire est déshydraté en raison de l'hyperabsorption du NaCl (cf. § I.C.5). Cette phase liquide est donc moins importante et les cils se retrouvent ainsi englués dans la phase gel et ne peuvent plus se mouvoir correctement. Ce processus d'engluage des cils est accentué par une viscosité augmentée du mucus, plus épais en raison d'une augmentation de sécrétion des mucines chez les patients CF (Ali & Pearson, 2007; Hauber *et al.*, 2004; Hauber *et al.*, 2005; Nakanishi *et al.*, 2001). Enfin, les ions bicarbonate jouant un rôle tampon dans les liquides de surface des épithéliums, une diminution du pH dans les liquides de surface de l'épithélium bronchique est observée chez les patients CF (Coakley *et al.*, 2003). Cette acidification modifierait les charges électrostatiques ainsi que l'exposition des régions hydrophobes des mucines provoquant leur agrégation et augmentant encore la viscosité du mucus (Bhaskar *et al.*, 1991).

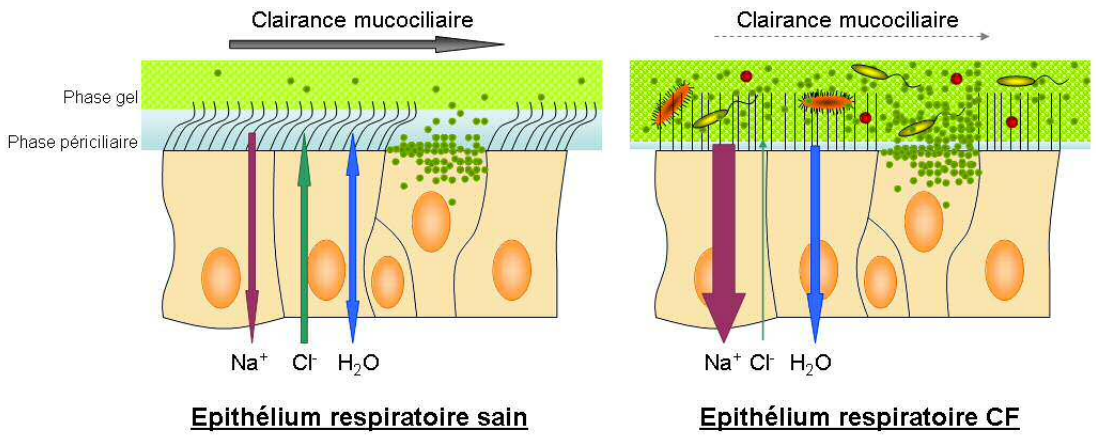


Figure 7 : Conséquence du dysfonctionnement de transport ionique sur la clairance mucociliaire dans la mucoviscidose

L'épithélium respiratoire CF présente une absorption d'eau secondaire à l'hyperabsorption de sodium et au manque de sécrétion de chlorure. Ainsi, le liquide périciliaire est déshydraté et les cils des cellules ciliées sont englués dans la phase gel et ne peuvent plus assurer un battement correct. Ce phénomène est aggravé par l'augmentation de sécrétion de mucines par les cellules caliciformes. La clairance mucociliaire est alors diminuée favorisant la prolifération de bactéries et virus au sein du mucus visqueux.

(2) Les infections pulmonaires

La clairance mucociliaire étant diminuée, les sécrétions renfermant les pathogènes s'accumulent, ces derniers s'y multiplient et provoquent diverses infections. De plus, les défenses immunitaires sont amoindries, à l'instar des neutrophiles qui ne peuvent plus migrer dans un mucus si visqueux, la capture et la destruction des bactéries étant de ce fait diminuées (Matsui *et al.*, 2005). Ainsi, la quasi-totalité des patients souffrent d'infections pulmonaires provoquées par diverses pathogènes qui peuvent être isolés à partir d'expectorations ou de lavages broncho-alvéolaires. La nature des germes retrouvés dépend du patient et varie avec l'âge (Figure 8). Le premier germe à s'implanter est souvent *Staphylococcus aureus*, très rapidement après la naissance. C'est le germe le plus répandu avec 67 % des patients touchés, tous âges confondus. De plus, ces 10 dernières années, la prévalence de souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) n'a cessé d'augmenter, avec 7.3 % des patients atteints en 2001, 22.6% en 2008 et 25.7 % en 2010. Cette émergence de souches de MRSA complique le traitement des patients mais n'est toutefois pas liée au facteur mucoviscidose puisqu'elle est également observée dans les infections communautaires (LiPuma, 2010). L'infection précoce à *S. aureus*, qui cause des lésions pulmonaires, ainsi que les traitements anti-Staphylococciques favorisent ensuite l'implantation de souches de *Pseudomonas aeruginosa*

(Govan & Nelson, 1993; Ratjen *et al.*, 2001). La primo-infection à *P. aeruginosa* a lieu vers l'adolescence. L'infection devient ensuite chronique et constitue un des facteurs prédicteurs de morbidité et de mortalité (Emerson *et al.*, 2002). C'est pour autant un germe très fréquent avec plus de la moitié des patients infectés. De manière au moins aussi préoccupante que pour le MRSA, il y a actuellement une émergence des *P. aeruginosa* multi-drug résistant (MDR-PA). Certains patients sont également infectés, de manière chronique par *Burkholderia cepacia complex*, qui regroupe 17 espèces très proches entre elles de *B. cepacia*. Actuellement, la prévalence de *B. cepacia* et de *P. aeruginosa* (hors MDR-PA) décroit. En revanche, d'autres pathogènes opportunistes tels que *Stenotrophomonas maltophilia* et *Alcaligenes xylosoxidans* émergent. *S. maltophilia* était par exemple retrouvée chez seulement 4 % des patients en 1996 alors que son niveau atteint les 13.8 % pour l'année 2010 (LiPuma, 2010); http://www.cff.org). Par ailleurs, en France 6.6 % des patients CF sont infectés par diverses Mycobactéries non tuberculeuse (NTM), notamment *Mycobacterium abscessus complex* et *Mycobacterium avium complex*, représentant à eux deux plus de 95 % des infections pulmonaires à NTM chez ces patients (Roux *et al.*, 2009). De par leurs différents dysfonctionnements, les poumons des patients CF constituent un véritable écosystème dans lequel sont retrouvées encore bien d'autres bactéries pathogènes, tel que *Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae* ou encore des entérobactéries telles que *E. coli* ou *Klebsiella pneumoniae* (LiPuma, 2010). De façon plus étonnante, des bactéries anaérobies, du genre *Prevotella*, *Propionibacterium, Porphyromonas, Selenomonas* ou encore *Veillonella*, sont fréquemment présentes dans les poumons des patients, et ceci en grande quantité, entre 10^4 et 10^7 CFU/g d'expectoration, concentration comparable à celle de *P. aeruginosa* (Bittar *et al.*, 2008; Tunney *et al.*, 2008). La colonisation à *P. aeruginosa* semble d'ailleurs participer à l'implantation de ces bactéries anaérobies puisque la probabilité de retrouver ces dernière dans les expectorations est plus importante pour les patients colonisés par *P. aeruginosa* (Tunney *et al.*, 2008). D'autre part, le microbiote pulmonaire des patients CF est aussi composé de nombreuses espèces de champignons dont certaines pourraient participer au déclin de la fonction respiratoire (Chotirmall *et al.*, 2010). Ainsi, dans les expectorations de patients adultes, les genres *Aspergillus et Candida* sont très fréquemment retrouvés, notamment *A. fumigatus* et *C. albicans* détectés chez 54 % et 80 % des patients respectivement (Bouchara *et al.*, 2008). *Malassezia sp., Scedosporium prolificans et S. apiospermum et Exophiala dermatitidis* sont aussi régulièrement retrouvés (Bouchara *et al.*, 2008; Delhaes *et al.*, 2012). Enfin, de multiples virus sont également retrouvés dans les expectorations de ces patients, incluant des *Rhinovirus*, les plus fréquents, des *Adénovirus,*

des virus *Influenza,* des virus *Parainfluenza,* le virus respiratoire syncytial ou encore des *Coronavirus* (Burns *et al.*, 2012).

Comme détaillé précédemment, ces différents pathogènes vont évoluer avec l'âge du patient mais aussi évoluer individuellement, compliquant une fois de plus le traitement de ces patients. En plus de l'acquisition de résistances aux antibiotiques, les bactéries développent des moyens de défense vis-à-vis du système immunitaire. Par exemple, la formation de biofilm par *P. aeruginosa* ou la formation d'une capsule polysaccharidique par *S.aureus* va leur conférer une résistance à la phagocytose (Callaghan & McClean, 2012; Ulrich *et al.*, 2007). D'autre part ces différents micro-organismes vont interagir entre eux, à l'image du virus respiratoire syncytial qui va aider à la colonisation bactérienne de l'épithélium et à la diminution de la clairance mucociliaire bactérienne (Van Ewijk *et al.*, 2007; Stark *et al.*, 2006).

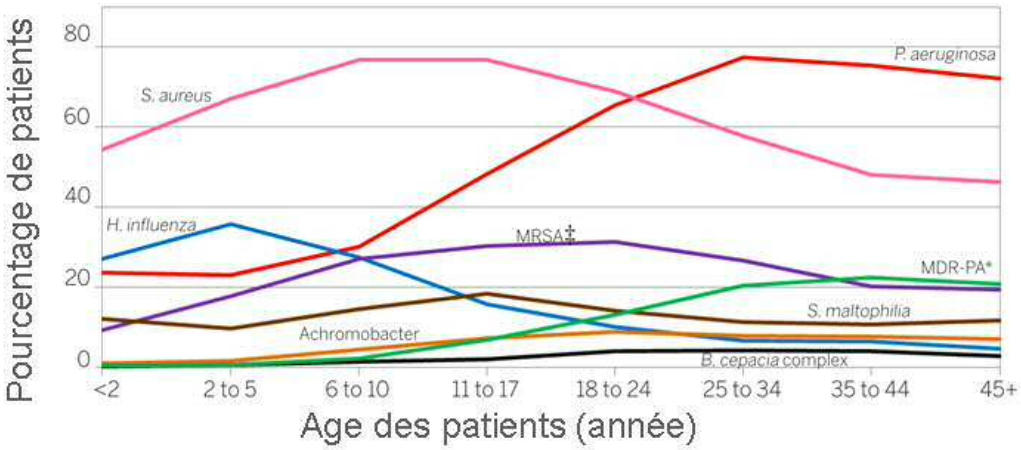


Figure 8 : Germes respiratoires par tranche d'âge en 2010

‡ MRSA : Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline
** MDR-PA : Pseudomonas aeruginosa multi-drug résistant*
En moyenne, sur l'ensemble des patients, la prévalence est 51.2 % pour P. aeruginosa (-), 17.2 % pour H. influenza (-), 67 % pour S. aureus (-), 9.8 % pour MDR-PA (-),13.8 % pour S. maltophilia (-), 2.5 % pour B. cepacia complex (-), 6.2 % pour A. xylosoxydans(-) et 25.7 % pour MRSA (-). Selon le rapport de données annuel 2010 du registre patient de la Cystic Fibrosis Foundation (http://www.cff.org/UploadedFiles/LivingWithCF/CareCenterNetwork/PatientRegistry/2010-Patient-Registry-Report.pdf).

(3) Les symptômes cliniques

En plus des lésions, les infections pulmonaires vont provoquer une inflammation chronique chez les patients, engendrant notamment la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires et une augmentation de la population de neutrophiles (cf. paragraphe II.B.3.).

En premier lieu, ces facteurs inflammatoires vont venir exacerber les problèmes préexistants, favorisant encore l'implantation des pathogènes. En effet, il a été montré que l'interleukine (IL-) 6, le tumor necrosis factor (TNF)-α, l'IL-1β et IL-9 stimulaient la sécrétion de différentes mucines (Hauber *et al.*, 2004; Longphre *et al.*, 1999; Louahed *et al.*, 2000; Smirnova *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001).

D'autres part, l'inflammation chronique, avec une hypersécrétion de protéases telle que l'élastase par les neutrophiles, ajoutée au stress oxydant généré par les ROS (cf. § I.C.5), va conduire à une protéolyse dégradant les tissus pulmonaires, une dilatation des bronches et une fibrose pulmonaire (Gibson *et al.*, 2003; Marelich & Cross, 1996). Viennent s'ajouter à cela, des atteintes ORL comme des polypes nasaux (Brihaye *et al.*, 1997). Les patients atteints de mucoviscidose présentent ainsi une dyspnée (gêne pour respirer), une ventilation pulmonaire accélérée et sifflante, des rhinosinusites et une toux chroniques, des expectorations de mucus et parfois des hémoptysies. L'intensité de ces symptômes varie dans le temps et les patients connaissent des épisodes d'exacerbation (augmentation en fréquence et en intensité de la toux, des expectorations, des hémoptysies, diminution des capacités respiratoires, fièvre, fatigue). Les exacerbations pulmonaires répétées ont des répercutions négatives à long terme, sur la fonction pulmonaire et l'espérance de vie. L'insuffisance respiratoire est de plus en plus sévère avec l'augmentation de l'âge. Elle peut être évaluée par la mesure du volume expiratoire forcé en 1 seconde (FEV_1), reflétant la fonction pulmonaire (Figure 9).

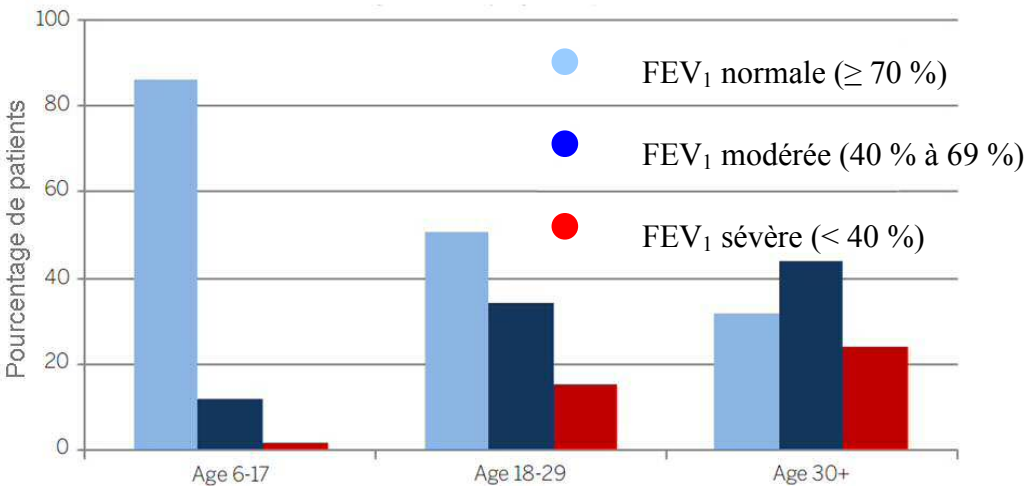


Figure 9 : Fonction respiratoire en fonction de l'âge

Le FEV_1 est exprimé en pourcentage de la valeur normale calculée par rapport à la taille, au poids, à l'âge, au sexe, aux origines ethniques… du patient.
D'après le rapport 2010 de la Cystic Fibrosis Foundation.

E. Les Traitements

1. Les traitements symptomatiques

Il n'existe aujourd'hui aucun traitement curatif de la mucoviscidose. Cependant, de grands progrès ont été faits sur les traitements symptomatiques, l'espérance de vie des patients augmentant d'année en année (Figure 10). Pour les symptômes gastro-intestinaux, les patients doivent suivre un régime hypercalorique associé à une administration d'extraits pancréatiques et de compléments alimentaires, tels que les vitamines. Pour les patients concernés par le diabète, s'ajoute une insulinothérapie. Les traitements les plus lourds sont liés aux symptômes pulmonaires. Les patients subissent une kinésithérapie respiratoire quotidienne pour désencombrer les bronches. Différentes drogues mucolytiques, des bronchodilatateurs ainsi que des drogues anti-inflammatoires leurs sont également administrés. Enfin, pour lutter contre les infections, les patients reçoivent des cures d'antibiotiques très régulières qu'il est nécessaire d'adapter à l'évolution de la résistance chez les différents germes. Certains patients dont l'insuffisance respiratoire est très sévère sont traités par oxygénothérapie. Lorsque ces traitements ne suffisent pas et que le pronostic vital est engagé, la transplantation pulmonaire reste aujourd'hui le seul recours (Ratjen & Döring, 2003).

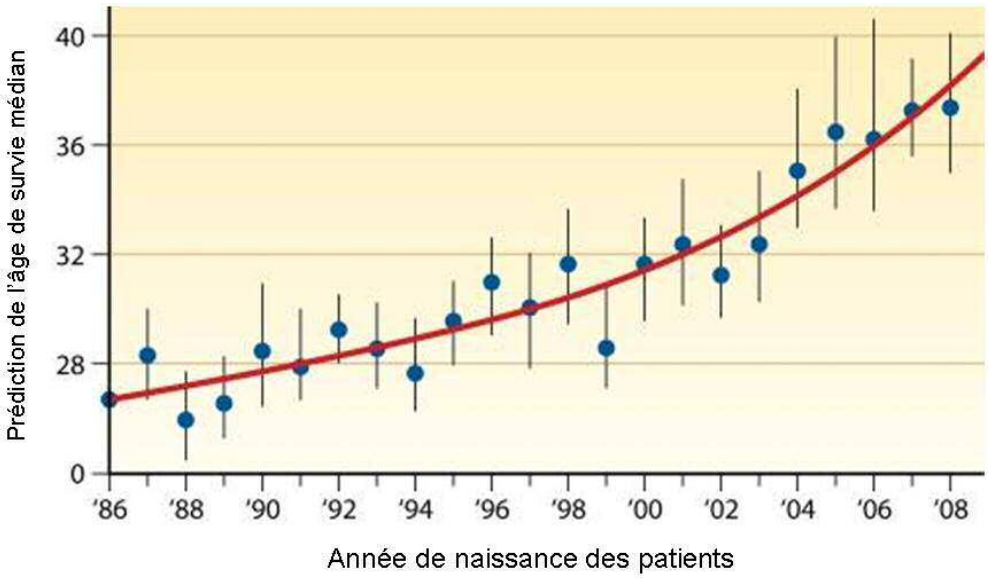


Figure 10 : Prédiction de l'âge de survie médian des patients en fonction de leur année de naissance

L'étude est réalisée pour des patients CF américains nés entre 1986 et 2008. D'après (LiPuma, 2010)*, basé sur le rapport 2008 de la Cystic Fibrosis Foundation.*

2. L'antibiothérapie contre *P. aeruginosa*

a) La primo-infection

Les souches de *P. aeruginosa* isolées de primo-infection sont généralement non mucoïdes et sensibles aux antibiotiques couramment utilisés. Le traitement de ces infections pose peu de problèmes. Associé à un diagnostique précoce de la maladie, un suivi régulier du patient et de bonnes mesures d'hygiène, les traitements antibiotiques précoces, parfois agressifs, semblent permettre l'éradication de *P. aeruginosa* pendant plusieurs années et retarder le passage à la chronicité de l'infection (Döring & Hoiby, 2004).

b) L'infection chronique

A partir du moment où l'infection devient chronique, l'antibiothérapie est souvent quotidienne, notamment avec des traitements inhalés (tobramycine, aztréonam, lévofloxacine, colimycine). Lors des exacerbations pulmonaires, l'antibiothérapie devient intensive et peut nécessiter l'hospitalisation du patient. En fonction du profil de résistance de la bactérie, différents antibiotiques ou associations d'antibiotiques sont alors utilisés par voie orale (azithromycine, ciprofloxacine) ou intraveineuse (aminosides / β-lactamines, aminosides / fluoroquinolones). Ces cures nécessitent plusieurs administrations quotidiennes pendant plusieurs semaines (www.has-santé.fr; Bals *et al.*, 2011; Gibson *et al.*, 2003).

3. Les nouvelles thérapies

a) Les molécules ciblant les origines de la maladie

De nombreuses molécules pharmacologiques visant à corriger directement les défauts de transport ionique sont actuellement à l'étude (Table 1). Certaines ont pour cible la protéine CFTR, afin d'augmenter le nombre de protéines présentes à la membrane apicale, ce sont les correcteurs, ou encore d'améliorer sa fonction, ce sont les potentiateurs. D'autres molécules ciblent différents canaux ioniques impliqués dans la physiopathologie de la mucoviscidose comme le canal ENaC. Bien que leur utilisation semblent prometteuse, certaines molécules efficaces en recherche préclinique se sont avérées avoir un très faible effet sur les patients CF (Leonard *et al.*, 2012). Ce manque de corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* ou chez l'animal et ceux obtenus chez l'homme n'est pas le seul obstacle. Beaucoup de ces molécules devront être optimisées afin de réduire leur toxicité et d'améliorer leur pharmacocinétique sans perte de l'activité de la molécule. Enfin, à l'instar du VX-770, le spectre d'activité de ces molécules est souvent réduit, ne couvrant pas l'ensemble des mutations existantes, ce qui implique le développement de nombreuses molécules.

Table 1 : Synthèse des molécules pharmacologiques en cours d'étude

Cibles	Nom de la molécule	Mutation ciblée	Fonctionnement	Stade de développement	Références
CFTR *Correcteurs*	Ataluren (PTC-124)	Codon stop prématurés	Permet la lecture malgré les codons stop par les ribosomes	Essai clinique phase III	(Kerem *et al.*, 2008; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010)
	4-PBA	F508-del	Améliore la maturation de la protéine dans le RE et prévient sa dégradation précoce	Essai clinique phase II	(Rubenstein *et al.*, 1997; Rubenstein & Zeitlin, 1998; Zeitlin *et al.*, 2002)
	Miglustat	F508-del	Améliore la maturation de la protéine dans le RE	Essai clinique phase II	(Leonard *et al.*, 2012; Norez *et al.*, 2006; Norez *et al.*, 2009)
	VX-809	F508-del	Réduit la rétention de la protéine mutée dans le RE	Essai clinique phase II	(Clancy *et al.*, 2012)
	Curcumin	F508-del	Réduit la rétention de la protéine mutée dans le RE par interaction avec le cytosquelette	Recherche préclinique	(Cartiera *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2004; Lipecka *et al.*, 2006)
	glafénine	F508-del	Améliore le routage	Recherche préclinique	(Robert *et al.*, 2010)
	sildénafil	F508-del, R1283M	Améliore la maturation et le routage de la protéine mutée	Recherche préclinique	(Dormer *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2008)
	thapsigargine	F508-del	Réduit la rétention de la protéine mutée dans le RE en modifiant l'interaction avec les protéines chaperonnes par inhibition des pompes-calcium	Recherche préclinique	(Egan *et al.*, 2002)
	VRT-325	F508-del, R258G S945L, H949Y	Améliore partiellement la conformation de la protéine muté	Recherche préclinique	(Van Goor *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2011)

CFTR *Potentiateurs*	VX-770	G551D	Augmente la fréquence d'ouverture du canal	Essai clinique phase III	(Accurso *et al.*, 2010; Ramsey *et al.*, 2011)
	antihypertensive1,4 dihydropyridine	F508-del, G551D	Activation de CFTR possiblement par interaction directe	Recherche préclinique	(Budriesi *et al.*, 2011; Pedemonte *et al.*, 2005)
	Génistéine	F508-del, G551D, K1250A	Augmente le temps d'ouverture du canal en inhibant l'hydrolyse de l'ATP au niveau du domaine NBD2	Recherche préclinique	(Al-Nakkash *et al.*, 2001; Illek *et al.*, 1999; Weinreich *et al.*, 1997)
	Phloxine B	G551D	Diminue la probabilité de fermeture du canal en réduisant, par interaction directe, l'hydrolyse de l'ATP au niveau du domaine NBD2.	Recherche préclinique	(Cai & Sheppard, 2002)
	tétrahydrobenzothio phènes	F508-del	Inconnu	Recherche préclinique	(Yang *et al.*, 2003)
	Triméthylangélicine (TMA)	Non précisé	Inconnu	Recherche préclinique	(Tamanini *et al.*, 2011)
	VX-532	F508-del	Maintient par interaction directe la conformation 'ouverte' du canal en stabilisant l'hétérodimère NBD1-NBD2	Recherche préclinique	(Van Goor *et al.*, 2006; Wellhauser *et al.*, 2009)
CFTR *Correcteurs & Potentiateurs*	CPX	F508-del	Améliore le routage de la protéine mutée et l'efflux au travers du canal par inhibition de phosphodiestérase	Essai clinique phase I	(Al-Nakkash & Hwang, 1999; Arispe *et al.*, 1998; McCarty *et al.*, 2002)
	Benzoquinolizinium	F508-del, G551D	Améliore la maturation et le routage de la protéine mutée en protégeant un site clivage par interaction directe	Recherche préclinique	(Dormer *et al.*, 2001; Marivingt-Mounir *et al.*, 2004; Stratford *et al.*, 2003)
	Corr4a-PG01	F508-del	Améliore la maturation et augmente la probabilité d'ouverture du canal.	Recherche préclinique	(Mills *et al.*, 2010)

ENaC	552-02 (proche de l'amiloride)	Toutes	Inhibe spécifiquement le canal ENaC	Recherche préclinique	(Hirsh *et al.*, 2008)
	BAY 39-9437	Toutes	Inhibe la fonction du canal ENaC	Recherche préclinique	(Bridges *et al.*, 2001)
	Camostat	Toutes	Atténue la fonction du canal ENaC	Recherche préclinique	(Coote *et al.*, 2009)
	Oligonucléotides antisens	Toutes	Atténue la fonction du canal ENaC	Recherche préclinique	(Sobczak *et al.*, 2009)
CaCC	Denufusol	Toutes	Active les CaCC en augmentant la concentration de calcium intracellulaire par activation des récepteurs purinergiques $P2Y_2$	Essai clinique phase III	(Accurso *et al.*, 2011)
	Duramycine (Moli 1901)	Toutes	Active les CaCC par mécanisme inconnu	Essai clinique phase II	(Grasemann *et al.*, 2007; Oliynyk *et al.*, 2010)
	E_{act}	Toutes	Active TMEM16A par interaction directe	Recherche préclinique	(Namkung *et al.*, 2011)
Multiples	lubiprostone	Non précisé	Potentiateur des canaux CLC-2 et activateur de CFTR par stimulation des récepteurs à la prostaglandine couplés aux protéines G. La relation entre les deux est controversée.	Recherche préclinique	(Bijvelds *et al.*, 2009; Cuppoletti *et al.*, 2004; Cuthbert, 2011; MacDonald *et al.*, 2008)

b) La thérapie génique

C'est une thérapie qui suscite un vif engouement comme en témoignent, toutes indications confondus, les 956 essais cliniques réalisés à travers le monde ces 10 dernières années (http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/). Dans la mucoviscidose, elle vise à introduire le gène CFTR normal au sein de cellules défectueuses, en premier lieu au niveau du tissu pulmonaire. L'ADN « nu » étant rapidement éliminé et ne permettant aucun ciblage cellulaire, des vecteurs sont nécessaires. Aujourd'hui deux grandes stratégies existent : les vecteurs viraux et les vecteurs synthétiques. Les vecteurs viraux les plus utilisés sont les Adéno-associated virus (AAV). Des études préclinique montrent qu'ils sont capables d'un transfert de gène efficace sur le long terme mais cette efficacité n'a pas pu être retrouvée chez l'homme (Martini *et al.*, 2011; Moss *et al.*, 2007). Ces résultats associés aux différents inconvénients liés à ce type de vecteurs (leur immunogénicité, les risques oncogéniques encourus) ont amené au développement de vecteurs non-viraux. Aujourd'hui, les vecteurs non-viraux les plus populaires sont les lipides cationiques qui forment une cavité interne hydrophile renfermant l'ADN. Par rapport aux virus, infectieux par nature, ces vecteurs pourraient laisser prévoir une efficacité réduite, pourtant, les premiers essais cliniques réalisés ont été probants (Alton *et al.*, 1999). Ils ont conduits à des essais sur un nombre de patients plus élevé, entre 2009 et 2011 au Royaume Unis, essais dont les conclusions ont permis la mise en place d'un troisième essai clinique dans lequel la dose est multiple, avec une administration par mois pendant un an (http://www.cfgenetherapy.org.uk/clinical/multidose.html). L'avancée des recherches sur ces deux types de vecteurs, viraux et synthétiques, est lente. Il existe, d'une part des difficultés liées aux caractéristiques même de la thérapie génique comme l'efficacité de transfert, et d'autre part des problèmes liés à la maladie tels que la viscosité du mucus, les vecteurs devant le traverser pour transfecter des cellules cibles.

Avec la découverte récente des cellules souches pluripotente induites (IPSCs), un nouveau type de thérapie génique est envisagé pour la mucoviscidose (Takahashi & Yamanaka, 2006). En effet, en principe, les cellules issues du patient pourraient être rendues pluripotentes avant d'être corrigées, grâce à l'utilisation de zinc-finger nucléases par exemple, puis différenciées en cellules épithéliales respiratoires et enfin transplantées chez le patient (Mou *et al.*, 2012; Sebastiano *et al.*, 2011). Ces découvertes sont très prometteuses et progressent rapidement. Cependant de nombreuses mises au point seront certainement nécessaires avant une utilisation thérapeutique optimale chez l'homme (Moodley *et al.*, 2011).

F. Le diagnostic de la maladie

1. Dépistage néonatal

Le dépistage néonatal est devenu obligatoire en France en 2002 (Farriaux *et al.*, 2003). Il permet une prise en charge plus précoce de la maladie réduisant la morbidité (Dijk *et al.*, 2011). Ainsi, l'incidence de la maladie est déterminée à une naissance sur 4136 en France (Munck & Roussey, 2008). Le dépistage néonatal consiste en un dosage de la trypsine immunoréactive (TIR) dans le sang couplé à une recherche de mutations (Figure 11). En effet, chez le nourrisson CF, les conduits pancréatiques sont obstrués, la pression dans ces conduits est donc augmentée favorisant le passage dans le sang des enzymes pancréatiques telles que la trypsine. Ce programme permet le dépistage de plus de 96 % des nouveau-nés atteints de mucoviscidose (Munck & Roussey, 2008). En revanche le dosage de la TIR n'est pertinent que pour les nouveau-nés car l'évolution de la maladie conduit à une fibrose pancréatique (cf. § I.D.1) provoquant une forte diminution de la synthèse des enzymes pancréatiques après 6 mois de vie. D'autre part, lors de la recherche de mutations, il est possible qu'une seule mutation soit retrouvée. Il peut alors s'agir d'un porteur sain qui ne développera pas la maladie ou, d'un sujet dont la seconde mutation n'appartient pas à la liste des 30 mutations recherchées. Afin de statuer, un autre test est réalisé : le test de la sueur.

2. Le test de la sueur

Le conduit d'absorption des glandes sudoripares est formé d'un épithélium d'absorption qui permet la réabsorption des ions, notamment chlorure et sodium. Le transport du chlorure étant effectué par CFTR dans le sens du gradient, les patients atteints de mucoviscidose produisent une sueur riche en sel. Le test, mis au point en 1959, consiste à stimuler la sudation grâce à la pilocarpine, alcaloïde végétal stimulant des récepteurs du système parasympathique, puis doser la concentration en ions chlorure dans la sueur recueillie (Gibson & Cooke, 1959). Dans certains cas, ni ce test ni l'étude approfondie du gène CFTR ne permettent d'établir un diagnostic et une étude fonctionnelle du transport ionique est alors préconisée par mesure de différence de potentiel au niveau de l'épithélium nasal (Figure 11).

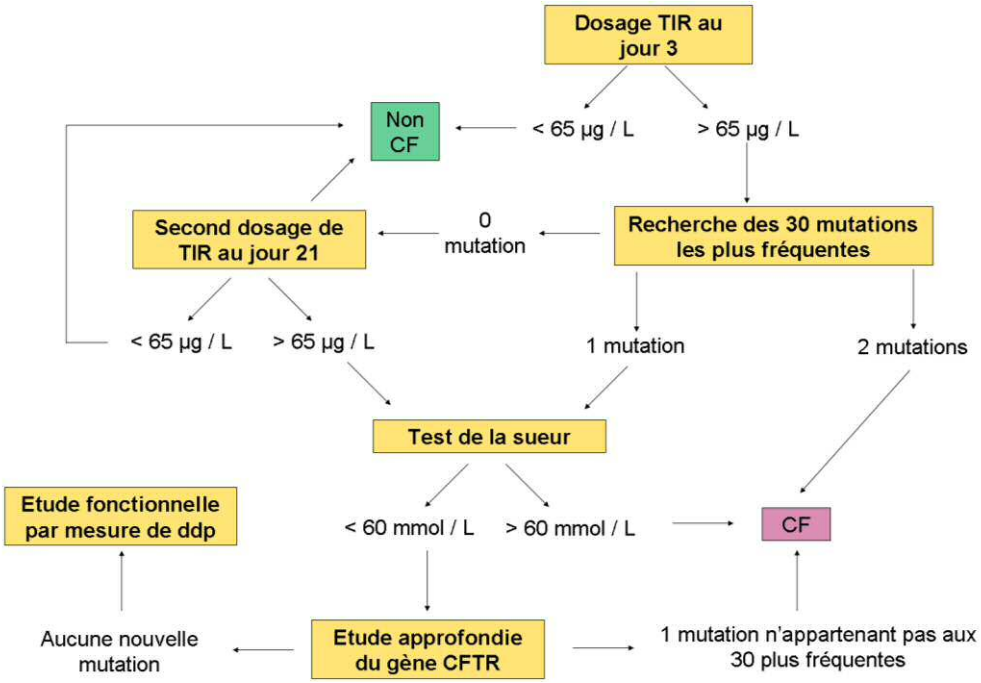


Figure 11 : Organigramme du dépistage de la mucoviscidose

ddp : différence de potentiel ; TIR : trypsine immunoréactive ; CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ; CF : cystic firosis

3. Exploration fonctionnelle du transport ionique par mesure de la différence de potentiel (ddp) nasale

a) Origine du potentiel transépithélial

L'épithélium est constitué de cellules jointives qui séparent deux compartiments de compositions chimiques différentes : le compartiment intracellulaire (int.) et le compartiment extracellulaire (ext.). La différence de composition en ions est nécessaire au maintient de l'homéostasie et aux besoins métaboliques des cellules. Elle est maintenue par l'association des transports trans-cellulaires (pompes, canaux et transporteurs) et par l'étanchéité de l'épithélium grâce aux jonctions serrées (cf. § I.C.1).

D'une part, les ions sont des molécules chargées répondant au principe d'électroneutralité. Ce principe implique qu'au sein de chaque compartiment, les charges positives et négatives s'annulent. La concentration de chaque ion sera donc différente dans les deux compartiments avec toujours autant d'anions que de cations pour un compartiment donné.

D'autre part, lorsqu'il existe une différence de concentration entre les 2 compartiments, celle-ci va créer un gradient de concentration au travers de l'épithélium régit par la loi de Fick (Table 2).

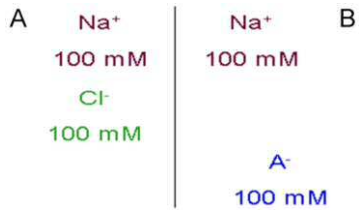
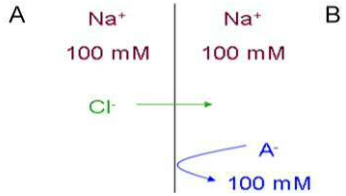
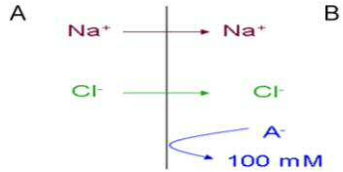
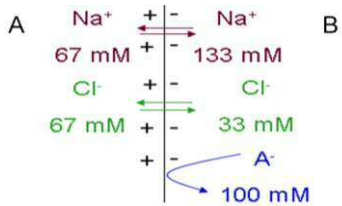
Ces 2 principes, d'électroneutralité et de diffusion de la matière, sont intégrés dans l'équilibre de Gibbs-Donnan (Table 2). A cet équilibre, les différences de concentration maintiennent un gradient de concentration pour chaque ion. Les ions étant des molécules chargées, celui-ci va induire, au niveau de la membrane, une séparation de charge produisant un gradient électrique en retour. Ce gradient électrique s'oppose à toute autre mouvement de l'ion dans le sens du gradient de concentration. Alors il existe pour chaque ion un équilibre dynamique où la diffusion est continue mais est compensée exactement par une migration imposée par le gradient électrique. Il existe ainsi une différence de potentiel théorique, entre les 2 compartiments, propre à chaque ion. Cette différence de potentiel est définie par l'équation de Nernst (Table 2).

L'équation de Goldman généralise l'équation de Nernst à la membrane de l'épithélium. Elle considère l'ensemble des ions ainsi que la perméabilité de la membrane, différente pour chaque ion (Table 2).

Si la membrane n'était perméable qu'à un seul ion, le potentiel de membrane E_m au repos serait égal au potentiel d'équilibre de l'ion E_{ion} décrit ci-dessus. Tel n'est pas le cas et chaque ion est soumis à un gradient électrochimique exprimé par E_m - E_{ion}. C'est ce gradient électrochimique qui définira le flux net de l'ion considéré au travers de la membrane plasmique : flux entrant ou flux sortant.

Si l'on considère maintenant le potentiel transépithélial, on ne se place plus de part et d'autre d'une membrane mais d'un épithélium. La différence de potentiel est alors mesurée entre la lumière du côté apical et la face basolatérale de l'épithélium. La perméabilité de l'ion va alors dépendre de la résistance imposée par l'épithélium. Cette résistance (exprimée en Ohm) est l'inverse de la conductance (exprimé en siemens). Elles sont dépendantes de deux paramètres :

- l'étanchéité de la voie paracellulaire dépendant des jonctions serrées (cf. § I.C.1). Plus l'épithélium est jointif, plus la résistance est importante.
- la capacité des ions à franchir les membranes apicale et basolatérale par les différents canaux, transporteurs et pompes (cf. § I.C.1). Plus le transport de l'ion est facilité, plus la conductance est élevée.

Loi de Fick	Le flux de diffusion de la matière, des zones de forte concentration vers celles de faible concentration, est proportionnel au gradient de concentration
Equilibre de Gibbs-Donnan	Soit deux compartiments A et B séparés par une membrane hémiperméable Etat initial : l'électroneutralité est respectée La membrane est perméable au sodium (Na^+) et au chlorure (Cl^-) La membrane est imperméable à un anion (A^-)  Les ions chlorure vont diffuser selon leur gradient de concentration L'anion A^- ne peut pas diffuser  En raison du principe d'électroneutralité, les ions sodium diffusent vers le compartiment B contre leur gradient de concentration  Il se créera un équilibre selon lequel le rapport de concentration des ions diffusibles est le suivant : $[Na^+]_A \times [Cl^-]_A = [Na^+]_B \times [Cl^-]_B$ 

Equation de Nernst	$E_{ion} = (RT / zF) \times (\ln [ion]_{ext.} / \ln [ion]_{int.})$	**E_{ion}** : le potentiel d'équilibre de l'ion considéré en mVolts **R** : la constante des gaz parfaits (8,314570 Joules·mol^{-1}·K^{-1}) **T** : la température en kelvin (K) **z** : la valence de l'ion **F** : la constante de Faraday (96 485 coulomb.mol^{-1}) **ln** : logarithme népérien **[ion]** : concentration de l'ion considéré
Equation de Goldman pour les 3 ions principalement responsables du potentiel de membrane	$E_m = (RT / F) \times \ln ((P_{Na+} \times [Na^+]_{int.} + P_{K+} \times [K^+]_{int} + P_{Cl-} \times [Cl^-]_{ext}) / (P_{Na+} \times [Na^+]_{ext.} + P_{K+} \times [K^+]_{ext} + P_{Cl-} \times [Cl^-]_{int}))$	**E_m** : le potentiel de membrane du côté du compartiment ext. par rapport au compartiment int., en mVolts **R** : la constante des gaz parfaits (8,314570 Joules·mol^{-1}·K^{-1}) **T** : la température en kelvin (K) **F** : la constante de Faraday (96 485 coulomb.mol^{-1}) **P** : la perméabilité de l'ion en m/s **ln** : logarithme népérien **[x]** : concentration de l'ion considéré **int.** :compartiment interne **ext.** : compartiment externe

Table 2 : Lois et équations régissant le transport des ions au travers d'une membrane

b) Technique de mesure de la ddp nasale

La technique de mesure de ddp chez l'homme a été développée par Knowles et ses collaborateurs qui ont également montré qu'elle permettait de discriminer les sujets atteints de mucoviscidose des sujets sains (Knowles *et al.*, 1981; Knowles *et al.*, 1995). Son utilité a ensuite été mise en évidence pour le diagnostic des patients ayant une mucoviscidose atypique (Wilschanski *et al.*, 2001). En France aujourd'hui, ce test est réalisé sur les patients présentant un phénotype atypique lors du dépistage (cf. § I.F.2) afin d'évaluer la fonction de la protéine CFTR au niveau de l'épithélium nasal (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010).

En effet, cette technique permet d'apprécier la perméabilité de la membrane pour différents ions et ainsi d'évaluer l'activité de CFTR. Elle consiste à mesurer la différence de potentiel existant entre deux électrodes. Etant admis que les tissus sous-cutanés ont le même potentiel électrique en tout point du corps, la première électrode est reliée à une aiguille placée en sous-cutanée (côté basolatéral de l'épithélium) au niveau du bras et est utilisée comme électrode de référence. L'électrode de mesure est elle reliée à une voie d'un double cathéter placée au niveau du cornet nasal inférieur, où prédominent les cellules ciliées (cf. § I.D.3.a) (De Boeck *et al.*, 2011). La différence de potentiel basale est mesurée après la perfusion, par la seconde voie du cathéter, d'une solution physiologique de Ringer. Cette ddp basale dépend essentiellement de l'absorption du sodium par le canal ENaC, induite par la sécrétion active du sodium au niveau basolatéral par la pompe Na^+/K^+ATPase. La perfusion d'une solution contenant de l'amiloride, un inhibiteur spécifique du canal ENaC, induit une dépolarisation de la membrane proportionnelle à la perméabilité des ions sodium et donc à l'activité basale du canal. La perfusion d'une solution pauvre en ions chlorure crée un gradient de concentration favorisant la sécrétion du chlorure. Cette étape est traduite par une hyperpolarisation membranaire qui permet d'évaluer globalement la perméabilité de la membrane à ces ions. Afin d'évaluer l'activité maximum de CFTR, la solution pauvre en ions chlorure est supplémentée d'isoprotérénol, un activateur de l'adénylate cyclase permettant ainsi d'augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc (Figure 12).

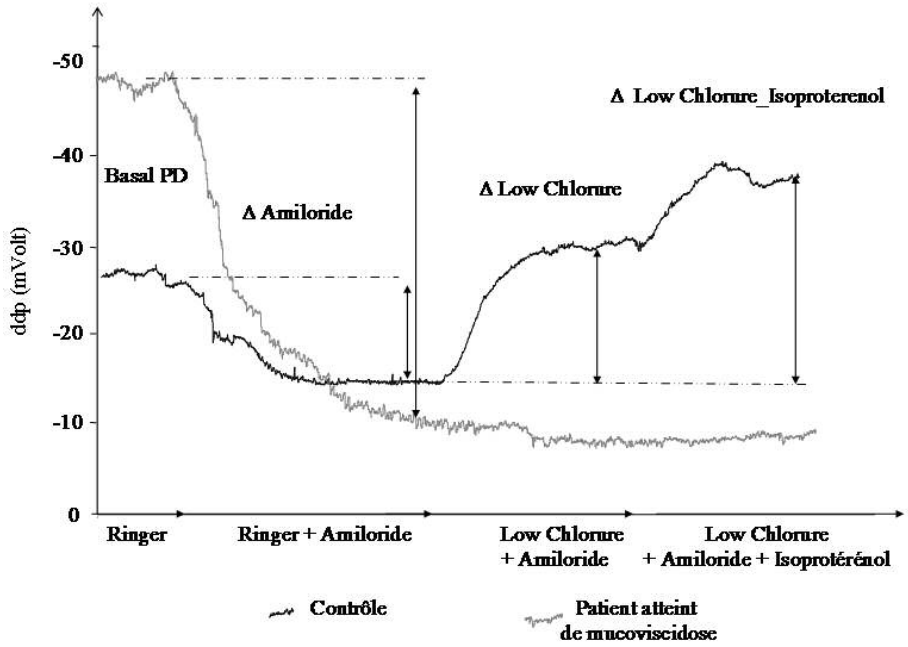


Figure 12 : Exemple de mesure de ddp nasale chez un sujet sain et un patient atteint de mucoviscidose

Les tracés représentent l'évolution de la ddp en fonction des différentes solutions perfusées dans le temps. Les valeurs de différence de potentiel basale ainsi que de la dépolarisation induite par l'amiloride (ΔAmiloride) sont fortement plus négatives pour les patients atteints de mucoviscidose que pour les sujets sains en raison de l'absorption accrue du sodium par ENaC chez les patients. L'hyperpolarisation induite par le gradient de chlorure puis par l'isoprotérénol observés chez le sujet sain est absente ou réduite chez les patients, montrant que la conductance aux ions chlorure à la membrane apicale de l'épithélium est majoritairement dépendante de l'activité de CFTR (tracés procurés par D. Roussel et I. Sermet).

G. Le modèle murin de mucoviscidose

1. Caractéristiques du modèle

La mise au point de nouveaux traitements de la mucoviscidose, tels que les molécules thérapeutiques citées dans le paragraphe I.E.3.a), nécessite une phase de recherche préclinique mettant souvent en jeu les modèles animaux. La souris étant l'animal de laboratoire le mieux caractérisé et le plus accessible, le modèle animal de mucoviscidose le plus utilisé aujourd'hui est la souris génétiquement modifiée. Cependant, en raison des différences dans la physiopathologie entre la souris et l'homme, il a récemment été développé des modèles de porcs et de furets « knock-out » pour le gène CFTR. Ces modèles ouvrent de nouvelles possibilités de recherche mais ne constituent pas aujourd'hui le modèle idéal du fait du taux de mortalité périnatal très élevé, de la grande variation phénotypique dans le développement de la maladie entre les différents individus, de la nécessité d'animalerie particulièrement

adaptées à leur hébergement et des coûts qui en résultent. Le modèle murin semble donc malgré tout le plus adapté, le plus couramment utilisé étant la souris « knock-out » pour le gène CFTR (Figure 13). Il existe également des souris portant des mutations particulières telles que F508del-CFTR ou G551D-CFTR. Toutes ces souris développent une pathologie intestinale mais pas de pathologie pulmonaire. Elles présentent une histologie pulmonaire normale et une absence d'hyperproduction de mucus au niveau bronchique (Grubb & Boucher, 1999).

Une des raisons de cette absence de physiopathologie est la différence d'architecture cellulaire des voies aériennes inférieures murines par rapport aux humaines. En effet, chez la souris, les cellules de Clara se retrouvent dans tout l'arbre bronchique et constituent ~ 80 % de l'épithélium bronchiolaire. Au contraire, chez l'homme, elles ne sont présentes qu'au niveau des dernières bronchioles, où sont également retrouvées des cellules ciliés et des cellules endocrines. Les cellules de Clara, cellules non-ciliées au pôle apical bombé, sécrètent notamment des lipides, des anti-protéases, des oxydases et joue un rôle dans la composition du surfactant pulmonaire et la détoxification (Komáromy & Tigyi, 1988). A l'inverse, les glandes sous-muqueuses, qui constituent le site majeur de l'expression de CFTR dans le poumon humain, ne sont présentes que dans la partie proximale de la trachée chez la souris (Borthwick *et al.*, 1999). Ainsi, la structure des bronchioles humaines semble plus proche de l'épithélium murin bronchique que bronchiolaire. Ces différences de structure influencent la physiologie du poumon et constitue un premier élément de réponse à l'absence de phénotype pulmonaire chez les souris CF (Wilke *et al.*, 2011). D'autre part, chez l'homme, les canaux CaCC contribuent que faiblement à la sécrétion du chlorure et leur activation est généralement transitoire ou dépendante de CFTR. Ainsi, bien que l'activité de ces canaux soit augmentée chez les patients CF, cela ne permet pas de compenser le défaut d'activité de CFTR. Chez la souris en revanche, la sécrétion de chlorure est plutôt liée aux canaux chlorure calcium dépendant, et notamment au canal TMEM16A, qu'au canal CFTR. Ce canal assurerait donc une sécrétion d'ion chlorure chez la souris CF, en particulier au niveau de la trachée et des voies aériennes inférieures, ce qui pourrait aussi contribuer à l'absence de phénotype pulmonaire chez ces souris (Kunzelmann *et al.*, 2012).

L'absence de phénotype pulmonaire a pour conséquence une faible susceptibilité des souris CF aux infections pulmonaires bactériennes. Lors d'une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, les souris CF comme les wild type, éliminent les bactéries ou meurent rapidement, en fonction de la dose administrée. L'établissement d'une infection pulmonaire chronique à *P. aeruginosa* nécessite donc l'utilisation d'agents immobilisants, tels que l'agar,

permettant une libération lente des bactéries dans les poumons et dépend aussi du fond génétique des souris. Actuellement, ces modèles d'infection chronique sont encore imparfaits (Bragonzi, 2010).

Par ailleurs, la mucoviscidose est certes due à des mutations sur le gène CFTR mais la physiopathologie découle aussi de l'hyperabsorption du sodium par le canal ENaC, secondaire à sa non régulation par CFTR (cf. § I.C.5). Dans ce contexte, des souris surexprimant la sous-unité β du canal ENaC ont été générées (Mall *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2011). Ces souris présentent une déplétion du liquide de surface périciliaire et un épaississement du mucus qui vont induire une diminution de la clairance mucociliaire et de l'inflammation I.D.3.b)(1). Cela induit un ralentissant de la clairance bactérienne mais les souris ne présentent pas de disposition naturelle aux infections. Malgré un taux de mortalité périnatal de 50 %, ces souris constituent une alternative intéressante permettant des études dans un contexte d'encombrement pulmonaire semblable à celui des patients. Cependant, elles ne peuvent constituer un modèle d'étude du transport ionique dans le contexte mucoviscidose puisque l'expression et la fonction de CFTR, ainsi que toutes les régulations qui en découlent, ne sont pas altérées (cf. § I.C).

En revanche, pour étudier le transport ionique, la muqueuse nasale des souris CFTR « knock-out » ou CFTR-muté est un modèle pertinent. En effet, contrairement à l'épithélium pulmonaire, l'épithélium nasal de ces souris présente des caractéristiques structurales et fonctionnelles semblables à l'épithélium bronchique humain. Ainsi, la partie proximale de la cavité nasale est majoritairement recouverte d'épithélium respiratoire, principalement constitué de cellules ciliées et de cellules à mucus, comme l'épithélium trachéo-bronchique humain. Chez la souris, la protéine CFTR est 10 fois plus exprimée au niveau de l'épithélium nasal que dans les poumons (Wilke *et al.*, 2011). D'un point de vue fonctionnel, les anomalies majeures du transport ionique observées chez les patients CF sont retrouvées au niveau de l'épithélium nasal des souris CF. Cet épithélium montre une hyperabsorption du sodium ainsi qu'un défaut de sécrétion du chlorure à l'état basal (Grubb *et al.*, 2009; Grubb & Boucher, 1999). De plus, comme dans les voies aériennes humaines, au niveau de l'épithélium nasal des souris la sécrétion de chlorure dépendante du calcium semble être plus stimulée chez les CF que chez les sujets sains/souris WT (Grubb *et al.*, 1994; Grubb *et al.*, 2009; Kunzelmann *et al.*, 2012; Mall *et al.*, 2003). L'étude des transports ioniques dans ce modèle est possible grâce à différentes techniques d'électrophysiologie dont la différence de potentiel (ddp) nasale.

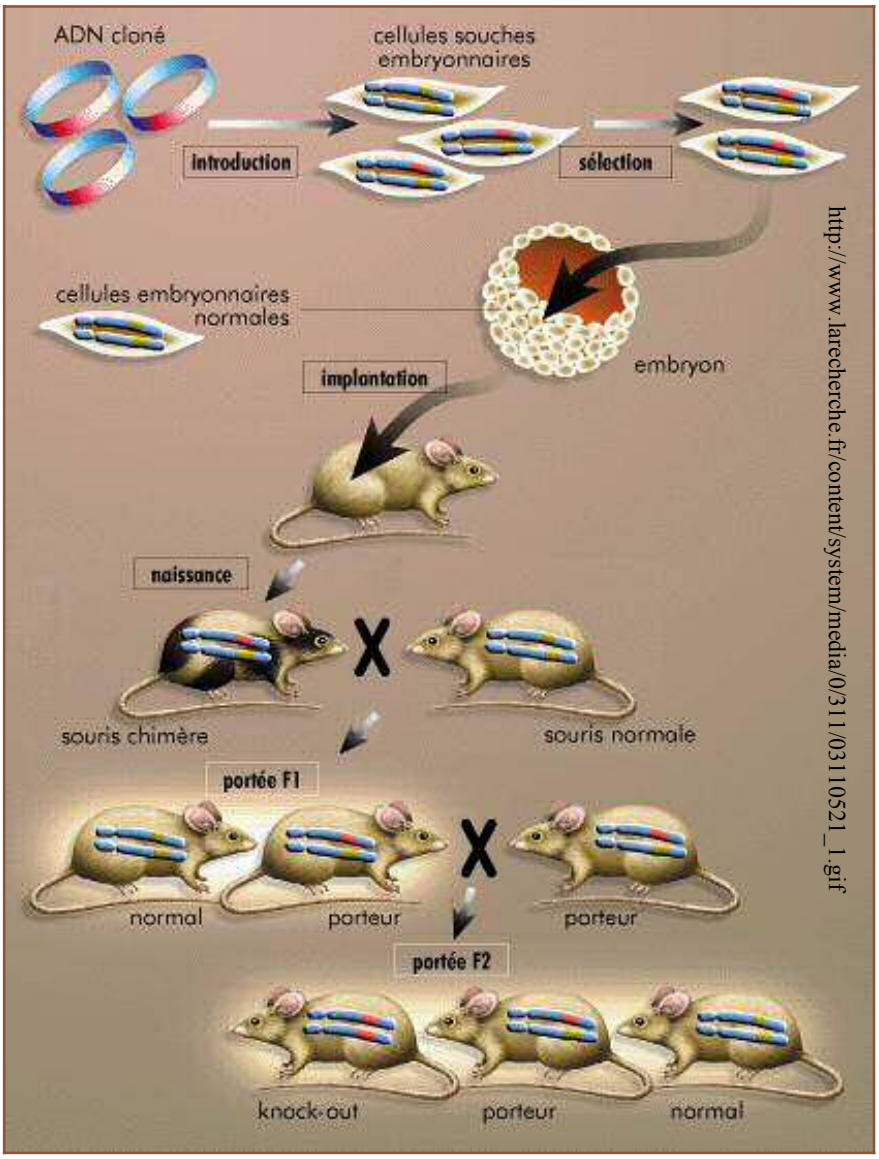


Figure 13 : Génération de souris génétiquement invalidées

La première étape consiste à construire un plasmide porteur contenant l'exon inactivé du gène d'intérêt bordé par des séquences de recombinaisons homologues et des gènes de résistance aux antibiotiques. Ce vecteur est ensuite transfecté dans des cellules souches embryonnaires murines. L'exon inactivé du gène va s'insérer par recombinaison homologue et de manière spécifique au locus précis du gène à supprimer. Les cellules souches recombinées sont ensuite sélectionnées par les gènes de résistance aux antibiotiques puis injectées dans des blastocystes murins, eux-mêmes réimplantés dans l'utérus d'une femelle pseudo-gestante. Cela donnera naissance à une génération F0 de souris chimères dont une partie des cellules, y compris germinales, pourra être porteuse de la mutation génétique. Le croisement entre chimères F0 et souris de phénotype "sauvage" permet l'obtention de souris F1 hétérozygotes (knock-out/sauvage) lorsque les cellules souches modifiées touchaient la lignée germinale des F0. Le croisement des individus F1 permet la génération F2 avec des homozygotes knock-out / knock-out dans 25% des cas.

2. La mesure de ddp chez la souris

La mesure de ddp chez la souris a été adaptée à partir de la technique utilisée chez l'homme (cf. § 0 (Grubb *et al.*, 1994). Cependant, plusieurs points diffèrent de la mesure chez l'homme et diffèrent également entre les différents groupes pratiquant cette technique chez la souris (Griesenbach *et al.*, 2008; Grubb *et al.*, 1994; Kelley *et al.*, 1997; Lubamba *et al.*, 2008; Salinas *et al.*, 2004):

- La séquence de perfusion :

- Solution physiologique (parfois supprimée)
- Solution physiologique + amiloride
- Solution physiologique pauvre en ions chlorure (souvent remplacé par du gluconate, anion imperméant) + amiloride (parfois supprimée)
- Solution physiologique pauvre en ions chlorure + amiloride + activateur/inhibiteur

La nature de la solution physiologique varie d'un protocole à l'autre : Ringer, Krebs, autres solutions phosphate ou HEPES.

L'utilisation d'activateur de CFTR n'est pas systématique. Le plus utilisé est la forskoline, un activateur de l'adénylate cyclase permettant d'augmenter la concentration intracellulaire d'AMPc, alors que c'était l'isoprotérénol qui était utilisé chez l'homme (médicament autorisé).

Le protocole chez l'homme ne fait pas intervenir l'utilisation d'inhibiteur. Chez la souris, la mesure de ddp n'étant pas un outil diagnostique mais un outil de recherche, il est important de pouvoir caractériser la sécrétion de chlorure, résultant du gradient de concentration engendré par la perfusion de la solution pauvre en ion chlorure, afin de déterminer la nature du transport (CFTR, autre canaux, transport par voie paracellulaire (cf. § I.C.1)) (Brady *et al.*, 2001). Sont ainsi utilisés des inhibiteurs spécifiques de CFTR tels que l'Inh-172 et le GlyH101, des inhibiteurs spécifiques d'autres canaux comme l'acide niflumique pour les CaCC ou des inhibiteurs de canaux chlorure non spécifiques à l'exemple du DPC et du DIDS, CFTR n'étant pas sensible à ce dernier (Brady *et al.*, 2001; Muanprasat *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2004).

- Le débit de perfusion :

Chez l'homme d'environ 5 mL/min, il est réduit entre 0.018 et 3 mL/h chez la souris. Malgré cette réduction du débit de perfusion, la souris à une propension à l'étouffement du fait que la manipulation doive être réalisée sous anesthésie générale. Selon les groupes de

recherche, la souris est donc intubée ou positionnée de façon inclinée avec un papier absorbant à l'extrémité de la narine.

- La position double cathéter :

La taille du cathéter est également adaptée, le diamètre ne dépassant pas 1 mm. D'autre part, la partie supérieure de la cavité nasale de la souris (5 mm et au-delà) est recouverte d'un mélange d'épithélium respiratoire, comprenant des cellules ciliées et des cellules caliciformes (cf. § I.D.3.a), et d'épithélium olfactif constitué notamment de cellules réceptrices. L'odorat étant plus développé chez la souris, cet épithélium est plus étendu que chez l'homme, représentant la moitié de la surface de la cavité nasale contre moins de 8 % pour l'homme (Escada *et al.*, 2009). Les propriétés du transport ionique diffèrent entre cet épithélium olfactif et l'épithélium respiratoire, c'est pourquoi malgré que les protéines CFTR et ENaC soit exprimées au niveau de l'épithélium olfactif, cette partie est peu pertinente pour l'étude des transports ioniques (Grubb *et al.*, 2009). En revanche, la partie inférieure du nez de la souris est recouverte très majoritairement d'épithélium respiratoire et peut être explorée par la mesure de ddp afin d'en étudier les transports ioniques (Parsons *et al.*, 2000). Le cathéter est donc positionné entre 2 et 5 mm selon les groupes de recherche.

Comme c'est le cas chez l'homme, il y a deux profils distincts entre les souris wild type (WT) et les souris CF comparables aux profils humains de sujets sains et de patients (Figure 14). Ainsi, chez la souris CF :

- la ddp basale, reflétant principalement le transport du sodium, est plus électro-négative
- la dépolarisation induite par l'amiloride, inhibiteur du canal ENaC, est plus importante, son activité basale n'étant plus régulée négativement par CFTR
- l'hyperpolarisation en réponse à la solution pauvre en ions chlorure observée chez les souris WT est absente chez les souris *cftr* « knock-out » et moindre chez les souris porteuses de la mutation F508del-CFTR.

Il est à noter que comme attendu, aucune activité de CFTR n'est observée chez les souris *cftr* « knock-out » alors qu'il existe une activité résiduelle de la protéine F508del-CFTR chez les souris portant cette mutation, avec une hyperabsorption du sodium moins exagérée et une légère sécrétion d'ions chlorure.

Cette technique permet donc l'étude du transport des ions sodium et chlorure chez les souris CF. Elle est beaucoup utilisée pour mettre en évidence une restauration de la sécrétion

des ions chlorure dans le test de molécules pharmacologiques visant à corriger les dysfonctionnements de la protéine CFTR mutée (cf. § I.E.3.a) et les essais de thérapie génique (Alexander *et al.*, 2011; Barker, 2005; Bruscia *et al.*, 2006; Cartiera *et al.*, 2010; Colas *et al.*, 2011; Elmer *et al.*, 1999; Griesenbach *et al.*, 2010; Lubamba *et al.*, 2008; Lubamba *et al.*, 2009; Lubamba *et al.*, 2011; Ostrowski *et al.*, 2007).

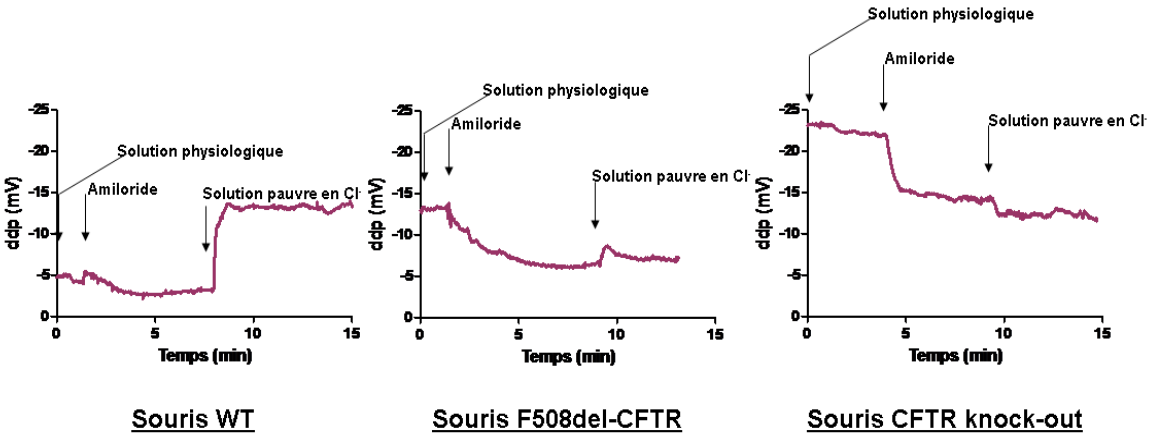


Figure 14 : Exemple de mesure de ddp nasale chez la souris WT et dans deux modèles de souris CF

Les enregistrements représentent la ddp en fonction des différentes solutions perfusées dans le temps. La ddp basale, obtenue après perfusion d'une solution physiologique, représente principalement le transport du sodium et est augmentée chez les souris CF. L'amiloride inhibe ENaC induisant une dépolarisation proportionnelle à la fonction basale de ce canal, et donc supérieure chez les souris CF. La solution pauvre en ions chlorure induit une hyperpolarisation, traduisant la sécrétion d'ions chlorure, qui est absente chez les souris CF en raison de la faible perméabilité de leur membrane à ces ions. La souris portant la mutation F508del-CFTR présente une activité ionique intermédiaire entre la souris WT et la CFTR « knock-out », F508del-CFTR conservant une activité résiduelle (données personnelles).

II. L'infection à *Pseudomonas aeruginosa* dans la mucoviscidose

A. Généralités sur la bactérie

P. aeruginosa est un bacille Gram négatif appartenant à la famille des Pseudomonadaceae (Figure 15). Ces bactéries sont mobiles grâce à une ciliature monotriche et se présentent isolées, par 2 ou associées en courtes chaînes. La grande majorité des souches de *P. aeruginosa* synthétisent de la pyocyanine, de la fluorescine ou de la pyoverdine et plus rarement, de la pyomélanine ou de la pyorubine, des pigments hydrosolubles se diffusant dans les milieux de culture. Leur température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C mais elles tolèrent aussi une température de 42°C. *P. aeruginosa* est aérobie mais capable de dénitrification (Palleroni, 2010). Elle vit en saprophyte dans l'eau et les sols humides ainsi qu'à la surface des végétaux, résistant mal à la dessiccation (Hirai, 1991). Sa concentration dans les eaux potables est surveillée et un arrêté du 14 mars 2007 impose zéro colony forming unit (cfu) /250 mL. Par ailleurs, l'ANSES recommande une valeur limite de 100 cfu/L dans les eaux de baignades artificielles. Il existe une grande diversité des souches de *P. aeruginosa* isolées des patients CF qui semble indiquer qu'elles sont le plus souvent originaire de l'environnement (Pirnay *et al.*, 2009). Ces souches sont classiquement typées par des méthodes phénotypiques. Cependant, il est aujourd'hui possible de typer les différentes souches de *P. aeruginosa* par des techniques génotypiques, de manière rapide et extrêmement fiable et précise. L'une de ces approches, basée sur la détection de polymorphismes au niveau du core-génome et d'ilots génomiques, produit un codage binaire à partir de 58 marqueurs génétiques permettant de distinguer différents complexes clonaux au sein d'une population de *P. aeruginosa* (CLONDIAG, Jena, Germany). Une étude réalisée sur des isolats provenant de divers pays d'Asie, d'Europe et d'Amérique, a d'ailleurs montré, grâce à cette technique, que certaines souches pouvaient être isolées à la fois de patients CF et de l'environnement. Parmi les plus fréquemment retrouvées, la souche CHA a par exemple été isolée du sol au Japon, d'eau de rivière en Allemagne et de patients CF en Europe centrale. (Toussaint *et al.*, 1993; Wiehlmann *et al.*, 2007). En effet, *P. aeruginosa* est aussi une bactérie commensale pour l'homme et les animaux, retrouvée dans les intestins et plus rarement sur la peau, qui est également un pathogène opportuniste, notamment chez les patients atteint de mucoviscidose (Berthelot *et al.*, 2005). Ce caractère opportuniste est d'ailleurs observable même chez ces patients puisque près de 50 % des patients CF colonisés par *P. aeruginosa* au niveau pulmonaire, le sont également au niveau du tractus gastro-intestinal sans symptômes particuliers associés à la bactérie alors que les symptômes respiratoires sont très marqués

(Speert *et al.*, 1993). En effet, l'infection à *P. aeruginosa* est associée au déclin de la fonction pulmonaire chez les patients CF et l'affection pulmonaire est d'autant plus sévère que l'infection a lieu précocement dans la vie de l'enfant (Kosorok *et al.*, 2001; Pittman *et al.*, 2010). L'infection à *P. aeruginosa* est une étape clé dans la mucoviscidose qui constitue un facteur pronostique de morbidité et de mortalité (Emerson *et al.*, 2002). Les facteurs de virulence de la bactérie sont particulièrement adaptés à l'environnement pulmonaire de ces patients, produisant une infection chronique chez près de 80 % des patient CF adultes.

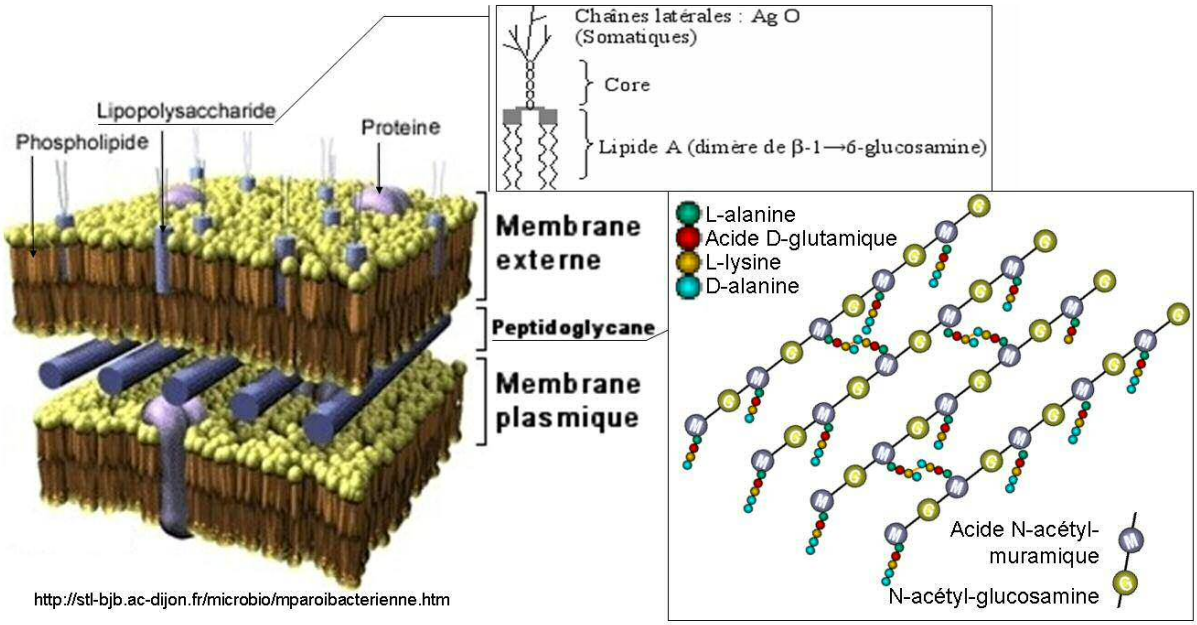


Figure 15 : Représentation schématique de la paroi des bactéries Gram négatif

La paroi des bactéries Gram négatif possède une membrane externe, absente des Gram positif, et un peptidoglycane plus fin. L'acide N-acétylmuramique (NAM) et le N-acétylglucosamine sont unis par une liaison osidique β 1→4 et composent les chaines de glycane. Ces chaînes sont reliées entre elles par des ponts peptidiques grâce à une liaison amide entre le NAM et la L-alanine. Le lipopolysaccharide (LPS), est spécifique des bactéries Gram négatif.

B. La pathogénèse pulmonaire

1. Les facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

a) Les facteurs de virulence de surface

Ils incluent le flagelle, les pili de type IV et le lipopolysaccharide (LPS). Le flagelle est polaire et indispensable à la motilité de la bactérie. Il comprend 3 parties, le corps basal enchâssé dans la paroi, le crochet et le filament composé de monomères de flagelline. Les pili de type IV sont des petites structures protéiques filamenteuses constituées de monomères de piline et sont également impliqués dans la motilité (Köhler *et al.*, 2000). Le LPS quand à lui,

constitué de 3 parties, le lipide A, le core et l'antigène O, est indispensable à la croissance et à la viabilité de la bactérie et confère à la membrane une faible perméabilité (Figure 15). Il a un rôle important dans la pathogénèse puisque d'une part, les charges négatives du lipide A lui confère une activité toxique sur les cellules et d'autre part, l'antigène O protège la bactérie de la phagocytose (Rietschel *et al.*, 1994). Ces 3 facteurs de virulence membranaires sont à l'origine de l'inflammation chronique induite par *P. aeruginosa* puisqu'ils stimulent tous trois les TLR présents à la membrane des cellules immunitaires (cf. paragraphe II.B.3). D'autre part, il a été montré que la flagelline, la piline ainsi que le LPS facilitaient l'adhésion de *P. aeruginosa* aux cellules épithéliales par leur fixation aux récepteurs asialo-GM1 (Feldman *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 1994). Or, les asialo-GM1 sont des glycosphingolipides naturellement présents à la membrane des cellules et dont la quantité est augmentée au niveau des cellules de l'épithélium respiratoire chez les patients CF, provoquant ainsi une adhésion plus importante de *P. aeruginosa* (De Bentzmann *et al.*, 1996; Saiman & Prince, 1993).

De plus, *P. aeruginosa* est capable d'adapter certains de ces facteurs de virulence pour lutter contre le système immunitaire. Il a par exemple été montré que la structure du lipide A du LPS, première cible des peptides antimicrobiens cationiques (CAMPs), était différente entre la souche PAK de *P. aeruginosa* et les souches isolées de patients CF. En effet, les souches CF montrent une S-acylation plus importante du lipide A, acylation qui est dépendante des conditions environnementales telles que la concentration en ions magnésium. Cette différence structurale du lipide A induit d'une part, une réponse pro-inflammatoire plus importante exacerbant l'inflammation chronique, et d'autre part rend le lipide A moins électronégatif réduisant ainsi la force d'attraction envers les CAMPs, conférant alors une résistance accrue (Buchanan *et al.*, 2009; Ernst *et al.*, 1999; Rietschel *et al.*, 1994).

Enfin, un mécanisme de défense de l'organisme consiste à l'internaliser *P. aeruginosa* par les cellules épithéliales, par l'intermédiaire du LPS. Cette fonction est altérée dans le cas de la mucoviscidose. En effet, il a été montré que le peptide 108-117 de la protéine CFTR interagissait avec le core du LPS de *P. aeruginosa,* permettant l'internalisation de la bactérie, par la formation d'une cavéole grâce à la cavéoline-1. Cette endocytose par les cellules épithéliales, permettant l'activation du facteur NF-κB et la présentation des antigènes aux cellules immunitaires, participant ainsi à la clairance bactérienne, est réduite jusqu'à 100 fois dans les cellules n'exprimant pas CFTR ou exprimant F508del-CFTR (Bajmoczi *et al.*, 2009; Pier *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 2002).

b) Les facteurs de virulence sécrétés

(1) Le système de sécrétion de type III

C'est un complexe protéique qui forme une aiguille, associée à des protéines chaperones, qui permet l'injection de protéines directement dans le cytoplasme des cellules de l'hôte. C'est un système très important pour *P. aeruginosa* qui fait intervenir 56 gènes pour sa synthèse et sa régulation. Cette régulation est dépendante du milieu environnent (concentration en calcium, présence d'acide aminés particuliers comme le glutamate). Ce système permet la sécrétion de quatre protéines ExoS, ExoT, ExoU et ExoY (Hauser, 2009; Kipnis *et al.*, 2006). ExoS et ExoT sont des toxines similaires, possédant une activité GAP (GTPase activating protein) et une activité ADP transférase, qui entrainent (i) une perturbation de l'organisation du cytosquelette, conduisant à un dérèglement du cycle cellulaire et une altération du routage des protéines, (ii) une réduction de la mobilité des phagocytes et (iii) une induction de l'apoptose des PMN et macrophages. La mort des neutrophiles va libérer de l'ADN qui augmentera encore la viscosité du mucus dans les poumons des patients CF (Lyczak *et al.*, 2002). ExoY a une activité adénylate cyclase induisant l'accumulation massive de nucléotides cycliques dont la fonction physiopathologique reste à déterminer (Voigt *et al.*, 2011). Enfin, ExoU est une cytotoxine conduisant à la mort rapide des cellules eucaryotes, grâce à son activité phospholipase perturbant les membranes cellulaires (Kipnis *et al.*, 2006).

(2) Le système de sécrétion de type II

Il consiste en douze protéines organisées en un complexe multiprotéique qui permet la sécrétion, dans l'environnement proche des cellules de l'hôte, de diverses protéines, dont l'élastase, la phospholipase C ou encore l'exotoxine A. Ces facteurs dégradent les opsonines et autres protéines du complément, les protéines de la matrice extracellulaire du tissu pulmonaire (élastine, laminine, collagènes) et les phospholipides membranaires, conduisant à la mort cellulaire (Kipnis *et al.*, 2006; Sandkvist, 2001). Ce système de sécrétion semble fortement impliqué dans l'issue mortelle des infections pulmonaires par *P. aeruginosa* (Jyot *et al.*, 2011).

(3) Le système de sécrétion de type VI

P. aeruginosa possède 3 systèmes de sécrétion de ce type : H1-T6SS H2-T6SS et H3-T6SS. L'assemblage de leur appareil sécrétoire fait intervenir deux types de protéines structurellement proches des protéines de la queue du phage T4, Hcp (hemolysin co-regulated

protein) et Vgr (valine glycine repeat). H1-T6SS sécrète 3 toxines, Tse 1 à 3, qui ciblent les autres bactéries et confèrent alors un avantage à *P. aeruginosa* pour sa multiplication contribuant ainsi probablement à la chronicité de l'infection (Hood *et al.*, 2010). Il semblerait que H2-T6SS soit également impliqué dans la virulence par son interaction avec les cellules épithéliales, alors qu'aucune fonction de virulence n'est encore associée au système H3-T6SS découvert récemment (Sana *et al.*, 2012).

(4) Les sidérophores

Il s'agit de molécules sécrétées dans le milieu extérieur pour chélater le fer, des hémoglobines par exemple, celui-ci étant un cofacteur essentiel qui n'est pas librement disponible. Les deux principaux sont la pyocyanine et la pyoverdine (Bricha *et al.*, 2009). Il a été montré qu'à une concentration semblable à celle retrouvée dans les poumons de patients, la pyocyanine, par ses propriétés oxydantes, induisaient l'apoptose des neutrophiles et différents dommages tissulaires jouant ainsi un rôle important dans la virulence de la bactérie (Allen *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2004; O'Malley *et al.*, 2004; Usher *et al.*, 2002).

(5) Les rhamnolipides

Ce sont des biosurfactants, ou détergent, composés d'une partie sucre hydrophile, le L-rhamnose, et d'un corps lipidique hydrophobe. De nombreuses propriétés leur sont conférées dont la lyse des PMN et des macrophages, l'inhibition de la phagocytose, le maintient des biofilms mais aussi la perturbation de la clairance mucociliaire et du transport ionique qui, dans un contexte CF, conduit encore à une exacerbation des symptômes (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010; McClure & Schiller, 1996; Read *et al.*, 1992; Stutts *et al.*, 1986).

(6) Les lectines

Ce sont des protéines solubles cytotoxiques notamment représentées par lecA et lecB. Elles interviennent dans l'adhésion de *P. aeruginosa* ou l'inhibition du battement ciliaire des cellules pulmonaires causant des dommages tissulaires (Chemani *et al.*, 2009). Elles sont également, l'une comme l'autre, impliquées dans la formation des biofilms (Diggle *et al.*, 2006; Tielker *et al.*, 2005).

Il existe encore d'autres protéases sécrétées par *P. aeruginosa* telles que la protéase alcaline par exemple (système sécrétion de type I). La sécrétion de l'ensemble de ces facteurs a pour conséquences une double action de réduction de l'efficacité de la réponse immunitaire

et de formation de lésions tissulaires qui conjointement dégradent la fonction pulmonaire des patients CF et aide à la pénétration de la bactérie.

c) La mucoïdie

La mucoïdie est conférée par la synthèse d'alginate (ou exopolysaccharide), un copolymère acétylé d'acide mannuronique et d'acide guluronique dont le degré d'acétylation est variable entre les souches. Cette synthèse est contrôlée par un cluster de gène chromosomique et notamment par les gènes *mucA, algD* et a*lgU* codant respectivement les protéines MucA, GDP-mannose déshydrogénase et AlgU. Dans les souches non mucoïdes, le facteur anti-sigma MucA réprime le facteur sigma alternatif AlgU, qui contrôle positivement l'expression d'*algD*, codant l'enzyme clé de la voie de synthèse des alginates. Le passage à la mucoïdie est généralement dû à une mutation du gène *mucA* rendant la protéine MucA22 inactive. Cette mutation est retrouvée dans la quasi-totalité des souches mucoïdes isolées de patients CF mais dépend de l'environnement et est donc instable avec un retour au phénotype non-mucoïde fréquent *in vitro* (Lyczak *et al.*, 2002; Schurr *et al.*, 1994). Il a été montré que les radicaux libres oxygénés libérés lors de la phagocytose de la bactérie par les PMN induisaient cette mutation *mucA22* (Mathee *et al.*, 1999; Miller & Britigan, 1997).

Le phénotype mucoïde confère à la bactérie plusieurs avantages :

- une diminution de la réponse immunitaire globale, une diminution de l'attraction des PMN ainsi qu'une résistance à la phagocytose aussi bien par les macrophages que les PMN et une protection contre la réponse immunitaire adaptative, l'homme produisant naturellement peu d'anticorps anti-alginate (Cobb *et al.*, 2004; Lyczak *et al.*, 2002)
- une diminution de la diffusion des antibiotiques tels que les aminosides par leur attachement aux alginates (Nichols *et al.*, 1988)

Les souches de *P. aeruginosa* retrouvée lors des primo-infections chez les enfants CF sont généralement non mucoïdes et sensibles aux antibiotiques. L'émergence du phénotype mucoïde initie probablement le passage de l'infection à la phase chronique à l'adolescence (Burns *et al.*, 2001; Lyczak *et al.*, 2002). Ce phénotype constitue un facteur pronostique défavorable de mortalité et les rares patients, adultes ou adolescents, infectés uniquement par des souches non-mucoïdes présentent d'ailleurs une meilleure fonction pulmonaire (Henry *et al.*, 1992; Parad *et al.*, 1999).

d) La formation de biofilm

Le biofilm est une communauté symbiotique de bactéries, adhérant entre elles et aux surfaces, et qui sécrètent une matrice adhésive et protectrice. Les bactéries peuvent ne représenter que 10 % du biofilm et la matrice 90 %. Cette matrice contient principalement des polysaccharides et aussi des lipides, de l'ADN, des protéines et de l'eau (Flemming & Wingender, 2010). Deux types majoritaires de polysaccharides sont sécrétés (Friedman & Kolter, 2004):

- les polysaccharides PSL riches en mannose et dont la production implique les gènes de l'opéron *psl* (pour « polysaccharide synthesis locus »)
- les polysaccharides PEL riches en glucose et dont la production implique les gènes du cluster *pel* (pour « pellicle »)

La production de ces polysaccharides est indépendante du phénotype mucoïde. Il existe ainsi des biofilms formés par des souches non mucoïdes (Kipnis *et al.*, 2006). Ces polysaccharides sont sécrétés en phase stationnaire de croissance de la bactérie avec une production régulée par le système chimio-senseur *wsp* (pour « wrinkly spreader »). L'opéron *wsp* code deux protéines, une protéine senseur kinase WspE qui régule positivement une protéine WspR possédant un domaine GGDEF permettant la synthèse de c-di-GMP. Une forte concentration de c-di-GMP, second messager d'une voie de signalisation, active alors la formation du biofilm (McDougald *et al.*, 2008). Parallèlement, la formation de biofilm est aussi régulée par le quorum sensing (cf. paragraphe II.B.1.e).

Chez *P. aeruginosa*, la formation d'un biofilm mature a lieu en 5 à 7 jours et s'effectue en 5 étapes (Figure 16) (Høiby *et al.*, 2011). A l'intérieur du biofilm mature, la densité de bactérie varie et il existe un gradient de nutriments et de disponibilité de l'oxygène. Cela produit une population bactérienne hétérogène. Les populations localisées au plus profond du biofilm présentent une activité métabolique réduite et sont ainsi moins sensibles aux antibiotiques ciblant des enzymes. De plus, le biofilm semble être une structure facilitant le transfert de gène horizontal entre bactéries, processus impliqué dans l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques (cf. paragraphe II.B.2) (Flemming & Wingender, 2010). Ainsi, le biofilm confère une moindre sensibilité des bactéries aux antibiotiques qui s'ajoute à sa fonction de barrière physique (Drenkard, 2003). Comme pour la mucoïdie, le biofilm protège aussi la bactérie de la phagocytose (Lyczak *et al.*, 2002). Pour ces raisons, la capacité des souches de *P .aeruginosa* à former un biofilm contribue à la persistance de cette bactérie chez les patients atteints de mucoviscidose (Costerton *et al.*, 1999).

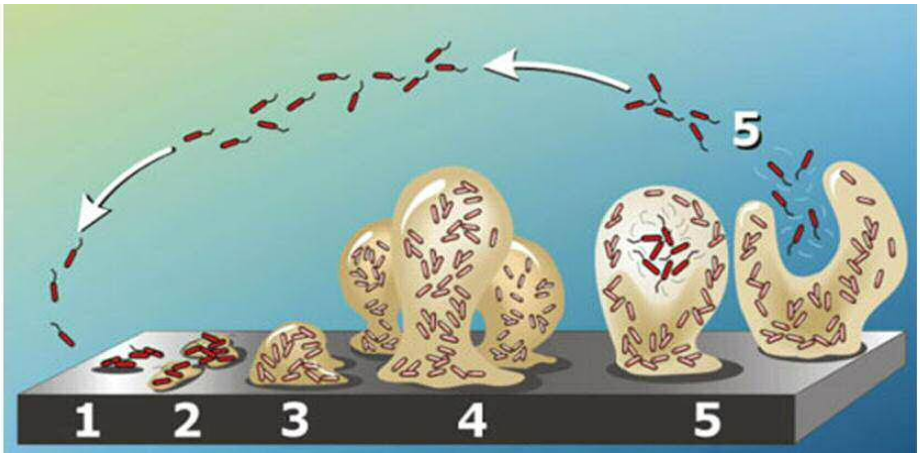


Figure 16 : Etapes de la formation d'un biofilm

L'étape initiale est l'adhésion réversible de la bactérie mobile à une surface (1). Cette étape est non spécifique et se fait par des liaisons électrostatiques faibles. L'adhésion devient ensuite permanente grâce aux facteurs bactériens (pili par exemple) (2). Vient ensuite la maturation primaire avec une multiplication des bactéries pour former des microcolonies (3). A ce stade les bactéries sécrètent de la matrice et perdent leur mobilité (les gènes impliqués dans la synthèse des pilis et du flagelle sont réprimés). Le biofilm se développe ensuite en multicouches formant des structures caractéristiques en forme de champignon, c'est la maturation secondaire (4). Le biofilm a alors une épaisseur de plus de 50 µm et des canaux aqueux se créent entre les colonies permettant une circulation des nutriments. Le vieillissement du biofilm induit la phase de dispersion où certaines bactéries redeviennent planctoniques et mobiles et peuvent recommencer un nouveau cycle de formation de biofilm. D'après (Cogan & Keener, 2004).

e) Régulation des facteurs de virulence

La régulation des facteurs de virulence permet à la bactérie d'adapter sa synthèse protéique aux facteurs environnementaux. Cette régulation fait intervenir deux principaux mécanismes : les systèmes à deux composants et le quorum sensing (Bricha *et al.*, 2009).

(1) Les systèmes à deux composants

Ces systèmes fonctionnent par l'association de deux protéines. La première, souvent présente à la membrane plasmique, est une protéine histidine kinase senseur comportant un domaine détecteur et un domaine transmetteur. Elle est capable de s'auto-phosphoryler au niveau du résidu histidine conservé du domaine transmetteur en réponse à un stimulus. Il y a ensuite phospho-transfert, aboutissant à la phosphorylation d'un résidu aspartate conservé sur le domaine receveur de la seconde protéine, la protéine effectrice. Cette phosphorylation régule le domaine effecteur de cette protéine modifiant ainsi son activité régulatrice de l'expression de gènes, codant notamment des facteurs de virulence. Le nombre de protéines senseurs et effectrices « putative » détectés dans les génomes de *P. aeruginosa* est très élevé.

118 ORFs (pour open reading frame) ont par exemple été retrouvés dans le génome de la souche PAO1 (Stover *et al.*, 2000). Ceci pourrait expliquer en partie la capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* aux poumons des patients CF.

(2) Le quorum sensing

C'est le principal acteur de la régulation des facteurs de virulence, en particulier lors de la formation du biofilm. Il permet la communication entre les bactéries et leur adaptation coordonnée. Chez *P. aeruginosa*, les deux systèmes de quorum sensing les plus communs, Las et Rhl, reposent sur la production de N-acyl-homosérine lactone (AHL) diffusibles qui indique la densité de bactérie dans le milieu. Ces deux systèmes fonctionnent de manière similaire avec d'une part les protéines synthase, LasI et RhlI, et d'autre part les protéines régulatrices, LasR et RhlR. LasI et RhlI sont responsables de la synthèse des AHL qui traversent la membrane facilement pour diffuser dans le milieu. En présence d'une forte concentration d'AHL, LasR et RhlR, qui sont des activateurs transcriptionnels, se lient à ces AHL formant ainsi un complexe. Ce complexe active alors, de façon synchrone dans la population, la transcription de différents facteurs de virulence, dont l'exotoxine A, l'élastase ou encore la protéase alcaline, grâce à LasR et les rhamnolipides grâce à RhlR (Bricha *et al.*, 2009; Kipnis *et al.*, 2006). Ces systèmes sont eux même modulés, entre autres, négativement par QscR (quorum sensing control repressor) pendant la phase exponentielle de croissance, ou positivement par le système à deux composants GacS/GacA (Diggle *et al.*, 2008). Il existe un troisième système de quorum sensing décrit qui module entre autre l'expression de la pyocyanine. Il repose lui sur la production de 2-alkyl-4(1H)quinolones (AHQ), qui est dépendante des gènes de l'opéron *pqsABCDE* ainsi que des gènes *pqsH* et *pqsL,* et qui est régulée par le produit du gène *pqsR* (Heeb *et al.*, 2011).

2. La plasticité génétique de *P. aeruginosa*

Le génome de *P. aeruginosa* fait partie des génomes bactériens les plus grands (Genomes online database). Cette taille est plus le résultat d'une grande complexité génétique avec de nombreux gènes uniques plutôt que celui d'une duplication des gènes, augmentant ainsi la diversité de souches (Silby *et al.*, 2011). Ce génome est constitué d'un chromosome d'ADN circulaire dont la taille est comprise entre 6.1 et 6.9 Mpb selon la souche et avec un G+C % compris entre 65 et 67 %. Il s'agit d'une mosaïque de régions conservées entrecoupées par des régions de plasticité génomique (RGP) très variables en fonction des souches (Silby *et al.*, 2011). Originellement, de nombreux RGP sont acquises depuis

différentes espèces et ont donc un G+C % plus faible que celui du core de *P. aeruginosa* spécialement élevé. Cette particularité permet la régulation négative de ces gènes par des protéines H-NS (pour Histone-like nucleoid structuring protein) reconnaissant particulièrement ces régions (Lucchini *et al.*, 2006). L'ensemble des régions conservées constituent le core du génome dont la diversité entre les souches est de seulement 0.7 % (Cramer *et al.*, 2011). Les mutations dans le core peuvent provoquer l'apparition de souches hypermutables, défectueuses pour les systèmes de réparation de l'ADN, et de SCV (small colony variant). Ces SCV, dont la croissance est ralentie, constituent une population sous-jacente, hyperpiliée, plus mobile, présentant une adhésion augmentée et une meilleure capacité à former un biofilm (Proctor *et al.*, 2006). Cependant chez *P. aeruginosa*, la diversité génomique provient principalement du génome accessoire qui est central pour la biologie de la bactérie. Ce génome accessoire est composé d'éléments génétiques mobiles libres, les plasmides, ou intégrés dans le chromosome (RGP) tels que les prophages, les îlots génomiques, les transposons et les intégrons. Certains plasmides possédant des séquences de recombinaisons spécifiques sont capables de s'intégrer au chromosome et inversement, certains éléments intégrés peuvent s'exciser du génome en réponse à des signaux environnementaux, à l'instar des prophages. Ces éléments génétiques mobiles comportent souvent des gènes codant des facteurs de virulence (par exemple ExoU, cf. paragraphe II.B.1.b)(1)), des systèmes de régulation à deux composants (cf. paragraphe II.B.1.e)(1)) ou des gènes de résistance aux antibiotiques tels que des pompes à efflux (cf. paragraphe II.C). Le rôle de ces éléments mobiles dans la virulence de la bactérie est bien illustré par la souche LESB58 (pour Liverpool epidemic strain) particulièrement agressive et qui comporte 5 îlots génomiques et 6 prophages (Winstanley *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa*, il existe de nombreux îlots génomiques dont certains possèdent des gènes codant leur excision du chromosome, leur transfert et leur intégration, les ICE (pour integrative and conjugative elements). La présence de certains de ces ICE, comme PAGI-5 ou LESGI-5, est corrélée avec une augmentation de virulence. Les prophages sont également très fréquents puisque la quasi-totalité des souches de *P. aeruginosa* en possèdent. Ils peuvent également être à l'origine d'une augmentation de virulence. Il a par exemple été montré que le génome du prophage D3 contenait des gènes codant des enzymes qui permettent la séroconversion de l'antigène-O du LPS (O5 → O16) (Newton *et al.*, 2001). Cela confère alors à la bactérie une résistance à ce phage D3 empêchant ainsi la surinfection. Vu les différentes fonctions du LPS, la lysogénie de la souche PAO1 par ce phage D3, ou le phage Fiz15 semblable, conférait aussi à la bactérie une augmentation d'adhérence aux cellules épithéliales buccales humaines ainsi qu'une

résistance à la phagocytose (Vaca-Pacheco *et al.*, 1999). Toujours chez PAO1, il a également été reporté le rôle du prophage filamenteux Pf4 dans le maintient du biofilm (Rice *et al.*, 2008).

Avec les délétions, les mutations et les réarrangements du core, le transfert horizontal des composants du génome accessoire contribue largement à l'évolution du génome de *P. aeruginosa* (Figure 17) (Kung *et al.*, 2010). Chez les patients CF, cette évolution va dans le sens de l'adaptation de la bactérie aux poumons du patient et aide ainsi à sa persistance dans les poumons. Une étude menée sur des isolats provenant d'un même patient à 7,5 ans d'intervalle, montre une sélection positive avec 13 mutations dans des gènes codant des facteurs de virulence ou leur régulateurs et 12 mutations pour des gènes induisant des résistances aux antibiotiques (Smith *et al.*, 2006). Cependant, les souches isolées des patients CF sont génétiquement diverses avec une rare émergence de clones épidémiques (Pirnay et al., 2009). Ainsi, la population de *P. aeruginosa* infectant chroniquement le patient se diversifie en multiples variants phénotypiques qui coexistent et présentent une diversité dans leur susceptibilité aux anti-microbiens (Silby *et al.*, 2011).

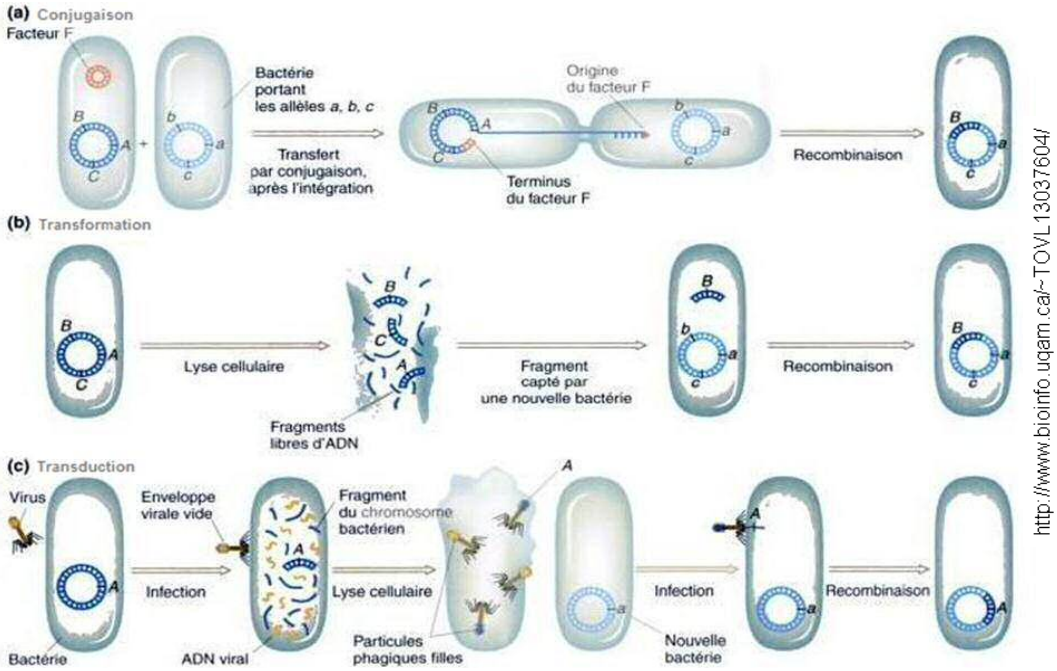


Figure 17 : Modes de transfert de gènes horizontaux

La conjugaison est un mécanisme qui nécessite le contact entre les deux cellules avec la formation d'un pilus sexuel. C'est le mécanisme utilisé pour le transfert des plasmides et des ICE. La transformation permet l'intégration d'ADN nu, provenant souvent de la lyse de la cellule donneuse, dans le chromosome de la cellule receveuse. C'est un mécanisme peu décrit chez P. aeruginosa*. La transduction permet l'infection de la bactérie receveuse par un prophage de la bactérie donneuse, le génome de ce prophage s'intégrera dans le chromosome. Le matériel génétique transféré est susceptible de contenir des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes codant des facteurs de virulence.*

3. La réponse immunitaire contre *P. aeruginosa* chez les patients CF

La protéine CFTR régule normalement certaines voies de signalisation, dont la voie NF-κB et la cyclooxygénase-2 (COX-2), aboutissant à une production excessive de cytokines NF-κB-dépendante et de prostaglandine lorsque cette protéine est défectueuse (Chen *et al.*, 2012; Nichols *et al.*, 2008; Stecenko *et al.*, 2001). Ainsi, les patients CF souffrent d'inflammation chronique avant que l'infection à *Pseudomonas aeruginosa* ne devienne elle-même chronique. Cependant la primo-infection à *P. aeruginosa* se produit majoritairement durant les 3 premières années de vie, ce qui associé à d'autres infections ayant lieu très tôt dans l'enfance, à l'instar de l'infection à *Staphylococcus aureus*, pourrait amplifier cette inflammation chronique précoce (Burns *et al.*, 2001).

En effet, à son entrée dans l'organisme, la bactérie va être reconnue par les macrophages, cellules dendritiques et cellules « natural killer » (NK). Ce sont les Toll-like récepteurs (TLR) présents à la membrane de ces cellules qui reconnaissent les PAMPs bactériens, motifs moléculaires associés aux pathogènes qui leur sont essentiels, tels que la flagelline constituant le flagelle bactérien (Figure 18). La stimulation des TLR sera alors à l'origine de l'activation d'une cascade de signalisation aboutissant à l'activation du facteur de transcription NF-κB, qui lui régule l'expression de cytokines inductibles. Ainsi, la reconnaissance des bactéries par les TLR induit la production de cytokines pro-inflammatoires : IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8. Ces cytokines vont permettre :

- le recrutement des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN)
- la synthèse de protéines inflammatoires telle que la « mannose binding protein » (MBP), une lectine se fixant au mannose de la paroi bactérienne et qui active la voie du complément
- la synthèse de la phospholipase A_2 (PLA_2), permettant la production d'acide arachidonique à partir de phospholipides membranaires, et la synthèse de la COX-2. Cette dernière permet la synthèse de la PGE-2, prostaglandine inductrice de la prolifération lymphocytaire, à partir de l'acide arachidonique.
- le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative (par stimulation de la synthèse des molécules HLA augmentant la présentation des antigènes aux lymphocytes, et par stimulation de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes B et T).

Dans le cas de l'infection pulmonaire des patients CF à *P. aeruginosa*, la réponse immunitaire adaptative à médiation humorale (intervention de lymphocytes Th2) est prédominante. Cependant, les rares patients ayant une réponse immunitaire adaptative à médiation cellulaire dominante (intervention de lymphocytes Th1) ont une meilleure fonction

respiratoire, suggérant que le basculement d'une réponse Th2 vers une réponse Th1 pourrait être une option thérapeutique à envisager (Hartl *et al.*, 2006; Moser *et al.*, 2000).

Les PMN, cellules dendritiques, NK et macrophages ainsi que les cellules épithéliales inflammatoires vont également libérer des peptides antimicrobiens tels que les défensines. Ces peptides sont de petite taille (12 à 50 acides aminés), polycationiques et ont un large spectre. D'une part ils interagissent avec la membrane externe des bactéries chargée négativement et la déstabilisent aboutissant à la lyse bactérienne. Certains d'entre eux sembleraient aussi avoir des cibles intracellulaires et moduleraient ainsi l'expression de certains gènes de la bactérie (Bellemare *et al.*, 2010).

Parallèlement, les bactéries seront aussi reconnues par les protéines du complément. L'activation de la voie du complément conduit à la formation de pores dans les membranes bactériennes, attire les phagocytes et provoque l'opsonisation, aboutissant à la phagocytose par les macrophages et PMN.

Ainsi par rapport aux sujets sains, les patients CF infectés à *P. aeruginosa* présentent dans les lavages broncho-alvéolaires (Bonfield *et al.*, 1995; Hartl *et al.*, 2006; Lyczak *et al.*, 2002; Ulrich *et al.*, 2010) :

- une augmentation de la quantité de cytokines pro-inflammatoires : IL-8, d'IL-1β, d'IL-6 et de TNF-α
- une augmentation de la quantité de cytokines associées à la réponse Th2 : IL-4 et IL-13
- une augmentation de la quantité de neutrophiles et en conséquence d'élastase, protéine sécrétée par les neutrophiles
- une absence d'IL-10, cytokine anti-inflammatoire présente chez les sujets sains.

Avec les infections bactériennes répétées puis chroniques chez les patients CF, cette inflammation devient également chronique et certains acteurs inflammatoires engendrent alors des lésions tissulaires. C'est notamment le cas des PMN en raison de la sécrétion massive d'élastase et de radicaux libres oxygénés formés lors de la phagocytose. En plus des symptômes pulmonaires induits (cf. § I.D.3.b)(3)), ces dommages profitent à la pénétration de la bactérie dans l'organisme.

Ainsi, à l'issue d'un dialogue dynamique entre la bactérie et son hôte, les capacités d'adaptation de *P. aeruginosa,* particulièrement élaborées, lui confèrent un avantage qui se traduit par la colonisation durable d'une niche écologique particulière, les poumons des patients CF.

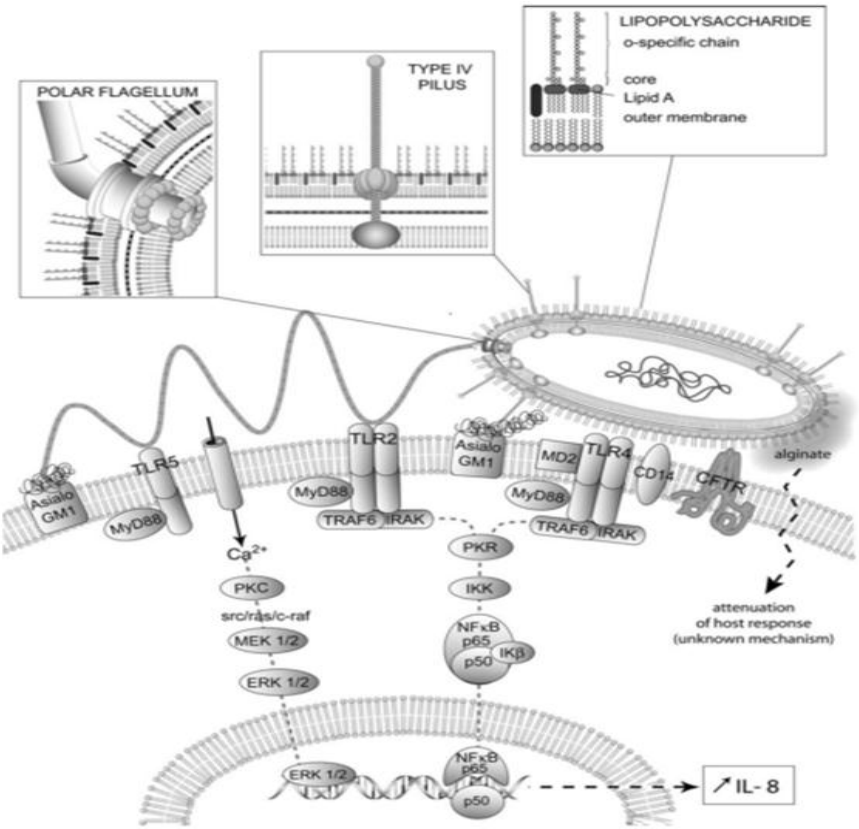


Figure 18 : Schéma des facteurs de virulence de surface cellulaire de *P. aeruginosa*

La flagelline, la piline et le LPS permettent l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales par attachement aux asialo-GM1 et /ou à CFTR et CD14. La flagelline est reconnue par les TLR5 et le LPS par les TLR2 et TLR4/MD2 activant ainsi les voies de signalisation des MAP-kinases et de NF-κB, conduisant à la transcription de gènes de l'inflammation.
MD2 : corécepteur membranaire; CD14: antigène de surface; MAP-kinase : mitogen-activated protein kinase ; MEK1/2 : MAP-kinase kinase; ERK 1/2: extracellular signal-regulated kinase ; PKR : protein kinase régulée par ARN ; IKK :I-kappa-B kinase ; NFκB : nuclear factor kappa B ; MyD88: myeloid differentiation primary response 8; TRAF6 : tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 ; IRAK : IL-1 receptor-associated kinase.
D'après Kipnis et al., 2006.

4. Les effets de *P. aeruginosa* sur le transport ionique

L'infection à *P. aeruginosa* altère également les transports du sodium et du chlorure. La Table 3 présente, de manière non exhaustive, les acteurs à l'origine de ces altérations. Ce sont des facteurs de virulence de la bactérie (en violet dans la Table 3) ou des effecteurs de l'inflammation produit en réponse à l'infection (en vert dans la Table 3). Chez les patients CF, ces acteurs directs et indirects vont encore potentiellement accentuer les dysfonctionnements de transports ioniques préexistants.

Table 3 : Effets de l'infection par *P. aeruginosa* sur le transport ionique

Effets	Activation	Inhibition	Modèles utilisés	Références
Sur le transport du sodium				
Expression du canal ENaC	IL-6		M-1	(Li *et al.*, 2010)
	Pyocyanine		16HBE	(Kong *et al.*, 2006)
	Infection < 24h	Infection > 24h	Poumons murins	(Dagenais *et al.*, 2005)
	IL1-β		Poumons de cobaye commun	(Nair *et al.*, 2005)
		IL1-β	Cell. épith. alvéolaires primaires humaines et de rat	(Roux *et al.*, 2005)
		TNF-α	Cell. épith. alvéolaires primaires de rat	(Dagenais *et al.*, 2004)
		IL-4	Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2002)
Fonction du canal ENaC		LPS	Cell. épith. alvéolaires primaires de rat	(Boncoeur *et al.*, 2010)
	IL-6		M-1	(Li *et al.*, 2010)
		Flagelline	Trachée de souris	(Kunzelmann, 2006)
		IL-1β	Cell. épith. bronchique humaines primaires et Cell. épith. alvéolaires primaire de rat	(Gray *et al.*, 2004; Roux *et al.*, 2005)
		TNF-α	Cell. épith. primaires alvéolaires de rat et bronchique humaines	(Dagenais *et al.*, 2004; Galietta *et al.*, 2000)
		IL-4	Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2002)
		IFN-γ	Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2000)
	IL-10		Iléon de rat	(Madsen *et al.*, 1996)

Effets	Activation	Inhibition	Modèles utilisés	Références
Fonction du canal ENaC		Bactérie entière	Cell. épith. primaires de trachée bovine et Cell. épith. bronchiques de chien	(Evans *et al.*, 1998; Stutts *et al.*, 1986)
		Rhamnolipides	Cell. épith. de trachée de mouton	(Graham *et al.*, 1993)
Sur le transport du chlorure				
Expression de CFTR		Elastase PMN	Souris	(Le Gars (soumis))
		Epoxide hydrolase Cif	MDCK transfectée CFTR-WT	(MacEachran *et al.*, 2007)
	IL-13		Cell. épith. nasales primaires humaines	(Skowron-zwarg *et al.*, 2007)
		Bactérie entière	Calu-3, MDCK et CFBE transfectée CFTR-WT	(Swiatecka-Urban *et al.*, 2006)
		Pyocyanine	16HBE et Cell. épith. nasales primaires humaines	(Kong *et al.*, 2006)
	IL-1β		Cell. épith. bronchique humaines primaires	(Gray *et al.*, 2004)
	IL-4		Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2002)
	TNF-α		Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2002)
		IFN-γ	Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2002)
		LPS	Cellules glandulaire de trachée humaine	(Kammouni *et al.*, 1997)
Routage de CFTR		Pyocyanine	16HBE et Cell. épith. nasales primaires humaines	(Kong *et al.*, 2006)
Fonction de CFTR		Elastase PMN	Souris	(Le Gars (soumis))
	LPS (effet retardé ~ 15 min)	LPS (effet rapide ~ 5 min)	C127 transfectée CFTR-WT	(Haenisch *et al.*, 2010)

Effets	Activation	Inhibition	Modèles utilisés	Références
Fonction de CFTR	Flagelline		Calu-3	(Illek *et al.*, 2008)
		Epoxide hydrolase Cif	MDCK transfectée CFTR-WT	(MacEachran *et al.*, 2007)
		Bactérie entière	Calu-3, MDCK et CFBE transfectée CFTR-WT	(Swiatecka-Urban *et al.*, 2006)
	IL-1β		Cell. épith. bronchique humaines primaires	(Gray *et al.*, 2004)
	IL-4		Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2002)
	IL-2		Entérocytes humains	(O'Loughlin *et al.*, 2001)
		IFN-γ	Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2000)
	TNF-α		Cell. épith. bronchique primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2000)
		IL-10	Iléon de rat	(Madsen *et al.*, 1996)
Fonction de CaCC	IL-1β		Cell. épith. bronchique humaines primaires	(Gray *et al.*, 2004)
	IL-4		Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2002)
	IFN-γ		Cell. épith. bronchiques primaires humaines	(Galietta *et al.*, 2000)
Fonction ClC-2	IFN-γ		Calu-3	(Chu *et al.*, 2004)
Sécrétion Cl^- non définie	PGE-2		Cell. épith. de trachée de chien	(Leikauf *et al.*, 1985)

Calu-3 : Lignée cellulaire épithéliale pulmonaire humaine
16HBE : Lignée cellulaire épithéliale bronchique humaine
MDCK : Lignée cellulaire épithéliale rénale canine
C127 : Lignée cellulaire épithéliale mammaire murine
CF CFBE : Lignée cellulaire épithéliale bronchique de patient CF
M-1 : Lignée cellulaire murine du tube collecteur cortical du rein
ClC-2 : canal chlorure voltage-dépendant

C. La réponse de P. aeruginosa *aux antibiotiques*

Avec l'infection chronique à *P. aeruginosa*, les patients CF reçoivent des traitements antibiotiques quotidiens renforcés par des cures plus intensives lors des épisodes d'exacerbations pulmonaires (cf. paragraphe I.E.2.b)). Cette pression antibiotique permanente entraine l'émergence de souches résistantes de *P. aeruginosa*.

1. Les mécanismes de résistances

Ils existent différents mécanismes qui peuvent conférer une résistance aux antibiotiques (Poole, 2011) :

- Résistance par modification de la cible : la cible de l'antibiotique n'est plus reconnue par cet antibiotique. C'est le cas par exemple lors de mutation dans les gènes codant une sous-unité de l'ADN-gyrase bactérienne, cible des quinolones et fluoroquinolones.
- Résistance par modification de l'antibiotique : il y a acquisition d'une enzyme par la bactérie qui réduit ou inhibe l'activité de l'antibiotique. Par exemple, l'acquisition de gènes codant des β-lactamases ou des acyl-phospho-transférases permet respectivement l'hydrolyse les β-lactamines et la modification les aminosides.
- Résistance par diminution de la concentration en antibiotique au niveau de la cible : il s'agit de deux types de mécanismes. Le premier réduit la pénétration, par exemple par les porines présentes à la membrane externe, à l'instar d'OprD. Les mutations provoquant une réduction du diamètre ou des charges de ces porines permettent la résistance à certains antibiotiques comme l'imipénème (classe des carbapénèmes). Le second mécanisme consiste à exporter l'antibiotique par un système d'efflux qui peut être plus ou moins spécifique d'un antibiotique. Par exemple, la pompe MexAB-OprM permet l'efflux de certaines β-lactamines alors que l'efflux des aminosides est spécifique de MexXY-OprM (Masuda *et al.*, 2000). Ce mécanisme d'efflux semble prépondérant dans la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques.

D'autre part, il a été montré que le biofilm conférait une augmentation des résistances aux β-lactamines, aminosides et tétracyclines mais pas au fluoroquinolones (Olson *et al.*, 2002). En effet le biofilm diminue la pénétration des antibiotiques et réduit l'activité métabolique d'une partie de la population réduisant ainsi leur susceptibilité aux antibiotiques (cf. paragraphe II.B.1.d) (Drenkard, 2003).

2. *P. aeruginosa* : une bactérie multi-résistante

P. aeruginosa est naturellement résistante aux quinolones de première génération et à certaines β-lactamines en raison de la production intrinsèque d'une céphalosporinase inductible et d'une oxacillinase, AmpC et PoxB respectivement. La faible perméabilité naturelle de sa membrane externe lui confère également une résistance à certains aminosides, carbapénèmes et autres β-lactamines. A ces résistances naturelles, viennent s'ajouter les résistances acquises. Les résistances aux antibiotiques acquises proviennent, comme décrit dans le paragraphe II.B.2, de mutations dans les gènes du core-génome (mutations ponctuelles, souches hypermutables, SCV) ou d'une acquisition de gène exogènes par transfert horizontal (Poole, 2011). Par exemple les transposons, composants du génome accessoire et pouvant être transférés entre les bactéries, contiennent de nombreux gènes de résistance : aux β-lactamines (transposon Tn6061, Tn6001 et Tn1213) ; aux aminosides, tétracyclines, rifampicine, chloramphénicol et sulfamides (Tn6061) ; aux carbapénèmes (Tn4401b) (Kung *et al.*, 2010). Cette résistance a cependant un coût pour la bactérie qui devient généralement moins compétitive dans l'environnement, les isolats environnementaux présentant d'ailleurs globalement moins de résistances (Janam *et al.*, 2011). En revanche, avec la pression de sélection induite par l'utilisation massive d'antibiotiques dans l'environnement clinique, il est aujourd'hui observé chez les patients CF un accroissement des souches résistantes pour la majorité des antibiotiques depuis les années 90, y compris un accroissement des souches multi-résistantes (Table 4) (Emerson *et al.*, 2010). Ces souches multi-résistantes, appelés MDR (pour multi-drug resistant), sont caractérisées par une résistance à au moins 3 des 4 principales classes d'antibiotiques à savoir i) les β-lactamines, ii) les carbapénèmes, iii) les aminosides et iv) les fluoroquinolones. Ces MDR représentent aujourd'hui 10 à 20 % des souches retrouvées chez les patients CF et le traitement par colistine (une polymyxine) est actuellement le dernier recours (Barbier & Wolff, 2010). La colistine agit en déstabilisant la membrane externe de la bactérie et certaines souches acquièrent une résistance à cet antibiotique par modification de leur LPS. Ainsi, bien que cela reste rare, il a déjà été observé des souches résistances aux polymyxines ainsi qu'aux autres classes d'antibiotiques, dénommées souches pan-résistantes. (Barbier & Wolff, 2010; Falagas *et al.*, 2006).

L'augmentation de la prévalence de telles souches rend indispensable la recherche d'autres traitements antimicrobiens.

	Historical cohort		Contemporary cohort		
	N (%)	95% CI	N (%)	95% CI	*P*-value
Resistant *P. aeruginosa*					
Total subjects evaluated	508		253		
Tobramycin	60 (11.8%)	9.1%, 14.9%	77 (30.4%)	24.8%, 36.5%	<0.001
Amikacin	123 (24.2%)	20.5%, 28.2%	108 (42.7%)	36.5%, 49.0%	<0.001
Aztreonam	111 (21.9%)	18.3%, 25.7%	71 (28.1%)	22.6%, 34.0%	0.06
Ceftazidime	99 (19.5%)	16.1%, 23.2%	69 (27.3%)	21.9%, 33.2%	0.02
Ticarcillin ± clavulanate	145 (28.5%)	24.7%, 32.7%	91 (36.0%)	30.1%, 42.2%	0.04
Ciprofloxacin	175 (34.4%)	30.3%, 38.8%	85 (33.6%)	27.8%, 39.8%	0.81
Multidrug Resistance	59 (11.6%)	9.0%, 14.7%	43 (17.0%)	12.6%, 22.2%	0.04
Cefepime	—	—	68 (26.9%)	21.5%, 32.8%	—
Meropenem	—	—	50 (19.8%)	15.0%, 25.2%	—
Piperacillin/tazobactam	—	—	65 (25.7%)	20.4%, 31.5%	—

Table 4 : Prévalence de la résistance des souches de *P. aeruginosa* chez les patients CF

L'étude a été réalisée aux Etats Unis sur une cohorte de patients CF, présentant une culture positive à P. aeruginosa. La prévalence de la résistance pour chaque antibiotique a été évaluée en 1995 (historical cohort) et en 2008 (Comtemporary cohort). Sont surlignés en rouge les antibiotiques pour lesquels la prévalence des résistances à augmenté dans le temps et en vert celle pour lequel elle a stagné. A noter que la résistance à la ticarcilline a été évaluée pour cet antibiotique seul en 1995 et associé à l'acide clavulanique en 2008. D'après Emerson et al., 2010.

3. Les nouvelles pistes de traitements

De nouvelles formulations améliorant la biodisponibilité des antibiotiques et réduisant leur toxicité sont actuellement en phase d'essai clinique II et III (http://www.cff.org). Ces améliorations consistent à formuler l'antibiotique pour qu'il soit inhalé (lévofloxacine), proposé sous forme de poudre à inhaler (tobramycine, ciprofloxacine) ou encore sous forme de liposomes, en inhalation (amikacine). Enfin, l'association fosfomycine/tobramycine est également développée sous forme inhalée. Malgré une meilleure efficacité de l'antibiotique apportée par ces nouvelles formulations, celles-ci ne répondent pas au problème des MDR. Seul le développement de nouvelles classes d'antibiotiques visant de nouvelles cibles bactériennes, pourraient être efficaces sur ces MDR (Bals *et al.*, 2011). Cependant, le nombre de nouvelles cibles semble limité et la grande capacité d'adaptation de *P. aeruginosa* laisse penser que l'apparition de résistances à ces nouvelles classes pourrait être rapide. D'ailleurs, alors que de nouvelles cibles bactériennes ont été proposées, il n'y a actuellement, en phase d'essai clinique, aucune nouvelle classe d'antibiotique visant à traiter les infections pulmonaires chez les patients CF.

Sont également envisagées des solutions qui, contrairement aux antibiotiques, n'ont pas un effet bactéricide ni bactériostatique mais ont pour but de diminuer considérablement

l'expression des facteurs de virulence. Dans ces conditions, l'élimination de la bactérie par le système immunitaire du patient serait facilitée. Des composés tels que le furanone et les organosulfures ont été décrits comme inhibiteurs de quorum sensing. Associés à la réduction de l'expression de facteurs de virulence, le furanone altère l'architecture du biofilm tandis que les organosulfures inhibent sa formation. Ils permettent tous deux de réduire l'infection à *P. aeruginosa* dans deux modèles animaux différents, probablement en faisant basculer l'équilibre délicat entre la virulence de la bactérie et l'efficacité du système immunitaire en faveur des mécanismes de clairance de l'hôte (Cady *et al.*, 2012; Hentzer *et al.*, 2002; Hentzer *et al.*, 2003).

Une autre solution pourrait être de moduler la réponse immunitaire afin de faciliter l'élimination de la bactérie. Cela est envisageable sous plusieurs aspects. D'abord, en augmentant l'efficacité de cette réponse chez le patient avec d'une part une réduction de l'inflammation excessive, avec des antagonistes des TLR par exemple, et d'autre part en stimulant la réponse adaptative, par un vaccin contre *P. aeruginosa* par exemple (Bals *et al.*, 2011; Kipnis *et al.*, 2006). Le second aspect consiste à augmenter le taux de certains effecteurs de cette réponse immunitaire tels que les peptides antimicrobiens. Il a par exemple été montré que la surexpression de la trappin-2, précurseur de l'élafine qui est un inhibiteur de l'élastase, permettait de diminuer l'inflammation et d'augmenter la clairance bactérienne dans les poumons de souris (Sallenave, 2002; Simpson *et al.*, 2001; Wilkinson *et al.*, 2009). La trappin-2 ainsi que l'élafine semblent également pouvoir diminuer l'expression de facteurs de virulence de *P. aeruginosa* (Bellemare *et al.*, 2010).

Enfin, un traitement prometteur repose sur l'utilisation des bactériophages, virus infectant naturellement les bactéries. Cette option thérapeutique est pleinement développée dans la partie III.

Bien que l'ensemble de ces pistes thérapeutiques semble pouvoir répondre au problème des MDR, il semble cependant que la meilleure option actuelle reste leur association avec des antibiotiques. Il est notamment envisageable que cette approche réduise l'apparition de souches résistantes, à l'une comme à l'autre de ces thérapies. Cette hypothèse est d'autant plus pertinente que coexistent généralement plusieurs populations de *P. aeruginosa* dans les poumons d'un patient.

III. L'utilisation des bactériophages contre l'infection à *P. aeruginosa*

A. Biologie des bactériophages

1. La classification des bactériophages

La classification des bactériophages est réalisée par l'ICTV (pour International Commitee on taxonomy of viruses) et dérive du schéma proposé par Bradley en 1967 (Bradley, 1967). Elle dépend principalement des propriétés morphologiques et physico-chimiques du virion, de la nature de l'acide nucléique et est de plus en plus souvent complétée par des données génomiques (Ackermann, 2009). Dans la classification des virus, composée d'ordres, familles, sous-familles, genres et espèces, l'ordre des *Caudovirales* contient plus de 96 % des bactériophages qui ont été décrits. Les autres bactériophages sont regroupés dans des familles non classifiées à ce jour. L'ordre des Caudovirales est composé de trois familles, les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae* (Table 5). L'étendue de l'arborescence de cette classification ainsi que la liste des nombreuses familles non classifiées témoignent de la grande diversité de ces virus (Ackermann, 2011).

Forme	Acide Nucléique	Famille	Genre	Particularités	Exemples	Membres
Caudée	ADN db L	*Myoviridae*	6	Queue contractile (tube + gaine)	T4	1320
		Siphoviridae	7	Queue longue flexible et non contractile	λ	3229
		Podovirirdae	4	Queue courte	T7	771
Polyédrique	ADN sb C	*Microviridae*	4	Grands capsomères	ϕX174	40
	ADN db C, S	*Corticoviridae*	1	Capside complexe, lipides	PM2	3 ?
	ADN db L	*Tectiviridae*	1	Double capside, lipides et pseudo-queue	PRD1	19
	ADN db L	*SH1**		Double capside, lipides	SH1	1
	ADN db L	*STIV**		Protubérance en forme de tourelle	STIV	1
	ARN sb L	*Leviviridae*	2	Poliovirus-like	MS2	39
	ARN db L, M	*Cystoviridae*	1	Enveloppe, lipides	ϕ6	3
Filamenteuse	ADN sb C	*Inoviridae*	2	Filaments longs, courte tige	M13	67
	ADN db L	*Lipothrixviridae*	4	Enveloppe, lipides	TTV1	7
	ADN db L	*Rudiviridae*	1	Tige raide	SIRV-1	3
Pléomorphique	ADN db C, S	*Plasmaviridae*	1	Enveloppe, pas de capside, lipides	L2	5
	ADN db C, S	*Fuselloviridae*	1	Forme de citron, enveloppe, lipides ?	SSV1	11
	ADN db L, S	—	1**	Forme de citron, enveloppe	His1	1
	ADN db C, S	*Guttaviridae*	1	Forme de gouttelette	SNDV	1
	ADN db L	*Ampullaviridae**		Forme de bouteille, NC hélicoïdale	ABV	1
	ADN db C	*Bicaudaviridae**		Double queue développée hors hôte, NC hélicoïdale	ATV	1
	ADN db L	*Globuloviridae**		Enveloppe, sphérique, lipides, NC hélicoïdale	PSV	1

Table 5 : Propriétés des différentes familles de virus de procaryotes

C : circulaire; L : linéaire; M, multipartite; N :, nucléo-capside; S : superenroulé; — sans nom; *, non classé; **, genre Salterprovirus. La colonne « Membres » indique le nombre de virus de procaryotes examinés par microscopie électronique par Ackermann en 2007 (Ackermann, 2007). D'après Ackermann, 2009.

2. Structure des virions caudés

Les bactériophages de l'ordre des *Caudovirales* sont extrêmement variés dans leur structure générale et leur taille, la capside pouvant mesurer de 30 à 160 nm de diamètre et la queue 10 à 800 nm de longueur. La structure, la composition et la taille du génome (17 à 498 kpb) ainsi que leurs propriétés biologiques varient également beaucoup. Cependant, ils possèdent tous une capside icosaédrique généralement composée de pentamères au niveau des angles et d'hexamères de la même protéine au niveau des faces. Cette capside est non enveloppée et renferme un ADN double brin linéaire. Ils possèdent également une queue hélicoïdale généralement pourvue de structures de fixations (plateau de fixation, fibres et spicules). La structure et les propriétés de la queue varient avec la famille du bactériophage (Figure 19) (Guttman *et al.*, 2004).

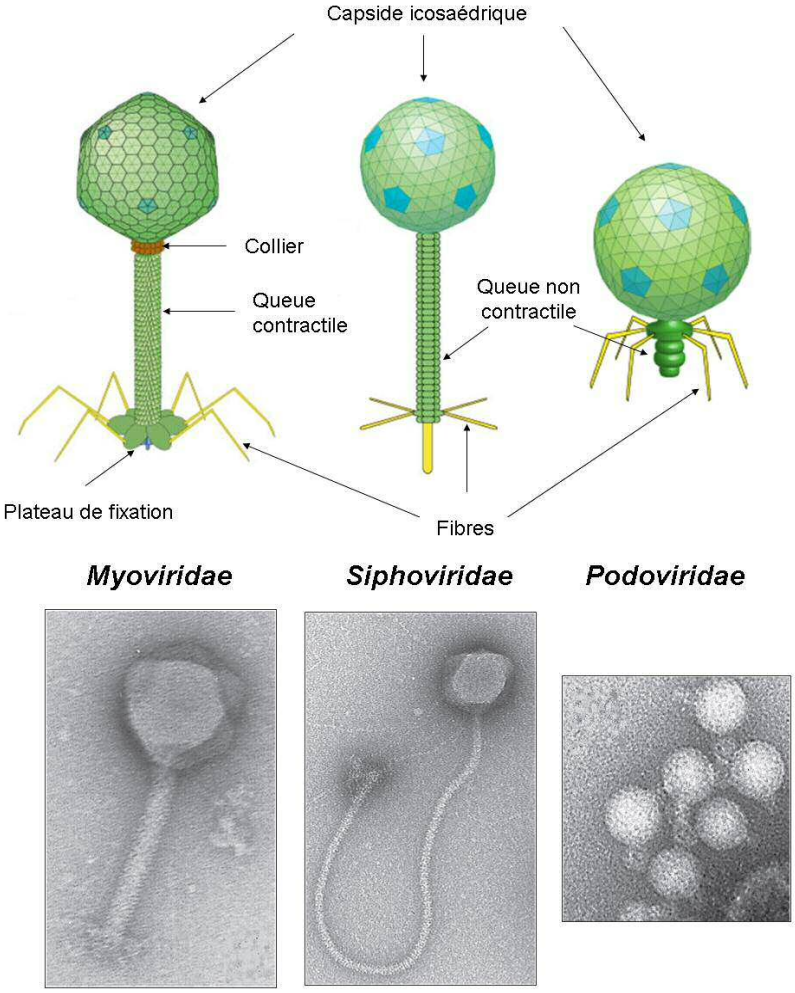


Figure 19 : Morphologie des 3 familles de *Caudovirales*

Haut : Morphologie schématique adaptée d'après http://viralzone.expasy.org
Bas : Morphologie observée en microscopie électronique d'après Clokie et al., 2011

3. Cycle infectieux des bactériophages caudés

Les bactériophages caudés, peuvent présenter deux types de cycles infectieux : lytique ou lysogénique (Figure 20). L'infection de la bactérie par des bactériophages virulents mène rapidement à la lyse de celle-ci, par un cycle lytique, alors que les bactériophages tempérés peuvent demeurer sous une forme quiescente dans la bactérie, via un cycle lysogénique, avant d'éventuellement produire un cycle lytique.

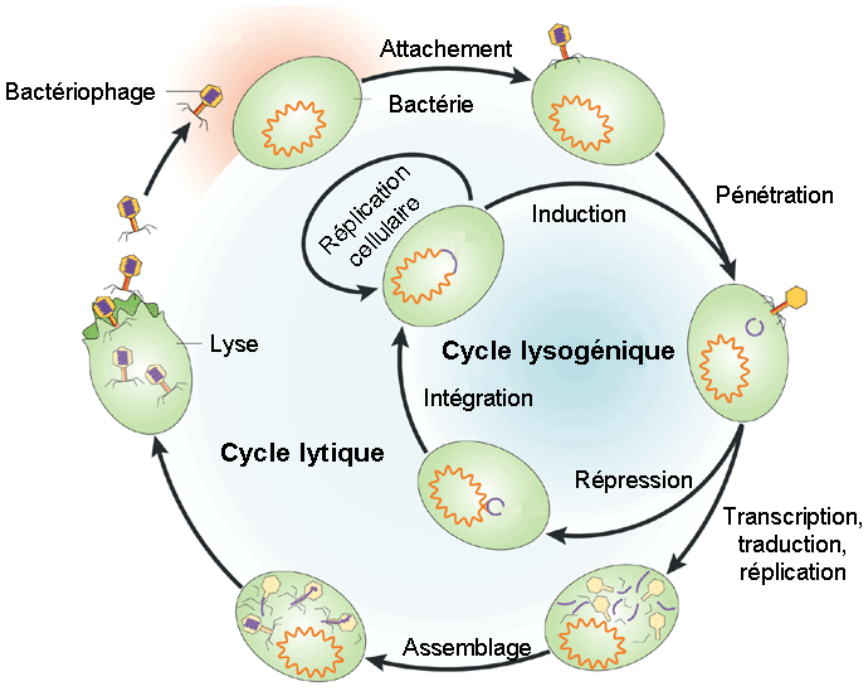


Figure 20 : Représentation schématique des principales étapes du cycle infectieux des bactériophages

Les bactériophages produisent tous un cycle lytique, certains de manière obligatoire (bactériophages virulents), d'autres en y intégrant un cycle lysogénique (bactériophage tempérés). Adapté d'après Campbell, 2003.

a) Cycle lytique

Il conduit à la mort obligatoire de la bactérie par sa lyse et à la libération dans le milieu de particules virales. Il présente plusieurs étapes qui sont détaillées ci-dessous en s'appuyant sur l'exemple d'un bactériophage virulent modèle, le bactériophage T4 d'*Escherichia coli* (Calendar, 2006; Guttman *et al.*, 2004; Kropinski, 2006; Leiman *et al.*, 2003):

- Le contact : le bactériophage est présent dans le milieu extérieur et le contact avec l'hôte à lieu par hasard avec la diffusion du bactériophage.

- L'absorption : c'est une phase qui dure quelques minutes. Généralement, des adhésines présentes sur les fibres ou les spicules de la queue du bactériophage interagissent de manière

spécifique avec des sites récepteurs de la bactérie. Cette étape peut se réaliser en plusieurs temps. Pour le bactériophage T4, au moins 3 des 6 fibres longues doivent d'abord s'attacher à un récepteur primaire pour déclencher le réarrangement du plateau de fixation. Cette interaction est réversible et le bactériophage peut encore être libéré dans le milieu. Les protéines du plateau pourront ensuite se lier, de façon irréversible cette fois, au récepteur secondaire, dans ce cas l'heptose du core du LPS d'*E .coli*. En fonction des bactériophages, ces récepteurs peuvent être chacun des composants de la surface de la bactérie (pili, flagelle, LPS, protéine, peptidoglycane ou même capsule). Certains bactériophages encodent deux formes alternatives d'adhésines au niveau de leurs fibres et peuvent ainsi élargir leur spectre d'hôte. Il est à noter que pour la majorité des bactériophages, cette étape d'absorption nécessite un cofacteur tel que les ions calcium ou magnésium.

- La pénétration : cette phase correspond au transfert de l'ADN dans la cellule hôte, la partie protéique du virion reste à l'extérieur. Elle peut être très rapide, comme chez le bactériophage T4 pour lequel 3000 à 10000 pb sont transférées par seconde. Pour l'injection de l'ADN, le plateau de fixation ou à défaut la base de la queue sont amenés au contact de la surface bactérienne. Il existe ensuite différents mécanismes pour l'injection de l'ADN. Par exemple, pour le bactériophage T4, il y a contraction de la gaine de la queue poussant ainsi le tube pour créer une structure en forme d'aiguille qui initie la pénétration de l'ADN. Cette structure en aiguille est constituée de différentes protéines formant des canaux dans la membrane et hydrolysant le peptidoglycane afin que l'ADN soit injecté dans le cytoplasme de la cellule. Souvent, afin d'éviter la dégradation de l'ADN par les enzymes bactériennes, celui est circularisé.

- Le détournement de la machinerie bactérienne : dès le début de la pénétration de l'ADN dans la cellule hôte, et avant même la fin du transfert de l'ADN, il y a transcription des gènes très précoces. Des promoteurs forts présents sur l'ADN viral possèdent des séquences consensus reconnues par l'ARN polymérase bactérienne. Les protéines produites vont ainsi permettre, entre autre, l'inhibition des enzymes de restriction bactériennes afin de préserver l'ADN viral. Vient ensuite la phase de réplication. Souvent, l'ADN bactérien est alors inactivé et dégradé par des endonucléases et exonucléases virales afin d'affecter entièrement la machinerie cellulaire à la formation de virions. Les nucléotides issus de la dégradation de l'ADN sont utilisés pour la réplication de l'ADN du bactériophage. Certains bactériophages encodent une grande partie des protéines nécessaires à leur réplication (hélicase, ligase, polymérase) ou à la réparation de leur ADN, à l'instar du bactériophage T4.

- Assemblage : avec l'expression des gènes tardifs, il y a production des protéines de structure du bactériophage (protéines de capside, de la queue, du collier, fibres) ainsi que des protéines nécessaires à l'encapsidation de l'ADN telles que les terminases. Si l'on reprend l'exemple du bactériophage T4, les capsomères de la capside sont assemblés et l'ADN est alors empaqueté dans la pro-capside. L'encapsidation de l'ADN se termine par le clivage de celui-ci après reconnaissance de sites spécifiques lorsque la capside est pleine. Parallèlement, sont assemblées les protéines des fibres d'une part et les protéines de la queue et du plateau de fixation d'autre part. La pro-capside est ensuite assemblée avec la queue et le collier puis l'ensemble avec les fibres.
- La libération des virions : deux types de protéines sont nécessaires à la libération des particules virales néoformées dans le milieu environnent : les holines et les endolysines. Les holines permettent la formation d'un pore dans la membrane plasmique donnant ainsi aux endolysines l'accès au peptidoglycane. Les endolysines possèdent une activité glycosylase et vont donc hydrolyser le peptidoglycane conduisant à la lyse osmotique de la bactérie. Il y aura ainsi libération de plusieurs dizaines de particules virales, ou plusieurs centaines selon le bactériophage considéré, qui pourront alors recommencer un nouveau cycle. Cette étape est très contrôlée ; la lyse ne doit pas être trop précoce afin qu'un maximum de néo-particules soient matures, ni trop tardive afin de ne pas réduire les opportunités d'infection.

b) Cycle lysogénique

Ce cycle débute de la même manière que le cycle lytique. Ensuite, le passage à la lysogénie plutôt qu'à un cycle lytique va dépendre d'interactions complexes entre les facteurs bactériens et viraux. Par exemple, pour le bactériophage λ d'*Escherichia coli*, bactériophage tempéré modèle, une fois l'ADN injecté, le génome est circularisé et les gènes précoces transcrits (dont les gènes *cII* et *cIII*). La présence du facteur de transcription viral CII en quantité suffisante est cruciale pour le choix lysogénique. Cependant, ce facteur est déstabilisé par des facteurs bactériens Hfl (KC, B et D) et est stabilisé entre autre par l'inhibiteur de protéase viral CIII (Banuett *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1988; Hoyt *et al.*, 1982; Parua *et al.*, 2010). Par ailleurs, la concentration de la protéase HflB est elle-même influencée par la concentration intracellulaire en AMPc (Slomińska *et al.*, 1999). Si les conditions sont réunies pour permettre un cycle lysogénique (*i.e.* concentration suffisante de la protéine CII), il y aura synthèse de protéines virales réprimant l'expression de gènes intervenant dans le développement du cycle lytique, comme la protéine CI. Des protéines permettant l'intégration de l'ADN dans le chromosome bactérien (intégrase, transposase), par recombinaison au

niveau de sites spécifiques ou de manière aléatoire, seront également synthétisées. Cependant, l'intégration n'est pas impérative pour le développement d'un cycle lysogénique et certains bactériophages se maintiennent sous forme de plasmide. Le bactériophage coexiste ainsi avec l'hôte sous une forme plus ou moins stable appelée prophage. Son ADN est répliqué en même temps que celui de la bactérie et peut rester intégré pendant des centaines ou des milliers de générations bactériennes. La bactérie est alors appelée bactérie lysogène. Dans certains cas, le prophage transmet ainsi à la bactérie des gènes de virulence lui conférant un avantage (cf. paragraphe II.B.2). Différents stress (changement de température, passage de la croissance bactérienne en phase stationnaire, UV) peuvent provoquer l'excision de l'ADN du prophage, interrompant la lysogénie et conduisant au démarrage d'un cycle lytique.

B. Importance écologique des bactériophages

Les bactériophages nécessitent un hôte pour leur multiplication. Leur distribution et leur abondance dépendent donc de celles de leur hôte. Les océans, les sédiments océaniques et les sols referment la majorité de la biomasse bactérienne sur Terre, avec une estimation de l'ordre 10^{30} cellules. Une étude réalisée sur un échantillon d'eau de mer suggère qu'il y aurait un rapport de 10 particules virales pour une cellule procaryote, estimant ainsi le nombre de particules virales sur Terre à 10^{31}, une grande majorité étant des bactériophages. Ainsi ils ne représentent que 5 % de la biomasse des océans mais 94 % des entités refermant un acide nucléique. Les bactériophages sont donc abondants mais ils sont aussi divers. Des analyses métagénomiques estiment le nombre de génotypes viraux à 5000 pour 200 L d'eau de mer (Breitbart & Rohwer, 2005; Clokie *et al.*, 2011). La majorité des séquences virales nouvellement identifiées ne sont pas déjà présentes dans les bases de données ce qui laisse apercevoir un large champ de découverte (Ackermann, 2011).

La population de bactériophage a donc un impact sur la population bactérienne. Il y a d'abord un impact sur la diversité des bactéries. En effet, les bactériophages tempérés constituent un réservoir de matériel génétique qui apportera une diversification des bactéries lysogènes. La relation entre le bactériophage et la bactérie est alors de nature parasitaire si le prophage n'apporte aucun avantage pour la virulence ou la survie de la bactérie ou de nature symbiotique dans le cas contraire. La relation proie-prédateur, entre bactérie et bactériophage lytique, a elle un impact sur la densité de la population bactérienne. Ainsi, pour certains couples bactérie/bactériophage, les populations des deux taxons oscillent dans le temps (Figure 21A). Cette dynamique évolue en fonction de la lyse des bactéries par les

bactériophages, de la résistance des différents clones bactériens et du coût de cette résistance pour la bactérie, de l'adaptation des différents clones viraux aux mécanismes de résistance bactériens et de l'instabilité des bactériophages dans l'environnement (sensibilité aux UV, température, pH). Se dessine ainsi le schéma décrit dans la figure 21B conduisant à une coévolution des populations de bactéries et de bactériophages. Globalement la biomasse bactérienne ne diminue pas mais est contrôlée par les bactériophages. Ils ont ainsi une importance écologique dans les écosystèmes marins et influencent les cycles biogéochimiques (cycle de l'azote, du carbone, du souffre…) (Clokie *et al.*, 2011; Rodriguez-Brito *et al.*, 2010; Suttle, 2007).

Une importance écologique évidente est attribuée aux bactériophages par leur abondance dans l'écosystème marin mais pas seulement. Il existe de nombreux autres écosystèmes influencés par les bactériophages, notamment des écosystèmes associés aux animaux, et en particulier l'écosystème intestinal. En effet, chez l'homme, la biomasse microbienne contribue pour plus de 54 % du poids total des fèces et le nombre de particules virales par g de fèces serait compris entre 10^{10} et 10^{11}. C'est un système complexe où les populations bactériennes s'influencent entre elles et sont influencées par le régime alimentaire et la réponse immunitaire de l'hôte humain. Cet écosystème est encore peu connu mais il est probable que les bactériophages jouent un rôle dans la dynamique et la diversité des populations bactériennes intestinales (Clokie *et al.*, 2011).

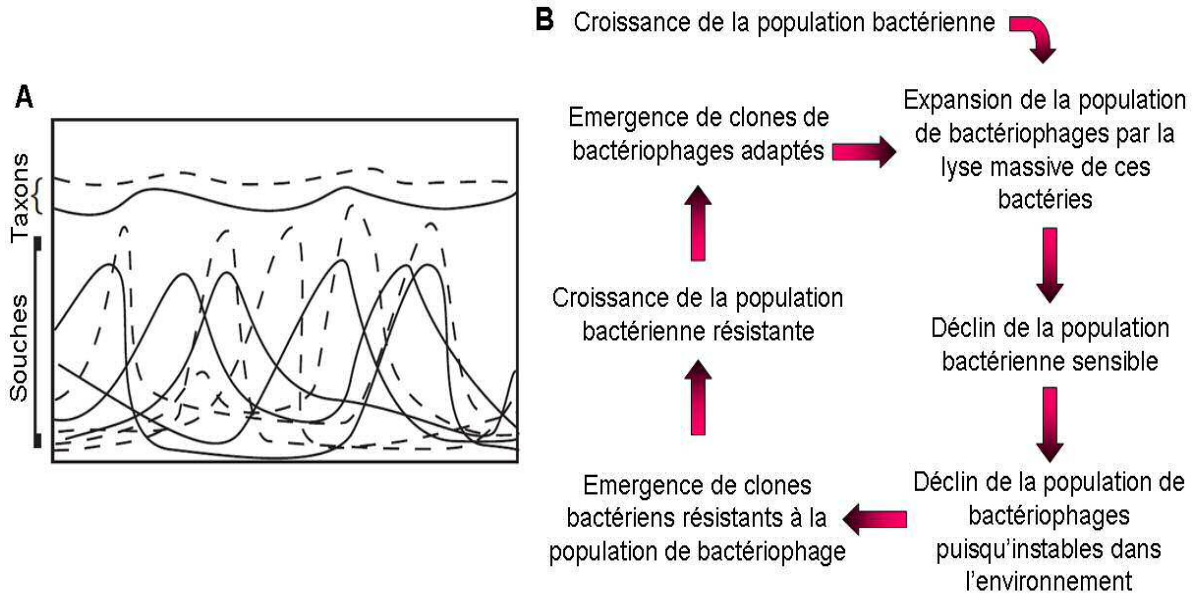


Figure 21 : Dynamiques des populations de bactéries et de bactériophages coexistant

A : Modélisation de la dynamique dans le temps de différentes souches de bactéries (ligne pleines) et de bactériophages (lignes en pointillés) dans des échantillons d'eau douce d'après (Rodriguez-Brito et al., 2010). B : Schématisation des différentes étapes de la dynamique de coévolution bactérie/bactériophage.

C. Applications des bactériophages

1. Application en biologie moléculaire

Les bactériophages, décrits en 1915 par F. Twort et en 1917 par F. d'Herelle, ont conduit à la découverte de nombreux concepts dans la biologie et la virologie et ont permis l'essor de la biologie moléculaire et de la génétique entre les années 30 et les années 60. Le bactériophage est une des entités biologiques les plus simples capable de diriger sa réplication. Sur ce principe, Hershey et Chase ont pu démontrer, grâce au bactériophage T2, que l'ADN était le support de l'information génétique. Grâce à un marquage isotopique différentiel de l'ADN et des protéines du bactériophage, ils ont montré qu'après l'infection des bactéries par les bactériophages puis séparation des bactéries infectées et des bactériophages libres, seules les molécules d'ADN du bactériophage étaient retrouvées dans les bactéries. Or, de nouvelles particules virales étaient produites par ces bactéries, seulement à partir de l'ADN des bactériophages (Hershey & Chase, 1952). D'autres découvertes importantes ont fait intervenir les bactériophages, notamment la nature en triplet du code génétique, les ARNm ou encore le rôle du facteur sigma dans la transcription (Brenner *et al.*, 1961; Burgess *et al.*, 1969; Crick *et al.*, 1961). En réalité, l'étude des bactériophages a permis l'essor de la biologie moléculaire, une discipline à part entière reconnue notamment par l'attribution du prix Nobel de Médecine et de physiologie à M. Delbrück, A.D. Hershey et S. Luria en 1969. Aujourd'hui, les bactériophages sont toujours utilisés en biologie moléculaire, comme par exemple dans les techniques de clonage ou de phage display.

2. Application dans l'industrie agro-alimentaire

De leur production à la fourchette du consommateur, les aliments passent par de nombreuses étapes de transformation et de stockage qui sont autant de points critiques pour d'éventuelles contaminations. L'utilisation des bactériophages dans l'industrie agro-alimentaire est récemment devenue une option nouvelle pour le bio-contrôle des pathogènes potentiellement présents dans les aliments, notamment dans les produits frais. Les bactériophages sont omniprésents et régulièrement ingérés par l'homme via son alimentation et l'eau. Pour cela, ils sont présumés inoffensifs et aucun effet secondaire à leur ingestion n'a été rapportée (Bruttin & Brüssow, 2005). Leur spécificité envers les souches bactériennes permet de cibler les micro-organismes indésirables sans affecter ceux qui seraient bénéfiques (probiotiques). Ainsi, ils se présentent comme de bons candidats pour une utilisation dans la protection des denrées alimentaires contre la contamination (Hagens & Loessner, 2010;

Mahony *et al.*, 2011). Se posent alors différentes questions sur la sécurité, l'efficacité et la stabilité des bactériophages dans le produit tout au long de la chaîne de production. En premier lieu, les bactériophages utilisés doivent être strictement virulents et ne contenir aucun gène codant des facteurs de virulence bactériens ni de protéines potentiellement allergènes, dans la limite des connaissances actuelles (Hagens & Loessner, 2010). Concernant l'efficacité, des études expérimentales réalisées sur des aliments artificiellement contaminés par 3 pathogènes alimentaires majeurs, *Salmonella enterica serovar enteritidis*, *Campylobacter jejuni* et *E. coli* O157 :H7, montrent que l'application de bactériophages réduits de plus de 90 % la contamination de la viande ou même l'éradique totalement (Goode *et al.*, 2003; O'Flynn *et al.*, 2004). Ces études encourageantes quant à l'efficacité des bactériophages devront être confirmées dans le contexte industriel, notamment pour les produits déjà commercialisés. En effet, les sociétés Intralytix et EBI Food Safety ont reçu l'autorisation de la FDA pour utiliser des solutions de bactériophages comme additifs alimentaires. Ces produits ciblent *Listeria monocytogenes* (LISTEX P100™ et ListShield™) et d'autres produits ciblant *Salmonella sp.* (SalmoFresh™ et SALMONELEX™) et *E. coli* O157 :H7 (EcoShield™) sont en instance d'autorisation. Par ailleurs, les endolysines des bactériophages, seules ou par une action synergique avec un agent de biopréservation alimentaire, semblent être efficaces pour éliminer de certains aliments les bactéries pathogènes, notamment les bactéries à Gram positif (García *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

En amont, l'utilisation des bactériophages semblent être une alternative biologique aux substances chimiques utilisées actuellement en agriculture (pesticides, antibiotiques). Concernant les cultures, sont notamment commercialisés deux produits ciblant *Xanthomonas sp*. ou *P. syringae,* deux pathogènes de la tomate entre autre (AgriPhage™). Concernant l'élevage, plusieurs études ont montré une efficacité de l'utilisation des bactériophages dans la lutte contre les infections à *Campylobacter jejuni* dans les élevages de volailles (Loc Carrillo *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2010; Wagenaar *et al.*, 2005).

Parallèlement, les bactériophages peuvent également être utilisés comme biosenseurs pour la détection des bactéries pathogènes dans les aliments. Ces tests reposent sur la simple détection de l'amplification des bactériophages ou sur des systèmes plus complexes, déjà commercialisés ou non. Nombre de ces systèmes sont basés sur l'utilisation de bactériophages porteurs de gènes rapporteurs (β-galactosidase, GFP, luciférase …). Il existe plusieurs autres systèmes parmi lesquels certains consistent à immobiliser les bactériophages, sur des particules de silice ou des nanofibres, puis d'évaluer quantitativement la lyse bactérienne, grâce à des tests bioluminescent-ATP-dépendant par exemple, qui permettent de déterminer

les quantités d'ATP libérée lors de la lyse de la bactérie. Grâce à la spécificité des bactériophages et à la rapidité de leur cycle de multiplication, ces tests ont l'avantage d'être spécifiques, plus rapide que les techniques de culture bactériennes et de ne détecter que les bactéries vivantes (Minikh *et al.*, 2010; Smartt *et al.*, 2012).

3. Applications thérapeutiques pour l'homme

a) Historique de la phagothérapie

(1) La découverte des bactériophages

Les premières observations compatibles avec l'activité des bactériophages remontent à la fin du XIXème siècle. En 1896, Ernest Hankin, un bactériologiste britannique, reporte une activité antiseptique contre de nombreuses bactéries, et en particulier *Vibrio cholerae*, dans les eaux de la Jumna et du Gange. Cette activité est filtrable et inactivée par la chaleur. Il suggère que le principe antiseptique soit une substance chimique volatile qui permet de limiter la propagation du choléra (Hankin, 2011). En 1901, Emmerich et Löw notent que certaines substances contenues dans des cultures auto-lysées sont capables i) de causer la lyse d'autres cultures, ii) de guérir certaines infections expérimentales et iii) de conférer une immunité prophylactique (Emmerich & Löw, 1901). Cependant, l'interprétation de cette étude reste ambigüe. Il pourrait s'agir de l'activité de bactériophages comme celle d'autres substances telle que les bactériocines.

La recherche sur les bactériophages a réellement débutée avec les observations indépendantes de Frederick Twort et de Félix d'Herelle. F. Twort, un bactériologiste anglais, reporte en 1915, qu'une partie des colonies de Micrococci ayant contaminé ses milieux de culture présentent une apparence mucoïde et vitreuse (Twort, 1915). Il remarqua que cette transformation était transmissible indéfiniment et nota que ces colonies, observées au microscope, présentaient des bactéries dégénérées en petites granules. Il posa alors plusieurs hypothèses pour ce qu'il qualifia de maladie infectieuse aiguë des Micrococci :

- c'est l'action d'un virus ultramicroscopique moins organisé que les bactéries
- il s'agit de protoplastes
- c'est l'action d'une enzyme ayant un pouvoir de croissance

Il est le premier à mettre en évidence ce phénomène mais restera imprécis dans ces conclusions et ne poursuivra pas ses recherches.

A la même époque, F. d'Herelle travaillait à l'Institut Pasteur de Paris, dans le climat de la première guerre mondiale, quand il fut appelé pour examiner une épidémie de dysenterie

bacillaire au sein d'une troupe de soldats français. Intrigué par la dichotomie des effets de la bactérie, parfois extrêmement pathogène, parfois inoffensive, il examine le filtrat d'échantillons de selles des soldats. Il est alors à la recherche de microbes invisibles et filtrables. En effet, des études antérieures associées à ses propres observations de « tâches claires » intrigantes dans ses cultures lors de recherches menées en Amérique latine et en Afrique du Nord, le mènent à penser à cette hypothèse. Il reportera alors, dans les filtrats de selles des soldats en voie de guérison, la présence d'un microbe antagoniste des bactéries. Ce microbe induit la lyse des bactéries en culture liquide et la formation de plaques discrètes sur les surfaces d'agar ensemencée de bactéries confluentes. Il propose que ces microbes invisibles soient des « ultravirus » envahissant les bactéries et s'y multipliant à leur dépend. Il les nommera « *Bacteriophagum intestinalis* » (d' Herelle, 1917). Il montrera que la multiplication de ces bactériophages est infinie, nécessite des cellules vivantes et la lyse de la bactérie. Il montrera également que la multiplication s'effectue en « vagues » qu'il interprètera comme des cycles d'infection. D'autre part, il pensait que les bactériophages étaient à l'origine de la majorité des guérisons d'infections et appela même les bactériophages « agents de l'immunité exogènes ». F. d'Herelle est alors le pionnier dans deux grands domaines de recherche : l'identification de la nature biologique des bactériophages et leur utilisation comme agent thérapeutique (Dublanchet & Bourne, 2007; Summers, 2004).

(2) Les premières applications thérapeutiques

F. d'Herelle débute ses premiers essais sur des animaux. Il montrera ainsi, en 1919, l'efficacité des bactériophages dans le traitement prophylactique contre le choléra des poules et des septicémies hémorragiques chez le bovin (d' Herelle, 1921; d' Herelle & Smith, 1926). Avant de mener les premiers essais sur l'Homme, F. d'Herelle s'assure de l'innocuité des bactériophages. Il testera sur lui-même et sa famille l'ingestion de doses croissantes de bactériophages contre *Shigella* puis leur injection sous-cutanée sans observer de réaction. Les premiers traitements par Shiga-bactériophages sont proposés en 1919 à des patients de l'hôpital Necker Enfants Malades souffrant de dysenterie bacillaire (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Viendra ensuite le traitement de patients atteints de peste bubonique en Egypte (d' Herelle, 1925). Ces deux essais furent de larges succès et leur diffusion permit l'essor de la phagothérapie.

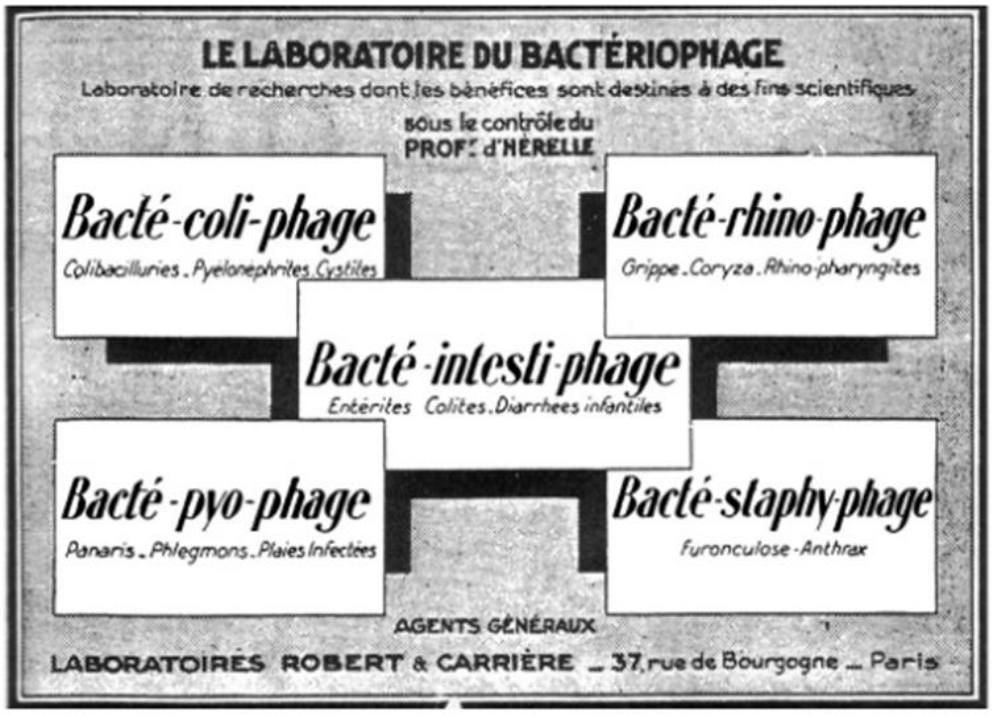
Cependant les travaux de d'Herelle sont à l'époque controversés. Jules Bordet, immunologiste et microbiologiste belge, lauréat du Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1919, l'affrontera avançant une nature enzymatique plutôt que virale du phénomène de

lyse observé par d'Herelle et Twort. Les bactériophages sont encore méconnus et cette controverse prendra fin dans les années 40 avec la mise au point du microscope électronique (Summers, 2004).

(3) L'extension mondiale

Suite à la diffusion des premiers succès de d'Herelle, des bactériologistes allemands, américains et brésiliens tentent de vérifier ses résultats. D'abord négatifs, ces essais montrent d'excellents résultats après optimisation suivant les suggestions de d'Herelle (Dublanchet & Bourne, 2007). Petit à petit, le traitement contre la dysenterie bacillaire par la phagothérapie devient commun. En 1927, lors d'une épidémie de choléra en Asie, d'Herelle traitera 74 patients gravement atteints. Ses observations sont menées sous forme d'essai clinique et montrent que 63 % des 124 patients non traités meurent contre 8 % des patients traités, majoritairement ceux ayant reçu le traitement tardivement (Sulakvelidze & Kutter, 2004). Dans les années 30, la phagothérapie s'étend très largement à travers le monde entier. Les entreprises pharmaceutiques s'y intéressent et de nombreuses variétés de préparations de bactériophages sont développées permettant de traiter avec succès des maladies intestinales, cutanées, génitales ou respiratoires. À Paris, d'Herelle crée le « Laboratoire du bactériophage » qui commercialise différents cocktails (Figure 22A). Il dirigera plusieurs instituts et travaillera aussi à Tbilissi en Géorgie, en collaboration avec Georges Eliava, fondateur de l'actuel « Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology » (EIBMV), qu'il a rencontré précédemment à Paris (Figure 22B). C'est l'âge d'or de la phagothérapie (Dublanchet & Bourne, 2007; Sulakvelidze & Kutter, 2004).

A



B

Figure 22 : Photographie pendant l'âge d'or de la phagothérapie

(A) Publicité pour les préparations de bactériophage du « laboratoire des bactériophages », diffusée à Paris en 1936. (B) Photographie réalisée entre 1933 et 1935, lors d'un des deux voyages de Félix d'Herelle à Tbilisi en Géorgie. De gauche à droite, Elena Makashvili, assistante de Georges Eliava, Félix D'Herelle (assis) et Georges Eliava, à ce qui est actuellement l'EIBMV. Photographie tirée de Sulakvelidze & Kutter, 2004.

(4) La phagothérapie décline mais persiste

Avec le succès de cette thérapie, les demandes de préparations augmentent et des difficultés de production s'installent, tant sur la quantité de préparations à produire que sur leur qualité. Les résultats des traitements deviennent alors inconstants. Une analyse des travaux sur la phagothérapie ordonnée par l' « American Medical Association », conclut que les résultats sont globalement peu convainquants. S'installe alors un doute et une perte de crédibilité concernant l'efficacité de la phagothérapie. Le déclin de la phagothérapie est maximal avec l'apparition de la pénicilline comme agent thérapeutique en 1942. C'est le début de l'ère des antibiotiques qui connaitra une expansion mondiale extraordinaire, avec le développement de dizaines de molécules pendant plusieurs décennies. Leur emploi et leur fabrication sont plus simples, ils sont plus stables et s'avèrent très efficaces contre de très nombreuses infections. La phagothérapie est rapidement abandonnée aux Etats Unis et en Europe occidentale, bien que le déclin ait été plus progressif en France où étaient encore produites certaines préparations jusque dans les années 70 (Dublanchet & Fruciano, 2008; Sulakvelidze & Kutter, 2004).

Cependant, en Union Soviétique et en Pologne il en était tout autrement. La phagothérapie est restée très utilisée en thérapeutique humaine et de nombreux travaux ont été publiés, mais trop souvent dans des revues à faible diffusion. Malgré que ces études ne soient pas toutes traduites en anglais et ne répondent pas aux critères rigoureux des essais cliniques actuels, elles relatent une certaine efficacité de la phagothérapie contre diverses infections liées à de nombreux pathogènes (*Shigella, Klebsiella, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, E. coli, Proteus et Salmonella*). De plus aucun effet secondaire grave n'a été reporté (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

(5) Le renouveau de la phagothérapie

Si l'émergence de souches bactériennes résistantes à un antibiotique a rapidement été évoquée, ce n'est que ces 20 dernières années que la dissémination de souches résistantes à plusieurs antibiotiques (MDR) s'est considérablement accrue, devenant un sujet majeur de préoccupation en santé publique. Pour la plupart des antibiotiques, des souches résistantes sont maintenant observées 2 à 3 ans après leur introduction en thérapeutique. Parfois, ces souches résistantes émergent même avant la commercialisation de l'antibiotique. En 2002, 90000 décès ont été imputés aux infections bactériennes aux Etats Unis dont plus de la moitié sont causées par des bactéries résistantes à au moins un antibiotique couramment utilisé. La

mise au point de nouveaux antibiotiques est longue et coûteuse, avec le risque de voir émerger des souches résistantes rapidement. De plus, les cibles bactériennes des antibiotiques sont limitées. Ainsi le nombre de nouveaux antibiotiques mis sur le marché décroit depuis le début des années 90 et il s'agit principalement de dérivés d'antibiotiques existant (Taubes, 2008).

Dans ce contexte, différents traitements antibactériens alternatifs sont aujourd'hui étudiés (cf. paragraphe II.C.3) et il existe notamment un regain d'intérêt pour la phagothérapie depuis une dizaine d'années (Sulakvelidze & Kutter, 2004). Les technologies ont aujourd'hui beaucoup évolué comparé aux premiers jours de la phagothérapie, tout comme nos connaissances concernant la biologie des bactériophages ainsi que leur interaction avec les bactéries. Il est maintenant possible de contrôler de manière fiable la production de solutions de bactériophages ayant une efficacité optimale contre des souches bactériennes ciblées (Gill & Hyman, 2010). Cependant, les données anciennes concernant la phagothérapie ne répondent pas aux critères actuels et les bactériophages thérapeutiques devront franchir les étapes rigoureuses du processus d'approbation avant leur commercialisation, incluant des études précliniques sur l'animal et des essais cliniques pour chaque application.

b) Points forts et points faibles des bactériophages pour le traitement des infections chez l'homme

L'utilisation thérapeutique des bactériophages confère différents avantages, en particulier par rapport aux antibiotiques, en raison de la nature même des bactériophages. Cette approche présente également quelques inconvénients mais qu'il est cependant souvent possible de contourner (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

(1) Les avantages

(a) L'activité des bactériophages sur les biofilms

Certains bactériophages possèdent une activité polysaccharide dépolymérase au niveau de leur plateau de fixation. Il a par exemple été montré que le bactériophage F116 de *P. aeruginosa* était capable de diffuser au travers d'un gel d'alginate et en diminuait la viscosité de plus de 40 %, et réduisait de 2-log le nombre de bactéries renfermées dans un biofilm formé depuis 20 jours (Hanlon *et al.*, 2001). Ces résultats ont également été confirmés pour d'autres bactériophages, NH-4 et MR299-2 (Alemayehu *et al.*, 2012).

(b) L'omniprésence des bactériophages

Il est admis qu'il existe des bactériophages spécifiques de chaque espèce bactérienne. Leur isolement et leur sélection est rapide et peu couteuse. Un traitement semble donc théoriquement envisageable pour chaque infection bactérienne à condition d'adapter le mode d'administration (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

(c) La distribution des bactériophages dans l'organisme

Différentes études ont montré que les bactériophages entraient dans la circulation sanguine rapidement. D'autre part, il a également été montré que, chez la souris, des bactériophages injectés par voie intrapéritonéale étaient capables de franchir la barrière hémato-encéphalique lors d'une infection bactérienne cérébrale (Dabrowska *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2003; Sulakvelidze & Kutter, 2004). Ces données permettent d'envisager l'utilisation de la phagothérapie dans des cas de septicémies et de méningites.

(2) Les inconvénients

(a) Le mode de préparation des bactériophages

L'amplification de bactériophages requiert l'utilisation de culture de bactéries vivantes qui produiront une grande quantité d'endotoxines lors de la lyse. Ces endotoxines doivent être éliminées des préparations afin d'éviter une stimulation excessive du système immunitaire et un choc éventuel. Toutefois, différentes technologies permettent actuellement l'élimination efficace de ces endotoxines (Gill & Hyman, 2010).

(b) La reconnaissance des bactériophages par le système immunitaire

Chaque protéine des bactériophages est potentiellement immunogène et peut induire une réponse humorale, notamment la production d'anticorps neutralisants. Une étude réalisée chez le lapin a rapporté que le titre d'anticorps neutralisants était plus faible lors d'une seule injection ou lors d'une série d'injections rapprochées dans le temps que lors de multiples injections espacées de plusieurs semaines. D'autre part, les anticorps induits lors d'injections rapprochées seraient de type IgM, dont l'activité neutralisante serait faible et facilement réversible, alors que les injections espacées produiraient des anticorps de type IgG. La voie d'administration a également un fort impact sur la production d'anticorps neutralisants, la

voie orale semblant être la moins immunogène. Par ailleurs, probablement en raison de l'omniprésence des bactériophages dans l'environnement, la présence d'anticorps anti-phages préexistant au traitement est observée chez certains patients. En outre, cette réponse dépend des bactériophages et il semblerait que la majorité de ces anticorps soient dirigés contre les protéines de la queue. Les bactériophages présentant une structure plus simple provoqueraient ainsi une réponse moins intense et seraient donc d'un plus grand intérêt thérapeutique. Il est probable que cette réponse humorale soit en partie à l'origine d'une élimination rapide des bactériophages de l'organisme et puisse impacter l'efficacité du traitement (Górski *et al.*, 2012; Sulakvelidze & Kutter, 2004). Cependant, une étude réalisée chez 30 patients en Pologne montre une faible corrélation entre la production d'anticorps pendant le traitement et l'issue de ce traitement (Górski *et al.*, 2012).

(3) Les propriétés conférant avantages et inconvénients

(a) La nature virale des bactériophages

Les bactéries sont capables de développer des mécanismes de résistance contre les bactériophages. Des mécanismes antiviraux bactériens existent ainsi pour différentes étapes du cycle de réplication du bactériophage, empêchant la production virale mais entraînant parfois conjointement la mort de la bactérie. Mais, les bactériophages ne sont pas inertes et co-évoluent avec les bactéries. En contrepartie, ils sont donc capables de s'adapter et de contourner ces mécanismes de résistance par sélection des mutations qui leur confèrent la capacité d'infecter la bactérie de nouveau (Table 6). Lorsqu'au cours d'un traitement d'éventuelles résistances aux bactériophages sont observées, le développement de nouvelles préparations est alors rapide et peu couteux. L'émergence de résistances bactériennes pourra également être réduite par l'utilisation de cocktails de bactériophages (Hyman & Abedon, 2010; Labrie *et al.*, 2010).

En revanche, cette nature virale et non chimique des bactériophages engendre un risque de transfert de gène horizontal. Les bactériophages thérapeutiques devront donc être obligatoirement virulents, leur génome devra être séquencé et ne contenir aucun gène de virulence identifié à ce jour. Malgré cela, la plupart de leurs gènes codent des protéines putatives dont la fonction est inconnue ; il reste donc impossible aujourd'hui d'assurer une innocuité totale des bactériophages (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

	Mécanisme de résistance de la bactérie	Mécanisme de contournement du bactériophage
Absorption	- production d'inhibiteurs compétitifs s'attachant aux adhésines du bactériophage - modification de la structure des récepteurs de surface - production de protéines masquant les récepteurs bactériens - synthèse d'une matrice d'extracellulaire	- diversification des adhésines présentes sur les fibres du bactériophage - production de lyase ou hydrolase dégradant les exopolysaccharides
Pénétration	- dégradation de l'ADN viral (enzymatique, CRISPR-Cas)	- absence des sites de reconnaissance des endonucléases - production d'enzymes permettant la méthylation de l'ADN viral ainsi non reconnu - mutation des motifs conservés reconnus par les systèmes CRIPSR-Cas
Réplication	- clivage des ARNt ou facteurs d'élongation protéique	- système de réparation
Assemblage / Libération	- infection « abortive » - lyse prématurée	- production d'inhibiteur d'enzymes bactériennes

Table 6 : Résistances bactériennes en fonction des étapes du cycle réplicatif viral et adaptation en retour des bactériophages

(b) La spécificité des bactériophages

La spécificité des bactériophages envers une espèce, et bien souvent un nombre restreint de souches bactériennes, permet d'épargner la flore commensale lors d'un traitement. Cela évite également la sélection de souches résistantes dans les populations bactériennes non visées. En contrepartie de cette spécificité, les pathogènes à l'origine de l'infection à traiter devront être identifiés pour la mise en place du traitement. Ce problème pourrait cependant être contourné par l'utilisation de cocktails (Goodridge, 2010).

(c) L'action bactéricide

Le cycle réplicatif des bactériophages virulent permet la lyse efficace des bactéries qu'ils infectent. Cette action bactéricide limite l'émergence de résistance en comparaison avec une action bactériostatique. De plus, leur réplication permet aussi d'amplifier le nombre de bactériophages au niveau même du site de l'infection, augmentant ainsi l'efficacité du traitement. Par contre, la lyse des bactéries provoque la libération d'endotoxines pouvant induire des effets secondaires, tels que des douleurs hépatiques. Cependant, ce problème est commun avec certains antibiotiques et les différentes approches utilisées ce cas (corticostéroïdes par exemple) pourront être utilisées de manière similaire en phagothérapie.

La phagothérapie pourrait ainsi être une alternative et/ou un complément aux traitements antibiotiques, en particulier dans le cas de la mucoviscidose (Kutateladze & Adamia, 2010). En effet, les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* chez ces patients sont de plus en plus préoccupantes en raison de l'émergence toujours plus fréquente de souches multi-résistantes (cf. paragraphe II.C.2).

c) Les bactériophages de *P. aeruginosa*

La GenBank référence aujourd'hui 64 bactériophages de *P. aeruginosa* dont le génome est entièrement séquencé, dont plus de 90 % sont des bactériophages caudés (Table 7). La majorité des ORF (open reading frame) de ces génomes codent des protéines prédictives n'ayant de similarité avec aucune autre protéine connue, ou similaires avec des protéines dont la fonction est inconnue. Par exemple, 80 % des protéines encodées par le bactériophage ϕKZ ne sont retrouvées dans aucune autre forme de vie (Brüssow & Kutter, 2004). Le nombre de nouvelles espèces de bactériophages de *P. aeruginosa* augmente de jour en jour dans les bases de données. Il semble qu'une grande diversité de bactériophages de *P. aeruginosa* existe, probablement en raison de la nature ubiquitaire de *P. aeruginosa*, assurant ainsi une large disponibilité d'espèces pour la phagothérapie (Sepúlveda-Robles *et al.*, 2012).

Famille	Bacteriophage	Numéro d'accès à la GenBank	Taille du génome (pdb ou nt)	G + C %	ORF	Tempéré/ Virulent	Apparenté à
Myoviridae	ϕCTX	NC_003278	35580	62	74	T	ϕCTX
	KPP12	AB560486	64144	55.6	88		PB1
	LBL3	NC_011165	64427	55.5	88	V	PB1
	PB1	NC_011810	65764	55.5	93	V	PB1
	F8	NC_007810	66015	54.9	109	V	PB1
	NH-4	JN254800	66116	55.5	56	V	PB1
	14-1	NC_011703	66238	55.6	90	V	PB1
	JG024	GU815091	66275	55.6	94	V	PB1
	SN	NC_011756	66390	55.6	92	V	PB1
	PaMx	JQ067083	66450	55.1			PB1
	LMA2	NC_011166	66530	55.6	95	V	PB1
	PAK-P3	HM173082	88097	54.8		V	PAK-P3
	P3-CHA	HM173081	88097	54.8		V	PAK-P3
	KPP10	NC_015272	88322	54.8	158	V	PAK-P3
	PaP1	HQ832595	91715	49.4			PaP1
	JG004	GU988610	93017	49.3	161	V	PaP1
	PAK-P1	NC_015294	93398	49.5		V	PaP1
	EL	NC_007623	211215	49.3	201	V	EL
	ϕKZ	NC_004629	280334	36.8	306	V	ϕKZ
	ϕPA3	HQ630627	309208	48	378		ϕPA3
Siphoviridae	PA/KOR/2010	HM624080	34553	64.8	51	V	D3112
	MP22	NC_009818	36409	64.2	51	T	D3112
	DMS3	NC_008717	36415	64	52	T	D3112
	MP29	NC_011613	36632	64.3	51	T	D3112
	PaMx73	JQ067085	36522	64.2		T	D3112
	MP42	NC_018274	36847	64.2	53	T	D3112
	MP38	NC_011611	36885	64.5			D3112

Famille	Bacteriophage	Numéro d'accès à la GenBank	Taille du génome (pdb ou nt)	G + C %	ORF	Tempéré/ Virulent	Apparenté à
	F_HA0480	JN808773	37374	64.1	55		D3112
	D3112	NC_005178	37611	64	55	T	D3112
	JBD26	JN811560	37840	64.1	59		D3112
	B3	NC_006548	38439	63.3	59	T	B3
	F10	NC_007805	39199	62.1	80	T	F10
	vB_Pae_Kakheti25	NC_017864	42844	53.7	58	V	PA73
	PA73	DQ163913	42999	53.6	75		PA73
	PAJU2	NC_011373	46872	56.3	79	T	D3
	ϕ297	NC_016762	49135	62		T	ϕ297
	vB_PaeS_PMG1	NC_016765	54024	57.5		T	D3
	D3	NC_002484	56426	57.8	90	T	D3
	PaMx25	JQ067084	57620	58.5			PaMx25
	YuA	NC_010116	58663	64.3	78	T	M6
	M6	NC_007809	59446	64.5	110	T	M6
	MP1412	NC_018282	61167	64.3	77		M6
Podoviridae	LKA1	AM265639	41593	60.9	56	V	LKA1
	ϕKMV	NC_005045	42519	62	49	V	ϕKMV
	PT5	NC_011105	42954	62.3			ϕKMV
	PT2	NC_011107	42961	62.2			ϕKMV
	vB_Pae_TbilissiM32	NC_017865	42966	62.3	50	V	ϕKMV
	ϕKF77	NC_012418	43152	62.9		V	ϕKMV
	LKD16	AM265638	43200	62.6	54	V	ϕKMV
	LUZ19	NC_010326	43548	62.3	54	V	ϕKMV
	119X	NC_007807	43365	44.9	56		PaP2
	PaP2	NC_005884	43783	45	58	T	PaP2
	MR229-2	JN254801	44789	52	68	V	PaP3
	PaP3	NC_004466	45503	52	71	T	PaP3
	LUZ24	NC_010325	45625	52	68	V	PaP3

Famille	Bacteriophage	Numéro d'accès à la GenBank	Taille du génome (pdb ou nt)	G + C %	ORF	Tempéré/ Virulent	Apparenté à
	F116	NC_006552	65195	63	70	T	F116
	PA26	JX194238	72321	54.8			LIT1
	LIT1	NC_013692	72543	54	92	V	LIT1
	LUZ7	NC_013691	74901	54	117	V	LUZ7
Leviviridae	PPR1	NC_008294	3573	49.2			PPR1
	PP7	NC_001628	3588	54	4	V	PP7
Inoviridae	Pf3	NC_001418	5833	45	9		Pf3
	Pf1	NC_001331	7349	61	14	T	Pf1
Non classé	PA11	NC_007808	49639	44.8	71		PA11

Table 7 : Tableau récapitulatif des 64 bactériophages de *P. aeruginosa* dont le génome est séquencé et référencé dans la GenBank

d) Les traitements d'infections expérimentales

Avec le regain d'intérêt envers la phagothérapie, ces dix dernières années ont vu se réaliser de plus en plus d'études expérimentales chez l'animal, alors qu'elles étaient rares avant les années 2000. Ces études ont permit d'apporter certains éléments de connaissance quant à l'efficacité des bactériophages pour traiter des infections intestinales, cutanées, pulmonaires ainsi que des septicémies.

(1) Les septicémies

La septicémie est probablement le modèle d'infection le plus utilisé pour étudier expérimentalement la phagothérapie. L'efficacité des bactériophages à été montrée dans le traitement de septicémies causées par *E. coli*, *Acinetobacter baumanii, Cronobacter turicensis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Enterococcus faecium* et *P. aeruginosa*, pathogène le plus étudié (Biswas *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2011; Pouillot *et al.*, 2012; Soothill, 1992; Sunagar *et al.*, 2010; Tóthová *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2006). Les études ayant pour modèle des infections à *P. aeruginosa* sont résumées dans la table 8. Ces études montrent qu'avec une MOI (multiplicity of infection) suffisante, le traitement par bactériophage reste efficace même s'il est retardé de plusieurs heures. Par ailleurs, la voie d'administration intrapéritonéale semble être la plus efficace, bien que celle-ci soit actuellement peu pertinente pour un traitement chez l'Homme.

(2) Les infections intestinales

Ces études ont principalement portés sur deux types de pathogènes : *Salmonella* et *E. coli*. Lors d'infections à *Salmonella*, l'utilisation de bactériophages a permit de réduire la mortalité et la colonisation intestinale chez le poulet et aussi de réduire le nombre de *Salmonella* dans les fèces et différentes parties de l'intestin chez le jeune porc (Berchieri *et al.*, 1991; Borie *et al.*, 2008; Callaway *et al.*, 2011). L'administration orale de bactériophages s'est révélée efficace contre différentes infections à *E. coli*. En effet ils permettent une élimination plus rapide de la bactérie dans l'intestin ou une réduction du nombre de bactéries présentes dans les fèces et/ou les intestins, dans des modèles de souris, de porc, de moutons et de bovins (Jamalludeen *et al.*, 2009; Raya *et al.*, 2006; Sheng *et al.*, 2006; Tanji *et al.*, 2005). Une étude réalisée chez la souris montre des résultats similaires lors d'infections intestinales avec *Listeria monocytogenes* (Mai *et al.*, 2010).

(3) Les infections cutanées

Le modèle le plus étudié est l'infection de brûlures de la peau par *P. aeruginosa*. Généralement, une petite surface de peau est lésée par brûlure puis les bactéries sont injectées au niveau de la plaie en sous-cutanée ou directement appliquées sur la brûlure. Les résultats de ces études sont très différents (Table 8). Dans le cas d'une infection létale, les bactériophages semblent être efficaces que dans le cas de très fortes doses curatives. En revanche, dans le même modèle d'infection pour *Klebsiella pneumoniae*, le traitement par les bactériophages, à une MOI de 1, permet la survie de 100% des souris infectées par une dose létale (Kumari *et al.*, 2009; Kumari *et al.*, 2010). D'autre part, l'utilisation de bactériophages semble adaptée pour réduire les infections à *P. aeruginosa* non létales et permettre ainsi la guérison des blessures. Cependant, ces études sont réalisées avec une administration des bactériophages immédiatement après l'infection et il a été montré, pour ce même modèle d'infection par *Klebsiella pneumoniae*, une efficacité réduite si le traitement est retardé de 6h et nulle pour un traitement retardé de 24h (Kumari *et al.*, 2010). Cela suggère que, chez l'Homme, l'application thérapeutique pourrait être plus adaptée au traitement préventif des brûlures qu'au traitement d'infections déjà développées.

(4) Les infections pulmonaires

Il existe peu d'études portant sur des infections pulmonaires expérimentales, toutes chez la souris et la majorité sont réalisées avec *P. aeruginosa*. Les différents modèles utilisés consistent en une infection intranasale de *P. aeruginosa* suivie d'une administration de bactériophages par voie intranasale ou intraveineuse (Table 8). Dans ce type d'infection, l'utilisation de bactériophages se révèle efficace tant que le traitement est réalisé dans les 2 h après l'infection. Si l'administration du traitement est retardée à 6 h, seulement 25 % des souris survivent à une infection létale alors que ce taux était de 100 % pour l'administration à 2 h. La MOI est un paramètre également important à prendre en compte. L'étude réalisée par Debarbieux *et al.* montre qu'une diminution de la MOI d'un facteur 10 fait chuter le taux de survie de 100 % à 0 % (Debarbieux *et al.*, 2010). En revanche, l'utilisation de souche de *P. aeruginosa* mucoïdes n'altère pas l'efficacité du traitement, ce qui est encourageant dans la perspective de traiter les patients atteints de mucoviscidose contre les infections chroniques à *P. aeruginosa* (Alemayehu *et al.*, 2012; Morello *et al.*, 2011). De plus, la survie des souris est corrélée avec une diminution de la charge bactérienne pulmonaire, une diminution des facteurs pro-inflammatoires dans les lavages broncho-alvéolaires et une diminution des

lésions pulmonaires (Debarbieux *et al.*, 2010; Morello *et al.*, 2011). D'autre part, le traitement préventif de ce type d'infection, réalisé jusqu'à 4 jours avant l'infection, s'avère également efficace. L'application thérapeutique d'un tel traitement semble limitée en raison de la spécificité des bactériophages, toutefois, cela montre que l'environnement pulmonaire n'est pas hostile pour les bactériophages (Morello *et al.*, 2011).

Des expériences similaires réalisées avec *Klebsiella pneumoniae* et *Burkholderia cenocepacia* montrent également que les bactériophages sont efficaces pour réduire le nombre de bactéries dans les poumons, mais toujours à des temps d'administration précoces (< 6 h) et à une MOI élevée (200 à 5000) (Carmody *et al.*, 2010; Chhibber *et al.*, 2008).

Table 8 : Etudes menées sur le traitement par les bactériophages d'infections à *P. aeruginosa* chez la souris.

	Protocole d'infection	Voie	MOI	Temps	Observations	Référence
Infections cutanées	Souche 4294, Applic. en surface, 10 % de mortalité	10 applic. locales	0.005	Immédiat et toutes les 30 minutes	80 % de guérison des brûlures	(Meitert *et al.*, 1987)
	Souche PAO1, SC 100 % de mortalité en 72h	IP	3000000	Immédiat	88 % de survie à 72h	(McVay *et al.*, 2007)
	Souche PAO1, SC 100 % de mortalité en 72h	IM ou SC	3000000	Immédiat	~ 25 % de survie à 72h	(McVay *et al.*, 2007)
	Souche PAO1, SC 100 % de mortalité en 72h	IP	900	Immédiat	0 % de survie	(Kumari *et al.*, 2009)
Infection pulmonaires	Souche 4294, IN, Dose létale 48h	IV	0.025	Immédiat	47 % de survie	(Meitert *et al.*, 1987)
	Souche 4294, IN, Dose létale 48h	IV	0.025	2 h	27 % de survie	(Meitert *et al.*, 1987)
	Souche 4294, IN, Dose létale 48h	IV	0.025	24 h	0 % de survie	(Meitert *et al.*, 1987)
	Souche PAK, IN, Dose létale 48h	IN	10 et 1	2 h	100 % de survie	(Debarbieux *et al.*, 2010)
	Souche PAK, IN, Dose létale 48h	IN	0.1	2 h	0 % de survie	(Debarbieux *et al.*, 2010)
	Souche PAK, IN, Dose létale 48h	IN	10	6 h	25 % de survie	(Debarbieux *et al.*, 2010)
	Souche CHA, IN, Dose létale 48h	IN	10	2 h	90 % de survie	(Morello *et al.*, 2011)
	Souche CHA, IN, Dose létale 48h	IN	1	2 h	40 % de survie	(Morello *et al.*, 2011)

	Protocole d'infection	Voie	MOI	Temps	Observations	Référence
	Souche MR299, IN	IN	10	2 h	Réduit l'infection pulmonaire	(Alemayehu *et al.*, 2012)
	Souche NH57388, IN	IN	10	2 h	Réduit l'infection pulmonaire	(Alemayehu *et al.*, 2012)
Septicémies	Souche 4294, IP, Dose létale 48 h	IV	0.0033	Immédiat	50 % de survie	(Meitert *et al.*, 1987)
	Souche 4294, IP, Dose létale 48 h	IV	0.0033	2 h	41 % de survie	(Meitert *et al.*, 1987)
	Souche 4294, IP, Dose létale 48 h	IV	0.0033	4 h	20 % de survie	(Meitert *et al.*, 1987)
	Isolat clinique, IP	IP	2	Immédiat	100 % de survie	(Soothill, 1992)
	Isolat clinique, IP	IP	0.2	Immédiat	20 % de survie	(Soothill, 1992)
	Souche PAO1, IP, Dose létal 24 h	IP, non réplicatif	1000	45 min	80 % de survie à 7 jours	(Hagens *et al.*, 2004)
	Souche PAO1, IP, Dose létal 24 h	IP, non réplicatif	10000	6 h	100 % de survie à 7 jours	(Hagens *et al.*, 2004)
	Souche imipénème résistante A392, IP, Dose létale 24h	IP	200 à 0.01	Immédiat	100 % de survie à 7 jours	(Wang *et al.*, 2006)
	Souche imipénème résistante A392, IP, Dose létale 24h	IP	200	1 h	60 % de survie à 7 jours	(Wang *et al.*, 2006)
	Souche D4, en eau de boisson pendant 3 jours puis rupture de la barrière intestinale	*per os*	?	24 h	65 % de survie à 17 jours	(Watanabe *et al.*, 2006)
	Souche D4, en eau de boisson pendant 3 jours puis rupture de la barrière intestinale	*per os*	?	6 jours	20 % de survie à 17 jours	(Watanabe *et al.*, 2006)

Protocole d'infection	Voie	MOI	Temps	Observations	Référence
Isolat clinique, IP, Dose létale 48 h	IP	0.75, 75 et 750	45 min	100 % de survie	(Vinodkumar *et al.*, 2008)
Isolat clinique, IP, Dose létale 48 h	IP	750	5 h	100 % de survie	(Vinodkumar *et al.*, 2008)
Isolat clinique, IP, Dose létale 48 h	IP	750	24 h	50 % de survie	(Vinodkumar *et al.*, 2008)
Souche PAO1, IP, Dose létale 48 h	IM	10	6 h	20-40 % de survie à 48h	(Heo *et al.*, 2009)
Souche PAO1, IP, Dose létale 48 h	IP	10	6 h	70-100 % de survie à 48h	(Heo *et al.*, 2009)

IM : intramusculaire ; IN : intranasal ; IP : intrapéritonéal ; IV : intraveineux ; SC : sous-cutanée
Voie : voie d'administration du traitement par bactériophages
MOI : Multiplicity Of Infection i.e. rapport bactériophages/bactérie
Temps : délai entre l'infection et l'administration du traitement

e) Les essais cliniques

(1) La phagothérapie humaine en Europe de l'est

Depuis l'avènement des antibiotiques, la phagothérapie est restée très utilisée dans les pays de l'Europe de l'est, Union soviétique et Pologne à l'époque. Durant cette période et jusqu'aujourd'hui, dans ces pays, plusieurs centaines d'études ont été rapportées sur la phagothérapie chez l'Homme. Très peu de ces études ont été traduites en anglais mais les résultats majeurs ont été résumés par Sulakvelidze et ses collaborateurs (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Ils rapportent des succès de traitements curatifs et/ou préventifs:

- pour diverses atteintes : dysenterie, abcès, infections pulmonaires et pleurales, brûlures et ulcères cutanés, septicémies, inflammation urogénitales
- pour des atteintes causées par divers pathogènes : *Shigella, S. aureus, Proteus, Klebsiella, P. aeruginosa, E. coli, Streptococcus* ou *Salmonella*
- pour des traitements administrés par différentes voies : rectale ou orale pour les infections gastro-intestinales, topique pour les infections cutanées, oculaires et muqueuses, aérosol pour les infections pulmonaires et de manière plus rare et réservée au cas de septicémies, par voie intraveineuse

La plus importante d'entre elles fut une étude soviétique, réalisée entre 1963 et 1964, qui évalua l'utilité des bactériophages thérapeutiques en traitement prophylactique de la dysenterie. Cette étude, menée à Tbilissi en Géorgie, inclut 30769 enfants ; pendant 109 jours, les habitants d'un côté des rues recevaient oralement, une fois par semaine, une préparation de bactériophages de *Shigella*, tandis que les habitants de l'autre côté des rues ne recevaient aucun traitement. Basé sur un diagnostic clinique confirmé par une culture bactérienne positive, l'incidence de la dysenterie chez les enfants non traités fut 2.6 fois supérieure par rapport aux enfants traités. Bien que nombre de ces études apportent des éléments concrets en faveur de l'efficacité de la phagothérapie, leurs résultats doivent être considérés avec précaution puisque la grande majorité de ces études n'incluent pas de groupes placebo, ne sont pas réalisées en « aveugle », ne précisent pas toujours le nombre de patients inclus et manquent souvent d'informations nécessaires à l'évaluation rigoureuse des conclusions avancées par les auteurs (Sulakvelidze *et al.*, 2001; Sulakvelidze & Kutter, 2004).

Pendant toute cette période et encore aujourd'hui, deux grands centres d'Europe de l'est ont joué un rôle majeur dans l'avancée de la phagothérapie :

- l'EIBMV : L' « Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology », à Tbilisi, Géorgie

- l'HIIET : L' « Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy » à Wroclaw, Pologne

Avec d'autres centres russes, ils sont à l'origine de nombre des études citées précédemment et produisent, encore à l'heure actuelle, différentes préparations de bactériophages, pour lutter contre de nombreux types d'infections, proposées sous différentes formulations (liquides, comprimés, crèmes). Leur recherche permet également le développement de nouvelles préparations comme PhagoBioDerm®, développé en 2000 en association entre les chercheurs de l'EIBMV et le « Center for Medical Polymers and Biomaterials ». Actuellement, PhagoBioDerm® est un « pansement » innovant à utiliser sur les brûlures cutanées qui consiste en un polymère non toxique, biodégradable et perforé contenant un mélange de bactériophages lytiques (de *P. aeruginosa, E. coli, S. aureus, Streptococcus et Proteus*), un antibiotique (Ciprofloxacine) et un analgésique (benzocaïne) (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

(2) La phagothérapie humaine en Europe occidentale

Le seul essai clinique, évaluant l'efficacité de la phagothérapie et réalisé conformément aux réglementations européennes actuelles, a été mené au Royaume-Uni, sur 24 patients souffrant d'otite chronique unilatérale à *P. aeruginosa* (Wright *et al.*, 2009). Dans cette étude randomisée en double aveugle, les patients ont été traités avec une dose unique de $6x10^5$ pfu d'un cocktail de six bactériophages, administrés par voie topique. Basé sur les scores obtenus d'après une échelle visuelle, le traitement par bactériophages a réduit l'intensité des symptômes. Cependant, la numération de *P. aeruginosa*, réalisée au dernier jour de l'essai, a montré une faible diminution moyenne, de $9x10^9$ à $2x10^9$ cfu/g d'échantillon. Toutefois, les bactériophages se sont multipliés au cours du traitement et certains patients traités par bactériophages ont montré jusqu'à 80% de réduction des symptômes, non observée dans le groupe ayant reçu le traitement placebo. Les résultats de cette étude furent confirmés, par la même équipe, lors d'un essai clinique vétérinaire réalisé dans les mêmes conditions, chez des chiens souffrant d'otites chroniques à *P. aeruginosa* (Hawkins *et al.*, 2010).

(3) La phagothérapie chez les patients CF

Une étude pionnière, réalisée en Union Soviétique en 1995, non disponible mais relatée par Sulakvelidze et ses collaborateurs, a reporté une efficacité des bactériophages dans le traitement de patients CF atteints d'infection à *P. aeruginosa* (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Plus récemment, entre 2007 et 2010, une étude a été réalisée sur 8 patients CF à Tbilisi. Les patients ont reçu des bactériophages sous forme d'aérosols, a plusieurs reprise pendant 6 à 10 jours, avec maintient du traitement antibiotique conventionnel, des fluidifiants de mucus et des vitamines. Les résultats rapportés concluent à une diminution considérable de la concentration des bactéries dans les expectorations des patients, une amélioration de l'état de santé général et pour l'ensemble des patients, cette phagothérapie permit d'allonger les périodes entre deux épisodes infectieux (Kutateladze & Adamia, 2010). D'autre part, une étude de cas, également réalisée à Tbilisi, rapporte les mêmes conclusions pour un patient CF atteint d'infection chronique à *S. aureus* et *P. aeruginosa* (Kvachadze *et al.*, 2011). Ces études sont encourageantes et il semble que les bactériophages soient capables de réduire les infections à *P. aeruginosa*, cependant peu de patients ont étés étudiés il est difficile de conclure sur l'efficacité réelle des bactériophages notamment sur le long terme. Dans la démarche consistant à traiter par phagothérapie les infections chroniques à *P. aeruginosa* des patients CF, il est nécessaire de mener des essais cliniques de plus grande envergure et respectant les rigoureux critères actuels encadrant ce type d'essais.

f) L'innocuité d'un traitement thérapeutique par bactériophages

(1) Origine possible d'effets secondaires

L'abondance des bactériophages dans l'environnement et l'exposition quotidienne de l'Homme à ces bactériophages est probablement à l'origine de la bonne tolérance générale du corps humain à ces micro-organismes. Cependant, des effets secondaires pourraient être provoqués par différentes particularités des conditions de la phagothérapie :

- la dose de bactériophages : afin de traiter efficacement une infection, la quantité de bactériophages administrée doit parfois être élevée (cf. paragraphe III.C.3.d). Les cellules du corps et en particulier localement au site de l'infection, sont alors exposées à une concentration de bactériophages probablement bien supérieure aux concentrations naturelles
- la libération massive d'endotoxines provoquée par la lyse bactérienne au site infectieux
- la présence d'endotoxines dans les préparations de bactériophages
- la stimulation du système immunitaire par les protéines du bactériophage
- l'influence des bactériophages sur l'évolution des bactéries cibles

Cependant, il est aujourd'hui possible de sélectionner des bactériophages strictement virulents et ne contenant aucun gène de virulence connu. D'autre part, la purification des préparations, afin d'obtenir des taux d'endotoxines faibles et tolérables pour l'Homme, est un pré-requis applicable avec les techniques actuelles (Abedon *et al.*, 2011; Sulakvelidze & Kutter, 2004).

(2) Activité immuno-modulatrice des bactériophages

De plus en plus d'études montrent que les bactériophages peuvent interagir avec certaines cellules de mammifères, notamment les cellules du système immunitaire. Ils moduleraient ainsi l'activité de phagocytose, accélèreraient le renouvellement des PMN (moins de formes matures et plus de formes immatures), inhiberaient la prolifération des lymphocytes T et seraient capable d'y adhérer, inhiberaient l'activation du facteur NF-κB et affecteraient la production de certaines cytokines. Cependant, ces observations résultent principalement d'études *in vitro* et l'importance de ces phénomènes n'est pas clairement définie dans le contexte de la phagothérapie (Górski *et al.*, 2012; Kurzepa *et al.*, 2009; Przerwa *et al.*, 2006; Weber-Dabrowska *et al.*, 2002). Il semble d'ailleurs qu'ils influencent peu l'issue du traitement. Des études réalisées par l'HIIET chez l'Homme, lors de traitements par différentes préparations de bactériophages, semblent confirmer ces observations cependant, elles montrent également que ces modulations du système immunitaire semblent dépendantes de la préparation de bactériophages et de la voie d'administration. Par ailleurs les bactériophages permettraient de réduire la production de radicaux libres oxygénés induite par l'infection bactérienne (Przerwa *et al.*, 2006). Des études réalisées *in vitro* montrent aussi qu'ils n'influenceraient pas la migration des phagocytes ni l'expression des TLR à la surface des monocytes (Górski *et al.*, 2012).

(3) L'innocuité dans des modèles expérimentaux

Des études réalisées chez la souris, le lapin et le poulet montrent que les bactériophages, administrés par voie intramusculaire, intrapéritonéale, intraveineuse, orale ou en spray sur l'animal, entrent rapidement (< 1 h) dans la circulation sanguine. Cependant, en absence de bactéries pour se multiplier, ils sont éliminés en quelques jours (Dabrowska *et al.*, 2005; Huff *et al.*, 2003; Sulakvelidze & Kutter, 2004). D'autre part, des études réalisées chez la souris et le cobaye, pour des préparations de bactériophages de *Klebsiella* administrés par ces mêmes voies, n'ont montré aucun signe de toxicité ni d'allergie, aucun choc ni aucun

changement histologique observable, malgré une dose rapportée au poids équivalente à 3500 fois celle d'un traitement prévu pour l'Homme (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

(4) L'innocuité chez l'Homme

Parmi les nombreuses études réalisées chez l'Homme en Europe de l'est ces dernières décennies, peu rapportent des résultats sur l'innocuité du traitement par bactériophages. En revanche, lorsque ces observations sont précisées, elles font état d'une absence d'effets secondaires graves. Seuls des effets indésirables pouvant être traités, telle que des douleurs au foie, ont été reportés. De plus, il est à noter que certaines de ces études ont été réalisées chez des patients immunodéprimés (Sulakvelidze & Kutter, 2004). Récemment, deux essais cliniques de phase I, visant à évaluer l'innocuité de traitements par bactériophages, ont été menés en Suisse et aux Etats Unis. Le premier a été réalisé sur 15 volontaires sains recevant oralement $1.5x10^5$, $1.5x10^7$ pfu de bactériophages T4 d'*E. coli* ou une solution placebo, 3 fois par jour pendant deux jours (Bruttin & Brüssow, 2005). Le second a été réalisé sur 39 patients souffrant d'ulcères qui ont été traités, pendant 12 semaines, par des bactériophages de *P. aeruginosa, S. aureus* et *E. coli* ou une solution saline placebo (Rhoads *et al.*, 2009). Ces deux études montrent qu'aucun effet secondaire grave n'est observable après les traitements par bactériophages. Seuls quatre volontaires incluent dans l'étude de Bruttin & Brüssow ont rapporté des nausées, des douleurs stomacales, un mal de gorge ou une augmentation du péristaltisme, sans que cela nécessite un traitement particulier. Cette étude montre également que quelques jours après la fin du traitement, les bactériophages ne sont plus retrouvés dans les selles, même pour les volontaires ayant reçu la dose la plus élevée.

Objectifs du travail

Ce travail a pour but d'apporter de nouvelles données sur le potentiel thérapeutique des bactériophages pour lutter contre les infections pulmonaires chroniques, causées par des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes aux antibiotiques, chez les patients atteints de mucoviscidose.

Dans l'ensemble, les résultats des études cliniques réalisées en Europe de l'Est ainsi que ceux des études sur des modèles d'infections expérimentales, démontrent l'efficacité de la phagothérapie à conditions de définir une dose, une voie et un délai d'administration adéquat. Dans le cas particulier des infections pulmonaires à *P. aeruginosa* et dans l'objectif d'adapter ce type de traitement pour les patients CF infectés de manière chronique, il est maintenant primordial d'évaluer la capacité des bactériophages à éliminer les bactéries dans des modèles se rapprochant d'avantage de l'environnement pulmonaire des patients.

Pour ce travail de thèse, nous avons donc trouvé pertinent d'utiliser la souche CHA de *P. aeruginosa*, une souche mucoïde et multi-résistante aux antibiotiques, isolée d'un patient CF.

A mon arrivée au laboratoire, la souche PAK de *P. aeruginosa* avait précédemment été utilisée pour démontrer l'efficacité de bactériophages à traiter une infection pulmonaire aiguë. Nous avons ensuite utilisé ce modèle pour démontrer l'efficacité des bactériophages à traiter une infection causée par la souche clinique CHA, chez la souris WT. Le premier objectif de ce travail de thèse était de vérifier ces résultats dans un modèle murin de mucoviscidose : la souris *cftr* $^{-/-}$. Parallèlement, les souches de *P. aeruginosa* étant capables de former des biofilms dans les poumons des patients, nous avons testé l'efficacité des bactériophages à réduire un biofilm formé *in vitro*.

Les données disponibles dans la littérature montrent que les traitements expérimentaux par bactériophages sont bien tolérés, malgré des interactions probables entre les bactériophages et les cellules du système immunitaire. Toutefois, de nombreuses autres interactions du bactériophage avec l'organisme humain sont possibles et restent à préciser, en particulier dans le contexte de la mucoviscidose. Deux fonctions physiologiques majeures sont au cœur de la pathogénèse de cette maladie : l'inflammation et les transports ioniques. En conséquence, le second objectif de ce travail de thèse était de déterminer si un traitement par bactériophages induisait une réaction inflammatoire ou une altération des transports ioniques, en particulier les transports du sodium et du chlorure. Ce deuxième point a nécessité la mise au point de la technique de mesure de potentiel nasale chez la souris, technique pour laquelle

il n'existe pas de données de référence dû à la disparité des résultats obtenus par les différents groupes de recherche.

D'autre part, les modèles murins de mucoviscidose ne présentant pas d'hypersécrétion de mucus, notre troisième objectif fut de mettre au point une méthode permettant de tester l'efficacité des bactériophages *ex vivo,* au sein d'expectorations de patients infectés par *P. aeruginosa* de façon chronique, où les bactériophages seraient confrontés à la complexité du milieu pulmonaire CF.

Travail Expérimental

Matériels et méthodes

I. Souches bactériennes et conditions de croissance

La souche CHA de *P. aeruginosa* est une souche mucoïde qui a été isolée d'un patient atteint de mucoviscidose à Grenoble (Toussaint *et al.*, 1993). Les souches de *P. aeruginosa*, isolées de primo-infections ou d'infections chroniques chez des patients CF et utilisées pour déterminer le spectre d'hôte des bactériophages, proviennent également d'une collection de Grenoble et nous ont été fournies par Patrick Plésiat. Les souches PAO1 et Aa245 ont été utilisées uniquement pour amplifier et dénombrer les bactériophages LUZ19/ΦKZ et LBL3 respectivement. La souche utilisée comme contrôle négatif pour la formation de biofilm est une souche d'*E. coli* isolée de selles d'un sujet sain, souche 49 de la collection ECOR fournie par le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (Ochman *et al.* 1984). Les souches ont été cultivées en routine à 37°C avec du milieu Luria-Bertani (LB) gélosé ou liquide, sous agitation.

II. Isolement et préparation des bactériophages de CHA

Des bactériophages spécifiques de la souche CHA ont été isolés sur cette souche à partir d'eaux usées par une technique d'enrichissement (Debarbieux *et al.*, 2010). Pour l'ensemble des bactériophages utilisés, des préparations à haute concentration virale ont été obtenues suivant la technique décrite par Debarbieux *et al.*, 2010. Les bactériophages sont stockés dans un tampon Tris (10 mM) / NaCl (150 mM) (TN) additionné de gélatine (0.02 %).

Les bactériophages utilisés pour l'étude sur l'innocuité ont été purifiés par chromatographie d'affinité afin d'éliminer les endotoxines des préparations. Les colonnes EndoTrap®blue ont été utilisées selon les recommandations du fournisseur (Hyglos, Allemagne). La concentration d'endotoxines dans les préparations a été déterminée par un test chromogénique quantitatif selon les recommandations du fournisseur. Ce test utilise la réaction naturelle entre les endotoxines et le Limulus Amebocyte Lysate (LAL), un extrait aqueux de cellules de la limule *Limulus Polyphemus* (QCL-1000, Lonza, USA).

III. Caractérisation des bactériophages de CHA

Le spectre d'hôte de chaque bactériophage a été déterminé. Pour cela 1 ml d'une culture en phase exponentielle de croissance a été réparti sur un milieu gélosé LB. L'excès de liquide a été enlevé et la boite séchée à température ambiante pendant 30 à 60 minutes. 4 µl de chaque dilution sériée (de 10 en 10) de la suspension de bactériophages en TN ont été déposés à la surface de chaque boite. Ces boites ont été incubées à 37°C sur la nuit. L'efficacité à former des plages de lyse a été déterminée en calculant le ratio du titre de la solution de bactériophages obtenu sur la souche testée divisé par le titre obtenu sur la souche de référence CHA (Figure 23).

Les échantillons pour l'analyse de la morphologie des virions en microscopie électronique ont été préparés comme décrit par Debarbieux *et al.* 2010.

Les cinétiques de lyse ont été réalisées à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance de la souche CHA, diluée en LB à une densité optique DO $_{600nm}$ de 0,1 puis 50 µl de cette suspension ont été distribués dans chaque puits d'une plaque 96 puits (plaques Microtest 96, Flacon). 50 µl de milieu LB ou de suspension de bactériophages (dilués en LB pour obtenir une multiplicité d'infection de 10^{-3} ou 10^{-5}) ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a ensuite été incubée dans un lecteur microplaques, à 37°C et sous agitation orbitale au réglage médium (Glomax MultiDetection System, Promega, USA). La DO à 600nm a été enregistrée à intervalles de 5 minutes sur une période de 12 heures.

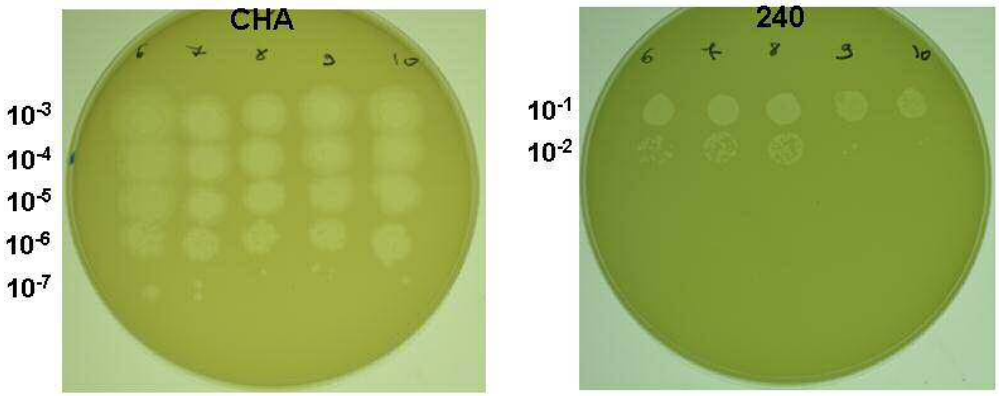


Figure 23 : Efficacité de 5 bactériophages à former des plages de lyse sur une souche de *P. aeruginosa* issue de primo-infection par rapport à la souche CHA

2 boites ont été recouvertes par une culture en phase exponentielle de la souche CHA (à gauche) ou d'une souche de P. aeruginosa *originellement isolée chez un patient CF lors d'une primo-infection (à droite). Les mêmes solutions des bactériophages L1A1A (6), S3A1A (7), S3B1A (8), L1A1A (9) et C3A1A (10) ont été diluée en série de 10 en 10 puis 4 µL des dilutions indiquées ont été déposés. Les photographies ont été réalisées après une incubation des boites pendant 16 h à 37 °C.*

IV. Modèle murin de mucoviscidose

Les souris 129 ;B6 wild type et invalidée pour le gène *cftr* proviennent du CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal) d'Orléans. Les souris *cftr* $^{-/-}$ (B6;129-CFTR^{tm1Unc}) ont été obtenues par mutations ciblées sur le gène *cftr* grâce à l'insertion d'une cassette de résistance à la néomycine dans l'exon 10 *via* une recombinaison homologue.

V. Infection pulmonaire et traitement par bactériophage

Les expérimentations sont réalisées sur des souris mâles et femelles B6 ;129 WT et *cftr* $^{-/-}$, âgées de 10 semaines.

A. L'infection par la souche CHA de P. aeruginosa

Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange xylazine/kétamine (100/10 mg/kg). Les bactéries sont suspendues dans 25 µL de PBS à la dose désirée et instillées par voie intranasale.

B. Le traitement par bactériophages

Cas où les souris reçoivent uniquement un traitement par bactériophages :

Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale d'un mélange xylazine/kétamine (100mg/kg / 10 mg/kg). Les bactériophages sont suspendus dans 25 µL de PBS à la dose désirée et instillées par voie intranasale.

Cas où les souris infectées par *P. aeruginosa* reçoivent un traitement par bactériophages :

Après l'anesthésie réalisée pour l'infection, les souris sont maintenues endormies par une seconde injection intrapéritonéale de xylazine-kétamine (50 mg/kg / 5 mg/kg) 1 h après l'infection. Ainsi, 2 h après l'infection, les souris toujours sous l'effet de l'anesthésie, reçoivent les bactériophages suspendus dans 25 µL de PBS par une instillation intranasale.

C. Les lavages broncho-alvéolaires (BAL)

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale puis sont ensuite disséquées de façon aseptique et 4 lavages successifs des poumons, avec 500 µL de PBS, sont réalisés. Les BAL sont maintenus à 4 °C jusqu'à la numération des bactéries, des bactériophages et des PMN.

Pour dénombrer les bactéries et les bactériophages, une dilution sériée de 10 en 10 de ces BAL a été effectuée et 4µL de chaque dilution ont été déposés sur milieu LB gélosé recouvert ou non par la souche CHA afin de quantifier les bactériophages ou la souche CHA seule.

Une dilution des BAL au 1/2 ou 1/10 avec une solution de Türk (Violet de gentiane)(Merck Chemicals, Allemagne) a été réalisée afin de colorer les noyaux plurilobés des PMN. Ces derniers ont ensuite été dénombrés sur cellule de Malassez.

Les BAL ont ensuite été centrifugés à 1500g puis le surnageant à été congelé à -20 °C jusqu'au dosage des facteurs d'inflammation.

VI. Formation et quantification de biofilms

La formation et la quantification de biofilms a été réalisée avec une version modifiée du protocole décrit par Tré-Hardy *et al.* (Tré-Hardy *et al.* 2008). Une culture de CHA incubée pendant 16 h à 37 °C a été diluée jusqu'à une DO_{600nm} de 0.1 en milieu LB puis répartie dans une plaque 96-puits (100 µl par puits, Nunc MicroWell Plates; Nunc, Wiesbaden, Allemagne). Les plaques ont ensuite été recouvertes d'un couvercle contenant des picots sur lesquels un biofilm peut se former (Nunc TSP Screening System). La microplaque a ensuite été incubée en chambre humide statique à 37 °C pendant 40 h. Le couvercle a été enlevé et introduit dans une nouvelle plaque 96-puits contenant 100 µl de PBS par puits pendant 10 secondes afin d'enlever les cellules planctoniques non adhérentes. Le couvercle contenant les biofilms a ensuite été introduit dans une nouvelle plaque 96-puits contenant 100 µl de milieu LB seul ou contenant des bactériophages et incubé pendant 9 h à 37 °C en chambre humide statique. Après 9 h, les couvercles ont été rincés deux fois en PBS comme décrit précédemment. Les biofilms accrochés aux picots ont été colorés en introduisant le couvercle dans une plaque 96-puits contenant 100 µl de cristal violet par puits (0,5 % w/v) pendant 20 minutes. Le cristal violet colore à la fois la matrice et les cellules du biofilm. L'excès de cristal violet est éliminé en rinçant les picots deux fois dans une plaque 96-puits contenant 100 µl d'eau distillée par puits. Le colorant attaché a ensuite été solubilisé en incubant les picots dans une plaque 96-puits contenant 200 µl de mélange éthanol : acétone en proportions 4 : 1 pendant 15 minutes. 50 µl de la solution résultante ont été transférés dans une nouvelle plaque 96-puits pour mesurer la DO à 560 nm (Glomax MultiDetection System, Promega, USA).

VII. Culture des cellules MHS

Les cellules MH-S sont des macrophages alvéolaires murins dont l'immortalisation a été induite par le virus SV40 (Mbawuike & Herscowitz, 1989).

A. Culture en routine

Les cellules sont cultivées à 37 °C, en présence 5 % de CO_2, en flasque ventilée de 75 cm^2 (Corning, USA). Le milieu de culture utilisé est du RPMI Glutamax (Invitrogen, USA) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen, USA), de pénicilline à 100 U/mL, de streptomycine à 100 µg/mL, d'amphotericine B à 0,25 µg/mL (Antibiotic-Antimycotic 100X, Invitrogen, USA) et 1 mM d'HEPES 1M (Invitrogen, USA). Les cellules à 90 % de confluence sont rincées avec 2 x 10 mL de PBS 1X puis décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen, USA). 5 mL de milieu RPMI complet sont ajoutés puis les cellules reprises sont centrifugées 5 min à 300 g. Le culot est remis en suspension dans 2 mL de milieu complet puis $1x10^6$ cellules sont ajoutées à 25 mL de milieu RPMI complet dans une flasque de 75 cm^2.

B. Culture pour la stimulation par les bactériophages

Les cellules MH-S d'une flasque de 75 cm², à 70 % de confluence, sont lavées, décollées, centrifugées comme décrit précédemment puis reprises dans du milieu RPMI complet mais ne contenant que 0,1 % de SVF. Les cellules du culot repris sont alors diluée au ½ dans du Bleu Trypan 0,4 % afin de colorer en bleu les cellules mortes. Les cellules vivantes sont ensuite dénombrées sur cellule de Malassez au microscope optique. $6.25x10^4$ cellules sont ensuite réparties dans chacun des puits d'une plaque de culture cellulaire 24 puits (TPP, Suisse). Chacun des puits est complété jusqu'à 500 µL avec du milieu RPMI 0,1 % SVF. Après 24 h, le milieu est retiré des puits et les cellules sont rincées avec 1 mL de PBS 1X. Les bactériophages sont chacun dilués en Tris-NaCl additionné de gélatine 0,02 % jusqu'à une concentration de $1.5x10^8$ pfu/mL. Pour chaque puits, 70 µL de cette solution sont ensuite ajoutés à 500 µL de milieu RPMI 0,1 % SVF puis incubés à 37 °C, 5 % CO_2. Après 24 h d'incubation, les surnageants de culture sont récupérés, centrifugés pendant 5 minutes à 1500 g, puis congelés à -20 °C jusqu'aux dosages des facteurs de l'inflammation.

VIII. Dosages ELISA des facteurs de l'inflammation

Les dosages de l'interleukine 6, de la KC et du TNF-α sont réalisés par la méthode immuno-enzymatique ELISA en sandwich selon les recommandations du fournisseur (DuoSet, R&D, USA). Les dosages de la prostaglandine PGE-2 ont été dosés par la méthode ELISA par compétition, selon les recommandations du fournisseur (R&D, USA).

IX. Mesure de la différence de potentiel (ddp)

Le principe de la mesure de la ddp est détaillé dans le premier chapitre de l'introduction. Le système mis en place au laboratoire est résumé dans la figure 24 et la technique de mesure est décrite dans l'article 2 (cf. annexes).

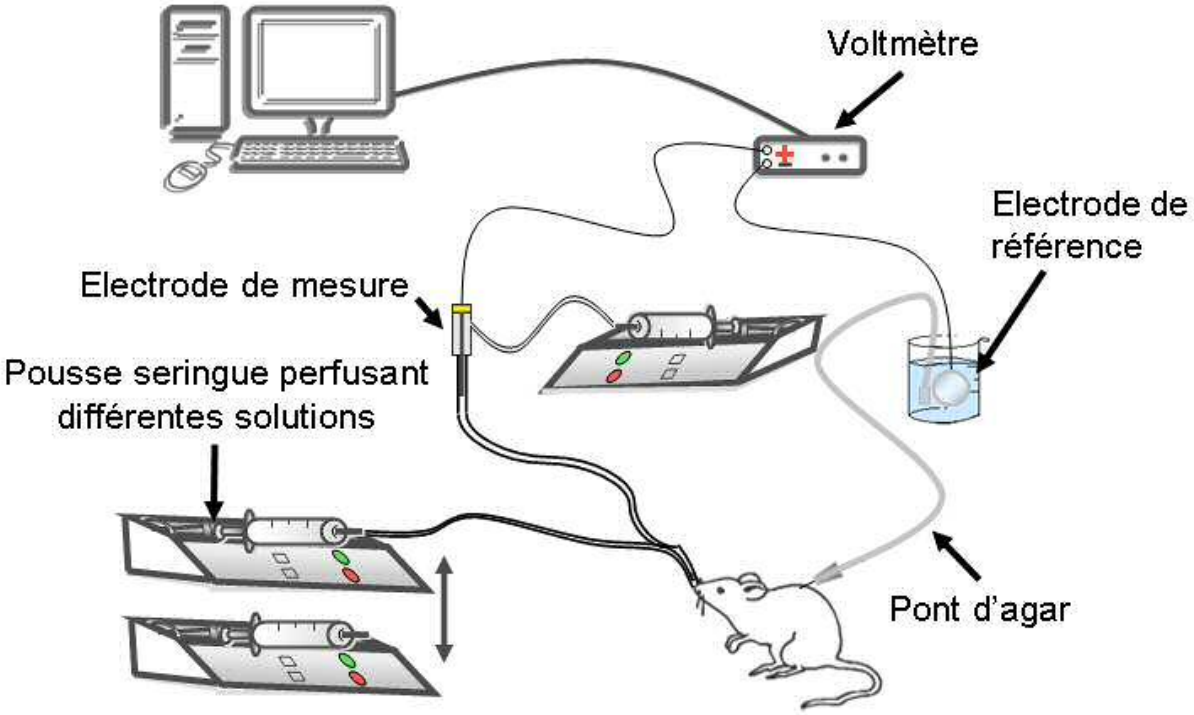


Figure 24 : Système de mesure de la différence de potentiel nasale chez la souris

La différence de potentiel est mesurée par un voltmètre entre deux électrodes d'argent. La première, l'électrode de référence est reliée à un pont d'agar conducteur. Ce pont est lui-même relié à une aiguille remplie d'agar et placée en sous-cutanée chez la souris, i.e. face basolatérale de l'épithélium. La seconde est l'électrode de mesure. Elle est reliée à la première voie d'un double cathéter. Cette voie est perfusée d'une solution physiologique conductrice. Son extrémité est assemblée avec la seconde voie du cathéter perfusée par différentes solutions permettant la modulation de l'activité des canaux ioniques. L'extrémité du double cathéter est insérée dans le nez de la souris au contact de la face apicale de l'épithélium respiratoire, à 4 mm de profondeur.

X. Test de l'efficacité des bactériophages sur les bactéries présentes dans les expectorations de patients CF

Les expectorations sont maintenues à 4°C entre le prélèvement et les expérimentations. L'échantillon brut est trop visqueux pour être manipulé. La première étape de l'expérimentation consiste donc à diluer chaque échantillon au ½ volume : volume dans une solution dénaturante (Sputasol™ (0.1 % dithiothreitol en tampon phosphate) dilué au 1/10 en eau). Le mélange est incubé 1 h à 4 °C sous agitation puis 5 aliquotes de 200 µL sont préparés.

A. Numération des bactéries présentes dans les expectorations

L'ensemble des numérations bactériennes est réalisé sur un milieu gélosé contenant 0,3 g/L de Cétrimide (Sigma-Aldrich, USA) incubé 16 h à 42 °C. Ces conditions permettent l'isolement sélectif de *P. aeruginosa*.

La numération de *P. aeruginosa* dans l'échantillon fluidifié est réalisée au temps 0 et après 6h d'incubation à 37 °C sous agitation. Dans les deux cas, un aliquote est dilué en série de 10 en 10 dans du tampon TN puis 4 µL de chaque dilution sont déposés sur le milieu Cétrimide puis incubé 16 h à 42 °C.

B. Evaluation de l'infection des bactéries par les bactériophages dans les échantillons

Chaque numération de bactériophages est réalisée sur les 4 souches de *P. aeruginosa* références pour les bactériophages utilisés: PAK, CHA, PAO1 et Aa245 (Table 9). La solution de bactériophages a été titrée sur chacune des 4 souches comme décrit dans le paragraphe III. Les boites sont incubées 16 h à 37 °C.

Le cocktail de bactériophages utilisé est composé de $1x10^8$ pfu/mL de chacun des 10 bactériophages suivants : PAK-P1, PAK-P2, PAK-P3, PAK-P4, PAK-P5, P3-CHA, CHAP1, LUZ19, ΦKZ et LBL3. Ce cocktail est titré sur les 4 souches de référence comme décrit ci-dessus.

Ce cocktail de bactériophages est ajouté à un aliquote de l'échantillon fluidifié, à raison de 10^7 pfu/mL de chacun des bactériophages, soit 10^8 pfu/mL au total. Le mélange est ensuite incubé à 37 °C sous agitation pendant 2h30, 4 h ou 6 h. Après l'incubation, les

bactériophages présents dans le mélange sont dénombrés sur les 4 souches de *P. aeruginosa* de référence et les bactéries sont dénombrées sur milieu Cétrimide, comme décrit ci-dessus.

Bactériophages	PAK-P1	PAK-P2	PAK-P3	PAK-P4	PAK-P5	P3-CHA	CHAP1	LUZ19	ΦKZ	LBL3
Souche de référence	PAK	PAK	PAK	PAK	PAK	CHA	CHA	PAO1	PAO1	Aa245

Table 9 : Récapitulatif des souches de référence pour chacun des 10 bactériophages utilisés durant l'étude

C. Détection, dans les expectorations, de bactériophages efficaces sur les 4 souches de référence utilisées

Un aliquote de l'échantillon fluidifié est dilué au 1/10 en tampon TN, incubé 15 min à 4 °C sous agitation puis centrifugé 10 minutes à 6000 g. 50 µL du surnageant sont déposés sur un jeu de 4 boîtes recouvertes chacune par l'une des 4 souches de *P. aeruginosa* de référence. Les boites sont incubées à 37 °C pendant 16 h.

D. Détermination de la sensibilité des souches de P. aeruginosa *aux bactériophages du cocktail*

Un aliquote de l'échantillon fluidifié est dilué à 10^{-1} et 10^{-4} en tampon TN puis 150 µL de chacune de ces dilutions sont étalés sur un milieu Cétrimide et incubés 16 h à 42 °C. 8 colonies choisies aléatoirement sur ces boites sont isolées sur milieu LB gélosé. Après 16 h d'incubation à 37 °C, pour chaque colonie isolée, un clone est ensemencé dans 50 µL de milieu LB. Pour chaque clone, 10 µL de milieu ensemencé sont ensuite déposés sur un milieu LB gélosé puis étalés suivant une ligne. Sur chaque ligne, sont déposés 10 x 3 µL d'une solution de 10^9 pfu/mL de chacun des 10 bactériophages du cocktail (Figure 25). Les boites sont incubées 16 h, à 37 °C.

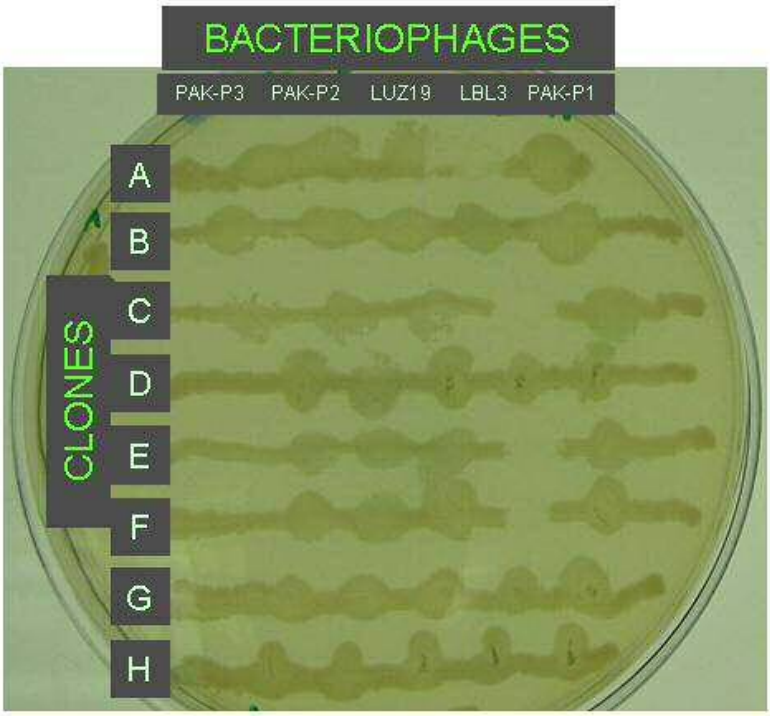


Figure 25 : Exemple d'un test de la sensibilité aux bactériophages de 8 colonies isolées

Huit colonies de P. aeruginosa *isolées à partir d'expectorations de patients CF ont été étalées. Sur chaque étalement, 3x10^6 pfu des bactériophages PAK-P2, PAK-P3, LUZ19, LBL3 et PAK-P1 pour cet exemple ont été déposés. La boite est incubée 16 h à 37 °C. Dans ce cas, les clones A, C, E et F sont sensibles au bactériophage LBL3.*

XI. Considérations éthiques

Les souris utilisées au cours de ce travail ont été maintenues dans une animalerie selon les recommandations Européennes et celles de l'Institut Pasteur et de l'INSERM. La nourriture et la boisson ont été fournies *ad libitum*. Les souris *cftr* $^{-/-}$ ont été nourries avec de la nourriture sans fibre (Special Diets Services, United Kingdom) et ont reçu une eau boisson contenant 17 g/L de Colopeg (Bayer Santé Familiale, France) afin d'éviter les occlusions intestinales. Les protocoles utilisés ont été approuvés par le comité régional d'éthique en matière d'expérimentation animal « Ile-de-France Sud » (autorisation n° P2.AE.092.09).

Les expectorations humaines proviennent de patients enfants atteints de Mucoviscidose et qui sont suivis à l'hôpital Necker-Enfants Malades à Paris. Les expectorations ont été recueillies lors des séances de kinésithérapie inhérentes à la prise en charge normale de la maladie et leur recueil n'a pas nécessité d'acte médical supplémentaire. Les échantillons ont été anonymisés par le praticien hospitalier et l'anonymat a été maintenu tout au long de l'expérimentation et de l'analyse des résultats.

XII. Analyses Statistiques

L'ensemble des analyses statistiques a été réalisé avec le logiciel Graphpad Instat (Graphpad software Inc., USA). Pour l'ensemble des données, la normalité de la distribution a été vérifiée par le test Shapiro-Wilk. Les données distribuées normalement sont exprimées par leur moyenne ± l'erreur standard, les autres données sont exprimées par leur médiane ± l'intervalle entre les quartiles 1 et 3 (InterQuartile Range). Les séries de données distribuées normalement sont comparées par le test de Student non apparié. Les séries de données qui ne sont pas distribuées normalement sont comparées par le test de Mann-Whitney, ou de Wilcoxon pour les données appariées de mesure de différence de potentiel. La représentation graphique de Bland et Altman a été utilisée pour établir la variabilité des mesures de ddp sur un même animal. Cette analyse est décrite dans l'article 2 (cf. annexes).

Résultats expérimentaux

I. Les bactériophages utilisés dans l'étude

A. Les bactériophages spécifiques de la souche PAK de P. aeruginosa

Cinq bactériophages isolés sur la souche PAK de *P. aeruginosa* ont été utilisés pendant ce travail de thèse : PAK-P1, PAK-P2, PAK-P3, PAK-P4 et PAK-P5. L'isolement, la préparation et la caractérisation de ces 5 bactériophages, incluant le séquençage complet de leur génome, ont été réalisés de manière identique mais à ce jour seules les données pour PAK-P1 et PAK-P3 ont été publiées (Debarbieux *et al.*, 2010; Morello *et al.*, 2011). Les bactériophages PAK-P1, PAK-P2 et PAK-P4 sont génétiquement apparentés (homologie > 90 %) et forment un groupe distinct des bactériophages PAK-P3 et PAK-P5, qui sont eux aussi apparentés (homologie > 80%) et forment un second groupe.

B. Adaptation du bactériophage PAK-P3 à la souche CHA

Lorsque que nous avons débuté notre étude sur le modèle utilisant la souche CHA, seuls les bactériophages PAK-P1, PAK-P2 et PAK-P3 avaient été caractérisés. Parmi eux, le bactériophage PAK-P3 présentait la meilleure activité sur la souche CHA et a été sélectionné pour être optimisé sur cette souche. Pour cela, ce bactériophage a été cultivé sur la souche CHA, et après 5 passages, un bactériophage du lysat a été isolé à partir d'une plage de lyse ; le bactériophage adapté a été nommé P3-CHA. Le séquençage complet du génome de ce bactériophage a été réalisé. Ainsi, nous avons pu déterminer que le bactériophage P3-CHA est un bactériophage qui diffère de PAK-P3 seulement par 2 nucléotides (position 7393 et 69922). Ces travaux sont décrits dans l'article 1 fourni en annexes (Morello *et al.*, 2011).

C. Bactériophages spécifiques de la souche CHA de P. aeruginosa

1. Isolement des bactériophages de CHA

Parallèlement à l'adaptation du bactériophage PAK-P3 à la souche CHA (réalisée par Eric Morello), j'ai effectué l'isolement de nouveaux bactériophages spécifiques de cette souche, à partir d'échantillons d'eaux usées provenant de 5 stations d'épurations de la région parisienne. La première lettre du nom des bactériophages correspond à l'initiale de la ville de la station d'épuration de laquelle ils proviennent. Treize bactériophages, de provenance et/ou de morphologie de plages de lyse différentes, ont été sélectionnés.

2. Spectre d'hôte des bactériophages de CHA

Le spectre d'hôte de ces treize bactériophages a été déterminé pour 10 souches de *P. aeruginosa* isolées de primo-infection de patients CF et 10 souches isolées de patients CF infectés de manière chronique (Table 10). L'ensemble des bactériophages montrent une efficacité pour former des plages de lyses (EFP) supérieure sur les souches issues de primo-infection (9 souches sur 10 sont infectées par au moins un bactériophage avec une EFP > 10 %) que sur les souches issues d'infections chroniques (aucune des 10 souches n'est infectée avec une EFP > 10 %). Par similitude d'EFP, nous avons pu définir 4 groupes, les groupes 1, 2, 3 et 4, qui sont capables de former des plages de lyse sur respectivement 80 %, 60 %, 50 % et 30-40 % des souches isolées de primo-infection et 40 %, 30 %, 20 % et 30 % des souches isolées d'infection chroniques (Table 10).

Bactériophages	E1A1A	E1B1A	E2A1A	E2A2A	C3B1A	L1A1A	L1A2A	S3A1A	S3B1A	C3A1A	Co1A1A	S1A1A	C1A1A
3078	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	.	.	.
3514	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	.	.
3894	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	+	+	.	.	.
4236	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+++	+++	+++
4250	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+	++	++	++
4276	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	.
4317	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.
4351	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4442	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	+++	.	.
4556	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3354	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3408	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	++	++
3445	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3448	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3465	+	+	+	+	+	.	.	.	.	.	+	+	+
3475	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3508	+	+	+	+	+	+	++	++	++	++	.	.	.
3526	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
3649	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	++	++	++
4121	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Table 10 : Spectre d'hôte des treize bactériophages isolés sur la souche CHA

Les bactériophages ont été classés en 4 groupes (voir paragraphe I.C.2) : groupe 1 (bleu), 2 (violet), 3 (jaune) et 4 (vert). L'efficacité à former des plages de lyses (EFP) a été déterminée par calcul du rapport suivant : [titre du bactériophage sur la souche donnée / titre du bactériophage sur la souche CHA de référence x *100]. Pour simplifier la lecture, les données ont été classées par groupe de valeurs : • = 0 % ; 0 < + < 0.01 % ; 0.01 % ≤ ++ < 10 % ; +++ ≥ 10 %. Dix souches de* P. aeruginosa *ont été isolées de primo-infections de patients CF (gris) et dix ont été isolées de patients CF infectés de façon chronique (orange).*

3. Cinétique de lyse des bactériophages infectant la souche CHA

Les bactériophages E2A1A, E2A2A, C3B1A, L1A1A et S3A1A ne sont pas capables de lyser complètement une culture planctonique de la souche CHA. Les bactériophages E1A1A, E1B1A, L1A2A, C3A1A et S3B1A sont peu efficaces puisque la lyse des bactéries est observée seulement lorsque la multiplicité d'infection (MOI *i.e.* [nombre de bactériophages / nombre de bactéries]) est comprise entre 1 et 100. Ces 10 bactériophages n'ont pas été sélectionnés pour la suite de ce travail. Des cinétiques de lyse ont été réalisées pour les bactériophages Co1A1A, C1A1A et S1A1A (Figure 26). Les bactériophages C1A1A et Co1A1A lysent des cultures planctoniques de la souche CHA, en phase exponentielle de croissance, en 2 h pour une MOI de 10^{-3} et en 2h30 pour une MOI de 10^{-5}. Pour une MOI de 10^{-3}, le bactériophage S1A1A lyse également la même culture en 2 h, en revanche la DO commence à diminuer 15 minutes plus tard comparée aux deux autres bactériophages et ce bactériophages n'est pas capable de lyser la culture pour une MOI de 10^{-5}. Selon le spectre d'hôte, le bactériophage S1A1A appartient au même groupe que C1A1A, qui est plus efficace. L'étude du bactériophage S1A1A n'a donc pas été poursuivie.

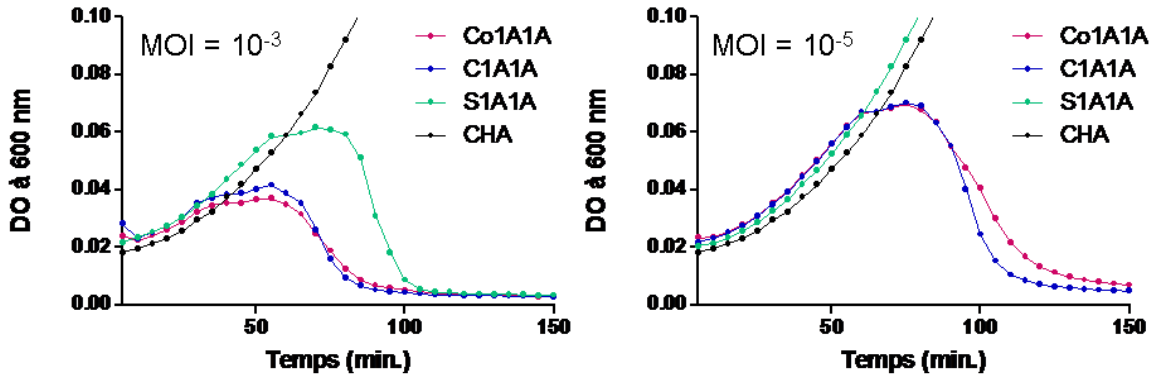


Figure 26 : Cinétique de lyse pour les bactériophages Co1A1A, C1A1A et S1A1A

La croissance bactérienne est évaluée grâce à une mesure de densité optique (DO), à 600 nm, toutes les 5 minutes. La DO est mesurée en absence de bactériophages (CHA), en présence de bactériophages à une MOI de 10^{-3} (à gauche) et en présence de bactériophages à une MOI de 10^{-5} (à droite). Pour chacune des conditions, l'expérience a été réalisée sur 8 réplicats.

4. Observation des bactériophages C1A1A et Co1A1A en microscopie électronique

Ces deux bactériophages appartiennent à l'ordre des *Caudovirales* (Figure 27). Leur morphologie, proche de celle des bactériophages spécifiques de la souche PAK, est caractéristique des *Myoviridae*. Ils possèdent une queue contractile d'une longueur de

123.2 nm (± 4.2 nm) pour C1A1A et 125.2 nm (± 5.9 nm) pour Co1A1A et une capside icosaédrique de 73.5 nm (± 4.2 nm) pour C1A1A et de 54.9 nm (± 4.6 nm) pour Co1A1A. Le bactériophage Co1A1A a été nommé CHA-P1 et le bactériophage C1A1A nommé CHA-P2. De manière aléatoire CHA-P1 a été choisi pour certaines parties de ce travail de thèse.

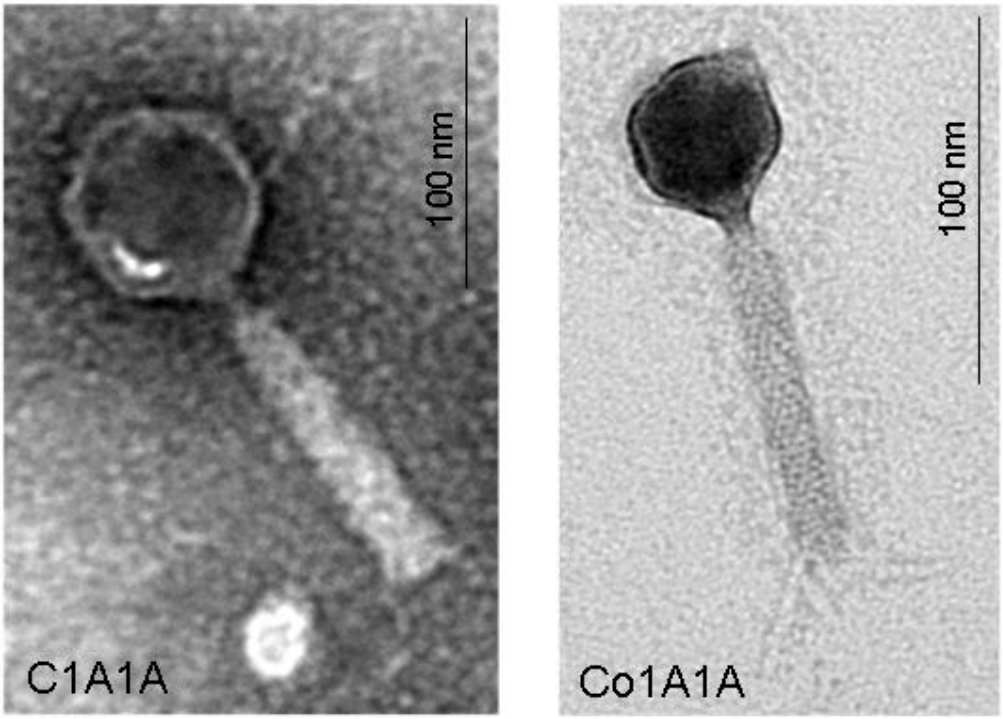


Figure 27 : Photographies des bactériophages C1A1A et Co1A1A en microscopie électronique

D. Les bactériophages LBL3, ΦKZ et LUZ19

Le bactériophage LBL3, isolé sur la souche Aa245 de *P. aeruginosa,* et les bactériophages ΦKZ et LUZ19, isolés sur la souche PAO1 de *P. aeruginosa*, nous ont été procurés par le Professeur Rob Lavigne (K.U.Leuven, Belgique) (Ceyssens *et al.*, 2009; Cornelissen *et al.*, 2011; Lammens *et al.*, 2009).

E. Comparaison de l'EFP des 10 bactériophages utilisés

Au cours de ce travail de thèse, 10 bactériophages de *P. aeruginosa* ont été utilisés : PAK-P1, PAK-P2, PAK-P3, PAK-P4, PAK-P5, P3-CHA, CHA-P1, LUZ19, ΦKZ et LBL3. La capacité de chacun de ces bactériophages à former des plages de lyse sur les souches de *P. aeruginosa* (PAK, CHA, Aa245 et PAO1) spécifiques de chacun de ces bactériophages a été testée (Table 11).

Souches / Bactériophages	PAK	CHA	Aa245	PAO1
PAK-P1	100	5	0.001	0
PAK-P2	100	7	0.02	0
PAK-P3	100	10	0.008	0
PAK-P4	100	28	0	0
PAK-P5	100	100	0.0008	0
P3-CHA	50	100	0	0
CHA-P1	50	100	0	0
LBL3	43	71	100	0.007
LUZ19	0	16	0	100
ΦKZ	100	0	0	100

Table 11 : Rapport d'efficacité des 10 bactériophages de l'étude

L'EFP est exprimée en pourcentage du rapport [titre du bactériophage sur la souche donnée / titre du bactériophage sur sa souche référence]. L'efficacité sur la souche référence est définie à 100 % (en gris).

II. Efficacité des bactériophages à réduire un biofilm formé par la souche CHA de *P. aeruginosa, in vitro*

La capacité des bactériophages PAK-P1, PAK-P3, P3-CHA, CHA-P1, LUZ19 et ΦKZ à réduire un biofilm formé *in vitro* par *P. aeruginosa*, a été évaluée (Figure 28). La méthode est adaptée de celle utilisée par Tré-Hardy *et al.*, 2008. Dans ces conditions, la souche CHA de *P. aeruginosa* est capable de former un biofilm plus important en 49 h qu'en 24 h (Figure 28A). Nous avons donc choisi d'ajouter les bactériophages après 40 h de formation de biofilm et avons observé la quantité de biofilm résiduelle après 9 h d'incubation.

Les résultats présentés dans la figure 28B montrent que ~ 67 % des bactériophages testés sont capables de réduire de plus de moitié un biofilm formé par une souche clinique de *P. aeruginosa* issue d'un patient CF. Les bactériophages PAK-P3, P3-CHA, CHA-P1 et LUZ19 ayant une EFP de 10 à 100 % sur la souche CHA, réduisent le biofilm respectivement de ~ 65 %, ~70 %, ~55 % et ~60 % (Figure 28B). A l'inverse, le bactériophage PAK-P1, lysant la souche CHA avec une efficacité semblable à PAK-P3 (EFP de 5%), réduit ce biofilm de seulement 35 %. De manière plus attendue, le bactériophage ΦKZ, incapable de former des plages de lyse sur la souche CHA, ne réduit pas significativement ce biofilm. Ces résultats

suggèrent que la capacité des bactériophages à réduire un biofilm ne serait pas étroitement liée avec l'efficacité du bactériophage à former des plages de lyse sur un tapis bactérien.

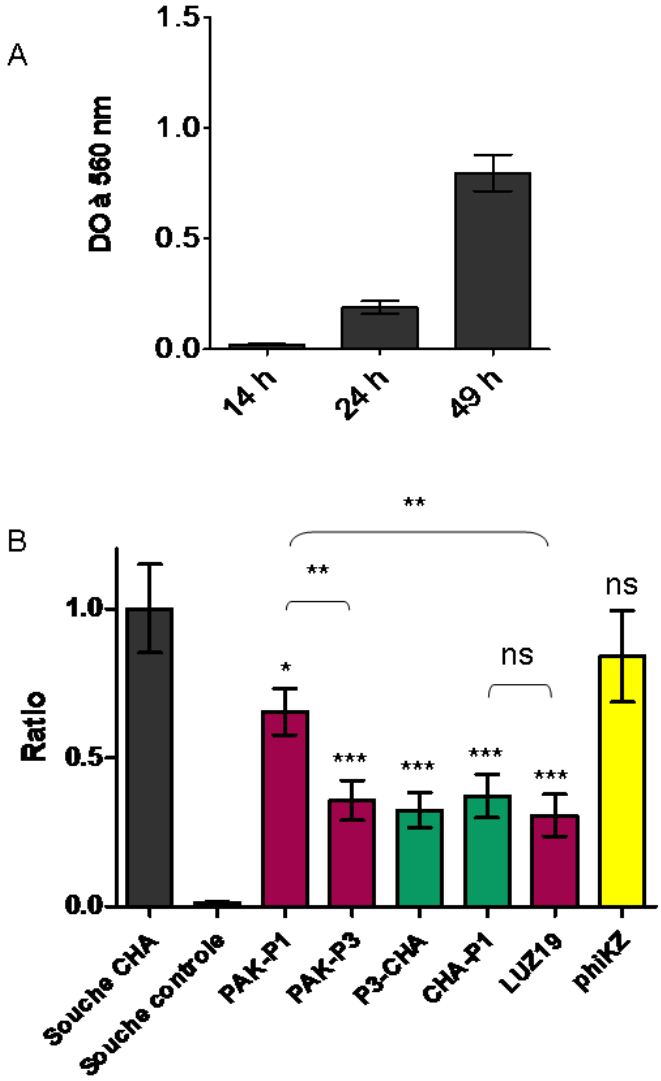


Figure 28 : Dégradation d'un biofilm de *P. aeruginosa* par différents bactériophages

*(A) La formation du biofilm par la souche CHA est quantifiée en fonction du temps. (B) Quantification du biofilm résiduel après 9h d'incubation en présence de bactériophages ou d'une solution contrôle. La quantité de biofilm est exprimée par le rapport [quantité de biofilm en présence du bactériophage donné / quantité de biofilm formé par la souche CHA]. Le test est réalisé pour des bactériophages efficaces (vert), peu efficaces (violet) et inefficaces (jaunes), pour former des plages lyse sur CHA. Pour chaque condition, la quantité de biofilm résiduelle est comparée avec celle formée par la souche CHA (t-test non apparié), ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$. (B) Les valeurs sont les moyennes ± Erreur Standard de 17 réplicats obtenus à partir de trois expériences indépendantes.*

III. Efficacité d'un traitement par bactériophages dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa*

A. Effet curatif du bactériophage P3-CHA chez la souris de type sauvage

ARTICLE 1 (cf. annexes)

Pulmonary bacteriophages therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention

Eric Morello, Emilie Saussereau, Damien Maura, Michel Huerre, Lhousseine Touqui, Laurent Debarbieux

PlosONE (2011). **6**(2) : e 16963

Résumé de l'article :

Dans ce travail, débuté avant mon arrivée au laboratoire, nous avons évalué l'efficacité des bactériophages pour prévenir et traiter une infection pulmonaire causée par la souche clinique CHA.

Le modèle d'infection pulmonaire a été adapté par rapport à celui décrit par Debarbieux *et al.* (2010). Il a été déterminé que la dose de $3x10^6$ cfu de la souche CHA, inoculée par voie intranasale, était suffisante pour provoquer la mort de 100 % des souris en 48 h. Grâce à ce modèle, nous avons montré qu'un traitement avec le bactériophage P3-CHA permettait :

1- la survie de ~ 95 % des souris infectées, lorsqu'il était administré 2 h après l'infection à raison de $3x10^7$ pfu
2- la survie de 100 % des souris infectées, lorsqu'il était administré 4 jours avant l'infection à raison de $3x10^8$ pfu
3- la réduction de l'inflammation et des lésions pulmonaires induites par l'infection
4- l'élimination des bactéries présentent dans l'espace extracellulaire au niveau des poumons, sans empêcher la phagocytose de la bactérie par les macrophages

Un traitement identique avec le bactériophage PAK-P3, bactériophage différent de P3-CHA par seulement 2 mutations dans son génome, ne permet en revanche la survie que de 20 % des souris infectées.

Ces résultats montrent le potentiel thérapeutique des bactériophages pour des traitements curatifs et préventifs d'infections pulmonaires causées par des souches de *P. aeruginosa* mucoïdes et multi-résistantes aux antibiotiques.

Ma participation à cette étude m'a permis d'apprendre différentes techniques nécessaires à mon travail de thèse, à savoir les techniques de purification des bactériophages, d'infection et de traitement des souris ou encore la réalisation de lavages broncho-alvéolaires.

B. Effet curatif du bactériophage P3-CHA chez la souris cftr $^{-/-}$

Dans l'objectif d'évaluer le potentiel thérapeutique des bactériophages pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose, nous avons étudié l'efficacité des bactériophages dans le modèle d'infection préalablement décrit mais cette fois chez des souris CF.

Le modèle d'infection pulmonaire aiguë développé chez les souris balb/c a été adapté aux souris 129;B6 invalidées pour le gène *cftr*. Pour ces souris, la dose létale en 48 heures a été déterminée à $1x10^6$ cfu de la souche CHA de *P. aeruginosa*, administrées par voie intranasale. La totalité des souris infectées puis traitées par $1x10^7$ bactériophages, 2 heures après, survivent jusqu'au 16ème jour où elles ont été euthanasiées, alors que les souris non traitées par bactériophages meurent en 48 heures. Les souris traitées perdent en moyenne 14 % de leur poids pendant les deux premiers jours de l'infection puis le reprennent progressivement entre le deuxième et le 7ème jour, où elles atteignent leur poids d'origine (Figure 29). Ces résultats montrent qu'une dose curative de bactériophages, administrée 2 h après l'infection, permet la survie et le rétablissement de l'ensemble des souris CF infectées par une dose létale de *P. aeruginosa*. Bien que les poumons des souris *cftr*$^{-/-}$ ne présentent pas les mêmes propriétés que les poumons des patients (absence d'hypersécrétion de mucus, absence d'infection chronique à *P. aeruginosa*), ce travail montre que les bactériophages conservent leur efficacité dans un environnement CF.

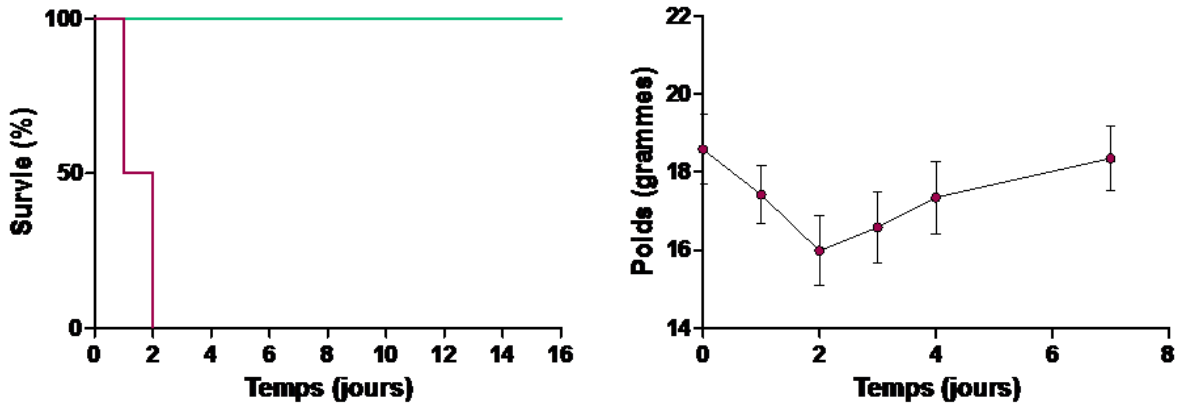


Figure 29 : Suivie de la survie et du poids de souris CF infectées et traitées par bactériophages

Huit souris cftr $^{-/-}$ ont été infectées par 1x10^{6} cfu de la souche CHA de P. aeruginosa puis 6 souris ont reçu un traitement intranasal de 1x10^{7}pfu *du bactériophage P3-CHA et 2 souris ont reçu un traitement contrôle (PBS), 2 h après l'infection. La survie des souris en fonction du temps est représentée sur le graphique de gauche, pour les six souris ayant reçu le traitement bactériophage 2 h après l'infection (en vert) et pour les deux souris infectées n'ayant pas reçu de bactériophages (en violet). Le poids des souris traitées par bactériophages a été suivi pendant les 4 premiers jours après l'infection puis le 7ème jour. Le poids moyen des six souris, ± Erreur Standard, est représenté.*

IV. Innocuité des bactériophages sur différents modèles *in vitro* et *in vivo*

Nous avons démontré, dans la première partie de ce travail, l'efficacité des bactériophages dans différents modèles :

- *in vitro* ils sont capables de lyser des bactéries planctoniques et de réduire un biofilm
- *in vivo* ils sont capables de traiter une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*, chez les souris WT et CF

Dans cette deuxième partie du travail, nous avons étudié l'innocuité des bactériophages à travers leur capacité à éventuellement induire une inflammation et à éventuellement altérer les transports ioniques, deux fonctions physiologiques centrales dans la mucoviscidose.

A. Pureté des préparations de bactériophages

Les bactériophages utilisés pour les différentes études sur l'innocuité ont été purifiés par gradient en chlorure de césium puis par plusieurs passages sur des colonnes de chromatographie d'affinité (EndoTrap®), afin d'éliminer les endotoxines jusqu'à obtenir un

taux inférieur à 0,25 ng pour une quantité de 10^7 pfu, quantité de bactériophages utilisée pour les expériences. Les concentrations d'endotoxines sont reportées, pour chacune des préparations de bactériophages utilisées, dans la Table 12.

Bactériophages	**PAK-P3**	**P3-CHA**	**ΦKZ**	**LUZ19**
Endotoxines en ng / 10^7 pfu	$8{,}4.10^{-3}$	$4{,}6.10^{-4}$	$2.4.10^{-1}$	$< 2.10^{-5}$

Table 12 : Concentration d'endotoxines dans les préparations de bactériophages utilisées lors des expériences portant sur l'innocuité

B. L'inflammation induite par différents bactériophages

1. Induction de l'inflammation par les bactériophages sur une lignée cellulaire pulmonaire

La lignée cellulaire MHS, macrophages alvéolaires murins, a été utilisée pour tester l'induction de 3 cytokines pro-inflammatoires (IL-6, KC et TNF-α), après une stimulation de 24 h par les bactériophages P3-CHA, PAK-P3, LUZ19 et ΦKZ. Les bactériophages P3-CHA et PAK-P3 sont des *Myoviridae* qui diffèrent seulement par 2 mutations dans leur génome mais sont amplifiés sur des souches différentes. Ils ont été choisis afin de mettre en évidence une éventuelle influence de la souche utilisée pour l'amplification sur l'induction de l'inflammation. Les bactériophages LUZ19 et ΦKZ ont en revanche la même souche d'amplification, PAO1, mais le premier est un membre de la famille des *Podoviridae* tandis que le second appartient à la famille des *Myoviridae*. Le ratio [nombre de bactériophages / nombre de cellules stimulées] utilisé est de 100. La dégradation des bactériophages dans le surnageant de culture cellulaire, au cours des 24 h de stimulation, a été déterminée par titration et est inférieur à ½ log pour chacun des bactériophages. Dans ces conditions, les bactériophages n'induisent pas de production de cytokines pro-inflammatoires et semblent donc être faiblement immunogènes, indépendamment de la famille à laquelle ils appartiennent et de la souche sur laquelle ils ont été amplifiés (Figure 30).

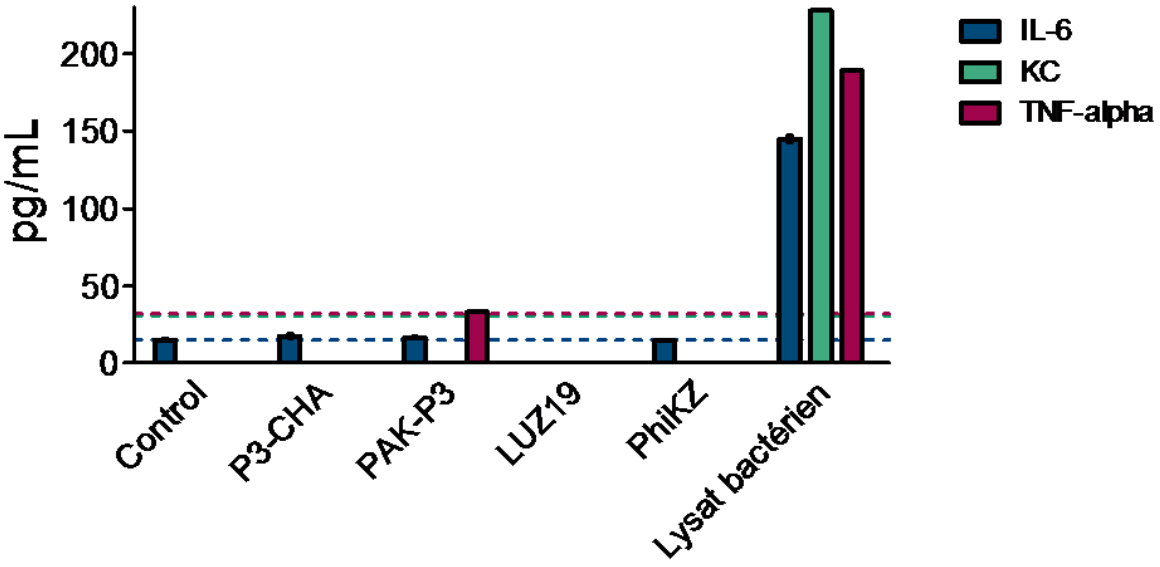


Figure 30 : Dosage de 3 cytokines pro-inflammatoires dans les surnageants de culture de cellules MHS stimulées par 4 bactériophages

Des macrophages alvéolaires murins (lignée MHS) ont été stimulés, pendant 24 h, avec 10^7 pfu du bactériophage P3-CHA, PAK-P3, LUZ19 ou ΦKZ, avec un lysat bactérien contenant 10^7pfu de P3-CHA ou avec une solution contrôle (tampon Tris-NaCl). La concentration de chacun des facteurs dans les surnageants de culture a été déterminée par dosage ELISA. Les lignes pointillées représentent, pour chacun des facteurs, le seuil de détection. Les données non représentées correspondent à des valeurs inférieures à ce seuil. Les valeurs sont les moyennes (± Erreur Standard) obtenues à partir de 3 réplicats pour l'IL-6 et un réplicat pour les autres facteurs.

2. Réponse inflammatoire dans des lavages broncho-alvéolaires de souris

L'étude a été réalisée avec le bactériophage P3-CHA, le mieux caractérisé des bactériophages spécifique de la souche CHA. Nous avons utilisé le modèle d'infection pulmonaire aiguë décrit au paragraphe III avec les adaptations suivantes : les souris *cftr* $^{-/-}$ et leur contrôle de type sauvage (WT) ont reçu une ½ dose curative de bactériophages par voie intranasale ou un traitement PBS contrôle, avec ou sans infection 2 h auparavant (½ dose létale de *P. aeruginosa*, souche CHA). Les mesures sont réalisées dans les lavages broncho-alvéolaires (BAL) des souris, 16 h après l'infection ou le traitement par bactériophages seuls.

a) Dosage de facteurs de l'inflammation par ELISA

Quatre facteurs inflammatoires ont été étudiés, l'IL-6, la KC, le TNF-α et la prostaglandine PGE-2 (Figure 31). Les données obtenues sur les souris WT et *cftr* $^{-/-}$ ne sont pas directement comparables puisque les doses létales de *P. aeruginosa*, et par conséquent les

doses curatives de bactériophages, diffèrent d'un facteur 3 entre les deux type de souris. Cependant, les profils sont similaires. Dans les BAL des souris CF ayant uniquement reçu une dose curative du bactériophage P3-CHA, la concentration des 4 facteurs est au maximum 1.5 fois celle mesurée dans les BAL des souris CF ayant reçu un traitement contrôle. Pour les souris WT, cette concentration est multipliée jusqu'à ~ 8 fois pour l'IL-6 et ~ 3 fois pour la PGE-2, cependant en condition infectieuse, la concentration d'IL-6 et de PGE-2, dans les BAL de ces souris WT, est multipliée par 267 et 20 respectivement. Le bactériophage P3-CHA semble donc être très faiblement immunogène *in vivo* chez la souris, sans commune mesure avec l'inflammation induite par un agent pathogène.

La concentration de TNF-α est relativement faible, pour l'ensemble des conditions, probablement en raison du moment du sacrifice, 16 h post-infection, alors que le TNF-α est une cytokine pro-inflammatoire produite très précocement (1-4 h).

La production de KC, équivalent murin de l'IL-8 humaine, induite par l'infection est réduite lors d'un traitement par bactériophages administré 2 h après l'infection, chez les souris WT. Cette réduction est aussi observée pour le TNF-α. En revanche, les concentrations d'IL-6 et de PGE-2 ne sont pas réduite par le traitement par bactériophages. C'est l'inverse chez la souris *cftr*$^{-/-}$, 3 des 4 facteurs de l'inflammation étudiés présentent des concentrations plus importantes dans les BAL des souris infectées puis traitées, que dans les BAL des souris uniquement infectées. Cependant, le ratio entre les deux concentrations est seulement de 2 à 5 en fonction du facteur inflammatoire considéré. Globalement, le traitement par bactériophages n'induit donc pas une sur-inflammation importante, ni dans ce modèle murin de mucoviscidose, ni chez leur contrôles WT où il permet même une réduction de l'inflammation.

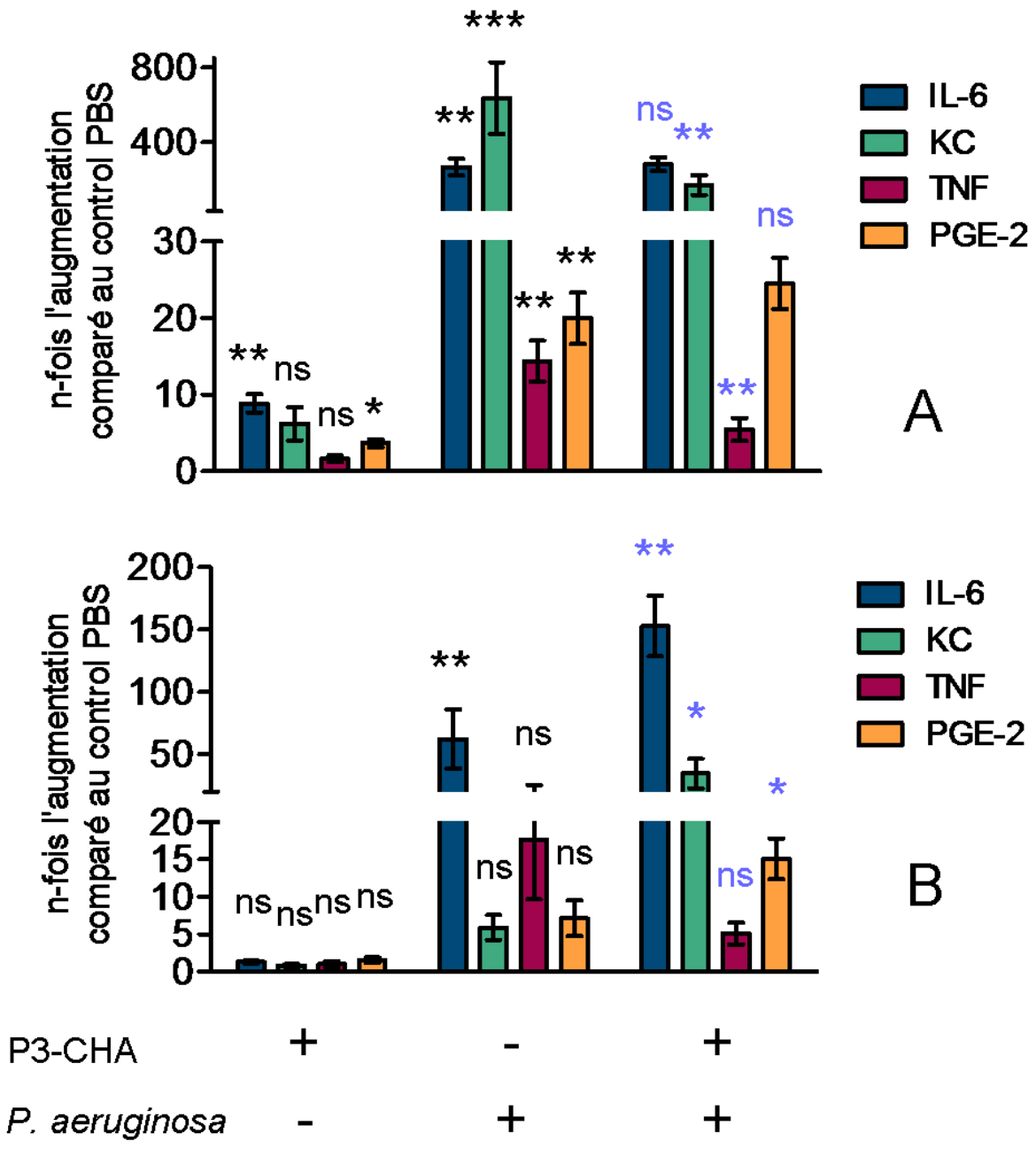


Figure 31 : Dosage de cytokines pro-inflammatoires et de la prostaglandine PGE-2 dans des lavages broncho-alvéolaires de souris en conditions d'infection et/ou de traitement

*Des souris de type sauvage (A) et invalidées pour le gène cftr (B) ont été soumises à 4 conditions : traitement PBS, traitement intranasal avec 1.5x10^7(A) et 0.5x10^7(B) pfu du bactériophage P3-CHA, infection intranasale avec 1.5x10^6(A) et 0.5x10^6(B) cfu de la souche CHA ou infection puis traitement 2 h après avec les mêmes doses respectivement. Les souris ont étés sacrifiées 16 h après l'infection ou le traitement par bactériophages seul puis des lavages broncho-alvéolaires (BAL) ont été réalisés sur chaque animal. La prostaglandine PGE-2 ainsi que 3 cytokines pro-inflammatoires ont été dosées dans ces BAL par ELISA. Les valeurs sont les moyennes des ratios ± Erreur Standard. ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$ et *** : $p < 0.001$ de couleur noire en comparaison au traitement PBS et de couleur bleue en comparaison à l'infection par P. aeruginosa.*

b) Dénombrement de neutrophiles

Le dénombrement des neutrophiles a été réalisé sur cellules de Malassez observée au microscope photonique. 16 h post-traitement, la concentration de neutrophiles dans les BAL des souris, WT comme *cftr* $^{-/-}$, est inférieure à 10^5 / mL (seuil de dénombrement) lorsqu'elles reçoivent uniquement un traitement par bactériophages, tout comme lorsqu'elles reçoivent un traitement contrôle. Lors de l'infection pulmonaire par la souche CHA, $1.5x10^6$ et $2x10^6$ neutrophiles par mL de BAL sont respectivement dénombrés chez les souris WT et *cftr* $^{-/-}$. Cette concentration n'est pas significativement réduite lorsque les souris infectées reçoivent une dose curative de bactériophages ($1.9x10^6$ et $1.1x10^6$ neutrophiles / mL de BAL chez les souris WT et *cftr* $^{-/-}$ respectivement ; Test de Mann-Whitney). Ces résultats montrent que l'administration intranasale de bactériophages ne stimule ni la prolifération, ni le recrutement des PMN de manière suffisamment importante pour que cela soit observable dans les BAL 16 h après le traitement. Cela est en accord avec les faibles concentrations des médiateurs inflammatoires mesurées dans les BAL de ces souris.

C. L'influence des bactériophages sur le transport ionique

1. Mise au point de la technique de mesure de différence de potentiel (ddp) nasale chez la souris

La mise au point de la technique de mesure de ddp fait partie intégrante de mon travail de thèse. Cependant, dans un souci de clarté, l'article issu de ce travail (article 2) n'est pas inclus dans cette partie « Résultats expérimentaux ». Une partie de cet article est consacrée à l'étude de souris F508del-CFTR ainsi qu'à la mise au point d'outils associés aux mesures de ddp permettant d'évaluer l'efficacité de potentielles drogues thérapeutiques à corriger le défaut de la protéine CFTR portant la mutation F508del-CFTR. Or, dans la présente étude sur l'innocuité des bactériophages, nous n'avons pas utilisé ce modèle mais des souris *cftr*$^{-/-}$. Ainsi, dans les paragraphes suivants, sont résumés les principaux résultats ayant permis la suite de ce travail de thèse, l'ensemble des résultats étant détaillé dans l'article 2 fourni en annexes.

ARTICLE 2 (cf. annexes)

Validation of nasal potential difference in *cftr* knockout and F508del-CFTR mice

Emilie Saussereau, Delphine Roussel, Siradiou Diallo, Laurent Debarbieux, Aleksander Edelman and Isabelle Sermet-Gaudelus

Soumis PlosONE

Résumé de l'article :

Dans le cadre de la mucoviscidose, le transport ionique au niveau de l'épithélium respiratoire est un paramètre clé. Notre étude sur l'innocuité d'un traitement par bactériophages s'est donc orientée vers l'impact potentiel que les bactériophages pourraient avoir sur le transport ionique.

Afin de réaliser cette étude, la technique de mesure de ddp nasale a été développée chez la souris, adaptée à partir de la technique mise en œuvre chez l'humain par I. Sermet. Le principe de la technique est détaillé en introduction (cf. I.F.3). L'objectif de ce travail était de développer les outils nécessaires pour identifier et interpréter, à la suite d'un traitement, les éventuelles modifications de transports d'ions au niveau de l'épithélium nasal, en particulier l'absorption de sodium et la sécrétion de chlorure.

Ainsi cet article s'articule en 3 axes :

1- Nous avons réalisé des mesures de ddp sur 2 modèles de souris CF, *cftr* $^{-/-}$ qui est le modèle utilisé dans ce travail de thèse, et F508del-CFTR qui est le modèle murin utilisé au laboratoire afin d'étudier le potentiel thérapeutique de diverses molécules pour restaurer l'activité de la protéine CFTR mutée. Des mesures ont également été réalisées pour les souris contrôles (WT) respectifs de ces deux modèles CF. Des exemples de tracés représentatifs des mesures de ddp sont présentés dans la Figure 1 de l'article 2 (cf. annexes). A partir de l'ensemble des mesures, des valeurs standard ont été déterminées pour 5 paramètres de la mesure de ddp (Table 13):

- la ddp basale (Basale) reflétant majoritairement l'absorption du sodium au travers de l'épithélium.
- la réponse à l'amiloride (ΔAmil.), un inhibiteur spécifique du principal canal sodium, ENaC. Cet inhibiteur induit une dépolarisation proportionnelle à l'activité basale du canal ENaC.
- la réponse à une perfusion pauvre en ions chlorure, favorisant la sécrétion de cet ion. Cela se traduit par une hyperpolarisation dont l'amplitude reflète la perméabilité membranaire pour le chlorure (ΔLowCl$^-$).

- la réponse à l'inhibiteur spécifique de CFTR, l'Inh-172, indicateur de l'activité de CFTR (ΔInh-172).
- la réponse au DIDS, un inhibiteur des canaux chlorure non spécifique hormis pour CFTR qui y est insensible.

Cette première partie a permis, entre autre, d'évaluer la perméabilité de l'épithélium nasal respiratoire au sodium et au chlorure et de déterminer la nature de ces transports, dans les deux modèles CF et leur contrôle WT utilisés au laboratoire. Nous avons ainsi déterminé des valeurs de référence selon le protocole que nous avions défini.

	Valeurs standard				**Comparaison (*p*-value)**			
	B6;129		FVB		B6;129 (WT / $cftr^{-/-}$)	FVB (WT / F508del)	WT (B6;129 / FVB)	CF ($cftr^{-/-}$ / F508del)
	WT	$cftr^{-/-}$	WT	F508del				
Basale (mV) Médiane (IQR)	-4.9 (3.5) *n* = 50	-20.9 (6.5) *n* = 50	-4.2 (5.2) *n* = 25	-13.3 (5.4) *n* = 50	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
ΔAmil (mV) Médiane (IQR)	1.6 (1.3) *n* = 50	9,1 (4.2) *n* = 50	1.5 (1.7) *n* = 25	7.1 (4.2) *n* = 50	<0.0001	<0.0001	ns	0.002
Δ Low Cl- (mV) Médiane (IQR)	-7.8 (3.8) *n* = 50	3.0 (4.1) *n* = 50	-4.7 (5.3) *n* = 25	0.8 (2.4) *n* = 50	<0.0001	<0.0001	0.003	0.001
Δ Inh-172 (mV) Médiane (IQR)	1.6 (2.3) *n* = 50	0.9 (1.7) *n* = 50	1.6 (3.1) *n* = 17	0.2 (2.0) *n* = 45	0.02	0.05	ns	ns
Δ DIDS (mV) Médiane (IQR)	2.0 (1.7) *n* = 38	3.1 (3.1) *n* = 32	2.4 (2.8) *n* = 9	2.9 (3.9) *n* = 6	0.003	ns	ns	ns

Table 13 : Valeurs standard de ddp pour les 5 paramètres chez les souris B6;129 et FVB

Les valeurs sont exprimées par la médiane ± l'écart interquartile (IQR) pour les souris B6;129 WT et $cftr^{-/-}$ ainsi que les souris FVB WT et F508del-CFTR. Les groupes sont comparés en utilisant le test de Mann-Whitney.

2- Des mesures répétées 2 fois pour un même groupe d'animaux ont permis de déterminer la répétabilité de la technique. Cette partie de l'étude a été réalisée pour les souris *cftr* $^{-/-}$ et leur contrôle (Figure 32). Nous avons ainsi montré que les valeurs de ddp obtenues pour un groupe de souris ne différaient pas significativement des valeurs obtenues pour ce même groupe de souris lors d'une seconde mesure (test des rangs signés de Wilcoxon). C'est ici un aspect primordial pour la suite du travail.

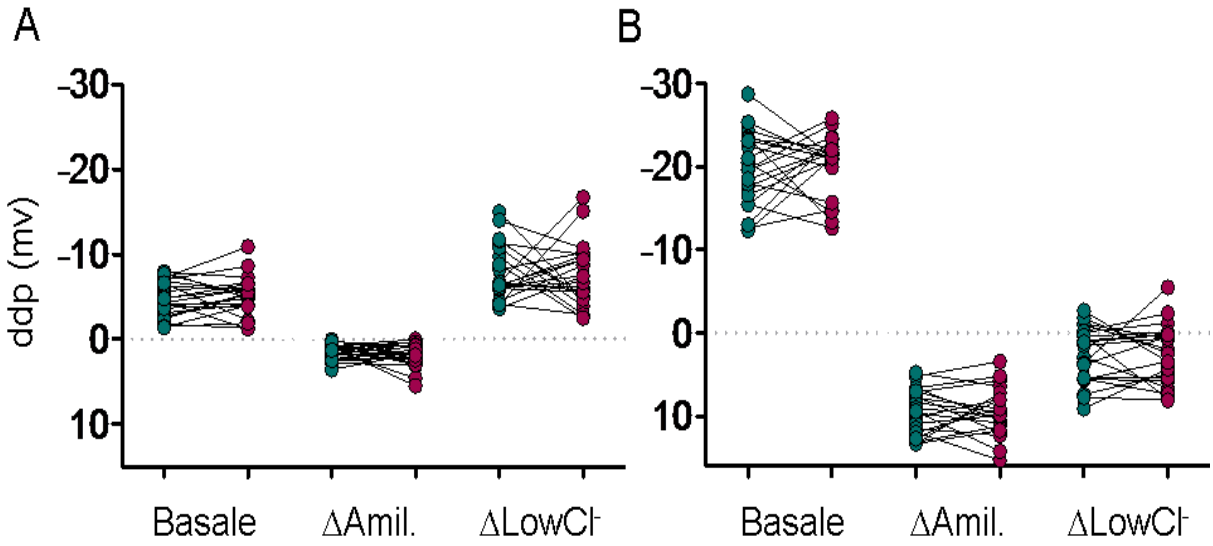


Figure 32 : Répétabilité entre deux mesures de ddp chez la souris B6 ;129

Pour les deux groupes de souris, WT (A) et cftr$^{-/-}$ (B), une première mesure de ddp a été réalisée (•) puis, au minimum 7 jours plus tard et chez les mêmes animaux une seconde mesure a été réalisée (•). Les valeurs sont représentées de manière appariée pour chaque souris et pour les trois principaux paramètres de la mesure de ddp.

D'autre part, une représentation graphique de Bland-Altman a été réalisée, chez les souris WT et *cftr* $^{-/-}$, pour la ddp basal, le ΔAmil. et le ΔLowCl$^-$, (détails dans l'article 2 fourni en annexes). Cette représentation est basée sur les différences entre deux mesures réalisées chez un même animal (Bland & Altman, 1986). Elles nous ont permis de définir un intervalle de variations type entre deux mesures, pour les 3 principaux paramètres mesurés : ddp basale, ΔAmil. et ΔLowCl$^-$ (Table 14). Ainsi, lors d'un traitement par bactériophages ou autre, le transport ionique pourra être considéré comme modifié lorsque les différences observées entre les 2 mesures, avant et après traitement, ne seront pas comprises dans cet intervalle.

	Intervalle de variation
WT	
Basale	4.4 / -3.9
Δ Amil	2.7 / -3.4
Δ Low Cl-	10.4 / -11.2
cftr$^{-/-}$	
Basale	11.3 / -10.3
Δ Amil	5.8 / -6.1
Δ Low Cl-	7.1 / -6.9

Table 14: Valeurs définissant la variabilité intra-animal entre 2 mesures de ddp répétées

Les deux limites des intervalles définissent la variabilité intra-animal et sont obtenues à partir d'une analyse statistique des différences observées entre 2 mesures de ddp, chez les mêmes animaux, en dehors de tout traitement. L'analyse statistique est basée sur la représentation graphique de Bland et Altman qui est détaillée dans l'article 2 (exemple pour le ΔLowCl⁻ dans la Figure 2 C et D de l'article 2). Lors d'un traitement quelconque, la différence entre la mesure avant et après traitement devra être supérieure à ces limites pour pouvoir être attribuée au traitement et non à la variabilité des mesures.

3- La troisième partie de ce travail a été réalisée à partir des valeurs standard obtenues chez les souris F508del-CFTR et leur contrôles WT. Une analyse statistique nous a permis d'établir des valeurs seuils indicatrices d'un transport ionique normal (Figure 3 de l'article 2). Ces seuils sont très utiles afin d'évaluer, chez les souris portant la mutation F508del-CFTR, la potentielle restauration du transport ionique induite par différentes drogues à l'essai.

Ces données ont d'ailleurs permis de confirmer, *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro* montrant l'efficacité de molécules potentiellement thérapeutiques pour corriger le défaut de la protéine F508del-CFTR (Article 3 fourni en annexes).

L'ensemble de ces données constituent les outils nécessaires à l'interprétation des mesures de ddp réalisées dans le but d'identifier les potentielles modifications induites par un traitement donné.

2. Exploration du transport ionique dans le contexte d'une d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* et / ou d'un traitement par bactériophages

Comme pour la partie de l'étude portant sur l'inflammation, le bactériophage P3-CHA a été utilisé. Le modèle d'infection pulmonaire aiguë utilisé est également le même, *i. e.* les souris WT et *cftr* $^{-/-}$ ont reçu respectivement $1.5x10^6$ et $0.5x10^6$ cfu de la souche CHA pour l'infection ou un traitement avec respectivement $1.5x10^7$ et $0.5x10^7$ pfu du bactériophage P3-CHA, par voie intranasale dans les deux cas. Les souris infectées puis traitées ont reçu ce même traitement par bactériophages 2 h après l'infection.

Lors des mesures de ddp, quatre paramètres sont systématiquement étudiés :

- la ddp basale (Basale)
- la réponse à l'amiloride (ΔAmil.)
- la réponse à une perfusion pauvre en ions chlorure ($\Delta LowCl^-$)
- la réponse à un inhibiteur spécifique de CFTR (ΔInh-172)

Dans certaines conditions, le DIDS, un inhibiteur non spécifique des canaux chlorure hormis CFTR, est utilisé.

Deux mesures de ddp sont réalisées, chaque souris étant son propre contrôle :

- en dehors de tout traitement et au moins une semaine avant l'infection et/ou le traitement (J_0)
- 16 h post-infection (infection ou infection + traitement) ou post-traitement par bactériophages seuls (T_{16})

Dans les trois conditions (infection, traitement, infection + traitement) et pour chaque paramètre de ddp (ddp basal, ΔAmil., $\Delta LowCl^-$ et ΔInh-172), la différence entre les mesures J_0 et T_{16} est évaluée pour chaque groupe de souris par le test des rangs signés de Wilcoxon (Wilc.).

D'autre part, les limites d'intervalles définissant la variabilité intra-animal de notre modèle (cf. Table 14 et article 2) ont été utilisées pour analyser ces résultats. Ainsi, lors de l'infection ou du traitement, si les différences entre deux mesures de ddp sont comprises entre ces limites dans 95 % des cas, alors elles seront attribuées à la variabilité intra-animal et non à l'infection et/ou au traitement.

a) Etude de souris WT

Pour le groupe de souris infectées comme pour le groupe uniquement traité par le bactériophage P3-CHA, aucune différence significative n'est observée entre les mesures réalisées avant l'infection/traitement et celles réalisées après, pour aucun des quatre paramètres de ddp étudiés (Wilc. $p > 0.05$). Dans chacun des cas, les valeurs de ddp obtenues sont semblables aux valeurs standards établies dans l'Article 2. Ces résultats sont illustrés dans la figure 33A. De plus, d'après la représentation de Bland-Altman, ces différences correspondent à la variabilité intra-animal (Table 15). En revanche, malgré des différences non significatives entres les mesures J_0 et T_{16} (Wilc. $p > 0.05$), les souris du groupe infecté puis traité par le bactériophage P3-CHA présentent un transport du sodium semblant être légèrement altéré. En effet, entre les mesures J_0 et T_{16} de ddp basale et ΔAmil., plus de 35 % des souris montrent des différences non-inclues entre les limites standard de la variabilité intra-animal (Table 15). Parallèlement, les dénombrements dans les BAL de ces souris montrent que le traitement par P3-CHA a réduit le nombre de *P. aeruginosa* d'environ 1,5 log (Figure 33B). Ces résultats suggèrent que l'infection pulmonaire par la souche CHA et que le bactériophage P3-CHA, séparément, ne perturberaient pas de manière conséquente les transports du sodium et ni du chlorure.

	Infection par CHA n= 14	Traitement par P3-CHA n = 13	Infection + Traitement n = 11
ddp basale	~ 95	~ 95	~ 65
ΔAmil.	~ 95	100	~ 65
ΔLowCl	100	~ 95	100

Table 15 : Analyse de la représentation de Bland et Altman pour 3 paramètres de ddp chez des souris WT infectées et/ou traitées

Sont exprimés, pour chaque cas, le pourcentage de souris dont les différences entre les mesures J_0 et T_{16} *sont inclues entre les limites standard définies. Ces limites ont étés établies grâce à représentation de Bland-Altman réalisée en fonction de deux mesures répétées chez les mêmes souris, en dehors de tout traitement, et définissent la variabilité intra-animal dans notre modèle de mesure de ddp (Article 2). Lors de l'infection et/ou du traitement, les différences entre deux mesures de ddp seront attribuées à la variabilité intra-animal seulement si au moins 95 % d'entre elles sont comprises entre ces limites.*

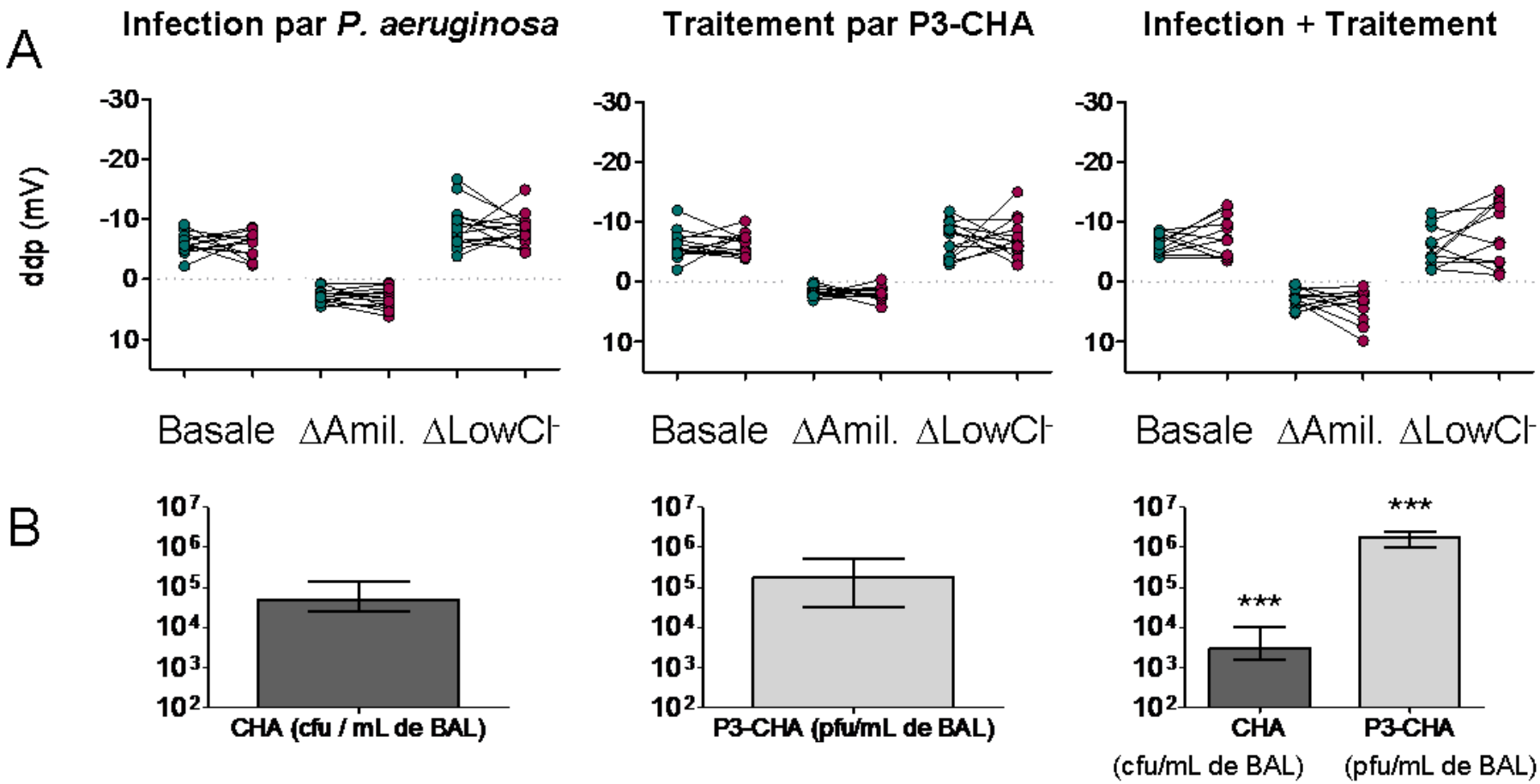


Figure 33 : Mesure de ddp dans 3 conditions d'infection pulmonaire et/ou traitement par bactériophages chez la souris WT

*Une première mesure de ddp a été réalisée pour chacune des souris au minimum une semaine avant l'infection et / ou le traitement (•). Une mesure à ensuite été réalisée sur ces mêmes souris 16 h après l'infection (pour les souris infectées et les souris infectées puis traitées) ou après le traitement par P3-CHA seul (•). (A) La ddp basale, la réponse à l'amiloride et la réponse à la perfusion d'une solution pauvre en ions chlorure ont été mesurées. (B) Les bactéries et/ou les bactériophages ont été dénombrés dans les BAL de ces souris. Les données sont exprimées en médianes (± InterQuartile Range). *** : $p < 0,0001$, en comparaison avec l'infection seule ou le traitement seul (Test de Mann-Whitney).*

b) Etude d'un modèle murin de mucoviscidose

Les résultats obtenus chez les souris WT montrent que les bactériophages ne semblent pas perturber le transport ionique. Cependant, il est important de tester cette hypothèse dans un environnement CF, où les propriétés de l'épithélium sont différentes avec une absorption du sodium exagérée et une sécrétion du chlorure dépendante de CFTR inexistante. Les résultats de ddp obtenus chez la souris *cftr* $^{-/-}$, montrent de la même manière que chez les souris WT, qu'une administration intranasale de $5x10^6$ pfu du bactériophage P3-CHA n'affecte ni l'activité du canal ENaC ni le transport du chlorure alternatif à CFTR (Figure 34A ; Table 16 et 17).

En revanche, l'infection pulmonaire par $0.5x10^6$ cfu de la souche CHA provoque, chez ces souris, une inhibition partielle significative de l'activité du canal ENaC (Figure 34A ; Table 17). Celle-ci ne peut pas être attribuée à la variabilité normale (Table 16). Les valeurs de ddp basale et du ΔAmil. sont d'ailleurs diminuées par rapport aux valeurs standard décrites dans l'article 2, à savoir une valeur médiane de ddp basale de -15.9 mV (IQR = 7.6 mV) vs. -20.9 mV (IQR = 6.5) et une valeur médiane du ΔAmil. de 6.6 mV (IQR = 5.7 mV) vs. 9.1 mV (IQR = 4.2 mV) (cf. Table 13). Cette altération de l'activité du canal ENaC n'est pas retrouvée dans le lot de souris ayant reçu une dose curative de bactériophages 2 h après l'infection. Ces résultats suggèrent que, dans un contexte CF, le traitement par bactériophages tend à éliminer les perturbations du transport du sodium causées par l'infection à *P. aeruginosa*.

D'autre part le transport du chlorure semble stimulé par l'infection à *P. aeruginosa* (Figure 34). Cette stimulation est peu marquée et pourrait être attribuée à la variabilité normale (Table 16). Cependant, chez les souris infectées comme chez les souris infectées puis traitées, les valeurs entre les mesures J_0 et T_{16} diffèrent significativement (Table 17). De plus, il est à noter que respectivement 46 % et 33 % de ces souris montrent une hyperpolarisation en réponse à la solution pauvre en chlorure de respectivement -2.4 mV (± 1.2 mV) et -3.1 mV (± 1.5 mV) en moyenne. Or, en dehors de toute infection, ce phénomène est observé chez seulement 18 % des souris *cftr* $^{-/-}$ et avec une amplitude moyenne de seulement -0.6 mV (± 0.5 mV) (n = 50). Il semble donc que l'infection par la souche CHA de *P. aeruginosa* stimule la sécrétion des ions chlorure, par des canaux alternatifs à CFTR. Cette hypothèse est renforcée par la valeur du ΔDIDS, inhibiteur des canaux chlorure hormis CFTR, qui est significativement plus élevée chez les souris infectées puis traitées (Table 17 ; 6.6 mV (IQR = 4.6 mV) vs. 2.6 mV (IQR = 2.9 mV)).

	Infection par CHA	Traitement par P3-CHA	Infection + Traitement
	n= 13	n = 14	n = 9
ddp basale	~ 70	~ 95	100
ΔAmil.	~ 75	100	~ 90
ΔLowCl	~ 95	~ 95	~ 90

Table 16 : Analyse de la représentation de Bland et Altman pour 3 paramètres de ddp chez des souris *cftr*$^{-/-}$ infectées et/ou traitées

Est exprimé, pour chaque cas, le pourcentage de souris dont les différences entre les mesures J_0 et T_{16} *sont inclues entre les limites standards définies. Ces limites ont étés établies grâce à représentation de Bland-Altman réalisée en fonction de deux mesures répétées chez les mêmes souris, en dehors de tout traitement, et définissent la variabilité intra-animal dans notre modèle de mesure de ddp (Article 2). Lors de l'infection et/ou du traitement, les différences entre deux mesures de ddp seront attribuées à la variabilité intra-animale seulement si au moins 95 % d'entre elles sont comprises entre ces limites.*

	Infection par CHA	Traitement par P3-CHA	Infection + Traitement
	n= 13	n = 14	n = 9
ddp basale	** (0.0052)	ns	ns
ΔAmil.	* (0.0342)	ns	ns
ΔLowCl-	* (0.0327)	ns	* (0.0273)
ΔInh-172	ns	ns	ns
ΔDIDS	nd	ns	* (0.0313)

Table 17 : Analyse des différences entre les mesures de ddp réalisées avant et après infection / traitement chez la souris *cftr*$^{-/-}$

*La différence entre les mesures de ddp réalisées avant l'infection et/ou le traitement (J_0) et celles réalisées après (T_{16}) est évaluée, pour chaque paramètre de la mesure de ddp, par le test des rangs signés de Wilcoxon (Wilc.). ns : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; nd : non déterminé.*

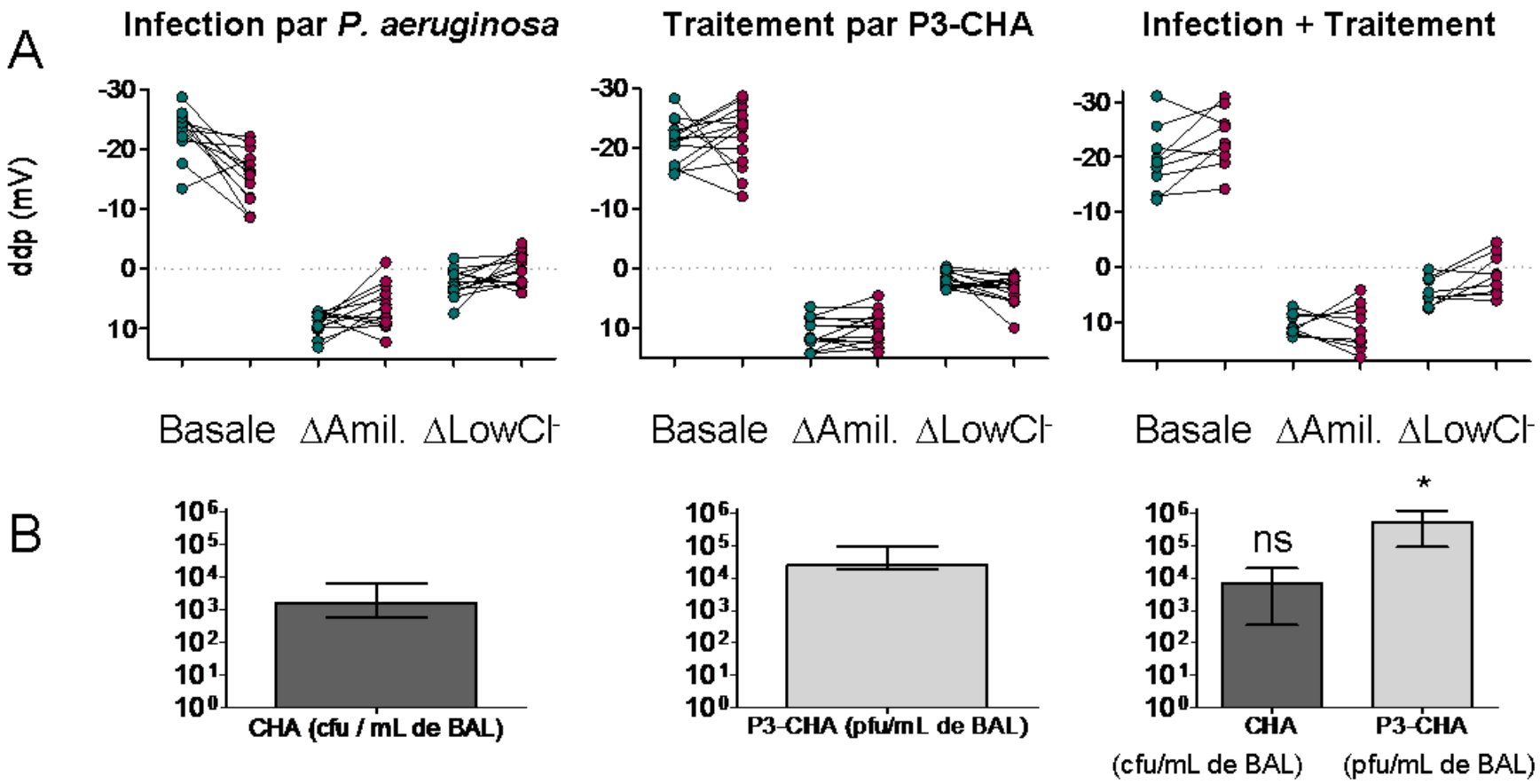


Figure 34 : Mesure de ddp dans 3 conditions d'infection pulmonaire et/ou traitement par bactériophages chez la souris *cftr*$^{-/-}$

*Une première mesure de ddp a été réalisée pour chacune des souris au minimum une semaine avant l'infection et / ou le traitement (•). Une mesure à ensuite été réalisée sur ces mêmes souris 16 h après l'infection (pour les souris infectées et les souris infectées puis traitées) ou après le traitement par P3-CHA seul (•). (A) La ddp basale, la réponse à l'amiloride et la réponse à la perfusion d'une solution pauvre en ions chlorure ont été mesurées. (B) Les bactéries et/ou les bactériophages ont été dénombrés dans les BAL de ces souris. Les données sont exprimées en médianes (± InterQuartile Range). * : $p < 0,05$; ns : non significatif, en comparaison avec l'infection seule ou le traitement seul (Test de Mann-Whitney.*

V. Evaluation de la capacité des bactériophages à infecter des souches de *P. aeruginosa* au sein même d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose

Après avoir démontré l'efficacité puis l'innocuité des bactériophages *in vivo* dans des modèles murins, notre étude sur le potentiel thérapeutique des bactériophages s'est orientée vers un modèle *ex-vivo* humain. En effet, l'hyperproduction de mucus retrouvée dans les poumons des patients CF ne peut pas être reproduite chez la souris CF. Or, la viscosité du mucus mais aussi la présence d'autres facteurs (macrophages, flore des poumons…) pourraient représenter des obstacles à l'efficacité des bactériophages pour infecter les souches de *P. aeruginosa*. Il nous est donc apparu essentiel de tester l'efficacité des bactériophages au sein même d'expectorations de patients CF qui représentent le milieu le plus proche d'une situation clinique.

Je présenterai ci-dessous les expériences préliminaires, réalisées à partir de 5 échantillons, qui m'ont permis d'élaborer un protocole expérimental qui pourra par la suite être appliqué à un plus grand nombre d'échantillons.

A. Le choix du cocktail de bactériophages

L'objectif étant de mimer une situation clinique, nous avons choisi de travailler en aveugle, *i.e.* sans effectuer une identification préalable des souches de *P. aeruginosa* présentes dans les expectorations. L'étude vise ainsi à tester la capacité des bactériophages à infecter les bactéries sensibles dans les expectorations de patients CF, et non d'établir la fréquence à laquelle les bactéries sont effectivement sensibles. Nous avons donc formulé un cocktail à partir de 10 bactériophages disponibles au laboratoire et qui ont pour hôte spécifique les 4 souches suivantes :

- Souche PAK : PAK-P1, PAK-P2, PAK-P3, PAK-P4 et PAK-P5,
- Souche CHA : P3-CHA et CHA-P1
- Souche PAO1 : LUZ19 et ΦKZ
- Souche Aa245 : LBL3

Il est à noter que bien qu'ils soient proches, les 5 bactériophages isolés sur la souche PAK ne présentent pas le même spectre d'hôte vis-à-vis de 20 souches CF (Table 18). Leur combinaison permet donc d'élargir le spectre du cocktail.

Bactériophages	PAK-P1	PAK-P2	PAK-P3	PAK-P4	PAK-P5
3078	+	++	.	.	.
3514	+	.	.	.	.
3894	.	.	.	.	.
4236	+++	+++	++	+++	+++
4250	+++	+++	+++	+++	+++
4276	+++	+++	+++	+++	+++
4317	+++	+++	.	+++	++
4351	+++	+++	+++	+++	.
4442	+++	+++.	.	+++	+++
4556	.	.	.	.	.
3354	.	.	.	.	.
3408	+	++	+++	++	+++
3445	+	.	.	.	.
3448	.	.	.	.	.
3465	+	++	+++	++	+++
3475	.	.	.	.	++
3508	.	.	.	.	.
3526	.	.	.	.	++
3649	++	++	++	++	.
4121	.	.	.	.	.

Table 18 : Spectre d'hôte des 5 bactériophages isolés sur la souche PAK

L'efficacité à former des plages de lyses (EFP) a été déterminée par calcul du rapport suivant : [titre du bactériophage sur la souche donnée / titre du bactériophage sur la souche PAK de référence x *100]. Pour simplifier la lecture, les données ont été classées par groupe de valeurs : • = 0 % ; 0 < + < 0.01 % ; 0.01 % ≤ ++ < 10 % ; +++ ≥ 10 %. Dix souches de P. aeruginosa ont été isolées de primo-infections de patients CF (gris) et dix ont été isolées de patients CF infectés de manière chronique (orange).*

B. Faisabilité de la méthode

Trois échantillons, fluidifiés grâce à une solution de Sputasol™, ont été incubés chacun en présence de 10^7 pfu/mL de chacun des bactériophages du cocktail pendant 2h30. Les bactéries ont été dénombrées dans les échantillons, avant et après l'incubation, sur milieu sélectif de *P. aeruginosa* (gélose contenant 0.03 % de cétrimide et incubée à 42 °C). La quantité de bactériophages réellement ajoutée à l'échantillon a été déterminée par titration du cocktail sur les souches de *P. aeruginosa* PAK et CHA, chacun des bactériophages du cocktail étant capable de lyser au moins une de ces deux souches. La quantité de bactériophages présents dans l'échantillon après incubation a été déterminée par titration de l'échantillon sur ces 2 mêmes souches.

Les résultats obtenus pour ces échantillons montrent 3 profils différents (Tables 19 et 20):

- l'échantillon 1 : les bactériophages ne semblent pas avoir infecté la/les souches de *P. aeruginosa* présentes dans l'expectoration, aucune réduction du nombre de bactéries ainsi qu'aucune multiplication des bactériophages n'est observée.
- l'échantillon 2 : le nombre de bactéries est réduit de 8 % et des bactériophages capables de lyser la souche CHA se sont multipliés par ~ 6 durant les 2h30 d'incubation.
- l'échantillon 3 : aucune bactérie n'a pu être dénombrée dans cet échantillon après l'incubation avec le cocktail de bactériophages. Il est à noter que si le nombre de bactériophages est supérieur au nombre de bactéries sensibles alors la numération des bactéries devient impossible. Ce résultat est en accord avec la multiplication par 22 des bactériophages dénombrés sur la souche PAK et par 45 de ceux dénombrés sur la souche CHA.

Ces résultats montrent qu'au moins un des bactériophages du cocktail a été capable d'infecter la/les souches de *P. aeruginosa* dans l'expectoration n°3 et au moins une des souches de l'expectoration n°2 puisque dans ces deux cas l'augmentation du nombre de bactériophages a été observée.

	P. aeruginosa
Echantillon 1	104 %
Echantillon 2	92 %
Echantillon 3	0 %

Table 19 : Quantification des bactéries dans les échantillons après incubation 2h30 avec le cocktail de bactériophages

La quantité de bactéries présentes dans les échantillons, après incubation en présence du cocktail de bactériophages, est exprimée en pourcentage du ratio [bactérie dénombrées après incubation / bactérie dénombrées dans l'échantillon initial avant l'ajout des bactériophages].

	Bactériophages	
	PAK	**CHA**
Echantillon 1	0.3	1.5
Echantillon 2	0.2	6.2
Echantillon 3	22	45

Table 20 : Quantification des bactériophages du cocktail dans les échantillons après une incubation 2h30

La quantité de bactériophages présents dans les échantillons, après 2h30 d'incubation en présence du cocktail de bactériophages, est exprimée par le ratio [bactériophages dénombrées après incubation / bactériophages ajoutés dans l'échantillon]. Les bactériophages ont été dénombrés sur les souches PAK et CHA.

C. Sensibilité aux bactériophages des souches de **P. aeruginosa** *présentes dans les expectorations*

La sensibilité de 8 colonies de *P. aeruginosa* isolées à partir des échantillons 1 et 2 a été testée pour les 10 bactériophages du cocktail (Table 21). L'échantillon 1, qui ne présentait pas de réduction du nombre de bactéries après l'incubation avec le cocktail, ni d'amplification des bactériophages du cocktail, montrent ici une sensibilité de 50 % à 100 % des colonies aux bactériophages PAK-P3, ΦKZ et LUZ19. Ces bactériophages sont donc capables de former des plages de lyses sur ces souches de *P. aeruginosa in vitro* sur milieu gélosé, alors qu'ils ne semblent pas pouvoir infecter ces souches *ex vivo* dans les expectorations. En revanche, il semblerait que la réduction du nombre de *P. aeruginosa* ainsi que la multiplication des bactériophages dénombrés sur la souche CHA dans l'échantillon 2, résultent de la sensibilité de la moitié des souches au bactériophage LBL3.

	PAK-P1	PAK-P2	PAK-P3	PAK-P4	PAK-P5	P3-CHA	CHA-P1	ΦKZ	LUZ19	LBL3
Echantillon 1										
colonie 1	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.
colonie 2	.	.	+	.	.	.	.	+	+	.
colonie 3	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.
colonie 4	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.
colonie 5	.	.	+	.	.	.	.	+	+	.
colonie 6	.	.	+	.	.	.	.	+	+	.
colonie 7	.	.	+	.	.	.	.	+	+	.
colonie 8	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.
Echantillon 2										
colonie 1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
colonie 2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
colonie 3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
colonie 4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
colonie 5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
colonie 6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+
colonie 7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
colonie 8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Table 21 : Sensibilité des colonies de *P. aeruginosa* isolées des échantillons 1 et 2 aux bactériophages du cocktail

Les colonies isolées ont été striées sur milieu gélosé puis un spot de $3x10^6$ *pfu de chacun des bactériophages à été déposé séparément. La souche est considérée comme sensible lorsque des plages de lyses non isolées sont observées (+) et résistante si peu ou pas de plages de lyse sont observables (.).*

D. Optimisation du protocole

Deux autres échantillons (n°4 et n°5), fluidifiés grâce à une solution de Sputasol™, ont été incubés chacun en présence de 10^6 pfu/mL de chacun des bactériophages du cocktail pendant 4 h et 6 h. Les bactéries et les bactériophages ont été dénombrés de la même manière que pour les trois échantillons précédents mais cette fois sur les 4 souches de référence pour les 10 bactériophages du cocktail.

Dans les deux échantillons, l'incubation pendant 4 h en présence de bactériophages a permis de réduire le nombre de bactéries, de 50 % pour l'échantillon 4 et de 85 % pour l'échantillon 5. Deux heures d'incubation supplémentaires n'ont pas permis de réduire d'avantage le nombre de bactéries dans l'échantillon 4, en revanche pour l'échantillon 5, le nombre de bactéries est encore réduit d'un facteur 2 (Table 22).

	4h	**6h**
Echantillon 4	50 %	60 %
Echantillon 5	15 %	6 %

Table 22 : Quantification des bactéries dans les échantillons en fonction du temps d'incubation avec le cocktail de bactériophages

La quantité de bactéries présentes dans les échantillons, après 4 h et 6 h d'incubation en présence du cocktail de bactériophages, est exprimée en pourcentage du ratio [bactérie dénombrées après incubation / bactérie dénombrées dans l'échantillon initial avant l'ajout des bactériophages].

Ces résultats concordent avec l'augmentation de bactériophages observée dans les échantillons. En effet, après 4 h d'incubation, les bactériophages dénombrés sur la souche CHA ainsi que ceux dénombrés sur la souche PAK se sont multipliés par 2 environ dans les 2 échantillons, et par 3 pour les bactériophages dénombrés sur la souche PAO1, dans l'échantillon 5. Après 6 h d'incubation, cette amplification des bactériophages dénombrés sur la souche PAO1 est encore plus marquée avec une multiplication par 4.3 et 5 respectivement pour les échantillons 4 et 5 (Table 23).

En premier lieu, ces résultats confirment la faisabilité de l'étude et conduisent au choix d'une incubation de 6 h. En effet, entre 4 h et 6 h, le nombre de bactériophages a augmenté dans les deux échantillons et le nombre de bactéries est réduit pour l'échantillon 5.

D'autre part, les résultats obtenus sur ces échantillons 4 et 5 suggèrent qu'ici LUZ19 et ΦKZ, seuls bactériophages du cocktail capables de lyser la souche PAO1 (LUZ19 lysant également la souche CHA et ΦKZ la souche PAK), sont capables d'infecter des souches de *P. aeruginosa* présentes au sein d'expectorations de patients CF.

	4h				6h			
	PAK	**CHA**	**PAO1**	**Aa245**	**PAK**	**CHA**	**PAO1**	**Aa245**
Echantillon 4	1.7	2.8	1.4	1	2	3.6	4.3	0.9
Echantillon 5	2.2	2.9	3.6	1.3	1.9	2.7	5	0.8

Table 23 : Quantification des bactériophages dans les échantillons en fonction du temps d'incubation

La quantité de bactériophages présents dans les échantillons, après 4 h et 6 h d'incubation en présence du cocktail de bactériophages, est exprimée par le ratio [bactériophages dénombrées après incubation / bactériophages ajoutés dans l'échantillon]. Les bactériophages ont été dénombrés sur les 4 souches référence des bactériophages utilisés dans le cocktail.

E. Détermination de la présence de bactériophages dans les expectorations des patients

Il a été montré que les expectorations des patients CF pouvaient, de manière plus ou moins fréquente, contenir des bactériophages de *P. aeruginosa* (Willner *et al.*, 2009). Pour cette raison, avant l'ajout du cocktail, nous avons vérifié la présence, dans les expectorations, de bactériophages capables de lyser l'une des 4 souches de référence utilisées (PAK, CHA, PAO1 et Aa245). Aucun des 5 échantillons étudiés ne renfermaient de tels bactériophages.

F. Protocole final

Ces expériences préliminaires nous ont permis de décrire un protocole adapté pour évaluer la capacité d'un cocktail de bactériophage à infecter des souches de *P. aeruginosa* présentes au sein des expectorations des patients CF infectés de façon chronique.

1- Les échantillons seront dilués en Sputasol car il permet de manipuler avec précision les expectorations.

2- Le cocktail de bactériophages sera composé des 10 bactériophages décrits ici.

3- Le temps d'incubation de l'échantillon en présence du cocktail est défini à 6h.

4- Afin de prendre en compte la croissance bactérienne au cours de l'incubation, la référence utilisée pour calculer la réduction du nombre de bactéries ne sera plus le nombre de *P. aeruginosa* présentes avant l'ajout du cocktail mais le nombre de bactéries dénombrées dans un aliquote de l'échantillon incubé pendant 6 h sans bactériophage.

5- La multiplication des bactériophages sera le paramètre prioritaire, la réduction du nombre de bactéries le secondaire, pour conclure à une efficacité des bactériophages à infecter les souches présentes dans les expectorations. En effet, en observant la sensibilité des souches isolées de l'échantillon 2, il est aisé d'envisager que les bactériophages puissent cibler une souche de *P. aeruginosa* minoritaire dans l'échantillon. Dans ce cas, une amplification des bactériophages serait observée en absence d'une réduction globale du nombre de bactéries.

6- La présence préalable de bactériophages dans les expectorations (avant l'ajout du cocktail) et lysant les 4 souches de référence utilisées sera testée. Ainsi, l'hypothèse que de tels bactériophages interfèrent dans le dénombrement des bactériophages pourra être infirmée, ou confirmée, et facilitera l'interprétation de ces résultats.

7- Vingt colonies seront isolées à partir de chaque échantillon pour tester leur sensibilité individuelle aux bactériophages du cocktail. Cela permettra ainsi de mieux apprécier la diversité des souches présentes dans les échantillons vis-à-vis de leur sensibilité aux bactériophages. Cependant, une absence de colonie sensible ne sera pas indicatrice d'une absence totale de telles colonies dans l'échantillon entier. A l'inverse, la présence de colonie(s) sensible(s) dans ces conditions *in vitro* n'impliquera pas nécessairement une efficacité des bactériophages dans l'expectoration. Ce test permettra de conforter les résultats obtenus lorsque la présence ou l'absence de colonie sensible sera en accord avec l'efficacité ou non des bactériophages à se multiplier au sein de ces expectorations.

A terme ce protocole sera utilisé pour une étude portant sur 60 expectorations de patients CF provenant de 3 centres hospitaliers différents.

Discussion et Perspectives

Peu d'études expérimentales sont disponibles concernant l'utilisation des bactériophages pour traiter les infections pulmonaires causées par *P. aeruginosa*. Pourtant, l'utilisation de modèles animaux est un pré-requis indispensable avant une utilisation chez l'Homme en essais cliniques. Ils permettent de reproduire des pathologies humaines dans des organismes entiers, grâce entre autre à des manipulations génétiques, apportant ainsi des réponses sur les fondements physiologiques d'une maladie ainsi que des données prédictives sur la réponse aux traitements. Dans le cas particulier des modèles murins, leur large utilisation en recherche expérimentale permet d'améliorer continuellement les connaissances concernant leur anatomie et leur physiologie. Ainsi, nous savons aujourd'hui que les conditions d'hébergement, le stress des animaux, l'utilisation des anesthésiques ou encore le fond génétique influencent les résultats des expériences. Ces notions permettent d'affiner la comparaison entre la pathologie observée chez la souris et celle développée chez l'Homme. Elles permettent également la mise au point de modèles de plus en plus pertinents. Il a par exemple été montré que l'établissement d'une infection pulmonaire persistante avec une souche clinique de *P. aeruginosa* était possible chez les souris C57Bl/6N mais que les C57Bl/6J étaient résistantes à ce type d'infection, ces deux « sous-lignées » très proches étant toutes deux issues du même fond génétique : C57Bl/6 (Bragonzi, 2010). Parfois, le modèle murin peut se révéler résistant au développement de la pathologie humaine. C'est le cas pour les souris *cftr* $^{-/-}$ qui ne développent pas le phénotype observé chez les patients CF, malgré leur défaut d'activité de la protéine CFTR. Cependant, à en juger par le nombre d'étude réalisées sur ce modèle, il a permis de répondre à différentes questions concernant la mucoviscidose. De plus, l'absence de phénotype dans ce modèle a soulevé des interrogations sur les origines de cette résistance au développement de la maladie. Cela contribua notamment à l'identification du canal TMEM16A, un canal chlorure calcium dépendant, probablement alternatif à CFTR dans les poumons des souris *cftr* $^{-/-}$ (Wouthuyzen-Bakker, n.d.). Ce canal représente désormais une nouvelle cible thérapeutique (Namkung *et al.*, 2011). Quelque soit la pathologie, il n'existe pas de modèle parfait et il est ainsi souvent nécessaire de croiser les résultats obtenus dans différents modèles afin d'apporter des conclusions fiables. Les modèles *in vitro* peuvent ainsi apporter des éléments de réponse permettant de confirmer ou compléter des résultats obtenus dans des modèles *in vivo*. Au laboratoire, Marine Henry a par exemple montré qu'il existait une très bonne corrélation, bien que celle-ci ne soit pas parfaite, entre l'efficacité des bactériophages *in vitro* et celle observée *in vivo*, et ce pour les 10 bactériophages utilisés au cours de ce travail de thèse.

Dans le but d'établir l'efficacité des bactériophages dans des modèles expérimentaux, une seule étude réalisée *in vivo* fut publiée précédemment à celles qui ont été réalisées au sein du laboratoire, montrant alors seulement une efficacité relative d'un tel traitement (Meitert *et al.*, 1987). En effet, dans ce modèle d'infection similaire à celui que nous avons utilisé, cette étude montre que seulement 47 % des souris infectées par une dose létale de *P. aeruginosa* survivent après un traitement par bactériophages immédiat et 27 % si le traitement est administré 2 h après l'infection. En utilisant une multiplicité d'infection (MOI) supérieure à l'étude de Meitert *et al.* (1 au lieu de 0.025), l'étude réalisée par notre équipe précédemment à ce travail de thèse, a montré que l'on pouvait atteindre une survie de 100 % en administrant le traitement 2 h après l'infection. D'autre part, dans l'étude de 1987, les bactériophages sont administrés par voie intraveineuse (ou par voie orale, les deux donnant des résultats similaires), alors que nous administrons le traitement par voie intranasale. La voie topique semble donc plus adaptée, réduisant ainsi le temps entre l'administration et l'interaction bactériophage-bactérie dans les poumons. Elle permet également d'augmenter le nombre de bactériophages dans les poumons par rapport à une administration intraveineuse où les bactériophages seront dispersés dans tout l'organisme, une partie étant éliminée par le système immunitaire (Sulakvelidze & Kutter, 2004). Surtout, elle mime une voie d'administration qui pourrait être utilisée chez l'homme (aérosols pour les patients CF). L'ensemble de ces résultats suggèrent aussi que, pour traiter efficacement ce type d'infection, la dose de bactériophages doit être élevée, à savoir au moins un bactériophage pour une bactérie inoculée. Finalement, l'étude réalisée dans notre laboratoire a démontré que l'environnement pulmonaire, renfermant des macrophages ou encore des enzymes lytiques, n'était pas un frein à l'infection de *P. aeruginosa* par les bactériophages (Debarbieux *et al.*, 2010).

Ce succès nous a amené à développer nos études en utilisant la souche CHA, une souche clinique de *P. aeruginosa*, mucoïde et multi-résistante aux antibiotiques (Morello *et al.*, 2011). Ces deux études réalisées récemment au laboratoire ont été les premières à démontrer *in vivo* l'efficacité d'un traitement curatif et préventif par bactériophages d'une infection pulmonaire causée par *P. aeruginosa*. Ces résultats ont depuis été confirmés avec d'autres bactériophages (Alemayehu *et al.*, 2012).

Devant l'absence de données bibliographiques concernant la phagothérapie expérimentale dans le contexte CF, nous avons ensuite estimé important de déterminer si l'environnement pulmonaire particulier dans la mucoviscidose influençait l'issue d'un traitement par bactériophages. En effet, les patients CF présentent des perturbations des

transports ioniques, induisant une déshydratation du liquide de surface des voies aériennes, ainsi qu'une réponse immunitaire perturbée, notamment par une inflammation chronique (Boucher, 2007; Hartl *et al.*, 2012)(cf. Introduction chapitre I). Or, il n'est pas exclu que la réduction du liquide de surface dans les poumons puisse réduire la diffusion des bactériophages. D'autre part, la contribution du système immunitaire dans l'élimination des bactéries lors d'un traitement par bactériophages est méconnue (Górski *et al.*, 2012). Devant ces interrogations, il s'avérait nécessaire de reproduire les résultats obtenus chez les souris WT dans un modèle murin de mucoviscidose afin de vérifier que l'interaction bactériophage-bactérie ne soit pas particulièrement altérée dans les poumons CF. Pour cela, la souris invalidée pour le gène *cftr* est un bon modèle. Comparés aux souris WT, les poumons des souris *cftr* $^{-/-}$ présentent des transports ioniques altérés, notamment celui du sodium, qui conduisent à un défaut de sécrétion du liquide de surface alvéolaire (Lazrak *et al.*, 2011; Lindert *et al.*, 2007). Ce modèle présente également une altération de la fonction des macrophages alvéolaires ainsi qu'une réponse inflammatoire accrue, comparée aux souris WT, lors d'une infection par une souche mucoïde de *P. aeruginosa* (Deriy *et al.*, 2009; Heeckeren *et al.*, 2006). Au cours de ce travail de thèse, les bactériophages, en particulier P3-CHA, ont montré une efficacité *in vivo* pour lutter contre une infection pulmonaire aiguë causée par la souche CHA, dans un modèle murin CF. Ainsi, pour la première fois, ces résultats apportent des éléments tangibles sur la capacité des bactériophages à conserver leur efficacité pour infecter une souche mucoïde de *P. aeruginosa* dans un contexte CF.

Il est à noter que sont utilisés pour ces études des modèles d'infection aiguë entrainant la mort des souris, le délai d'administration du traitement est donc crucial pour l'issue de ces expériences mais n'a pas de pertinence dans la perspective d'un traitement chez l'Homme. C'est ici une des limites de ce modèle.

Afin de permettre l'efficacité d'un tel traitement, une seconde condition est cependant primordiale : la capacité des bactériophages à réduire un biofilm. En effet, dans les poumons des patients CF, la chronicité de l'infection entraine la formation de biofilm par *P. aeruginosa* (Høiby *et al.*, 2011). En revanche, *P. aeruginosa* ne produit naturellement pas d'infection chronique chez les souris *cftr*$^{-/-}$. En l'absence d'un tel modèle, nous avons donc testé l'efficacité des bactériophages à réduire un biofilm *in vitro*. Ainsi, nous avons montré que plusieurs bactériophages, PAK-P3, P3-CHA, CHA-P1, LUZ19 et PAK-P1 réduisaient significativement le biofilm formé *in vitro* par la souche CHA. Ces résultats confirment, pour ces bactériophages, les résultats d'autres études obtenus dans des modèles différents (Alemayehu *et al.*, 2012; Hanlon *et al.*, 2001). De nombreux bactériophages produisent des

polysaccharide-dépolymérases qui hydrolysent la matrice extracellulaire des biofilms (Donlan, 2009). Nos résultats suggèrent que PAK-P3, P3-CHA, CHA-P1, LUZ19 et PAK-P1 pourraient posséder ce type d'activité enzymatique. Il serait alors intéressant de tester pour chacun de ces bactériophages, d'une part leur capacité à réduire la matrice du biofilm uniquement (avec du DMMB) et d'autre part celle à réduire le nombre de cellules viables (avec du XTT) (Ramage *et al.*, 2001; Toté *et al.*, 2008). Ces expériences complémentaires seront prochainement réalisées au laboratoire.

D'autre part, les souches cliniques de *P. aeruginosa* présentent une sécrétion variable d'alginates, or il a été montré que la concentration en alginates altérait la diffusion des bactériophages (Hanlon *et al.*, 2001). Les résultats obtenus avec la souche CHA, productrice d'alginate, devront donc être vérifiés pour différentes souches de *P. aeruginosa* (Delic-Attree *et al.*, 1996). Par ailleurs, des modèles basés sur l'utilisation d'une souche mucoïde hyper-productive d'alginates (par mutation du gène *mucA*), les bactéries étant incorporer ou non dans des billes d'agar, montrent une infection pulmonaire persistant jusqu'à 7 jours chez la souris WT et *cftr* $^{-/-}$ (Bragonzi *et al.*, 2005; Hoffmann *et al.*, 2005). Ces modèles réunissent des conditions favorables à la formation d'un biofilm mais sont encore imparfaits avec une forte variabilité dans la persistance de l'infection entre les animaux. Plus récemment, un modèle d'expectorations artificielles permettant la formation d'un biofilm, proche de celui observé dans les poumons des patients CF, a été développé (Kirchner *et al.*, 2012). Il serait aujourd'hui intéressant de tester également l'efficacité des bactériophages dans de tels modèles d'infection malgré leurs inconvénients respectifs.

En complément des travaux expérimentaux réalisés sur l'efficacité de la phagothérapie dans un contexte CF, nous avons également cherché à apporté des données concernant l'innocuité. Ainsi, nous avons aussi montré que des bactériophages, différents par la famille à laquelle ils appartiennent et/ou par la souche sur laquelle ils ont été isolés, n'induisaient pas d'inflammation dans un modèle cellulaire murin *in vitro*, malgré une concentration de 100 bactériophages par cellules. Chez la souris CF, l'administration intranasale du bactériophage P3-CHA n'a stimulé ni la production d'aucun des 4 facteurs de l'inflammation étudiés, ni la migration des polynucléaires neutrophiles dans les poumons. Chez la souris WT, une faible stimulation de la production d'IL-6 et de PGE-2 a été observée. Cette stimulation pourrait dépendre de la purification de la préparation de bactériophages. En effet, la dose de bactériophages administrée étant 3 fois supérieure chez les WT comparé aux CF, la quantité d'endotoxines est également 3 fois supérieure. Cependant, la concentration en endotoxines

dans la préparation du bactériophage PAK-P3 restait inférieure à 0,5 pg/dose de bactériophages (i.e. < 0.04 ng/kg) quand la FDA autorise chez l'homme 0,5 ng/kg pour les préparations thérapeutiques. Il n'est donc pas exclu que ce bactériophage induise en lui-même une faible stimulation de facteurs inflammatoires. Une étude a d'ailleurs montré qu'une préparation purifiée de bactériophage de *S. aureus* induisait une production d'IL-6 dans certains types cellulaires (Zimecki *et al.*, 2003). Malgré tout, cette stimulation reste très faible, absente pour les souris CF ayant pourtant reçu 5.10^6 pfu de ce bactériophage et le profil de production des cytokines est absolument différent de celui observé dans un contexte infectieux. Désormais, ces résultats devront être confirmés à la fois pour d'autres bactériophages, pour un temps de stimulation plus court et dans des modèles humains, par exemple les cellules CFBE, cellules épithéliales provenant de patient CF. Lors de ces expériences complémentaires, il serait aussi intéressant de tester une plus large sélection de cytokines. Le système Bio-Plex® (BIO-RAD, USA) permet par exemple, grâce à un système de microbilles aux signatures spectrales distinctes, le dosage de plus de 100 facteurs différents dans un même échantillon.

D'autre part, chez les souris WT, nous avons montré que l'inflammation induite par l'infection était partiellement réduite, à savoir une production de KC et de TNF-α inférieure, lorsque les souris recevaient un traitement par bactériophages 2 h après l'infection. Bien que les valeurs absolues ne soient pas directement comparables (doses différentes et fonds génétiques des souris différents), nous avons également observé ce résultats concernant la production de KC, équivalent murin de l'IL-8 humaine, dans le même modèle d'infection chez des souris d'un autre fond génétique (Morello *et al.*, 2011). Une étude réalisée dans un modèle semblable d'infection pulmonaire par *B. cenocepacia*, avait également montré une diminution de la production de TNF-α (24h post-infection) après un traitement intranasal par bactériophages (Carmody *et al.*, 2010).

En revanche, nos résultats montrent que chez la souris CF, le traitement par bactériophages d'une infection à *P. aeruginosa* provoque une réponse inflammatoire 2 à 5 fois supérieure à celle observée lors de l'infection (pour TNF-α, KC et IL-6). Il est probable que ce phénomène s'explique par la libération d'endotoxines lors de la lyse bactérienne (Sulakvelidze & Kutter, 2004). Bien que dans notre modèle cela ne soit pas comparable en raison des différences dans les doses administrées, d'autres études ont montré que divers modèles de souris CF, comparées à leur contrôles, avaient une réponse inflammatoire d'avantage stimulée par l'infection (Bragonzi *et al.*, 2005). Il est donc probable que la

libération d'endotoxines suite à la lyse bactérienne induise une sur-inflammation chez les souris *cftr* $^{-/-}$ et pas chez les WT. En résumé, l'inflammation potentiellement induite par les bactériophages semblent négligeable comparée à l'inflammation chronique préexistante chez les patients CF. De plus, malgré qu'il ne soit pas exclu que le traitement puisse induire une sur-inflammation par libération d'endotoxines, celle-ci est réduite et existe également lors de l'administration d'antibiotiques bactéricides, sans que cela ne remette en question leur utilisation (Sulakvelidze & Kutter, 2004).

Dans la deuxième partie de notre étude sur l'innocuité des bactériophages, nous avons étudié l'incidence de ces derniers sur le transport ionique. Pour réaliser cette étude nous avons préalablement dû mettre au point la technique de mesure de la différence de potentiel nasale chez la souris. Cette technique utilisée comme test diagnostique chez l'Homme, était déjà décrite chez la souris par plusieurs groupes de recherche. Cependant, les différences entre les protocoles utilisés et les différences de résultats qui en découlent nous ont amené à tester de nombreux paramètres avant de définir notre protocole final : la position de la souris, le format du cathéter, la vitesse et la séquence de perfusion des solutions, la composition de la solution physiologique ou encore le choix des inhibiteurs et activateurs de canaux ioniques. Le protocole utilisé est décrit et discuté dans l'article 2, actuellement soumis. Dans cet article sont aussi détaillés les outils statistiques définis à partir des mesures de ddp qui ont permis l'analyse de nos résultats.

Grâce à cette technique et aux outils que nous avons développés autour, nous avons montré qu'une administration intranasale du bactériophage PAK-P3 n'avait pas d'incidence à moyen terme sur le transport du sodium ni du chlorure chez la souris, CF et non-CF. Il est à noter que la présence de bactériophages dans le nez au moment de la mesure, soit 16 h post-instillation et en absence d'infection, a été vérifiée. Ces résultats devront être confirmés avec d'autres bactériophages avant de pouvoir être généralisés. Cependant, ils montrent que certains d'entre eux peuvent être sans conséquences sur cette fonction physiologique, se distinguant ainsi des virus respiratoires pathogènes. En effet, différentes études ont montré, au niveau de l'épithélium trachéal murin, qu'un virus Influenza A (PR8 ; H1N1), un virus Parainfluenza (Sendai virus) et le virus respiratoire syncytial (souche A2) inhibaient l'absorption du sodium et que le Sendai virus activait la sécrétion du chlorure (Kunzelmann *et al.*, 2000; Kunzelmann *et al.*, 2004; Kunzelmann *et al.*, 2007).

Parallèlement, lorsque l'on s'intéresse à la souris WT, l'infection par la souche CHA ne semble pas perturber le transport ionique alors que lorsque cette infection est traitée par des

bactériophages, une légère activation du canal ENaC est observée. Or, il a été montré dans différents modèles, que *P. aeruginosa* (bactérie entière), le LPS, la flagelline ainsi que les rhamnolipides de cette bactérie inhibaient la fonction du canal ENaC (Boncoeur *et al.*, 2010; Evans *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 1993; Kunzelmann, 2006; Stutts *et al.*, 1986). D'autre part, une étude montre que le TNF-α inhibe l'expression et également la fonction du canal ENaC dans des cellules épithéliales pulmonaires (Dagenais *et al.*, 2004). Il semble alors probable que le transport du sodium soit inhibé lors de l'infection mais que d'autres facteurs, tels que l'IL-6 dont la production est fortement induite, ait un effet inverse nous empêchant ainsi d'observer l'inhibition de ce canal dans cette condition. En effet, il a été montré que l'IL-6 pouvait, dans certains modèles, activer à la fois l'expression et la fonction du canal ENaC (Li *et al.*, 2010). D'autre part, chez ces souris WT, nous avons montré que le nombre de bactéries diminuait et que la production de certaines cytokines comme le TNF-α était réduite après un traitement par bactériophages. Dans ces conditions, le canal ENaC pourrait être moins fortement inhibé alors que son activation serait maintenue par des facteurs tels que l'IL-6, dont la production n'est pas réduite après le traitement par bactériophages dans notre modèle. La faible activation du transport du sodium observée lors du traitement de l'infection n'est donc probablement pas attribuable au traitement par bactériophages en lui-même, les bactériophages seuls ne perturbant d'ailleurs pas le transport du sodium, mais il semblerait que l'infection induise différentes perturbations dont certaines seraient révélées dans les conditions de traitement.

D'autre part, chez la souris *cftr* $^{-/-}$, nos résultats montrent que l'infection par la souche CHA provoque une inhibition du canal ENaC visible 16 h après l'infection. Ces résultats sont en accord avec les études décrites dans le paragraphe précédent, montrant que la bactérie et plusieurs de ses facteurs de pathogénicité provoque l'inhibition de ce canal. Cette altération n'a pas été observée chez la souris WT. Cependant, si lors de l'infection l'inhibition du canal ENaC est réellement prépondérante sur son activation, comme le suggèrent les résultats obtenus chez la souris *cftr* $^{-/-}$, il semble délicat de vérifier cette hypothèse chez les souris WT. En effet, chez les souris WT les valeurs de ddp basale et de ΔAmil. sont déjà très faibles basalement. Par ailleurs, chez ces souris *cftr* $^{-/-}$, le transport du chlorure alternatif à CFTR est lui activé lors de l'infection par *P. aeruginosa*. Ces observations s'accordent avec différentes études montrant que cette sécrétion d'ions chlorure, notamment par les CaCC et ClC-2, est activée par plusieurs facteurs inflammatoires (Chu *et al.*, 2004; Galietta *et al.*, 2000; Galietta *et al.*, 2002; Gray *et al.*, 2004; Leikauf *et al.*, 1985). Cette sécrétion de chlorure étant de faible

amplitude, elle n'est pas observable chez les souris WT où la variabilité intra-animal pour le paramètre $\Delta LowCl^-$ est importante.

Dans ce modèle murin de mucoviscidose, lorsque l'infection à *P. aeruginosa* est traitée par bactériophages, les perturbations causées par l'infection seule ne sont pas aggravées. Au moment des mesures, soit 16 h post-infection et comparé aux conditions d'infection, l'inflammation n'était pas réduite. D'autre part, bien que le nombre de bactériophages ait augmenté, le nombre de bactéries n'avait pas varié de manière significative. Ainsi, une sécrétion d'ion Cl^- a de nouveau été observée chez ces souris *cftr* $^{-/-}$ après le traitement de l'infection par bactériophages. Comme suggéré par les études citées dans le précédent paragraphe, cette sécrétion est probablement due à l'activation de canaux chlorure alternatifs à CFTR. Cette hypothèse est renforcée par nos résultats montrant que celle-ci était inhibée par la perfusion d'une solution contenant du DIDS, un inhibiteur non-spécifique de canaux chlorure. A l'inverse, l'inhibition du canal ENaC n'est plus observée après le traitement par bactériophages de l'infection. Cela pourrait s'expliquer par l'augmentation de la quantité de certains facteurs inflammatoires observée dans les lavages broncho-alvéolaires dans ces conditions, tels que l'IL-6 qui selon une étude semble activer l'expression et la fonction du canal ENaC, limitant ainsi les effets inhibiteurs de la bactérie (Li *et al.*, 2010).

Globalement, cette étude des transports ioniques dans le cadre d'une phagothérapie expérimentale, montre d'abord l'innocuité des bactériophages sur cette fonction clé dans la mucoviscidose. Ils suggèrent aussi que le traitement par bactériophages d'une infection pulmonaire causée par une souche clinique de *P. aeruginosa* ne génère pas de perturbations additionnelles à celles déjà induites par l'infection elle-même, notamment chez les souris CF. Ainsi, ces résultats apportent les premières données concernant l'innocuité des bactériophages dans le traitement d'une infection pulmonaire dans un contexte CF.

L'ensemble des résultats obtenus durant ce travail de thèse apportent donc des éléments concrets de réponse concernant l'efficacité et l'innocuité des bactériophages pour leur utilisation potentielle dans le contexte particulier de la mucoviscidose.

Afin de se rapprocher encore des conditions pulmonaires des patients, nous avons développé un protocole qui sera par la suite utilisé dans une étude sur 60 expectorations provenant de patients CF. Cette étude définira la capacité des bactériophages à infecter des souches de *P. aeruginosa* présentes au sein même des échantillons, lorsque celles-ci seront

sensibles à l'un des bactériophages présent dans le cocktail que nous utiliseront. Il est en effet connu que le mucus des patients CF présente des propriétés adhésives ainsi qu'une composition riche en mucines, en débris cellulaires, dont l'ADN et l'actine, ou encore en protéases telles que celles libérées par les neutrophiles (élastase, protéase 3, cathepsine G) (Dubois *et al.*, 2012; Rubin, 2009). Il constitue ainsi un potentiel obstacle pour le succès de la phagothérapie dans le contexte CF. Notre étude permettra ainsi de déterminer l'efficacité des bactériophages sur des souches de *P. aeruginosa* directement dans l'environnement pulmonaire des patients mais également en présence des autres micro-organismes avec lesquels elles sont susceptibles d'interagir. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus lors de la mise au point du protocole suggèrent d'abord que la sensibilité des colonies, isolées à partir des expectorations, à l'un des bactériophages n'implique pas le succès du traitement. Ce n'est alors pas nécessairement le mucus qui constitue un frein à l'efficacité des bactériophages puisque la sensibilité des bactéries aux bactériophages peut varier selon le milieu utilisé (gélosé ou liquide) or, la sensibilité des souches est ici testée sur milieu gélosé alors que l'expectoration constitue plutôt un milieu liquide. D'ailleurs, ces résultats suggèrent aussi que l'infection demeure possible dans les expectorations lorsqu'une souche est sensible à l'un des bactériophages utilisés. Notre future étude élargie à 60 expectorations permettra de mieux apprécier l'influence du « milieu expectoration » sur la capacité des bactériophages à infecter les souches de *P. aeruginosa*.

Lors de cette étude, il sera également intéressant de déterminer le profil de résistances aux antibiotiques des souches de *P. aeruginosa*, contenues dans les échantillons, afin d'apporter de nouveaux éléments pour positionner la phagothérapie comme réponse aux problèmes de l'émergence de souches multi-résistantes aux antibiotiques chez les patients CF.

Par ailleurs, nous avons sélectionné des bactériophages présentant des spectres d'hôte différents afin de constituer un cocktail à spectre large. L'utilisation de tels cocktails de bactériophages ayant des spectres d'hôtes croisés permet de réduire le risque d'émergence de souches résistantes (Goodridge, 2010; Maura *et al.*, 2012; Tanji *et al.*, 2004). Devant la diversité des souches de *P. aeruginosa* présentes dans leurs poumons, cette stratégie semble être la plus pertinente dans l'hypothèse d'une phagothérapie chez les patients CF. Il pourrait ainsi être envisagé deux approches complémentaires (Pirnay *et al.*, 2011):

1- La formulation de cocktail « prêt-à-porter » à large spectre pour une utilisation de primo-intention.

2- La simplicité, la rapidité et le faible coût de l'isolement et de la caractérisation des bactériophages permettraient aussi d'envisager la formulation de cocktails de bactériophages

spécifiques des souches isolées chez un patient, apportant ainsi une réponse « sur-mesure » lors d'un échec thérapeutique préalable avec les cocktails usuels.

Il s'avèrerait d'ailleurs intéressant de tester la faisabilité d'un tel procédé dans une étude *ex vivo*. En effet, sur le même modèle que notre étude, il pourrait être envisagé de recueillir une première expectoration d'un patient, d'en isoler les souches de *P. aeruginosa*, de formuler ensuite un cocktail de bactériophages efficaces contre ces souches (à partir de bactériophages déjà isolés ou par isolement de nouveaux bactériophages à partir de l'environnement) puis, de tester l'efficacité de ce cocktail dans une seconde expectoration recueillie ultérieurement.

En outre, d'autres études réalisées sur des modèles murins d'infections pulmonaires non létales par *Burkholderia cenocepacia* et *Klebsiella pneumoniae* ont également montré que les bactériophages réduisaient le nombre de bactéries dans les poumons (Carmody *et al.*, 2010; Chhibber *et al.*, 2008). *Burkholderia sp.* et *Klebsiella pneumoniae* sont deux pathogènes régulièrement retrouvés dans les expectorations des patients CF et comme *P. aeruginosa*, certaines souches présentent une multi-résistances aux antibiotiques chez ces patients (Davies & Bilton, 2009). A l'image des cocktails commercialisés en Géorgie, comme le cocktail Pyo-phage (bactériophages lysant *Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus, E. coli* et *Proteus*), il semblerait envisageable de créer des cocktails spécialement adaptés pour les patients CF. Ils renfermeraient finalement différents cocktails de bactériophages chacun dirigés contre une espèce, leur associations formant des cocktails de cocktails. Cependant, il faudra déterminer le nombre de bactériophages qu'il serait raisonnable d'inclure dans ces cocktails afin de pouvoir assurer la sureté de ces préparations. Pour autant, l'utilisation de cocktails permettra-elle toujours de contourner l'émergence de souches résistantes aux bactériophages ? Dans quelle mesure sera-t-il possible d'assurer la formulation de nouveaux cocktails ?

Par ailleurs, bien que dans un traitement avec un cocktail, seuls les bactériophages efficaces seront amplifiés, il ne faut pas exclure que l'augmentation du nombre de bactériophages différents dans les cocktails puisse augmenter le risque de stimuler la réponse immunitaire. Les propriétés antigéniques étant très variables entre les différentes familles de bactériophages, il semble possible d'identifier des bactériophages peu immunogènes pour la phagothérapie, d'autant que l'Homme est continuellement confronté aux bactériophages dans l'environnement, l'eau de boisson ou encore la nourriture, sans que ces bactériophages ne stimulent une quelconque réponse immune (Sulakvelidze & Kutter, 2004). Cependant, avec l'utilisation de concentrations curatives de bactériophages, qu'il faudra par ailleurs définir, à

quelle fréquence ces derniers induiront une production d'anticorps ? Cette question est d'autant plus pertinente dans le cadre de la mucoviscidose où les traitements antibactériens sont souvent répétés en raison de la chronicité de l'infection. Est-il nécessaire d'envisager une éradication totale ou la fréquence de répétition des traitements par bactériophages pourrait-elle être réduite en prétendant simplement réduire le nombre de bactéries, permettant ainsi l'action du système immunitaire ? Cette stratégie est-elle pertinente chez les patients CF, lesquels souffrent d'une inflammation chronique ? Dans ce cas pourrait-il être envisagé une combinaison entre la phagothérapie et l'antibiothérapie ? Une étude a en effet montré une synergie entre les antibiotiques et les bactériophages. Il semblerait qu'en présence d'une concentration sous-létale de certains antibiotiques, la lyse des bactéries par les bactériophages soit plus rapide et la production de bactériophages augmentée (Comeau *et al.*, 2007). L'utilisation de concentrations sous-létales n'étant pas envisageable chez les patients afin de ne pas favoriser l'émergence de souches résistantes, qu'en est-il en présence de concentrations cliniques d'antibiotiques ? De manière plus générale, dans quelles mesures les résultats expérimentaux sont-ils transposables chez les patients ? La démonstration de l'efficacité des bactériophages *ex vivo* dans les expectorations des patients, et dans les différents modèles de biofilms *in vitro*, suffira-t-elle pour prédire de leur efficacité chez les patients ? Il n'est pas possible de connaitre la variabilité de la réponse au traitement entre les différents patients, cependant l'utilisation d'expectorations directement issues des patients permet de prendre en partie en compte le contexte individuel de chacun d'entre eux.

Finalement, le nombre croissant d'études expérimentales tend à apporter de plus de plus d'éléments permettant à terme d'envisager la mise en place d'essais cliniques chez les patients CF. Seuls ces essais permettront de répondre à toutes ces interrogations mais la réglementation qui les encadrera, actuellement inexistante, devra d'abord être définie.

Références Bibliographiques

Abdel-Mawgoud A. M., Lépine F. & Déziel E. (2010). "Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles", *Applied microbiology and biotechnology*, **86**(5) : 1323–1336.

Abedon S. T., Kuhl S. J., Blasdel B. G. & Kutter E. M. (2011). "Phage treatment of human infections", *Bacteriophage*, **1**(2) : 66–85.

Accurso F. J., Moss R. B., Wilmott R. W., Anbar R. D., Schaberg A. E., Durham T. A. & Ramsey B. W. (2011). "Denufosol Tetrasodium in Patients with Cystic Fibrosis and Normal to Mildly Impaired Lung Function", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **183**(5) : 627–634.

Accurso F. J., Rowe S. M., Clancy J. P., Boyle M. P., Dunitz J. M., Durie P. R., Sagel S. D., Hornick D. B., Konstan M. W., Donaldson S. H. & et. al. (2010). "Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation", *New England journal of medicine*, **363**(21) : 1991–2003.

Ackermann H. (2011). "Bacteriophage taxonomy", *Microbiology Australia*, **32**(2) .

Ackermann H.-W. (2007). "5500 Phages examined in the electron microscope", *Archives of virology*, **152**(2) : 227–243.

Ackermann H.-W. (2009). "Phage Classification and Characterization". In Clokie, M. R. J., Kropinski, A. M., & Walker, J. M. (eds) *Bacteriophages*, Humana Press, pp. 127–140.

Alemayehu D., Casey P. G., McAuliffe O., Guinane C. M., Martin J. G., Shanahan F., Coffey A., Ross R. P. & Hill C. (2012). "Bacteriophages ΦMR299-2 and ΦNH-4 Can Eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the Murine Lung and on Cystic Fibrosis Lung Airway Cells", *mBio*, **3**(2) .

Alexander N. S., Hatch N., Zhang S., Skinner D., Fortenberry J., Sorscher E. J. & Woodworth B. A. (2011). "Resveratrol has salutary effects on mucociliary transport and inflammation in sinonasal epithelium", *The laryngoscope*, **121**(6) : 1313–1319.

Ali M. S. & Pearson J. P. (2007). "Upper airway mucin gene expression: a review", *The laryngoscope*, **117**(5) : 932–938.

Allen L., Dockrell D. H., Pattery T., Lee D. G., Cornelis P., Hellewell P. G. & Whyte M. K. B. (2005). "Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **174**(6) : 3643–3649.

Al-Nakkash L., Hu S., Li M. & Hwang T. C. (2001). "A common mechanism for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein activation by genistein and benzimidazolone analogs", *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **296**(2) : 464–472.

Al-Nakkash L. & Hwang T. C. (1999). "Activation of wild-type and deltaF508-CFTR by phosphodiesterase inhibitors through cAMP-dependent and -independent mechanisms", *Pflügers archiv: European journal of physiology*, **437**(4) : 553–561.

Alton E. W., Stern M., Farley R., Jaffe A., Chadwick S. L., Phillips J., Davies J., Smith S. N., Browning J., Davies M. G., Hodson M. E., Durham S. R., Li D., Jeffery P. K., Scallan M., Balfour R., Eastman S. J., Cheng S. H., Smith A. E., Meeker D. & Geddes D. M. (1999). "Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial", *Lancet*, **353**(9157) : 947–954.

Andersen D. H. (1938). "Cystic Fibrosis of the Pancreas and Its Relation to Celiac Disease: A Clinical and Pathologic Study", *American journal of diseases of children*, **56**(2) : 344–399.

Andersen D. H. & Hodges R. G. (1946). "Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology", *American journal of diseases of children*, **72** : 62–80.

Arispe N., Ma J., Jacobson K. A. & Pollard H. B. (1998). "Direct activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels by 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (CPX) and 1,3-diallyl-8-cyclohexylxanthine (DAX)", *The journal of biological chemistry*, **273**(10) : 5727–5734.

Bachhuber T., König J., Voelcker T., Mürle B., Schreiber R. & Kunzelmann K. (2005). "Cl- interference with the epithelial Na+ channel ENaC", *The journal of biological chemistry*, **280**(36) : 31587–31594.

Bajmoczi M., Gadjeva M., Alper S. L., Pier G. B. & Golan D. E. (2009). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and caveolin-1 regulate epithelial cell internalization of *Pseudomonas aeruginosa*", *American journal of physiology- Cell physiology*, **297**(2) : C263.

Bakouh N., Chérif-Zahar B., Hulin P., Prié D., Friedlander G., Edelman A. & Planelles G. (2012). "Functional Interaction between CFTR and the Sodium-Phosphate Co-Transport Type 2a in *Xenopus laevis* Oocytes", *PLoS ONE*, **7**(4) .

Bals R., Hubert D. & Tümmler B. (2011). "Antibiotic treatment of CF lung disease: from bench to bedside", *Journal of cystic fibrosis*, **10 Suppl 2** : S146–151.

Banuett F., Hoyt M. A., McFarlane L., Echols H. & Herskowitz I. (1986). "hflB, a new *Escherichia coli* locus regulating lysogeny and the level of bacteriophage lambda cII protein", *Journal of molecular biology*, **187**(2) : 213–224.

Barbier F. & Wolff M. (2010). "Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*", *médecine/sciences*, **26**(11) : 960–968.

Barker P. M. (2005). "Effect of macrolides on in vivo ion transport across cystic fibrosis nasal epithelium", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **171**(8) : 868–871.

Bear C. E., Duguay F., Naismith A. L., Kartner N., Hanrahan J. W. & Riordan J. R. (1991). "Cl- channel activity in Xenopus oocytes expressing the cystic fibrosis gene", *The journal of biological chemistry*, **266**(29) : 19142–19145.

Bear C. E., Li C. H., Kartner N., Bridges R. J., Jensen T. J., Ramjeesingh M. & Riordan J. R. (1992). "Purification and functional reconstitution of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)", *Cell*, **68**(4) : 809–818.

Bellemare A., Vernoux N., Morin S., Gagné S. M. & Bourbonnais Y. (2010). "Structural and antimicrobial properties of human pre-elafin/trappin-2 and derived peptides against *Pseudomonas aeruginosa*", *BMC microbiology*, **10** : 253.

De Bentzmann S., Roger P., Dupuit F., Bajolet-Laudinat O., Fuchey C., Plotkowski M. C. & Puchelle E. (1996). "Asialo GM1 is a receptor for *Pseudomonas aeruginosa* adherence to regenerating respiratory epithelial cells.", *Infection and immunity*, **64**(5) : 1582–1588.

Berchieri A. Jr, Lovell M. A. & Barrow P. A. (1991). "The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*", *Research in microbiology*, **142**(5) : 541–549.

Berdiev B. K., Cormet-Boyaka E., Tousson A., Qadri Y. J., Oosterveld-Hut H. M. J., Hong J. S., Gonzales P. A., Fuller C. M., Sorscher E. J., Lukacs G. L. & Benos D. J. (2007). "Molecular proximity of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and epithelial sodium channel assessed by fluorescence resonance energy transfer", *The journal of biological chemistry*, **282**(50) : 36481–36488.

Berdiev B. K., Prat A. G., Cantiello H. F., Ausiello D. A., Fuller C. M., Jovov B., Benos D. J. & Ismailov I. I. (1996). "Regulation of epithelial sodium channels by short actin filaments", *The Journal of biological chemistry*, **271**(30) : 17704–17710.

Berdiev B. K., Qadri Y. J. & Benos D. J. (2009). "Assessment of the CFTR and ENaC association", *Molecular bioSystems*, **5**(2) : 123–127.

Berthelot P., Grattard F., Mallaval F. O., Ros A., Lucht F. & Pozzetto B. (2005). "Epidemiology of nosocomial infections due to *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* and *Stenotrophomonas maltophilia*", *Pathologie-biologie*, **53**(6) : 341–348.

Bertrand C. A., Zhang R., Pilewski J. M. & Frizzell R. A. (2009). "SLC26A9 is a constitutively active, CFTR-regulated anion conductance in human bronchial epithelia", *The journal of general physiology*, **133**(4) : 421–438.

Bhaskar K. R., Gong D. H., Bansil R., Pajevic S., Hamilton J. A., Turner B. S. & LaMont J. T. (1991). "Profound increase in viscosity and aggregation of pig gastric mucin at low pH", *The american journal of physiology*, **261**(5 Pt 1) : G827–832.

Bijvelds M. J. C., Bot A. G. M., Escher J. C. & De Jonge H. R. (2009). "Activation of intestinal Cl- secretion by lubiprostone requires the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *Gastroenterology*, **137**(3) : 976–985.

Biswas B., Adhya S., Washart P., Paul B., Trostel A. N., Powell B., Carlton R. & Merril C. R. (2002). "Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*", *Infection and immunity*, **70**(1) : 204–210.

Bittar F., Richet H., Dubus J.-C., Reynaud-Gaubert M., Stremler N., Sarles J., Raoult D. & Rolain J.-M. (2008). "Molecular Detection of Multiple Emerging Pathogens in Sputa from Cystic Fibrosis Patients", *PLoS ONE*, **3**(8) : e2908.

Bland J. M. & Altman D. G. (1986). "Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement", *Lancet*, **1**(8476) : 307–310.

De Boeck K., Derichs N., Fajac I., de Jonge H. R., Bronsveld I., Sermet I., Vermeulen F., Sheppard D. N., Cuppens H., Hug M., Melotti P., Middleton P. G. & Wilschanski M. (2011). "New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe", *Journal of cystic fibrosis*, **10 Suppl 2** : S53–66.

Boncoeur E., Tardif V., Tessier M.-C., Morneau F., Lavoie J., Gendreau-Berthiaume E., Grygorczyk R., Dagenais A. & Berthiaume Y. (2010). "Modulation of epithelial sodium channel activity by lipopolysaccharide in alveolar type II cells: involvement of purinergic signaling", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **298**(3) : L417–426.

Bonfield T. L., Panuska J. R., Konstan M. W., Hilliard K. A., Hilliard J. B., Ghnaim H. & Berger M. (1995). "Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **152**(6 Pt 1) : 2111–2118.

Borie C., Albala I., Sánchez P., Sánchez M. L., Ramírez S., Navarro C., Morales M. A., Retamales A. J. & Robeson J. (2008). "Bacteriophage treatment reduces Salmonella colonization of infected chickens", *Avian diseases*, **52**(1) : 64–67.

Borthwick D. W., West J. D., Keighren M. A., Flockhart J. H., Innes B. A. & Dorin J. R. (1999). "Murine submucosal glands are clonally derived and show a cystic fibrosis gene-dependent distribution pattern", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **20**(6) : 1181–1189.

Bouchara J.-P., Hsieh H. Y., Croquefer S., Barton R., Marchais V., Pihet M. & Chang T. C. (2008). "Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis", *Journal of clinical microbiology*, **47**(1) : 142–152.

Boucher R. C. (2007). "Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease", *Journal of internal medicine*, **261**(1) : 5–16.

Bradley D. E. (1967). "Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins", *Bacteriological reviews*, **31**(4) : 230–314.

Brady K. G., Kelley T. J. & Drumm M. L. (2001). "Examining basal chloride transport using the nasal potential difference response in a murine model", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **281**(5) : L1173–1179.

Bragonzi A. (2010). "Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens", *International Journal of Medical Microbiology*.

Bragonzi A., Worlitzsch D., Pier G. B., Timpert P., Ulrich M., Hentzer M., Andersen J. B., Givskov M., Conese M. & Doring G. (2005). "Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*

expresses alginate in the lungs of patients with cystic fibrosis and in a mouse model", *The journal of infectious diseases*, **192**(3) : 410–419.

Breitbart M. & Rohwer F. (2005). "Here a virus, there a virus, everywhere the same virus?", *Trends in microbiology*, **13**(6) : 278–284.

Brenner S., Jacob F. & Meselson M. (1961). "An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis", *Nature*, **190** : 576–581.

Bricha, Ounine, Oulkheir, Haloui & Attarassi (2009). "Facteurs de virulence et épidémiologie liés au *Pseudomonas aeruginosa*", *Revue Tunisienne d'infectiologie*, **2** : 7–14.

Bridges R. J., Newton B. B., Pilewski J. M., Devor D. C., Poll C. T. & Hall R. L. (2001). "Na^+ transport in normal and CF human bronchial epithelial cells is inhibited by BAY 39-9437", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **281**(1) : L16–23.

Brihaye P., Jorissen M. & Clement P. A. (1997). "Chronic rhinosinusitis in cystic fibrosis (mucoviscidosis)", *Acta oto-rhino-laryngologica Belgica*, **51**(4) : 323–337.

Brouillard F., Bensalem N., Hinzpeter A., Tondelier D., Trudel S., Gruber A. D., Ollero M. & Edelman A. (2005). "Blue native/SDS-PAGE analysis reveals reduced expression of the mClCA3 protein in cystic fibrosis knock-out mice", *Molecular & cellular proteomics*, **4**(11) : 1762–1775.

Bruscia E. M., Price J. E., Cheng E.-C., Weiner S., Caputo C., Ferreira E. C., Egan M. E. & Krause D. S. (2006). "Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **103**(8) : 2965–2970.

Brüssow H. & Kutter E. (2004). "Genomics and Evolution of Tailed Phages". In Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (eds) *Bacteriophages*, CRC Press.

Bruttin A. & Brüssow H. (2005). "Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**(7) : 2874–2878.

Buchanan P., Ernst R., Elborn J. & Schock B. (2009). "Role of CFTR, *Pseudomonas aeruginosa* and Toll-like receptors in cystic fibrosis lung inflammation", *Biochemical society transactions*, **37** : 863–867.

Budriesi R., Ioan P., Leoni A., Pedemonte N., Locatelli A., Micucci M., Chiarini A. & Galietta L. J. V. (2011). "Cystic Fibrosis: A New Target for 4-Imidazo[2,1-b]thiazole-1,4-dihydropyridines", *Journal of medicinal chemistry*, **54**(11) : 3885–3894.

Burgess R. R., Travers A. A., Dunn J. J. & Bautz E. K. (1969). "Factor stimulating transcription by RNA polymerase", *Nature*, **221**(5175) : 43–46.

Burns J. L., Emerson J., Kuypers J., Campbell A. P., Gibson R. L., McNamara S., Worrell K. & Englund J. A. (2012). "Respiratory viruses in children with cystic fibrosis: viral

detection and clinical findings", *Influenza and other respiratory viruses*, **6**(3) : 218–223.

Burns J. L., Gibson R. L., McNamara S., Yim D., Emerson J., Rosenfeld M., Hiatt P., McCoy K., Castile R., Smith A. L. & Ramsey B. W. (2001). "Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis", *The Journal of infectious diseases*, **183**(3) : 444–452.

Cady N. C., McKean K. A., Behnke J., Kubec R., Mosier A. P., Kasper S. H., Burz D. S. & Musah R. A. (2012). "Inhibition of biofilm formation, quorum sensing and infection in *Pseudomonas aeruginosa* by natural products-inspired organosulfur compounds", *PloS one*, **7**(6) : e38492.

Cai Z. & Sheppard D. N. (2002). "Phloxine B interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at multiple sites to modulate channel activity", *The Journal of biological chemistry*, **277**(22) : 19546–19553.

Calendar R. (2006). "The Bacteriophages", Oxford University Press.

Callaghan M. & McClean S. (2012). "Bacterial host interactions in cystic fibrosis", *Current opinion in microbiology*, **15**(1) : 71–77.

Callaway T. R., Edrington T. S., Brabban A., Kutter B., Karriker L., Stahl C., Wagstrom E., Anderson R., Poole T. L., Genovese K., Krueger N., Harvey R. & Nisbet D. J. (2011). "Evaluation of phage treatment as a strategy to reduce Salmonella populations in growing swine", *Foodborne pathogens and disease*, **8**(2) : 261–266.

Campbell A. (2003). "The future of bacteriophage biology", *Nature reviews. Genetics*, **4**(6) : 471–477.

Cantiello H. F., Jackson G. R. Jr, Grosman C. F., Prat A. G., Borkan S. C., Wang Y., Reisin I. L., O'Riordan C. R. & Ausiello D. A. (1998). "Electrodiffusional ATP movement through the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *The American journal of physiology*, **274**(3 Pt 1) : C799–809.

Cantin A. M., North S. L., Hubbard R. C. & Crystal R. G. (1987). "Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione", *Journal of applied physiology*, **63**(1) : 152–157.

Caputo A., Caci E., Ferrera L., Pedemonte N., Barsanti C., Sondo E., Pfeffer U., Ravazzolo R., Zegarra-Moran O. & Galietta L. J. V. (2008). "TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity", *Science (New York, N.Y.)*, **322**(5901) : 590–594.

Carmody L. A., Gill J. J., Summer E. J., Sajjan U. S., Gonzalez C. F., Young R. F. & LiPuma J. J. (2010). "Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection", *The journal of infectious diseases*, **201**(2) : 264–271.

Loc Carrillo C., Atterbury R. J., el-Shibiny A., Connerton P. L., Dillon E., Scott A. & Connerton I. F. (2005). "Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni*

colonization of broiler chickens", *Applied and environmental microbiology*, **71**(11) : 6554–6563.

Cartiera M. S., Ferreira E. C., Caputo C., Egan M. E., Caplan M. J. & Saltzman W. M. (2010). "Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles encapsulating curcumin", *Molecular pharmaceutics*, **7**(1) : 86–93.

Carvalho C. M., Gannon B. W., Halfhide D. E., Santos S. B., Hayes C. M., Roe J. M. & Azeredo J. (2010). "The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens", *BMC microbiology*, **10** : 232.

Casals T., Vázquez C., Lázaro C., Girbau E., Giménez F. J. & Estivill X. (1992). "Cystic fibrosis in the Basque country: high frequency of mutation delta F508 in patients of Basque origin", *American journal of human genetics*, **50**(2) : 404–410.

Ceyssens P.-J., Miroshnikov K., Mattheus W., Krylov V., Robben J., Noben J.-P., Vanderschraeghe S., Sykilinda N., Kropinski A. M., Volckaert G., Mesyanzhinov V. & Lavigne R. (2009). "Comparative analysis of the widespread and conserved PB1-like viruses infecting *Pseudomonas aeruginosa*", *Environmental microbiology*, **11**(11) : 2874–2883.

Chang M.-H., Plata C., Sindic A., Ranatunga W. K., Chen A.-P., Zandi-Nejad K., Chan K. W., Thompson J., Mount D. B. & Romero M. F. (2009). "Slc26a9 is inhibited by the R-region of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via the STAS domain", *The journal of biological chemistry*, **284**(41) : 28306–28318.

Chang M.-H., Plata C., Zandi-Nejad K., Sindić A., Sussman C. R., Mercado A., Broumand V., Raghuram V., Mount D. B. & Romero M. F. (2009). "Slc26a9--anion exchanger, channel and Na^+ transporter", *The journal of membrane biology*, **228**(3) : 125–140.

Chemani C., Imberty A., de Bentzmann S., Pierre M., Wimmerová M., Guery B. P. & Faure K. (2009). "Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands", *Infection and immunity*, **77**(5) : 2065–2075.

Chen J., Jiang X. H., Chen H., Guo J. H., Tsang L. L., Yu M. K., Xu W. M. & Chan H. C. (2012). "CFTR negatively regulates cyclooxygenase-2-PGE(2) positive feedback loop in inflammation", *Journal of cellular physiology*, **227**(6) : 2759–2766.

Cheng H. H., Muhlrad P. J., Hoyt M. A. & Echols H. (1988). "Cleavage of the cII protein of phage lambda by purified HflA protease: control of the switch between lysis and lysogeny", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **85**(21) : 7882–7886.

Chhibber S., Kaur S. & Kumari S. (2008). "Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice", *Journal of medical microbiology*, **57**(12) : 1508.

Choi J. Y., Muallem D., Kiselyov K., Lee M. G., Thomas P. J. & Muallem S. (2001). "Aberrant CFTR-dependent HCO3- transport in mutations associated with cystic fibrosis", *Nature*, **410**(6824) : 94–97.

Chotirmall S. H., O'Donoghue E., Bennett K., Gunaratnam C., O'Neill S. J. & McElvaney N. G. (2010). "Sputum Candida albicans presages FEV_1 decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis", *Chest*, **138**(5) : 1186–1195.

Chu S., Blaisdell C. J., Bamford P. & Ferro T. J. (2004). "Interferon-gamma regulates ClC-2 chloride channel in lung epithelial cells", *Biochemical and biophysical research communications*, **324**(1) : 31–39.

Clancy J. P., Rowe S. M., Accurso F. J., Aitken M. L., Amin R. S., Ashlock M. A., Ballmann M., Boyle M. P., Bronsveld I., Campbell P. W., De Boeck K., Donaldson S. H., Dorkin H. L., Dunitz J. M., Durie P. R., Jain M., Leonard A., McCoy K. S., Moss R. B., Pilewski J. M., Rosenbluth D. B., Rubenstein R. C., Schechter M. S., Botfield M., Ordoñez C. L., Spencer-Green G. T., Vernillet L., Wisseh S., Yen K. & Konstan M. W. (2012). "Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation", *Thorax*, **67**(1) : 12–18.

Clokie M. R., Millard A. D., Letarov A. V. & Heaphy S. (2011). "Phages in nature", *Bacteriophage*, **1**(1) : 31–45.

Coakley R. D., Grubb B. R., Paradiso A. M., Gatzy J. T., Johnson L. G., Kreda S. M., O'Neal W. K. & Boucher R. C. (2003). "Abnormal surface liquid pH regulation by cultured cystic fibrosis bronchial epithelium", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **100**(26) : 16083–16088.

Cobb L. M., Mychaleckyj J. C., Wozniak D. J. & López-Boado Y. S. (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **173**(9) : 5659–5670.

Cogan N. G. & Keener J. P. (2004). "The role of the biofilm matrix in structural development", *Mathematical medicine and biology: a journal of the IMA*, **21**(2) : 147–166.

Colas J., Faure G., Saussereau E., Trudel S., Rabeh W. M., Bitam S., Guerrera I. C., Fritsch J., Sermet-Gaudelus I., Davezac N., Brouillard F., Lukacs G. L., Herrmann H., Ollero M. & Edelman A. (2011). "Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect", *Human molecular genetics*.

Comeau A. M., Tétart F., Trojet S. N., Prère M.-F. & Krisch H. M. (2007). "Phage-Antibiotic Synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth", *PloS one*, **2**(8) : e799.

Coote K., Atherton-Watson H. C., Sugar R., Young A., MacKenzie-Beevor A., Gosling M., Bhalay G., Bloomfield G., Dunstan A., Bridges R. J., Sabater J. R., Abraham W. M., Tully D., Pacoma R., Schumacher A., Harris J. & Danahay H. (2009). "Camostat attenuates airway epithelial sodium channel function in vivo through the inhibition of a channel-activating protease", *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **329**(2) : 764–774.

Cornelissen A., Hardies S. C., Shaburova O. V., Krylov V. N., Mattheus W., Kropinski A. M. & Lavigne R. (2011). "Complete Genome Sequence of the Giant Virus OBP and Comparative Genome Analysis of the Diverse KZ-Related Phages", *Journal of virology*, **86**(3) : 1844–1852.

Costerton J. W., Stewart P. S. & Greenberg E. P. (1999). "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections", *Science (New York, N.Y.)*, **284**(5418) : 1318–1322.

Cramer N., Klockgether J., Wrasman K., Schmidt M., Davenport C. F. & Tümmler B. (2011). "Microevolution of the major common *Pseudomonas aeruginosa* clones C and PA14 in cystic fibrosis lungs", *Environmental microbiology*, **13**(7) : 1690–1704.

Crawford I., Maloney P. C., Zeitlin P. L., Guggino W. B., Hyde S. C., Turley H., Gatter K. C., Harris A. & Higgins C. F. (1991). "Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **88**(20) : 9262–9266.

Crick F. H., Barnett L., Brenner S. & Watts-Tobin R. J. (1961). "General nature of the genetic code for proteins", *Nature*, **192** : 1227–1232.

Cuppoletti J., Malinowska D. H., Tewari K. P., Li Q.-J., Sherry A. M., Patchen M. L. & Ueno R. (2004). "SPI-0211 activates T84 cell chloride transport and recombinant human ClC-2 chloride currents", *American journal of physiology. Cell physiology*, **287**(5) : C1173–1183.

Cuthbert A. W. (2011). "Lubiprostone targets prostanoid EP_4 receptors in ovine airways", *British journal of pharmacology*, **162**(2) : 508–520.

Dabrowska K., Switała-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B. & Gorski A. (2005). "Bacteriophage penetration in vertebrates", *Journal of applied microbiology*, **98**(1) : 7–13.

Dagenais A., Fréchette R., Yamagata Y., Yamagata T., Carmel J.-F., Clermont M.-E., Brochiero E., Massé C. & Berthiaume Y. (2004). "Downregulation of ENaC activity and expression by TNF-alpha in alveolar epithelial cells", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **286**(2) : L301–311.

Dagenais A., Gosselin D., Guilbault C., Radzioch D. & Berthiaume Y. (2005). "Modulation of epithelial sodium channel (ENaC) expression in mouse lung infected with *Pseudomonas aeruginosa*", *Respiratory research*, **6** : 2.

Davezac N., Tondelier D., Lipecka J., Fanen P., Demaugre F., Debski J., Dadlez M., Schrattenholz A., Cahill M. A. & Edelman A. (2004). "Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane", *Proteomics*, **4**(12) : 3833–3844.

Davies J. C. & Bilton D. (2009). "Bugs, biofilms, and resistance in cystic fibrosis", *Respiratory care*, **54**(5) : 628–640.

Debarbieux L., Leduc D., Maura D., Morello E., Criscuolo A., Grossi O., Balloy V. & Touqui L. (2010). "Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections", *The journal of infectious diseases*, **201**(7) : 1096–1104.

Delhaes L., Monchy S., Fréalle E., Hubans C., Salleron J., Leroy S., Prevotat A., Wallet F., Wallaert B., Dei-Cas E., Sime-Ngando T., Chabé M. & Viscogliosi E. (2012). "The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management", *PloS one*, **7**(4) : e36313.

Delic-Attree I., Toussaint B., Froger A., Willison J. C. & Vignais P. M. (1996). "Isolation of an IHF-deficient mutant of a *Pseudomonas aeruginosa* mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in algD gene expression", *Microbiology*, **142**(10) : 2785–2793.

Deriy L. V., Gomez E. A., Zhang G., Beacham D. W., Hopson J. A., Gallan A. J., Shevchenko P. D., Bindokas V. P. & Nelson D. J. (2009). "Disease-causing mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator determine the functional responses of alveolar macrophages", *Journal of biological chemistry*, **284**(51) : 35926–35938.

Devidas S. & Guggino W. B. (1997). "CFTR: domains, structure, and function", *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **29**(5) : 443–451.

Devor D. C., Singh A. K., Lambert L. C., DeLuca A., Frizzell R. A. & Bridges R. J. (1999). "Bicarbonate and Chloride Secretion in Calu-3 Human Airway Epithelial Cells", *The Journal of General Physiology*, **113**(5) : 743–760.

Diggle S. P., Heeb S., Dubern J. F., Fletcher M. P., Crusz S. A., Williams P. & Cámara M. (2008). "Quorum Sensing in Pseudomonads". In Rehm, B. H. A. (ed) *Pseudomonas*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 167–194.

Diggle S. P., Stacey R. E., Dodd C., Cámara M., Williams P. & Winzer K. (2006). "The galactophilic lectin, LecA, contributes to biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*", *Environmental microbiology*, **8**(6) : 1095–1104.

Dijk F. N., McKay K., Barzi F., Gaskin K. J. & Fitzgerald D. A. (2011). "Improved survival in cystic fibrosis patients diagnosed by newborn screening compared to a historical cohort from the same centre", *Archives of disease in childhood*, **96**(12) : 1118–1123.

Donlan R. M. (2009). "Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage", *Trends in microbiology*, **17**(2) : 66–72.

Döring G. & Hoiby N. (2004). "Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus", *Journal of cystic fibrosis*, **3**(2) : 67–91.

Dormer R. L., Dérand R., McNeilly C. M., Mettey Y., Bulteau-Pignoux L., Métayé T., Vierfond J. M., Gray M. A., Galietta L. J., Morris M. R., Pereira M. M., Doull I. J., Becq F. & McPherson M. A. (2001). "Correction of delF508-CFTR activity with benzo(c)quinolizinium compounds through facilitation of its processing in cystic fibrosis airway cells", *Journal of cell science*, **114**(Pt 22) : 4073–4081.

Dormer R. L., Harris C. M., Clark Z., Pereira M. M. C., Doull I. J. M., Norez C., Becq F. & McPherson M. A. (2005). "Sildenafil (Viagra) corrects DeltaF508-CFTR location in nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis", *Thorax*, **60**(1) : 55–59.

Drenkard E. (2003). "Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms", *Microbes and infection*, **5**(13) : 1213–1219.

Dublanchet A. & Bourne S. (2007). "The epic of phage therapy", *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology*, **18**(1) : 15–18.

Dublanchet A. & Fruciano E. (2008). "Brève histoire de la phagothérapie", *Médecine et maladies infectieuses*, **38**(8) : 415–420.

Dubois A. V., Gauthier A., Bréa D., Varaigne F., Diot P., Gauthier F. & Attucci S. (2012). "Influence of DNA on the Activities and Inhibition of Neutrophil Serine Proteases in Cystic Fibrosis Sputum", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **47**(1) : 80–86.

Edelman A., Fritsch J. & Ollero M. (2009). "Twenty years after cystic fibrosis gene identification: Where are we and what are we up to?", *Pathologie biologie*.

Egan M. E., Glöckner-Pagel J., Ambrose C., Cahill P. A., Pappoe L., Balamuth N., Cho E., Canny S., Wagner C. A., Geibel J. & Caplan M. J. (2002). "Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells", *Nature medicine*, **8**(5) : 485–492.

Egan M. E., Pearson M., Weiner S. A., Rajendran V., Rubin D., Glöckner-Pagel J., Canny S., Du K., Lukacs G. L. & Caplan M. J. (2004). "Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects", *Science (New York, N.Y.)*, **304**(5670) : 600–602.

Egan M., Flotte T., Afione S., Solow R., Zeitlin P. L., Carter B. J. & Guggino W. B. (1992). "Defective regulation of outwardly rectifying Cl- channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR", *Nature*, **358**(6387) : 581–584.

Ellsworth R. E., Jamison D. C., Touchman J. W., Chissoe S. L., Braden Maduro V. V., Bouffard G. G., Dietrich N. L., Beckstrom-Sternberg S. M., Iyer L. M., Weintraub L. A., Cotton M., Courtney L., Edwards J., Maupin R., Ozersky P., Rohlfing T., Wohldmann P., Miner T., Kemp K., Kramer J., Korf I., Pepin K., Antonacci-Fulton L., Fulton R. S., Minx P., Hillier L. W., Wilson R. K., Waterston R. H., Miller W. & Green E. D. (2000). "Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **97**(3) : 1172–1177.

Elmer H. L., Brady K. G., Drumm M. L. & Kelley T. J. (1999). "Nitric oxide-mediated regulation of transepithelial sodium and chloride transport in murine nasal epithelium", *The American journal of physiology*, **276**(3 Pt 1) : L466–473.

Emerson J., McNamara S., Buccat A. M., Worrell K. & Burns J. L. (2010). "Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008", *Pediatric pulmonology*, **45**(4) : 363–370.

Emerson J., Rosenfeld M., McNamara S., Ramsey B. & Gibson R. L. (2002). "*Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis", *Pediatric pulmonology*, **34**(2) : 91–100.

Emmerich R. & Löw O. (1901). "Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen(Nucleasen-Immunproteïdine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionsk-rankheiten und zur Schutzimpfung and Stelle de Heilserums", *Zeitsch f Hyg u infektionskrankh*, **36** : 9.

Ernst R. K., Yi E. C., Guo L., Lim K. B., Burns J. L., Hackett M. & Miller S. I. (1999). "Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*", *Science (New York, N.Y.)*, **286**(5444) : 1561–1565.

Escada P. A., Lima C. & da Silva J. M. (2009). "The human olfactory mucosa", *European archives of oto-rhino-laryngology: official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, **266**(11) : 1675–1680.

Estivill, Bancells & Ramos (1997). "Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations", *Human mutation*, **10**(2) : 135–154.

Estivill X., Chillon M., Casals T., Bosch A., Morral N., Nunes V., Gasparini P., Seia A., Pignatti P. F. & Novelli G. (1989). "Delta F508 gene deletion in cystic fibrosis in southern Europe", *Lancet*, **2**(8676) : 1404.

Evans D. J., Matsumoto P. S., Widdicombe J. H., Li-Yun C., Maminishkis A. A. & Miller S. S. (1998). "*Pseudomonas aeruginosa* induces changes in fluid transport across airway surface epithelia", *The American journal of physiology*, **275**(5 Pt 1) : C1284–1290.

Van Ewijk B. E., Wolfs T. F. W., Aerts P. C., Van Kessel K. P. M., Fleer A., Kimpen J. L. L. & Van der Ent C. K. (2007). "RSV mediates *Pseudomonas aeruginosa* binding to cystic fibrosis and normal epithelial cells", *Pediatric research*, **61**(4) : 398–403.

Falagas M. E., Koletsi P. K. & Bliziotis I. A. (2006). "The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*", *Journal of Medical Microbiology*, **55**(Pt 12) : 1619–1629.

Fanconi, Uehlinger & Knauer (1936). "Das coeliakiesyndrom bei angeborener zysticher pankreasfibromatose und bronchiektasien", *Weiner mediznische wochenschrift*, **86** : 753–756.

Farriaux J. P., Vidailhet M., Briard M. L., Belot V. & Dhondt J. L. (2003). "Neonatal screening for cystic fibrosis: France rises to the challenge", *Journal of inherited metabolic disease*, **26**(8) : 729–744.

Feldman M., Bryan R., Rajan S., Scheffler L., Brunnert S., Tang H. & Prince A. (1998). "Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection", *Infection and immunity*, **66**(1) : 43–51.

Flemming H.-C. & Wingender J. (2010). "The biofilm matrix", *Nature reviews. Microbiology*, **8**(9) : 623–633.

Fontecha I. A. y de los R. de (1606). "Diez previlegios para mugeres preñadas", *por Luys Martinez Grande* (12) : 230.

Friedman L. & Kolter R. (2004). "Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix", *Journal of bacteriology*, **186**(14) : 4457–4465.

Gadsby D. C., Vergani P. & Csanády L. (2006). "The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis", *Nature*, **440**(7083) : 477–483.

Galietta L. J., Folli C., Marchetti C., Romano L., Carpani D., Conese M. & Zegarra-Moran O. (2000). "Modification of transepithelial ion transport in human cultured bronchial epithelial cells by interferon-gamma", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **278**(6) : L1186–1194.

Galietta L. J. V., Pagesy P., Folli C., Caci E., Romio L., Costes B., Nicolis E., Cabrini G., Goossens M., Ravazzolo R. & Zegarra-Moran O. (2002). "IL-4 is a potent modulator of ion transport in the human bronchial epithelium in vitro", *The journal of immunology*, **168**(2) : 839–845.

Gao L., Kim K. J., Yankaskas J. R. & Forman H. J. (1999). "Abnormal glutathione transport in cystic fibrosis airway epithelia", *The American journal of physiology*, **277**(1 Pt 1) : L113–118.

García P., Martínez B., Rodríguez L. & Rodríguez A. (2010). "Synergy between the phage endolysin LysH5 and nisin to kill *Staphylococcus aureus* in pasteurized milk", *International journal of food microbiology*, **141**(3) : 151–155.

Garrod A. E. & Hurtley W. H. (1913). "Congenital Family Steatorrhea", *Quarterly journal of medicine*, **os6**(2) : 242–258.

Gibson L. E. & Cooke R. E. (1959). "A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis", *Pediatrics*, **23**(3) : 545–549.

Gibson R. L., Burns J. L. & Ramsey B. W. (2003). "Pathophysiology and Management of Pulmonary Infections in Cystic Fibrosis", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **168**(8) : 918–951.

Gill J. J. & Hyman P. (2010). "Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy", *Current pharmaceutical biotechnology*, **11**(1) : 2–14.

Goode D., Allen V. M. & Barrow P. A. (2003). "Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages", *Applied and environmental microbiology*, **69**(8) : 5032–5036.

Goodman M. R., Link D. W., Brown W. R. & Nakane P. K. (1981). "Ultrastructural evidence of transport of secretory IgA across bronchial epithelium", *The American review of respiratory disease*, **123**(1) : 115–119.

Goodridge L. D. (2010). "Designing phage therapeutics", *Current pharmaceutical biotechnology*, **11**(1) : 15–27.

Van Goor F., Straley K. S., Cao D., González J., Hadida S., Hazlewood A., Joubran J., Knapp T., Makings L. R., Miller M., Neuberger T., Olson E., Panchenko V., Rader J., Singh A., Stack J. H., Tung R., Grootenhuis P. D. J. & Negulescu P. (2006). "Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **290**(6) : L1117–1130.

Górski A., Międzybrodzki R., Borysowski J., Dąbrowska K., Wierzbicki P., Ohams M., Korczak-Kowalska G., Olszowska-Zaremba N., Lusiak-Szelachowska M., Kłak M., Jończyk E., Kaniuga E., Gołaś A., Purchla S., Weber-Dąbrowska B., Letkiewicz S., Fortuna W., Szufnarowski K., Pawełczyk Z., Rogóż P. & Kłosowska D. (2012). "Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy", *Advances in virus research*, **83** : 41–71.

Govan J. R. & Nelson J. W. (1993). "Microbiology of cystic fibrosis lung infections: themes and issues.", *Journal of the royal society of medicine*, **86**(Suppl 20) : 11–18.

Graham A., Steel D. M., Wilson R., Cole P. J., Alton E. W. & Geddes D. M. (1993). "Effects of purified Pseudomonas rhamnolipids on bioelectric properties of sheep tracheal epithelium", *Experimental lung research*, **19**(1) : 77–89.

Grasemann H., Stehling F., Brunar H., Widmann R., Laliberte T. W., Molina L., Döring G. & Ratjen F. (2007). "Inhalation of Moli1901 in Patients With Cystic Fibrosis*", *Chest*, **131**(5) : 1461–1466.

Gray T., Coakley R., Hirsh A., Thornton D., Kirkham S., Koo J.-S., Burch L., Boucher R. & Nettesheim P. (2004). "Regulation of MUC5AC mucin secretion and airway surface liquid metabolism by IL-1beta in human bronchial epithelia", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **286**(2) : L320–330.

Griesenbach U., Smith S. N., Farley R., Singh C. & Alton E. W. F. W. (2008). "Validation of nasal potential difference measurements in gut-corrected CF knockout mice", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **39**(4) : 490–496.

Griesenbach U., Sumner-Jones S. G., Holder E., Munkonge F. M., Wodehouse T., Smith S. N., Wasowicz M. Y., Pringle I., Casamayor I., Chan M., Coles R., Cornish N., Dewar A., Doherty A., Farley R., Green A.-M., Jones B. L., Larsen M. D. B., Lawton A. E., Manvell M., Painter H., Singh C., Somerton L., Stevenson B., Varathalingam A., Siegel C., Scheule R. K., Cheng S. H., Davies J. C., Porteous D. J., Gill D. R., Boyd A. C., Hyde S. C. & Alton E. W. F. W. (2010). "Limitations of the murine nose in the development of nonviral airway gene transfer", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **43**(1) : 46–54.

Grubb B. R. & Boucher R. C. (1999). "Pathophysiology of Gene-Targeted Mouse Models for Cystic Fibrosis", *Physiological reviews*, **79**(1) : S193–S214.

Grubb B. R., Rogers T. D., Boucher R. C. & Ostrowski L. E. (2009). "Ion transport across CF and normal murine olfactory and ciliated epithelium", *American journal of physiology- Cell physiology*, **296**(6) : C1301.

Grubb B. R., Vick R. N. & Boucher R. C. (1994). "Hyperabsorption of Na^+ and raised $Ca(^{2+})$-mediated Cl- secretion in nasal epithelia of CF mice", *American journal of physiology - Cell physiology*, **266**(5) : C1478 –C1483.

Grygorczyk R., Tabcharani J. A. & Hanrahan J. W. (1996). "CFTR channels expressed in CHO cells do not have detectable ATP conductance", *The journal of membrane biology*, **151**(2) : 139–148.

Gupta S. K., Berk R. S., Masinick S. & Hazlett L. D. (1994). "Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1", *Infection and immunity*, **62**(10) : 4572–4579.

Guttman B., Raya R. & Kutter E. (2004). "Basic phage Biology". In Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (eds) *Bacteriophages*, CRC Press.

Haardt M., Benharouga M., Lechardeur D., Kartner N. & Lukacs G. L. (1999). "C-terminal truncations destabilize the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator without impairing its biogenesis. A novel class of mutation", *The journal of biological chemistry*, **274**(31) : 21873–21877.

Haenisch M. D., Ciche T. A. & Luckie D. B. (2010). "Pseudomonas or LPS exposure alters CFTR iodide efflux in 2WT2 epithelial cells with time and dose dependence", *Biochemical and biophysical research communications*.

Hagens S., Habel A., Von Ahsen U., Von Gabain A. & Blasi U. (2004). "Therapy of experimental Pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **48**(10) : 3817.

Hagens S. & Loessner M. J. (2010). "Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations", *Current pharmaceutical biotechnology*, **11**(1) : 58–68.

Hankin E. (2011). "Hankin ME. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. Ann. Inst. Pasteur 10:511–523 (1896)", *Bacteriophage*, **1**(3) : 117–126.

Hanlon G. W., Denyer S. P., Olliff C. J. & Ibrahim L. J. (2001). "Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms", *Applied and environmental microbiology*, **67**(6) : 2746–2753.

Hartl D., Gaggar A., Bruscia E., Hector A., Marcos V., Jung A., Greene C., McElvaney G., Mall M. & Döring G. (2012). "Innate immunity in cystic fibrosis lung disease", *Journal of cystic fibrosis*, **11**(5) : 363-82

Hartl D., Griese M., Kappler M., Zissel G., Reinhardt D., Rebhan C., Schendel D. J. & Krauss-Etschmann S. (2006). "Pulmonary T(H)2 response in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients with cystic fibrosis", *The journal of allergy and clinical immunology*, **117**(1) : 204–211.

Hartzell C., Putzier I. & Arreola J. (2005). "Calcium-activated chloride channels", *Annual review of physiology*, **67** : 719–758.

Hasegawa H., Skach W., Baker O., Calayag M. C., Lingappa V. & Verkman A. S. (1992). "A multifunctional aqueous channel formed by CFTR", *Science (New York, N.Y.)*, **258**(5087) : 1477–1479.

Hauber, Bergeron C., Tsicopoulos A., Wallaert B., Olivenstein R., Holroyd K. J., Levitt R. C. & Hamid Q. (2005). "Increased expression of the calcium-activated chloride channel hCLCA1 in airways of patients with obstructive chronic bronchitis", *Canadian respiratory journal: journal of the Canadian thoracic society*, **12**(3) : 143–146.

Hauber, Tsicopoulos A., Wallaert B., Griffin S., McElvaney N. G., Daigneault P., Mueller Z., Olivenstein R., Holroyd K. J., Levitt R. C. & Hamid Q. (2004). "Expression of HCLCA1 in cystic fibrosis lungs is associated with mucus overproduction", *The European respiratory journal: official journal of the European society for clinical respiratory physiology*, **23**(6) : 846–850.

Hauser A. R. (2009). "The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection", *Nature reviews. Microbiology*, **7**(9) : 654–665.

Hawkins C., Harper D., Burch D., Anggård E. & Soothill J. (2010). "Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial", *Veterinary microbiology*, **146**(3-4) : 309–313.

Heeb S., Fletcher M. P., Chhabra S. R., Diggle S. P., Williams P. & Cámara M. (2011). "Quinolones: from antibiotics to autoinducers", *FEMS microbiology reviews*, **35**(2) : 247–274.

Heeckeren A. M. van, Schluchter M. D., Xue W. & Davis P. B. (2006). "Response to Acute Lung Infection with Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Mice", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **173**(3) : 288–296.

Henry R. L., Mellis C. M. & Petrovic L. (1992). "Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* is a marker of poor survival in cystic fibrosis", *Pediatric pulmonology*, **12**(3) : 158–161.

Hentzer M., Riedel K., Rasmussen T. B., Heydorn A., Andersen J. B., Parsek M. R., Rice S. A., Eberl L., Molin S., Høiby N., Kjelleberg S. & Givskov M. (2002). "Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound", *Microbiology*, **148**(Pt 1) : 87–102.

Hentzer M., Wu H., Andersen J. B., Riedel K., Rasmussen T. B., Bagge N., Kumar N., Schembri M. A., Song Z., Kristoffersen P., Manefield M., Costerton J. W., Molin S., Eberl L., Steinberg P., Kjelleberg S., Høiby N. & Givskov M. (2003). "Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors", *The EMBO journal*, **22**(15) : 3803–3815.

Heo Y.-J., Lee Y.-R., Jung H.-H., Lee J., Ko G. & Cho Y.-H. (2009). "Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and *Drosophila melanogaster*", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **53**(6) : 2469–2474.

d' Herelle F. (1917). "Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques", Compte rendu de l'académie des sciences de Paris **165** : 373–375.

d' Herelle F. (1921). "Le bactériophage: Son rôle dans l'immunité", Paris.

d' Herelle F. (1925). "Essai de traîtement de la peste bubonique par le bactériophage", La Presse Méd., **33** : 1393–1394.

d' Herelle F. & Smith G. H. (1926). "The bacteriophage and its behavior", Baltimore, Md. : The Williams & Wilkins Company.

Hershey A. D. & Chase M. (1952). "Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage", *The journal of general physiology*, **36**(1) : 39–56.

Hirai Y. (1991). "Survival of bacteria under dry conditions; from a viewpoint of nosocomial infection", *The journal of hospital infection*, **19**(3) : 191–200.

Hirsh A. J., Zhang J., Zamurs A., Fleegle J., Thelin W. R., Caldwell R. A., Sabater J. R., Abraham W. M., Donowitz M., Cha B., Johnson K. B., St George J. A., Johnson M. R. & Boucher R. C. (2008). "Pharmacological properties of N-(3,5-diamino-6-chloropyrazine-2-carbonyl)-N'-4-[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]butyl-guanidine methanesulfonate (552-02), a novel epithelial sodium channel blocker with potential clinical efficacy for cystic fibrosis lung disease", *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **325**(1) : 77–88.

Hoffmann N., Rasmussen T. B., Jensen P. Ø., Stub C., Hentzer M., Molin S., Ciofu O., Givskov M., Johansen H. K. & Høiby N. (2005). "Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis", *Infection and immunity*, **73**(4) : 2504–2514.

Høiby N., Ciofu O., Johansen H. K., Song Z., Moser C., Jensen P. Ø., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T. & Bjarnsholt T. (2011). "The clinical impact of bacterial biofilms", *International journal of oral science*, **3**(2) : 55–65.

Hood R. D., Singh P., Hsu F., Güvener T., Carl M. A., Trinidad R. R. S., Silverman J. M., Ohlson B. B., Hicks K. G., Plemel R. L., Li M., Schwarz S., Wang W. Y., Merz A. J., Goodlett D. R. & Mougous J. D. (2010). "A type VI secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* targets a toxin to bacteria", *Cell host & microbe*, **7**(1) : 25–37.

Hoyt M. A., Knight D. M., Das A., Miller H. I. & Echols H. (1982). "Control of phage lambda development by stability and synthesis of cII protein: role of the viral cIII and host hflA, himA and himD genes", *Cell*, **31**(3 Pt 2) : 565–573.

Huff W. E., Huff G. R., Rath N. C., Balog J. M. & Donoghue A. M. (2003). "Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection", *Poultry science*, **82**(7) : 1108–1112.

Hung C.-H., Kuo C.-F., Wang C.-H., Wu C.-M. & Tsao N. (2011). "Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **55**(4) : 1358–1365.

Hyman P. & Abedon S. T. (2010). "Chapter 7 - Bacteriophage host range and bacterial resistance". In *Advances in applied microbiology*, Academic press, pp. 217–248.

Illek B., Fu Z., Schwarzer C., Banzon T., Jalickee S., Miller S. S. & Machen T. E. (2008). "Flagellin-stimulated Cl^- secretion and innate immune responses in airway epithelia:

role for p38", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **295**(4) : L531–542.

Illek B., Zhang L., Lewis N. C., Moss R. B., Dong J. Y. & Fischer H. (1999). "Defective function of the cystic fibrosis-causing missense mutation G551D is recovered by genistein", *The American journal of physiology*, **277**(4 Pt 1) : C833–839.

Jamalludeen N., Johnson R. P., Shewen P. E. & Gyles C. L. (2009). "Evaluation of bacteriophages for prevention and treatment of diarrhea due to experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* O149 infection of pigs", *Veterinary microbiology*, **136**(1-2) : 135–141.

Janam R., Gulati A. K. & Nath G. (2011). "Antibiogram and genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human, animal, plant, water and soil sources in north India", *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, **42**(6) : 1477–1488.

Jyot J., Balloy V., Jouvion G., Verma A., Touqui L., Huerre M., Chignard M. & Ramphal R. (2011). "Type II secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: In vivo evidence of a significant role in death due to lung infection", *Journal of infectious diseases*, **203**(10) : 1369–1377.

Kammouni W., Figarella C., Baeza N., Marchand S. & Merten M. D. (1997). "*Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide induces CF-like alteration of protein secretion by human tracheal gland cells", *Biochemical and biophysical research communications*, **241**(2) : 305–311.

Kartner N., Hanrahan J. W., Jensen T. J., Naismith A. L., Sun S. Z., Ackerley C. A., Reyes E. F., Tsui L. C., Rommens J. M. & Bear C. E. (1991). "Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance", *Cell*, **64**(4) : 681–691.

Kelley T. J., Thomas K., Milgram L. J. & Drumm M. L. (1997). "In vivo activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant deltaF508 in murine nasal epithelium", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **94**(6) : 2604–2608.

Kerem B., Rommens J. M., Buchanan J. A., Markiewicz D., Cox T. K., Chakravarti A., Buchwald M. & Tsui L. C. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis", *Science (New York, N.Y.)*, **245**(4922) : 1073–1080.

Kerem E., Hirawat S., Armoni S., Yaakov Y., Shoseyov D., Cohen M., Nissim-Rafinia M., Blau H., Rivlin J., Aviram M., Elfring G. L., Northcutt V. J., Miller L. L., Kerem B. & Wilschanski M. (2008). "Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial", *Lancet*, **372**(9640) : 719–727.

Kipnis E., Sawa T. & Wiener-Kronish J. (2006). "Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis", *Médecine et maladies infectieuses*, **36**(2) : 78–91.

Kirchner S., Fothergill J. L., Wright E. A., James C. E., Mowat E. & Winstanley C. (2012). "Use of artificial sputum medium to test antibiotic efficacy against *Pseudomonas*

aeruginosa in conditions more relevant to the cystic fibrosis lung", *Journal of visualized experiments: JoVE*(64) : e3857.

Knowles M., Gatzy J. & Boucher R. (1981). "Increased bioelectric potential difference across respiratory epithelia in cystic fibrosis", *The New England journal of medicine*, **305**(25) : 1489–1495.

Knowles M. R., Paradiso A. M. & Boucher R. C. (1995). "In vivo nasal potential difference: techniques and protocols for assessing efficacy of gene transfer in cystic fibrosis", *Human gene therapy*, **6**(4) : 445–455.

Ko S. B. H., Shcheynikov N., Choi J. Y., Luo X., Ishibashi K., Thomas P. J., Kim J. Y., Kim K. H., Lee M. G., Naruse S. & Muallem S. (2002). "A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in cystic fibrosis", *The EMBO journal*, **21**(21) : 5662–5672.

Köhler T., Curty L. K., Barja F., van Delden C. & Pechère J. C. (2000). "Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili", *Journal of bacteriology*, **182**(21) : 5990–5996.

Komáromy L. & Tigyi A. (1988). "A unique cell type in the lung--the Clara cell (the non-ciliated bronchiolar epithelial cell)", *Acta biologica Hungarica*, **39**(1) : 17–29.

Kong F., Young L., Chen Y., Ran H., Meyers M., Joseph P., Cho Y.-H., Hassett D. J. & Lau G. W. (2006). "*Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization", *Cellular microbiology*, **8**(7) : 1121–1133.

Kopelman H., Corey M., Gaskin K., Durie P., Weizman Z. & Forstner G. (1988). "Impaired chloride secretion, as well as bicarbonate secretion, underlies the fluid secretory defect in the cystic fibrosis pancreas", *Gastroenterology*, **95**(2) : 349–355.

Kosorok M. R., Zeng L., West S. E., Rock M. J., Splaingard M. L., Laxova A., Green C. G., Collins J. & Farrell P. M. (2001). "Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition", *Pediatric pulmonology*, **32**(4) : 277–287.

Kropinski A. M. (2006). "Phage therapy - everything old is new again", *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie médicale / AMMI Canada*, **17**(5) : 297–306.

Kumari S., Harjai K. & Chhibber S. (2009). "Efficacy of bacteriophage treatment in murine burn wound infection induced by *Klebsiella pneumoniae*", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **19**(6) : 622–628.

Kumari S., Harjai K. & Chhibber S. (2009). "Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO specific bacteriophages isolated from sewage samples", *American journal of biomedical sciences* : 91–102.

Kumari S., Harjai K. & Chhibber S. (2010). "Evidence to support the therapeutic potential of bacteriophage Kpn5 in burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in BALB/c mice", *Journal of microbiology and biotechnology*, **20**(5) : 935–941.

Kumari S., Harjai K. & Chhibber S. (2010). "Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055", *Journal of medical microbiology*, **60**(2) : 205-10

Kung V. L., Ozer E. A. & Hauser A. R. (2010). "The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*", *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, **74**(4) : 621–641.

Kunzelmann K. (2006). "Flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* inhibits Na^+ transport in airway epithelia", *The FASEB Journal*, **20**(3) : 545-6

Kunzelmann K., Beesley A. H., King N. J., Karupiah G., Young J. A. & Cook D. I. (2000). "*Influenza virus* inhibits amiloride-sensitive Na^+ channels in respiratory epithelia", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **97**(18) : 10282–10287.

Kunzelmann K., Kiser G. L., Schreiber R. & Riordan J. R. (1997). "Inhibition of epithelial Na^+ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *FEBS letters*, **400**(3) : 341–344.

Kunzelmann K., König J., Sun J., Markovich D., King N. J., Karupiah G., Young J. A. & Cook D. I. (2004). "Acute effects of *parainfluenza virus* on epithelial electrolyte transport", *The journal of biological chemistry*, **279**(47) : 48760–48766.

Kunzelmann K., Mall M., Briel M., Hipper A., Nitschke R., Ricken S. & Greger R. (1997). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator attenuates the endogenous Ca^{2+} activated Cl^- conductance of Xenopus oocytes", *Pflügers archiv: European journal of physiology*, **435**(1) : 178–181.

Kunzelmann K., Sun J., Meanger J., King N. J. & Cook D. I. (2007). "Inhibition of airway Na^+ transport by *respiratory syncytial virus*", *Journal of virology*, **81**(8) : 3714–3720.

Kunzelmann K., Tian Y., Martins J. R., Faria D., Kongsuphol P., Ousingsawat J., Wolf L. & Schreiber R. (2012). "Airway epithelial cells-Functional links between CFTR and anoctamin dependent Cl^- secretion", *The international journal of biochemistry & cell biology*, **44**(11) : 1897–1900.

Kurzepa A., Dabrowska K., Skaradziński G. & Górski A. (2009). "Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy", *Clinical and experimental medicine*, **9**(2) : 93–100.

Kutateladze M. & Adamia R. (2010). "Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics", *Trends in biotechnology*, **28**(12) : 591–595.

Kvachadze L., Balarjishvili N., Meskhi T., Tevdoradze E., Skhirtladze N., Pataridze T., Adamia R., Topuria T., Kutter E., Rohde C. & Kutateladze M. (2011). "Evaluation of lytic activity of staphylococcal bacteriophage Sb-1 against freshly isolated clinical pathogens", *Microbial biotechnology*, **4**(5) : 643–650.

Labrie S. J., Samson J. E. & Moineau S. (2010). "Bacteriophage resistance mechanisms", *Nature reviews microbiology*.

Lammens E., Ceyssens P.-J., Voet M., Hertveldt K., Lavigne R. & Volckaert G. (2009). "Representational Difference Analysis (RDA) of bacteriophage genomes", *Journal of microbiological methods*, **77**(2) : 207–213.

Landsteiner K. (1905). "Darmverschluss durch eingedicktes meconium; pankreatitis", *Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie*, **16** : 903–907.

Lau G. W., Ran H., Kong F., Hassett D. J. & Mavrodi D. (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice", *Infection and immunity*, **72**(7) : 4275–4278.

Lazrak A., Jurkuvenaite A., Chen L., Keeling K. M., Collawn J. F., Bedwell D. M. & Matalon S. (2011). "Enhancement of alveolar epithelial sodium channel activity with decreased cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in mouse lung", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **301**(4) : L557–567.

Lee M. G., Wigley W. C., Zeng W., Noel L. E., Marino C. R., Thomas P. J. & Muallem S. (1999). "Regulation of Cl^-/ HCO_3^- exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 cells", *The journal of biological chemistry*, **274**(6) : 3414–3421.

Lehrer R. I., Lichtenstein A. K. & Ganz T. (1993). "Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells", *Annual review of immunology*, **11** : 105–128.

Leikauf G. D., Ueki I. F., Nadel J. A. & Widdicombe J. H. (1985). "Bradykinin stimulates Cl secretion and prostaglandin E2 release by canine tracheal epithelium", *The American journal of physiology*, **248**(1 Pt 2) : F48–55.

Leiman P. G., Kanamaru S., Mesyanzhinov V. V., Arisaka F. & Rossmann M. G. (2003). "Structure and morphogenesis of bacteriophage T4", *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **60**(11) : 2356–2370.

Leonard A., Lebecque P., Dingemanse J. & Leal T. (2012). "A randomized placebo-controlled trial of miglustat in cystic fibrosis based on nasal potential difference", *Journal of cystic fibrosis*, **11**(3) : 231–236.

Li C., Ramjeesingh M. & Bear C. E. (1996). "Purified cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) does not function as an ATP channel", *The journal of biological chemistry*, **271**(20) : 11623–11626.

Li K., Guo D., Zhu H., Hering-Smith K. S., Hamm L. L., Ouyang J. & Dong Y. (2010). "Interleukin-6 stimulates epithelial sodium channels in mouse cortical collecting duct cells", *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, **299**(2) : R590–595.

Lindert J., Perlman C. E., Parthasarathi K. & Bhattacharya J. (2007). "Chloride-dependent secretion of alveolar wall liquid determined by optical-sectioning microscopy", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **36**(6) : 688–696.

Linsdell P. & Hanrahan J. W. (1998). "Glutathione permeability of CFTR", *The American journal of physiology*, **275**(1 Pt 1) : C323–326.

Linsdell P., Tabcharani J. A., Rommens J. M., Hou Y.-X., Chang X.-B., Tsui L.-C., Riordan J. R. & Hanrahan J. W. (1997). "Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions", *The journal of general physiology*, **110**(4) : 355–364.

Lipecka J., Norez C., Bensalem N., Baudouin-Legros M., Planelles G., Becq F., Edelman A. & Davezac N. (2006). "Rescue of DeltaF508-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) by curcumin: involvement of the keratin 18 network", *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, **317**(2) : 500–505.

LiPuma J. J. (2010). "The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis", *Clinical microbiology reviews*, **23**(2) : 299–323.

Longphre M., Li D., Gallup M., Drori E., Ordoñez C. L., Redman T., Wenzel S., Bice D. E., Fahy J. V. & Basbaum C. (1999). "Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells", *The journal of clinical investigation*, **104**(10) : 1375–1382.

Louahed J., Toda M., Jen J., Hamid Q., Renauld J.-C., Levitt R. C. & Nicolaides N. C. (2000). "Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **22**(6) : 649–656.

Loussouarn G., Demolombe S., Mohammad-Panah R., Escande D. & Baró I. (1996). "Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K^+ currents", *The american journal of physiology*, **271**(5 Pt 1) : C1565–1573.

Lubamba B., Lebacq J., Lebecque P., Vanbever R., Leonard A., Wallemacq P. & Leal T. (2009). "Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **179**(11) : 1022–1028.

Lubamba B., Lebacq J., Reychler G., Marbaix E., Wallemacq P., Lebecque P. & Leal T. (2011). "Inhaled phosphodiesterase type 5 inhibitors restore chloride transport in cystic fibrosis mice", *The european respiratory journal*, **37**(1) : 72–78.

Lubamba B., Lecourt H., Lebacq J., Lebecque P., De Jonge H., Wallemacq P. & Leal T. (2008). "Preclinical evidence that sildenafil and vardenafil activate chloride transport in cystic fibrosis", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **177**(5) : 506–515.

Lucchini S., Rowley G., Goldberg M. D., Hurd D., Harrison M. & Hinton J. C. D. (2006). "H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria", *PLoS pathogens*, **2**(8) : e81.

Lucotte G., Hazout S. & Loirat F. (1991). "North-west/south-east gradient in delta F508 frequency in Europe", *Lancet*, **338**(8771) : 882–883.

Lyczak J. B., Cannon C. L. & Pier G. B. (2002). "Lung infections associated with cystic fibrosis", C*linical microbiology reviews*, **15**(2) : 194–222.

MacDonald K. D., McKenzie K. R., Henderson M. J., Hawkins C. E., Vij N. & Zeitlin P. L. (2008). "Lubiprostone activates non-CFTR-dependent respiratory epithelial chloride secretion in cystic fibrosis mice", *American journal of physiology- lung cellular and molecular physiology*, **295**(5) : L933.

MacEachran D. P., Ye S., Bomberger J. M., Hogan D. A., Swiatecka-Urban A., Stanton B. A. & O'Toole G. A. (2007). "The *Pseudomonas aeruginosa* secreted protein PA2934 decreases apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *Infection and immunity*, **75**(8) : 3902–3912.

Madsen K. L., Tavernini M. M., Mosmann T. R. & Fedorak R. N. (1996). "Interleukin 10 modulates ion transport in rat small intestine", *Gastroenterology*, **111**(4) : 936–944.

Mahony J., McAuliffe O., Ross R. P. & van Sinderen D. (2011). "Bacteriophages as biocontrol agents of food pathogens", *Current opinion in biotechnology*, **22**(2) : 157–163.

Mai V., Ukhanova M., Visone L., Abuladze T. & Sulakvelidze A. (2010). "Bacteriophage administration reduces the concentration of *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal tract and its translocation to spleen and liver in experimentally infected mice", *International journal of microbiology*, **2010** : 624234.

Mall M. A. (2009). "Role of the amiloride-sensitive epithelial Na^+ channel in the pathogenesis and as a therapeutic target for cystic fibrosis lung disease", *Experimental physiology*, **94**(2) : 171–174.

Mall M., Bleich M., Greger R., Schreiber R. & Kunzelmann K. (1998). "The amiloride-inhibitable Na^+ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways", *The journal of clinical investigation*, **102**(1) : 15–21.

Mall M., Bleich M., Kuehr J., Brandis M., Greger R. & Kunzelmann K. (1999). "CFTR-mediated inhibition of epithelial Na^+ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis", *The american journal of physiology*, **277**(3 Pt 1) : G709–716.

Mall M., Gonska T., Thomas J., Schreiber R., Seydewitz H. H., Kuehr J., Brandis M. & Kunzelmann K. (2003). "Modulation of Ca^{2+}-activated Cl^- secretion by basolateral K^+ channels in human normal and cystic fibrosis airway epithelia", *Pediatric research*, **53**(4) : 608–618.

Mall M., Grubb B. R., Harkema J. R., O'Neal W. K. & Boucher R. C. (2004). "Increased airway epithelial Na^+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice", *Nature medicine*, **10**(5) : 487–493.

Marchiando A. M., Graham W. V. & Turner J. R. (2010). "Epithelial barriers in homeostasis and disease", *Annual review of pathology*, **5** : 119–144.

Marelich G. P. & Cross C. E. (1996). "Cystic fibrosis in adults. From researcher to practitioner.", *Western journal of medicine*, **164**(4) : 321.

Marivingt-Mounir C., Norez C., Dérand R., Bulteau-Pignoux L., Nguyen-Huy D., Viossat B., Morgant G., Becq F., Vierfond J.-M. & Mettey Y. (2004). "Synthesis, SAR, crystal

structure, and biological evaluation of benzoquinoliziniums as activators of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channels", *Journal of medicinal chemistry*, **47**(4) : 962–972.

Martini S. V., Rocco P. R. M. & Morales M. M. (2011). "Adeno-associated virus for cystic fibrosis gene therapy", *Brazilian journal of medical and biological research*, **44**(11) : 1097–1104.

Masuda N., Sakagawa E., Ohya S., Gotoh N., Tsujimoto H. & Nishino T. (2000). "Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **44**(12) : 3322–3327.

Mathee K., Ciofu O., Sternberg C., Lindum P. W., Campbell J. I., Jensen P., Johnsen A. H., Givskov M., Ohman D. E., Molin S., Høiby N. & Kharazmi A. (1999). "Mucoid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung", *Microbiology*, **145 (Pt 6)** : 1349–1357.

Matsui H., Verghese M. W., Kesimer M., Schwab U. E., Randell S. H., Sheehan J. K., Grubb B. R. & Boucher R. C. (2005). "Reduced three-dimensional motility in dehydrated airway mucus prevents neutrophil capture and killing bacteria on airway epithelial surfaces", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **175**(2) : 1090–1099.

Maura D., Morello E., du Merle L., Bomme P., Le Bouguénec C. & Debarbieux L. (2012). "Intestinal colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* supports long-term bacteriophage replication in mice", *Environmental microbiology*, **14**(8) : 1844–1854.

Mbawuike I. N. & Herscowitz H. B. (1989). "MH-S, a murine alveolar macrophage cell line: morphological, cytochemical, and functional characteristics", *Journal of leukocyte biology*, **46**(2) : 119–127.

McCarty N. A., Standaert T. A., Teresi M., Tuthill C., Launspach J., Kelley T. J., Milgram L. J. H., Hilliard K. A., Regelmann W. E., Weatherly M. R., Aitken M. L., Konstan M. W. & Ahrens R. C. (2002). "A phase I randomized, multicenter trial of CPX in adult subjects with mild cystic fibrosis", *Pediatric pulmonology*, **33**(2) : 90–98.

McClure C. D. & Schiller N. L. (1996). "Inhibition of macrophage phagocytosis by *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids in vitro and in vivo", *Current microbiology*, **33**(2) : 109–117.

McDougald D., Klebensberger J., Tolker-Nielsen T., Webb J. S., Conibear T., Rice S. A., Kirov S. M., Matz C. & Kjelleberg S. (2008). "*Pseudomonas aeruginosa*: a model for biofilm formation". In Rehm, B. H. A. (ed) *Pseudomonas*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 215–253.

McNicholas C. M., Nason M. W. Jr, Guggino W. B., Schwiebert E. M., Hebert S. C., Giebisch G. & Egan M. E. (1997). "A functional CFTR-NBF1 is required for ROMK2-CFTR interaction", *The american journal of physiology*, **273**(5 Pt 2) : F843–848.

McVay C. S., Velasquez M. & Fralick J. A. (2007). "Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**(6) : 1934–1938.

Mehta A. (2005). "CFTR: more than just a chloride channel", *Pediatric Pulmonology*, **39**(4) : 292–298.

Meitert E., Petrovici M., Sima F., Costache G. & Savulian C. (1987). "Investigation on the therapeutical efficiency of some adapted bacteriophages in experimental infection with *Pseudomonas aeruginosa*", *Archives roumaines de pathologie expérimentales et de microbiologie*, **46**(1) : 17–26.

Miller R. A. & Britigan B. E. (1997). "Role of oxidants in microbial pathophysiology", *Clinical microbiology reviews*, **10**(1) : 1–18.

Mills A. D., Yoo C., Butler J. D., Yang B., Verkman A. S. & Kurth M. J. (2010). "Design and synthesis of a hybrid potentiator-corrector agonist of the cystic fibrosis mutant protein DeltaF508-CFTR", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, **20**(1) : 87–91.

Minikh O., Tolba M., Brovko L. Y. & Griffiths M. W. (2010). "Bacteriophage-based biosorbents coupled with bioluminescent ATP assay for rapid concentration and detection of *Escherichia coli*", *Journal of microbiological methods*, **82**(2) : 177–183.

Moodley Y., Manuelpillai U. & Weiss D. J. (2011). "Cellular therapies for lung disease: a distant horizon", *Respirology*, **16**(2) : 223–237.

Morello E., Saussereau E., Maura D., Huerre M., Touqui L. & Debarbieux L. (2011). "Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention", *PLoS ONE*, **6**(2) .

Morris A. P. & Frizzell R. A. (1994). "Vesicle targeting and ion secretion in epithelial cells: implications for cystic fibrosis", *Annual review of physiology*, **56** : 371–397.

Moser C., Kjaergaard S., Pressler T., Kharazmi A., Koch C. & Høiby N. (2000). "The immune response to chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis patients is predominantly of the Th2 type", *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, **108**(5) : 329–335.

Moss R. B., Milla C., Colombo J., Accurso F., Zeitlin P. L., Clancy J. P., Spencer L. T., Pilewski J., Waltz D. A., Dorkin H. L., Ferkol T., Pian M., Ramsey B., Carter B. J., Martin D. B. & Heald A. E. (2007). "Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial", *Human gene therapy*, **18**(8) : 726–732.

Mou H., Zhao R., Sherwood R., Ahfeldt T., Lapey A., Wain J., Sicilian L., Izvolsky K., Musunuru K., Cowan C. & Rajagopal J. (2012). "Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs", *Cell stem cell*, **10**(4) : 385–397.

Muanprasat C., Sonawane N. D., Salinas D., Taddei A., Galietta L. J. . & Verkman A. S. (2004). "Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism,

structure-activity analysis, and in vivo efficacy", *The journal of general physiology*, **124**(2) : 125.

Munck A. & Roussey M. (2008). "The French nationwide cystic fibrosis newborn screening program: strategy and results", *Archives de pédiatrie*, **15 Suppl 1** : S1–6.

Nair P. K., Li T., Bhattacharjee R., Ye X. & Folkesson H. G. (2005). "Oxytocin-induced labor augments IL-1beta-stimulated lung fluid absorption in fetal guinea pig lungs", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **289**(6) : L1029–1038.

Nakanishi A., Morita S., Iwashita H., Sagiya Y., Ashida Y., Shirafuji H., Fujisawa Y., Nishimura O. & Fujino M. (2001). "Role of Gob-5 in mucus overproduction and airway hyperresponsiveness in asthma", *Proceedings of the national academy of sciences*, **98**(9) : 5175–5180.

Namkung W., Yao Z., Finkbeiner W. E. & Verkman A. S. (2011). "Small-molecule activators of TMEM16A, a calcium-activated chloride channel, stimulate epithelial chloride secretion and intestinal contraction", *FASEB journal*, **25**(11) : 4048–4062.

Newton G. J., Daniels C., Burrows L. L., Kropinski A. M., Clarke A. J. & Lam J. S. (2001). "Three-component-mediated serotype conversion in *Pseudomonas aeruginosa* by bacteriophage D3", *Molecular microbiology*, **39**(5) : 1237–1247.

Nichols D., Chmiel J. & Berger M. (2008). "Chronic inflammation in the cystic fibrosis lung: alterations in inter- and intracellular signaling", *Clinical reviews in allergy & immunology*, **34**(2) : 146–162.

Nichols W. W., Dorrington S. M., Slack M. P. & Walmsley H. L. (1988). "Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **32**(4) : 518–523.

Norez C., Antigny F., Noel S., Vandebrouck C. & Becq F. (2009). "A cystic fibrosis respiratory epithelial cell chronically treated by miglustat acquires a non-cystic fibrosis-like phenotype", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **41**(2) : 217–225.

Norez C., Noel S., Wilke M., Bijvelds M., Jorna H., Melin P., DeJonge H. & Becq F. (2006). "Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat", *FEBS letters*, **580**(8) : 2081–2086.

Ntimbane T., Comte B., Mailhot G., Berthiaume Y., Poitout V., Prentki M., Rabasa-Lhoret R. & Levy E. (2009). "Cystic fibrosis-related diabetes: from CFTR dysfunction to oxidative stress", *The clinical biochemist. Reviews / australian association of clinical biochemists*, **30**(4) : 153–177.

O'Flynn G., Ross R. P., Fitzgerald G. F. & Coffey A. (2004). "Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7", *Applied and environmental microbiology*, **70**(6) : 3417–3424.

O'Loughlin E. V., Pang G. P., Noltorp R., Koina C., Batey R. & Clancy R. (2001). "Interleukin 2 modulates ion secretion and cell proliferation in cultured human small intestinal enterocytes", *Gut*, **49**(5) : 636–643.

O'Malley Y. Q., Reszka K. J., Spitz D. R., Denning G. M. & Britigan B. E. (2004). "*Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **287**(1) : L94–103.

Oliynyk I., Varelogianni G., Roomans G. M. & Johannesson M. (2010). "Effect of duramycin on chloride transport and intracellular calcium concentration in cystic fibrosis and non‐cystic fibrosis epithelia", *APMIS*, **118**(12) : 982–990.

Olson M. E., Ceri H., Morck D. W., Buret A. G. & Read R. R. (2002). "Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics", *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, **66**(2) : 86–92.

Ostrowski L. E., Yin W., Diggs P. S., Rogers T. D., O'Neal W. K. & Grubb B. R. (2007). "Expression of CFTR from a ciliated cell-specific promoter is ineffective at correcting nasal potential difference in CF mice", *Gene Therapy*, **14**(20) : 1492–1501.

Ousingsawat J., Kongsuphol P., Schreiber R. & Kunzelmann K. (2011). "CFTR and TMEM16A are separate but functionally related Cl^- channels", *Cellular physiology and biochemistry*, **28**(4) : 715–724.

Palleroni N. J. (2010). "The Pseudomonas story", *Environmental microbiology*, **12**(6) : 1377–1383.

Parad R. B., Gerard C. J., Zurakowski D., Nichols D. P. & Pier G. B. (1999). "Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype", *Infection and immunity*, **67**(9) : 4744–4750.

Parsons D. W., Hopkins P. J., Bourne A. J., Boucher R. C. & Martin A. J. (2000). "Airway gene transfer in mouse nasal-airways: importance of identification of epithelial type for assessment of gene transfer", *Gene therapy*, **7**(21) : 1810–1815.

Parua P. K., Mondal A. & Parrack P. (2010). "HflD, an *Escherichia coli* protein involved in the lambda lysis-lysogeny switch, impairs transcription activation by lambdaCII", *Archives of biochemistry and biophysics*, **493**(2) : 175–183.

Pasyk E. A. & Foskett J. K. (1997). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-associated ATP and adenosine 3'-phosphate 5'-phosphosulfate channels in endoplasmic reticulum and plasma membranes", *The journal of biological chemistry*, **272**(12) : 7746–7751.

Pedemonte N., Diena T., Caci E., Nieddu E., Mazzei M., Ravazzolo R., Zegarra-Moran O. & Galietta L. J. V. (2005). "Antihypertensive 1,4-dihydropyridines as correctors of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations", *Molecular pharmacology*, **68**(6) : 1736–1746.

Perez-Cornejo P. & Arreola J. (2004). "Regulation of Ca^{2+}-activated chloride channels by cAMP and CFTR in parotid acinar cells", *Biochemical and biophysical research communications*, **316**(3) : 612–617.

Pier G. B., Grout M. & Zaidi T. S. (1997). "Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is an epithelial cell receptor for clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the lung", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **94**(22) : 12088–12093.

Pirnay J.-P., Bilocq F., Pot B., Cornelis P., Zizi M., Van Eldere J., Deschaght P., Vaneechoutte M., Jennes S., Pitt T. & De Vos D. (2009). "*Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited", *PloS One*, **4**(11) : e7740.

Pirnay J.-P., De Vos D., Verbeken G., Merabishvili M., Chanishvili N., Vaneechoutte M., Zizi M., Laire G., Lavigne R., Huys I., Van den Mooter G., Buckling A., Debarbieux L., Pouillot F., Azeredo J., Kutter E., Dublanchet A., Górski A. & Adamia R. (2011). "The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure?", *Pharmaceutical research*, **28**(4) : 934–937.

Pittman J. E., Calloway E. H., Kiser M., Yeatts J., Davis S. D., Drumm M. L., Schechter M. S., Leigh M. W., Emond M., Van Rie A. & Knowles M. R. (2010). "Age of *Pseudomonas aeruginosa* acquisition and subsequent severity of cystic fibrosis lung disease", *Pediatric pulmonology*.

Poole K. (2011). "*Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max", *Frontiers in microbiology*, **2 :** 65

Postiaux G. & Paupe J. (2003). "Kinésithérapie respiratoire de l'enfant: les techniques de soins guidées par l'auscultation pulmonaire", *De Boeck Supérieur*.

Pouillot F., Chomton M., Blois H., Courroux C., Noelig J., Bidet P., Bingen E. & Bonacorsi S. (2012). "Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **56**(7) : 3568–3575.

Proctor R. A., Eiff C. von, Kahl B. C., Becker K., McNamara P., Herrmann M. & Peters G. (2006). "Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections", *Nature reviews microbiology*, **4**(4) : 295–305.

Przerwa A., Zimecki M., Świtała-Jeleń K., Dąbrowska K., Krawczyk E., Łuczak M., Weber-Dąbrowska B., Syper D., Międzybrodzki R. & Górski A. (2006). "Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions", *Medical microbiology and immunology*, **195**(3) : 143–150.

Puchelle E., Zahm J. M. & Quemada D. (1987). "Rheological properties controlling mucociliary frequency and respiratory mucus transport", *Biorheology*, **24**(6) : 557–563.

Quinton P. M. (1983). "Chloride impermeability in cystic fibrosis", *Nature*, **301**(5899) : 421–422.

Quinton P. M. & Bijman J. (1983). "Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis", *The New England journal of medicine*, **308**(20) : 1185–1189.

Ramage G., Vandewalle K., Wickes B. L. & López-Ribot J. L. (2001). "Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*", *Revista iberoamericana de micología*, **18**(4) : 163–170.

Ramphal R., Arora S. K. & Ritchings B. W. (1996). "Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **154**(4 Pt 2) : S170–174.

Ramsey B. W., Davies J., McElvaney N. G., Tullis E., Bell S. C., Dřevínek P., Griese M., McKone E. F., Wainwright C. E., Konstan M. W., Moss R., Ratjen F., Sermet-Gaudelus I., Rowe S. M., Dong Q., Rodriguez S., Yen K., Ordoñez C. & Elborn J. S. (2011). "A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation", *The New England journal of medicine*, **365**(18) : 1663–1672.

Ratjen F., Comes G., Paul K., Posselt H. G., Wagner T. O. & Harms K. (2001). "Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of P. aeruginosa acquisition in patients with cystic fibrosis", *Pediatric pulmonology*, **31**(1) : 13–16.

Ratjen F. & Döring G. (2003). "Cystic fibrosis", *Lancet*, **361**(9358) : 681–689.

Raya R. R., Varey P., Oot R. A., Dyen M. R., Callaway T. R., Edrington T. S., Kutter E. M. & Brabban A. D. (2006). "Isolation and characterization of a new T-even bacteriophage, CEV1, and determination of its potential to reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in sheep", *Applied and environmental microbiology*, **72**(9) : 6405–6410.

Read R. C., Roberts P., Munro N., Rutman A., Hastie A., Shryock T., Hall R., McDonald-Gibson W., Lund V. & Taylor G. (1992). "Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating", *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, **72**(6) : 2271–2277.

Reddy M. M., Quinton P. M., Haws C., Wine J. J., Grygorczyk R., Tabcharani J. A., Hanrahan J. W., Gunderson K. L. & Kopito R. R. (1996). "Failure of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to conduct ATP", *Science (New York, N.Y.)*, **271**(5257) : 1876–1879.

Reisin I. L., Prat A. G., Abraham E. H., Amara J. F., Gregory R. J., Ausiello D. A. & Cantiello H. F. (1994). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel", *The journal of biological chemistry*, **269**(32) : 20584–20591.

Rhoads D. D., Wolcott R. D., Kuskowski M. A., Wolcott B. M., Ward L. S. & Sulakvelidze A. (2009). "Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial", *Journal of wound care*, **18**(6) : 237–238, 240–243.

Rice S. A., Tan C. H., Mikkelsen P. J., Kung V., Woo J., Tay M., Hauser A., McDougald D., Webb J. S. & Kjelleberg S. (2008). "The biofilm life cycle and virulence of

Pseudomonas aeruginosa are dependent on a filamentous prophage", *The ISME journal*, **3**(3) : 271–282.

Rietschel E. T., Kirikae T., Schade F. U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A. J., Zähringer U., Seydel U. & Padova F. D. (1994). "Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function.", *The FASEB Journal*, **8**(2) : 217–225.

Riordan J. R. (2008). "CFTR function and prospects for therapy", *Annual review of biochemistry*, **77**(1) : 701–726.

Riordan J. R., Rommens J. M., Kerem B., Alon N., Rozmahel R., Grzelczak Z., Zielenski J., Lok S., Plavsic N. & Chou J. L. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA", *Science (New York, N.Y.)*, **245**(4922) : 1066–1073.

Robert R., Carlile G. W., Liao J., Balghi H., Lesimple P., Liu N., Kus B., Rotin D., Wilke M., De Jonge H. R., Scholte B. J., Thomas D. Y. & Hanrahan J. W. (2010). "Correction of the ΔPhe508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking defect by the bioavailable compound glafenine", *Molecular pharmacology*, **77**(6) : 922–930.

Robert R., Carlile G. W., Pavel C., Liu N., Anjos S. M., Liao J., Luo Y., Zhang D., Thomas D. Y. & Hanrahan J. W. (2008). "Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect", *Molecular pharmacology*, **73**(2) : 478–489.

Rodriguez-Brito B., Li L., Wegley L., Furlan M., Angly F., Breitbart M., Buchanan J., Desnues C., Dinsdale E., Edwards R., Felts B., Haynes M., Liu H., Lipson D., Mahaffy J., Martin-Cuadrado A. B., Mira A., Nulton J., Pasić L., Rayhawk S., Rodriguez-Mueller J., Rodriguez-Valera F., Salamon P., Srinagesh S., Thingstad T. F., Tran T., Thurber R. V., Willner D., Youle M. & Rohwer F. (2010). "Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments", *The ISME journal*, **4**(6) : 739–751.

Rommens J. M., Dho S., Bear C. E., Kartner N., Kennedy D., Riordan J. R., Tsui L. C. & Foskett J. K. (1991). "cAMP-inducible chloride conductance in mouse fibroblast lines stably expressing the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **88**(17) : 7500–7504.

Rommens J. M., Iannuzzi M. C., Kerem B., Drumm M. L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J. L., Kennedy D. & Hidaka N. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping", *Science (New York, N.Y.)*, **245**(4922) : 1059–1065.

Roux, Catherinot E., Ripoll F., Soismier N., Macheras E., Ravilly S., Bellis G., Vibet M.-A., Le Roux E., Lemonnier L., Gutierrez C., Vincent V., Fauroux B., Rottman M., Guillemot D. & Gaillard J.-L. (2009). "Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in france", *Journal of clinical microbiology*, **47**(12) : 4124–4128.

Roux J., Kawakatsu H., Gartland B., Pespeni M., Sheppard D., Matthay M. A., Canessa C. M. & Pittet J.-F. (2005). "Interleukin-1β decreases expression of the epithelial sodium channel α-subunit in alveolar epithelial cells via a p38 MAPK-dependent signaling pathway", *Journal of biological chemistry*, **280**(19) : 18579–18589.

Rowntree R. K. & Harris A. (2003). "The phenotypic consequences of CFTR mutations", *Annals of human genetics*, **67**(5) : 471–485.

Rubenstein R. C., Egan M. E. & Zeitlin P. L. (1997). "In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR", *The journal of clinical investigation*, **100**(10) : 2457–2465.

Rubenstein R. C. & Zeitlin P. L. (1998). "A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **157**(2) : 484–490.

Rubin B. K. (2009). "Mucus, phlegm, and sputum in cystic fibrosis", *Respiratory care*, **54**(6) : 726–732; discussion 732.

Saiman L. & Prince A. (1993). "*Pseudomonas aeruginosa* pili bind to asialoGM1 which is increased on the surface of cystic fibrosis epithelial cells", *The journal of clinical investigation*, **92**(4) : 1875–1880.

Salinas D. B., Pedemonte N., Muanprasat C., Finkbeiner W. F., Nielson D. W. & Verkman A. S. (2004). "CFTR involvement in nasal potential differences in mice and pigs studied using a thiazolidinone CFTR inhibitor", *American journal of physiology - lung cellular and molecular physiology*, **287**(5) : L936–L943.

Sallenave J. M. (2002). "Antimicrobial activity of antiproteinases", *Biochemical society transactions*, **30**(2) : 111–115.

Sana T. G., Hachani A., Bucior I., Soscia C., Garvis S., Termine E., Engel J., Filloux A. & Bleves S. (2012). "The second type six secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 is regulated by quorum sensing and fur, and modulates internalization in epithelial cells", *The journal of biological chemistry*.

Sandkvist M. (2001). "Biology of type II secretion", *Molecular microbiology*, **40**(2) : 271–283.

Di Sant'Agnese P. A., Darling R. C., Perera G. A. & Shea E. (1953). "Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease", *Pediatrics*, **12**(5) : 549–563.

Schreiber R., Hopf A., Mall M., Greger R. & Kunzelmann K. (1999). "The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na^+ channel", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **96**(9) : 5310–5315.

Schreiber R., Nitschke R., Greger R. & Kunzelmann K. (1999). "The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activates aquaporin 3 in airway epithelial cells", *The journal of biological chemistry*, **274**(17) : 11811–11816.

Schreiber R., Pavenstädt H., Greger R. & Kunzelmann K. (2000). "Aquaporin 3 cloned from *Xenopus laevis* is regulated by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *FEBS letters*, **475**(3) : 291–295.

Schroeder B. C., Cheng T., Jan Y. N. & Jan L. Y. (2008). "Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit", *Cell*, **134**(6) : 1019–1029.

Schroeder T. H., Lee M. M., Yacono P. W., Cannon C. L., Gerçeker A. A., Golan D. E. & Pier G. B. (2002). "CFTR is a pattern recognition molecule that extracts *Pseudomonas aeruginosa* LPS from the outer membrane into epithelial cells and activates NF-kappa B translocation", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **99**(10) : 6907–6912.

Schurr M. J., Martin D. W., Mudd M. H. & Deretic V. (1994). "Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*: functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy", *Journal of bacteriology*, **176**(11) : 3375–3382.

Schwiebert E. M., Benos D. J., Egan M. E., Stutts M. J. & Guggino W. B. (1999). "CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel", *Physiological reviews*, **79**(1) : S145–S166.

Schwiebert E. M., Egan M. E., Hwang T. H., Fulmer S. B., Allen S. S., Cutting G. R. & Guggino W. B. (1995). "CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP", *Cell*, **81**(7) : 1063–1073.

Sebastiano V., Maeder M. L., Angstman J. F., Haddad B., Khayter C., Yeo D. T., Goodwin M. J., Hawkins J. S., Ramirez C. L., Batista L. F. Z., Artandi S. E., Wernig M. & Joung J. K. (2011). "In situ genetic correction of the sickle cell anemia mutation in human induced pluripotent stem cells using engineered zinc finger nucleases", *Stem cells (Dayton, Ohio)*, **29**(11) : 1717–1726.

Sepúlveda-Robles O., Kameyama L. & Guarneros G. (2012). "High diversity and novel species of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages", *Applied and environmental microbiology*, **78**(12) : 4510–4515.

Sermet-Gaudelus I., Boeck K. D., Casimir G. J., Vermeulen F., Leal T., Mogenet A., Roussel D., Fritsch J., Hanssens L., Hirawat S., Miller N. L., Constantine S., Reha A., Ajayi T., Elfring G. L. & Miller L. L. (2010). "Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **182**(10) : 1262–1272.

Sermet-Gaudelus I., Girodon E., Roussel D., Deneuville E., Bui S., Huet F., Guillot M., Aboutaam R., Renouil M., Munck A., des Georges M., Iron A., Thauvin-Robinet C., Fajac I., Lenoir G., Roussey M. & Edelman A. (2010). "Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis", *Thorax*, **65**(6) : 539–544.

Shcheynikov N., Kim K. H., Kim K.-M., Dorwart M. R., Ko S. B. H., Goto H., Naruse S., Thomas P. J. & Muallem S. (2004). "Dynamic control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^-/HCO_3^- selectivity by external Cl^-", *The journal of biological chemistry*, **279**(21) : 21857–21865.

Shcheynikov N., Ko S. B. H., Zeng W., Choi J. Y., Dorwart M. R., Thomas P. J. & Muallem S. (2006). "Regulatory interaction between CFTR and the SLC26 transporters", *Novartis foundation symposium*, **273** : 177–186; discussion 186–192, 261–264.

Shcheynikov N., Yang D., Wang Y., Zeng W., Karniski L. P., So I., Wall S. M. & Muallem S. (2008). "The Slc26a4 transporter functions as an electroneutral Cl-/I-/HCO3- exchanger: role of Slc26a4 and Slc26a6 in I- and HCO_3^- secretion and in regulation of CFTR in the parotid duct", *The journal of physiology*, **586**(16) : 3813–3824.

Sheng H., Knecht H. J., Kudva I. T. & Hovde C. J. (2006). "Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants", *Applied and environmental microbiology*, **72**(8) : 5359–5366.

Sheppard D. N., Rich D. P., Ostedgaard L. S., Gregory R. J., Smith A. E. & Welsh M. J. (1993). "Mutations in CFTR associated with mild-disease-form Cl^- channels with altered pore properties", *Nature*, **362**(6416) : 160–164.

Sheppard D. N. & Welsh M. J. (1999). "Structure and function of the CFTR chloride channel", *Physiological reviews*, **79**(1) : S23–S45.

Silby M. W., Winstanley C., Godfrey S. A. C., Levy S. B. & Jackson R. W. (2011). "Pseudomonas genomes: diverse and adaptable", *FEMS microbiology reviews*, **35**(4) : 652–680.

Simpson A. J., Wallace W. A., Marsden M. E., Govan J. R., Porteous D. J., Haslett C. & Sallenave J. M. (2001). "Adenoviral augmentation of elafin protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bacterial infection", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **167**(3) : 1778–1786.

Skowron-zwarg M., Boland S., Caruso N., Coraux C., Marano F. & Tournier F. (2007). "Interleukin-13 interferes with CFTR and AQP5 expression and localization during human airway epithelial cell differentiation", *Experimental cell research*, **313**(12) : 2695–2702.

Slomińska M., Neubauer P. & Wegrzyn G. (1999). "Regulation of bacteriophage lambda development by guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate", *Virology*, **262**(2) : 431–441.

Smartt A. E., Xu T., Jegier P., Carswell J. J., Blount S. A., Sayler G. S. & Ripp S. (2012). "Pathogen detection using engineered bacteriophages", *Analytical and bioanalytical chemistry*, **402**(10) : 3127–3146.

Smirnova M. G., Kiselev S. L., Birchall J. P. & Pearson J. P. (2001). "Up-regulation of mucin secretion in HT29-MTX cells by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6", *European cytokine network*, **12**(1) : 119–125.

Smith E. E., Buckley D. G., Wu Z., Saenphimmachak C., Hoffman L. R., D'Argenio D. A., Miller S. I., Ramsey B. W., Speert D. P., Moskowitz S. M., Burns J. L., Kaul R. & Olson M. V. (2006). "Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **103**(22) : 8487–8492.

Sobczak K., Segal A., Bangel-Ruland N., Semmler J., Van Driessche W., Lindemann H., Heermann R. & Weber W.-M. (2009). "Specific inhibition of epithelial Na^+ channels by antisense oligonucleotides for the treatment of Na^+ hyperabsorption in cystic fibrosis", *The journal of gene medicine*, **11**(9) : 813–823.

Soothill J. S. (1992). "Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages", *Journal of medical microbiology*, **37**(4) : 258.

Southern K. W., Munck A., Pollitt R., Travert G., Zanolla L., Dankert-Roelse J. & Castellani C. (2007). "A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe", *Journal of cystic fibrosis*, **6**(1) : 57–65.

Speert D. P., Campbell M. E., Davidson A. G. & Wong L. T. (1993). "*Pseudomonas aeruginosa* colonization of the gastrointestinal tract in patients with cystic fibrosis", *The Journal of infectious diseases*, **167**(1) : 226–229.

Stark J. M., Stark M. A., Colasurdo G. N. & LeVine A. M. (2006). "Decreased bacterial clearance from the lungs of mice following primary respiratory syncytial virus infection", *Journal of medical virology*, **78**(6) : 829–838.

Stecenko A. A., King G., Torii K., Breyer R. M., Dworski R., Blackwell T. S., Christman J. W. & Brigham K. L. (2001). "Dysregulated cytokine production in human cystic fibrosis bronchial epithelial cells", *Inflammation*, **25**(3) : 145–155.

Stewart A. K., Yamamoto A., Nakakuki M., Kondo T., Alper S. L. & Ishiguro H. (2009). "Functional coupling of apical Cl^-/HCO_3^- exchange with CFTR in stimulated HCO_3^- secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct", *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **296**(6) : G1307–1317.

Stover C. K., Pham X. Q., Erwin A. L., Mizoguchi S. D., Warrener P., Hickey M. J., Brinkman F. S., Hufnagle W. O., Kowalik D. J., Lagrou M., Garber R. L., Goltry L., Tolentino E., Westbrock-Wadman S., Yuan Y., Brody L. L., Coulter S. N., Folger K. R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G. K., Wu Z., Paulsen I. T., Reizer J., Saier M. H., Hancock R. E., Lory S. & Olson M. V. (2000). "Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen", *Nature*, **406**(6799) : 959–964.

Stratford F. L. L., Pereira M. M. C., Becq F., McPherson M. A. & Dormer R. L. (2003). "Benzo(c)quinolizinium drugs inhibit degradation of Delta F508-CFTR cytoplasmic domain", *Biochemical and biophysical research communications*, **300**(2) : 524–530.

Stutts M. J., Canessa C. M., Olsen J. C., Hamrick M., Cohn J. A., Rossier B. C. & Boucher R. C. (1995). "CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels", *Science (New York, N.Y.)*, **269**(5225) : 847–850.

Stutts M. J., Chinet T. C., Mason S. J., Fullton J. M., Clarke L. L. & Boucher R. C. (1992). "Regulation of Cl^- channels in normal and cystic fibrosis airway epithelial cells by extracellular ATP", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **89**(5) : 1621–1625.

Stutts M. J., Fitz J. G., Paradiso A. M. & Boucher R. C. (1994). "Multiple modes of regulation of airway epithelial chloride secretion by extracellular ATP", *The American journal of physiology*, **267**(5 Pt 1) : C1442–1451.

Stutts M. J., Schwab J. H., Chen M. G., Knowles M. R. & Boucher R. C. (1986). "Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on bronchial epithelial ion transport", *The american review of respiratory disease*, **134**(1) : 17–21.

Sugita M., Yue Y. & Foskett J. K. (1998). "CFTR Cl^- channel and CFTR-associated ATP channel: distinct pores regulated by common gates", *The EMBO journal*, **17**(4) : 898–908.

Sulakvelidze A., Alavidze Z. & Morris Jr J. G. (2001). "Bacteriophage therapy", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **45**(3) : 649.

Sulakvelidze A. & Kutter E. (2004). "Bacteriophage therapy in humans". In Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (eds) *Bacteriophages*, CRC Press.

Summers W. (2004). "Bacteriophage research". In Kutter, E. & Sulakvelidze, A. (eds) *Bacteriophages*, CRC Press.

Sunagar R., Patil S. A. & Chandrakanth R. K. (2010). "Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* bacteremia in streptozotocin-induced diabetic mice", *Research in microbiology*, **161**(10) : 854–860.

Suttle C. A. (2007). "Marine viruses — major players in the global ecosystem", *Nature reviews microbiology*, **5**(10) : 801–812.

Swiatecka-Urban A., Moreau-Marquis S., Maceachran D. P., Connolly J. P., Stanton C. R., Su J. R., Barnaby R., O'toole G. A. & Stanton B. A. (2006). "*Pseudomonas aeruginosa* inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells", *American journal of physiology. Cell physiology*, **290**(3) : C862–872.

Takahashi K. & Yamanaka S. (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell*, **126**(4) : 663–676.

Tamanini A., Borgatti M., Finotti A., Piccagli L., Bezzerri V., Favia M., Guerra L., Lampronti I., Bianchi N., Dall'Acqua F., Vedaldi D., Salvador A., Fabbri E., Mancini I., Nicolis E., Casavola V., Cabrini G. & Gambari R. (2011). "Trimethylangelicin reduces IL-8 transcription and potentiates CFTR function", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, **300**(3) : L380–390.

Tanji Y., Shimada T., Fukudomi H., Miyanaga K., Nakai Y. & Unno H. (2005). "Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice", *Journal of bioscience and bioengineering*, **100**(3) : 280–287.

Tanji Y., Shimada T., Yoichi M., Miyanaga K., Hori K. & Unno H. (2004). "Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail", *Applied microbiology and biotechnology*, **64**(2) : 270–274.

Tarran R., Loewen M. E., Paradiso A. M., Olsen J. C., Gray M. A., Argent B. E., Boucher R. C. & Gabriel S. E. (2002). "Regulation of murine airway surface liquid volume by CFTR and Ca^{2+}-activated Cl^- conductances", *The journal of general physiology*, **120**(3) : 407–418.

Taubes G. (2008). "The bacteria fight back", *Science (New York, N.Y.)*, **321**(5887) : 356–361.

Tielker D., Hacker S., Loris R., Strathmann M., Wingender J., Wilhelm S., Rosenau F. & Jaeger K.-E. (2005). "*Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation", *Microbiology (Reading, England)*, **151**(Pt 5) : 1313–1323.

Toczylowska - Mamińska R. & Dolowy K. (2012). "Ion transporting proteins of human bronchial epithelium", *Journal of cellular biochemistry*, **113**(2) : 426–432.

Toté K., Vanden Berghe D., Maes L. & Cos P. (2008). "A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms", *Letters in applied microbiology*, **46**(2) : 249–254.

Tóthová L., Celec P., Bábícková J., Gajdosová J., Al-Alami H., Kamodyova N., Drahovská H., Liptáková A., Turňa J. & Hodosy J. (2011). "Phage therapy of Cronobacter-induced urinary tract infection in mice", *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, **17**(7) : BR173–178.

Toussaint B., Delic-Attree I. & Vignais P. M. (1993). "*Pseudomonas aeruginosa* contains an IHF-like protein that binds to the algD promoter", *Biochemical and biophysical research communications*, **196**(1) : 416–421.

Tré-Hardy M., Vanderbist F., Traore H. & Devleeschouwer M. J. (2008). "In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures", *International journal of antimicrobial agents*, **31**(4) : 329–336.

Trivier D., Houdret N., Courcol R. J., Lamblin G., Roussel P. & Davril M. (1997). "The binding of surface proteins from *Staphylococcus aureus* to human bronchial mucins", *The european respiratory journal*, **10**(4) : 804–810.

Tsui L. C., Buchwald M., Barker D., Braman J. C., Knowlton R., Schumm J. W., Eiberg H., Mohr J., Kennedy D. & Plavsic N. (1985). "Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker", *Science (New York, N.Y.)*, **230**(4729) : 1054–1057.

Tunney M. M., Field T. R., Moriarty T. F., Patrick S., Doering G., Muhlebach M. S., Wolfgang M. C., Boucher R., Gilpin D. F., McDowell A. & Elborn J. S. (2008). "Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis", *American journal of respiratory and critical care medicine*, **177**(9) : 995–1001.

Twort F. (1915). "an investigation on the nature of ultra-microscopic viruses.", *The lancet*, **186**(4814) : 1241–1243.

Ulrich M., Bastian M., Cramton S. E., Ziegler K., Pragman A. A., Bragonzi A., Memmi G., Wolz C., Schlievert P. M., Cheung A. & Döring G. (2007). "The staphylococcal respiratory response regulator SrrAB induces ica gene transcription and polysaccharide intercellular adhesin expression, protecting *Staphylococcus aureus* from neutrophil killing under anaerobic growth conditions", *Molecular microbiology*, **65**(5) : 1276–1287.

Ulrich M., Worlitzsch D., Viglio S., Siegmann N., Iadarola P., Shute J. K., Geiser M., Pier G. B., Friedel G., Barr M. L., Schuster A., Meyer K. C., Ratjen F., Bjarnsholt T., Gulbins E. & Döring G. (2010). "Alveolar inflammation in cystic fibrosis", *Journal of cystic fibrosis,* **9**(3) : 217–227.

Usher L. R., Lawson R. A., Geary I., Taylor C. J., Bingle C. D., Taylor G. W. & Whyte M. K. B. (2002). "Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection", *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **168**(4) : 1861–1868.

Vaca-Pacheco S., Paniagua-Contreras G. L., García-González O. & de la Garza M. (1999). "The clinically isolated FIZ15 bacteriophage causes lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1", *Current microbiology*, **38**(4) : 239–243.

Vennekens R., Trouet D., Vankeerberghen A., Voets T., Cuppens H., Eggermont J., Cassiman J. J., Droogmans G. & Nilius B. (1999). "Inhibition of volume-regulated anion channels by expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *The journal of physiology*, **515 (Pt 1)** : 75–85.

Verdugo P. (1990). "Goblet cells secretion and mucogenesis", *Annual review of physiology*, **52**(1) : 157–176.

Vinodkumar C., Kalsurmath S. & Neelagund Y. (2008). "Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice", *Indian journal of pathology and microbiology*, **51**(3) : 360.

Voigt U., Burhenne H., Sonnow L., Wölfel C., Spangler C., Ladant D., Frank D. W., Kaever V. & Seifert R. (2011). "The effector protein ExoY secreted by *Pseudomonas aeruginosa* is a nucleotidyl cyclase with preference for GTP", *BMC pharmacology*, **11**(Suppl 1) : P74.

Wagenaar J. A., Van Bergen M. A. P., Mueller M. A., Wassenaar T. M. & Carlton R. M. (2005). "Phage therapy reduces Campylobacter jejuni colonization in broilers", *Veterinary microbiology*, **109**(3-4) : 275–283.

Wang J., Hu B., Xu M., Yan Q., Liu S., Zhu X., Sun Z., Reed E., Ding L., Gong J. & others (2006). "Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.", *International journal of molecular medicine*, **17**(2) : 309.

Wang J., Hu B., Xu M., Yan Q., Liu S., Zhu X., Sun Z., Tao D., Ding L., Reed E., Gong J., Li Q. Q. & Hu J. (2006). "Therapeutic effectiveness of bacteriophages in the rescue of

mice with extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* bacteremia", *International journal of molecular medicine*, **17**(2) : 347–355.

Watanabe R., Matsumoto T., Sano G., Ishii Y., Tateda K., Sumiyama Y., Uchiyama J., Sakurai S., Matsuzaki S., Imai S. & Yamaguchi K. (2006). "Efficacy of bacteriophage therapy against gut-gerived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice", *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**(2) : 446–452.

Weber-Dabrowska B., Zimecki M., Mulczyk M. & Górski A. (2002). "Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils", *FEMS immunology and medical microbiology*, **34**(2) : 135–138.

Wei L., Vankeerberghen A., Cuppens H., Cassiman J. J., Droogmans G. & Nilius B. (2001). "The C-terminal part of the R-domain, but not the PDZ binding motif, of CFTR is involved in interaction with Ca^{2+}-activated Cl^- channels", *Pflügers archiv: european journal of physiology*, **442**(2) : 280–285.

Wei L., Vankeerberghen A., Cuppens H., Eggermont J., Cassiman J. J., Droogmans G. & Nilius B. (1999). "Interaction between calcium-activated chloride channels and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator", *Pflügers archiv: european journal of physiology*, **438**(5) : 635–641.

Weinreich F., Wood P. G., Riordan J. R. & Nagel G. (1997). "Direct action of genistein on CFTR", *Pflügers archiv: european journal of physiology*, **434**(4) : 484–491.

Wellhauser L., Kim Chiaw P., Pasyk S., Li C., Ramjeesingh M. & Bear C. E. (2009). "A small-molecule modulator interacts directly with deltaPhe508-CFTR to modify its ATPase activity and conformational stability", *Molecular pharmacology*, **75**(6) : 1430–1438.

Welsh M. J. & Smith J. J. (2001). "cAMP stimulation of HCO_3^- secretion across airway epithelia", *JOP: journal of the pancreas*, **2**(4 Suppl) : 291–293.

Wiehlmann L., Wagner G., Cramer N., Siebert B., Gudowius P., Morales G., Köhler T., van Delden C., Weinel C., Slickers P. & Tümmler B. (2007). "Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*", *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **104**(19) : 8101–8106.

Wilke M., Buijs-Offerman R. M., Aarbiou J., Colledge W. H., Sheppard D. N., Touqui L., Bot A., Jorna H., de Jonge H. R. & Scholte B. J. (2011). "Mouse models of cystic fibrosis: phenotypic analysis and research applications", *Journal of cystic fibrosis*, **10 Suppl 2** : S152–171.

Wilkinson T. S., Dhaliwal K., Hamilton T. W., Lipka A. F., Farrell L., Davidson D. J., Duffin R., Morris A. C., Haslett C., Govan J. R. W., Gregory C. D., Sallenave J.-M. & Simpson A. J. (2009). "Trappin-2 promotes early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* through CD14-dependent macrophage activation and neutrophil recruitment", *The american journal of pathology*, **174**(4) : 1338–1346.

Willner D., Furlan M., Haynes M., Schmieder R., Angly F. E., Silva J., Tammadoni S., Nosrat B., Conrad D. & Rohwer F. (2009). "Metagenomic analysis of respiratory tract DNA

viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals", *PloS One*, **4**(10) : e7370.

Wilschanski M. & Durie P. R. (2007). "Patterns of GI disease in adulthood associated with mutations in the CFTR gene", *Gut*, **56**(8) : 1153–1163.

Wilschanski M., Famini H., Strauss-Liviatan N., Rivlin J., Blau H., Bibi H., Bentur L., Yahav Y., Springer H., Kramer M. R., Klar A., Ilani A., Kerem B. & Kerem E. (2001). "Nasal potential difference measurements in patients with atypical cystic fibrosis", *The European respiratory journal*, **17**(6) : 1208–1215.

Wilson J. R. & DuBois R. O. (1923). "Report of a fatal case of keratomalacia in an infant, with postmortem examination", *American journal of diseases of children*, **26**(5) : 431–446.

Winstanley C., Langille M. G. I., Fothergill J. L., Kukavica-Ibrulj I., Paradis-Bleau C., Sanschagrin F., Thomson N. R., Winsor G. L., Quail M. A., Lennard N., Bignell A., Clarke L., Seeger K., Saunders D., Harris D., Parkhill J., Hancock R. E. W., Brinkman F. S. L. & Levesque R. C. (2009). "Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa*", *Genome research*, **19**(1) : 12–23.

Wouthuyzen-Bakker M. (2011). Thèse de sciences médicales "Chapitre 6 : Calcium induced anion secretion in gallbladder epithelium of pigs and mice with cystic fibrosis", Pays-Bas, Groningen. http://irs.ub.rug.nl/ppn/337721424

Wright A., Hawkins C. H., Anggård E. E. & Harper D. R. (2009). "A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy", *Clinical otolaryngology*, **34**(4) : 349–357.

Yang H., Shelat A. A., Guy R. K., Gopinath V. S., Ma T., Du K., Lukacs G. L., Taddei A., Folli C., Pedemonte N., Galietta L. J. V. & Verkman A. S. (2003). "Nanomolar affinity small molecule correctors of defective Delta F508-CFTR chloride channel gating", *The journal of biological chemistry*, **278**(37) : 35079–35085.

Yang Y. D., Cho H., Koo J. Y., Tak M. H., Cho Y., Shim W.-S., Park S. P., Lee J., Lee B., Kim B.-M., Raouf R., Shin Y. K. & Oh U. (2008). "TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance", *Nature*, **455**(7217) : 1210–1215.

Yoon J. H., Kim K. S., Kim H. U., Linton J. A. & Lee J. G. (1999). "Effects of TNF-alpha and IL-1 beta on mucin, lysozyme, IL-6 and IL-8 in passage-2 normal human nasal epithelial cells", *Acta oto-laryngologica*, **119**(8) : 905–910.

Yu W., Chiaw P. K. & Bear C. E. (2011). "Probing conformational rescue induced by a chemical corrector of F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) mutant", *The journal of biological chemistry*, **286**(28) : 24714–24725.

Zeitlin P. L., Diener-West M., Rubenstein R. C., Boyle M. P., Lee C. K. K. & Brass-Ernst L. (2002). "Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate", *Molecular therapy: the journal of the American society of gene therapy*, **6**(1) : 119–126.

Zhang H., Bao H., Billington C., Hudson J. A. & Wang R. (2012). "Isolation and lytic activity of the Listeria bacteriophage endolysin LysZ5 against *Listeria monocytogenes* in soya milk", *Food microbiology*, **31**(1) : 133–136.

Zhao C., Wang I. & Lehrer R. I. (1996). "Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells", *FEBS letters*, **396**(2-3) : 319–322.

Zhou Y., Dong Q., Louahed J., Dragwa C., Savio D., Huang M., Weiss C., Tomer Y., McLane M. P., Nicolaides N. C. & Levitt R. C. (2001). "Characterization of a calcium-activated chloride channel as a shared target of Th2 cytokine pathways and its potential involvement in asthma", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, **25**(4) : 486–491.

Zhou Z., Duerr J., Johannesson B., Schubert S. C., Treis D., Harm M., Graeber S. Y., Dalpke A., Schultz C. & Mall M. A. (2011). "The ENaC-overexpressing mouse as a model of cystic fibrosis lung disease", *Journal of cystic fibrosis*, **10 Suppl 2** : S172–182.

Zimecki M., Weber-Dabrowska B., Łusiak-Szelachowska M., Mulczyk M., Boratyński J., Poźniak G., Syper D. & Górski A. (2003). "Bacteriophages provide regulatory signals in mitogen-induced murine splenocyte proliferation", *Cellular & molecular biology letters*, **8**(3) : 699–711.

Annexes

ARTICLE 1

Pulmonary bacteriophages therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention

Eric Morello, Emilie Saussereau, Damien Maura, Michel Huerre, Lhousseine Touqui, Laurent Debarbieux

PlosONE (2011). **6**(2) : e 16963

Article présenté dans la partie Résultats expérimentaux

Pulmonary Bacteriophage Therapy on *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Strains: First Steps Towards Treatment and Prevention

Eric Morello[1], Emilie Saussereau[1], Damien Maura[1], Michel Huerre[2], Lhousseine Touqui[3,4], Laurent Debarbieux[1]*

1 Molecular Biology of the Gene in Extremophiles Unit, Department of Microbiology, Institut Pasteur, Paris, France, **2** Histotechnology and Pathology Unit, Department of Infection and Epidemiology, Institut Pasteur, Paris, France, **3** Innate Host Defense and Inflammation Unit, Department of Infection and Epidemiology, Institut Pasteur, Paris, France, **4** INSERM, U874, Paris, France

Abstract

Multidrug-resistant bacteria are the cause of an increasing number of deadly pulmonary infections. Because there is currently a paucity of novel antibiotics, phage therapy—the use of specific viruses that infect bacteria—is now more frequently being considered as a potential treatment for bacterial infections. Using a mouse lung-infection model caused by a multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain isolated from a cystic fibrosis patient, we evaluated bacteriophage treatments. New bacteriophages were isolated from environmental samples and characterized. Bacteria and bacteriophages were applied intranasally to the immunocompetent mice. Survival was monitored and bronchoalveolar fluids were analysed. Quantification of bacteria, bacteriophages, pro-inflammatory and cytotoxicity markers, as well as histology and immunohistochemistry analyses were performed. A curative treatment (one single dose) administrated 2 h after the onset of the infection allowed over 95% survival. A four-day preventive treatment (one single dose) resulted in a 100% survival. All of the parameters measured correlated with the efficacy of both curative and preventive bacteriophage treatments. We also showed that *in vitro* optimization of a bacteriophage towards a clinical strain improved both its efficacy on *in vivo* treatments and its host range on a panel of 20 *P. aeruginosa* cystic fibrosis strains. This work provides an incentive to develop clinical studies on pulmonary bacteriophage therapy to combat multidrug-resistant lung infections.

Citation: Morello E, Saussereau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, et al. (2011) Pulmonary Bacteriophage Therapy on *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Strains: First Steps Towards Treatment and Prevention. PLoS ONE 6(2): e16963. doi:10.1371/journal.pone.0016963

Editor: Ramy Aziz, Cairo University, Egypt

Received November 8, 2010; **Accepted** January 15, 2011; **Published** February 15, 2011

Copyright: © 2011 Morello et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Funding was provided by Institut Pasteur PTR N°255, Vaincre la Mucoviscidose grant IC0704. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: laurent.debarbieux@pasteur.fr

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is the second most common pathogen responsible for hospital-acquired bacterial pneumonia as well as ventilator-associated pneumonia, and the first causative agent of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients [1,2]. Although antibiotics are still an effective means of treating bacterial lung infections, the alarming rise of multidrug-resistant bacteria in hospitals has highlighted the need for new therapies [3,4,5]. Bacteriophages —viruses infecting bacteria— have been proposed to treat human bacterial infections since their discovery in the early 20th century [6,7]. However, after a short period of development, the advent of antibiotics led to this therapeutic approach being abandoned, except in Eastern Europe where bacteriophages are still used today to treat patients [8,9,10]. During the past 20 years, studies in animal models have demonstrated the potential of bacteriophages [11,12,13,14,15]. Recently the first phase II clinical trial performed under European regulations on bacteriophage treatments of chronic otitis was published, and demonstrated the interest of using bacteriophages on multidrug resistant infections [16]. The effects of bacteriophage therapy on lung infections has only very recently been addressed in animal models [14,17]. On the one hand, a proof of concept with a bioluminescent strain of *P. aeruginosa* showed that bacteriophages administrated intranasally had a rapid efficacy with respect to preventing and curing deadly lung infections [14]. On the other hand, a clinical strain of *Burkholderia cenocepacia* isolated from a CF patient was used to show that the intraperitoneal administration of bacteriophages was more effective than intranasal applications in a non-deadly infectious model [17]. Here we report an in-depth evaluation of the efficacy of curative and preventive bacteriophage treatments of lung infections using a multidrug resistant mucoid *P. aeruginosa* strain isolated from a CF patient of Grenoble hospital, France [18,19]. For this study we specifically optimized the virulence of a bacteriophage of our collection towards this clinical strain and studied its efficacy both *in vitro* and *in vivo*.

Results

Characterization of a lung infection by a *P. aeruginosa* strain isolated from a cystic fibrosis patient

To investigate bacteriophage treatments on a mouse lung-infection caused by a clinical *P. aeruginosa* strain named CHA [18,19], we first established the conditions in which an intranasal administration of this strain was lethal. We found that inoculation of 3×10^6 bacteria was sufficient to induce death in 100% of

animals within 2 days (Figure 1A). Progress of the infection was assessed by quantification of bacteria, inflammatory markers, and cytotoxicity levels at 20 h post-infection (Figures 1 and 2). The number of bacteria in the lungs had increased at least by two orders of magnitude compared with the initial infectious dose (over 4×10^8 cfu were found in the broncho-alveolar lavages [BAL] form each infected mouse compared with the infectious dose of 3×10^6 cfu; Figure 1C). The levels of two pro-inflammatory markers (cytokines IL-6 and KC) as well as lactate dehydrogenase (LDH) which reflects organ toxicity, were highly elevated (Figure 2). Histological analysis, also at 20 h post-infection, revealed severe lesions consistent with acute pneumopathy, combined with focal and diffuse alveolitis and bronchitis, consolidation and necrosis (Figure 3A compared to Figure 3D from uninfected animals). Disease severity was scored at 16 out of 25 (Figure 3M). These findings confirmed that the clinical *P. aeruginosa* strain CHA is able rapidly to infect lungs and induce severe damage leading to death in these mice.

Bacteriophage selection and characterization

We screened our collection of natural *P. aeruginosa* bacteriophages (initially isolated from the environment using the *P. aeruginosa* strain PAK [14]) and found that the PAK-P3 bacteriophage was able to establish a moderate infection in strain

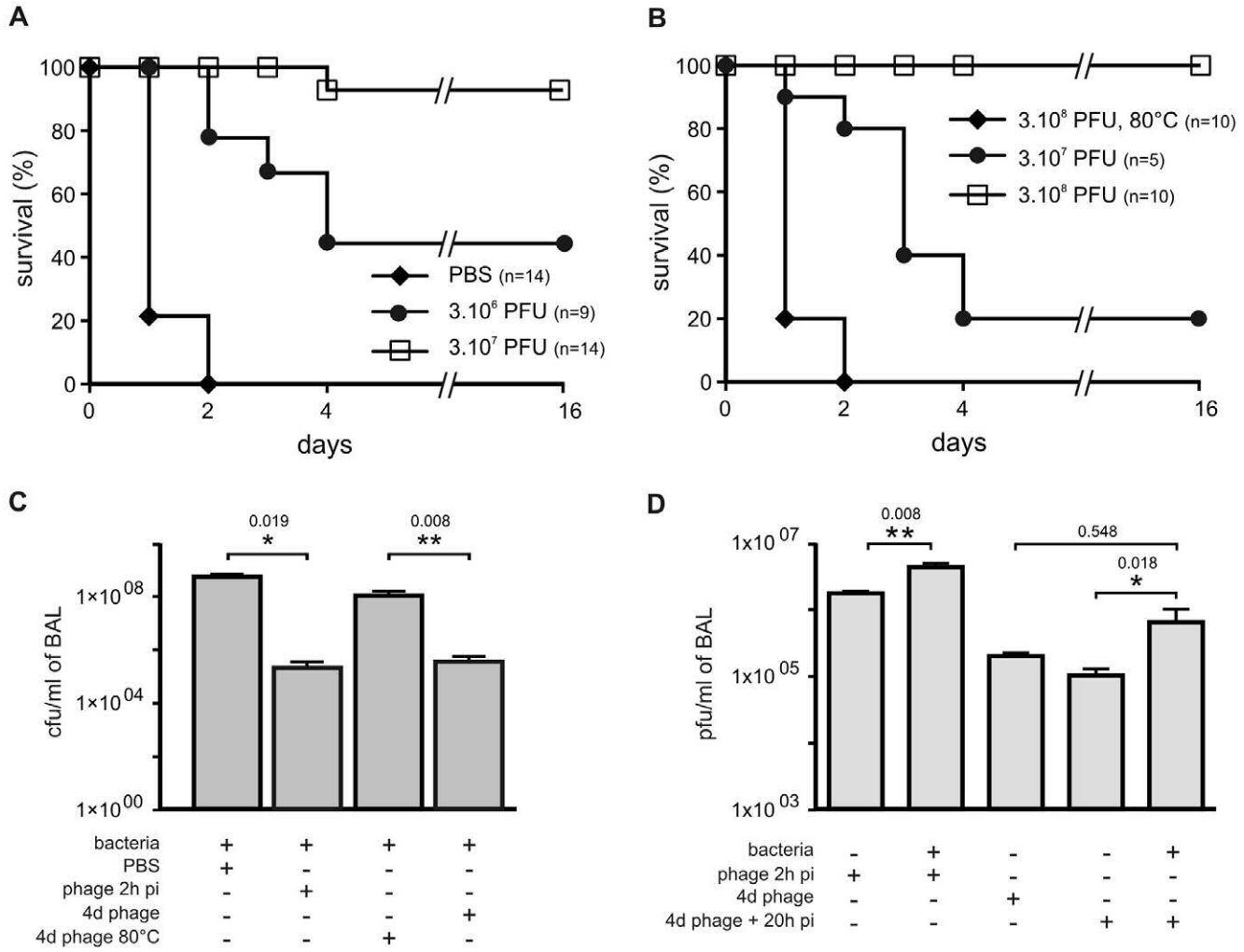


Figure 1. Bacteriophage P3-CHA cure and prevent lung infections caused by a clinical *P. aeruginosa* strain. (**A–B**) Survival curves of mice infected with the CHA strain and treated or pre-treated with P3-CHA bacteriophage. (**A**) PBS (♦), 3×10^6 (•) and 3×10^7 (□) pfu of bacteriophage were given intranasally 2 h after bacteria (3×10^6 cfu) were administered. This curative treatment appears to be dose dependent ($P<0.0001$ for both bacteriophage doses compared to PBS and $P<0.01$ between 3×10^6 and 3×10^7 bacteriophage doses). (**B**) Four days before infection with 3×10^6 bacteria, mice were given either 3×10^7 (•), or 3×10^8 (□) pfu of P3-CHA or 3×10^8 pfu of heat-inactivated P3-CHA solution (♦). These survival curves indicate that the preventative treatment is dose dependent ($P<0.0005$ and $P<0.0001$ for 3×10^7 and 3×10^8 bacteriophage doses respectively compared to heat-inactivated bacteriophage solution and $P<0.0005$ between 3×10^7 and 3×10^8 bacteriophage doses). (**C–D**) 20 h after infection with strain CHA, mice were euthanized and BAL fluids were assayed for bacteria (**C**) and bacteriophages (**D**). In the curative treatment protocols, mice were treated with PBS or bacteriophage 2 h post infection (phage 2 h pi). In the preventative treatment protocols, mice were intranasally administered bacteriophage solution (4d phage) or heat-inactivated bacteriophage solution (4d phage 80°C) four days before infection. (**C**) Bacterial counts were significantly lower in the BAL fluids from mice that had received either curative or preventative bacteriophage treatment than the respective control treatment (* $P<0.05$, and ** $P<0.01$). (**D**) Bacteriophage counts were significantly lower in the BAL fluids from mice that had received bacteriophage treatment than the non-infected animals (** $P<0.01$) or the non-infected animals pre-treated four days earlier with the bacteriophage P3-CHA (* $P<0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0016963.g001

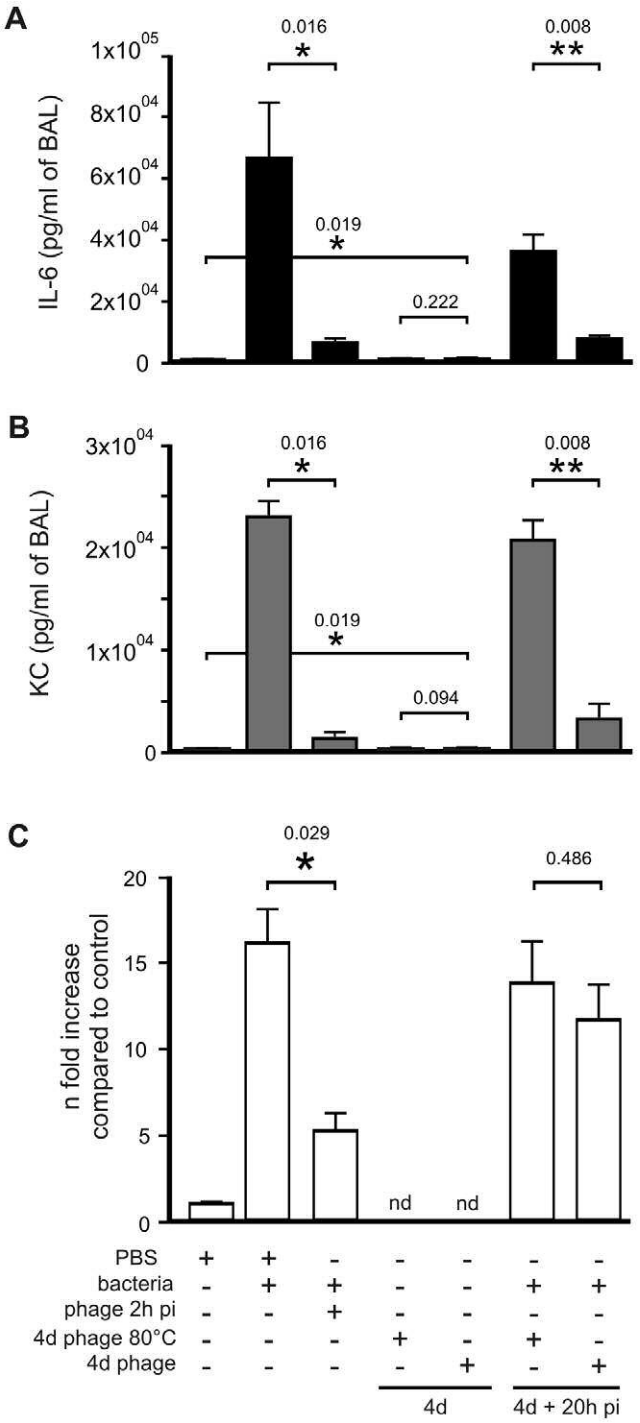


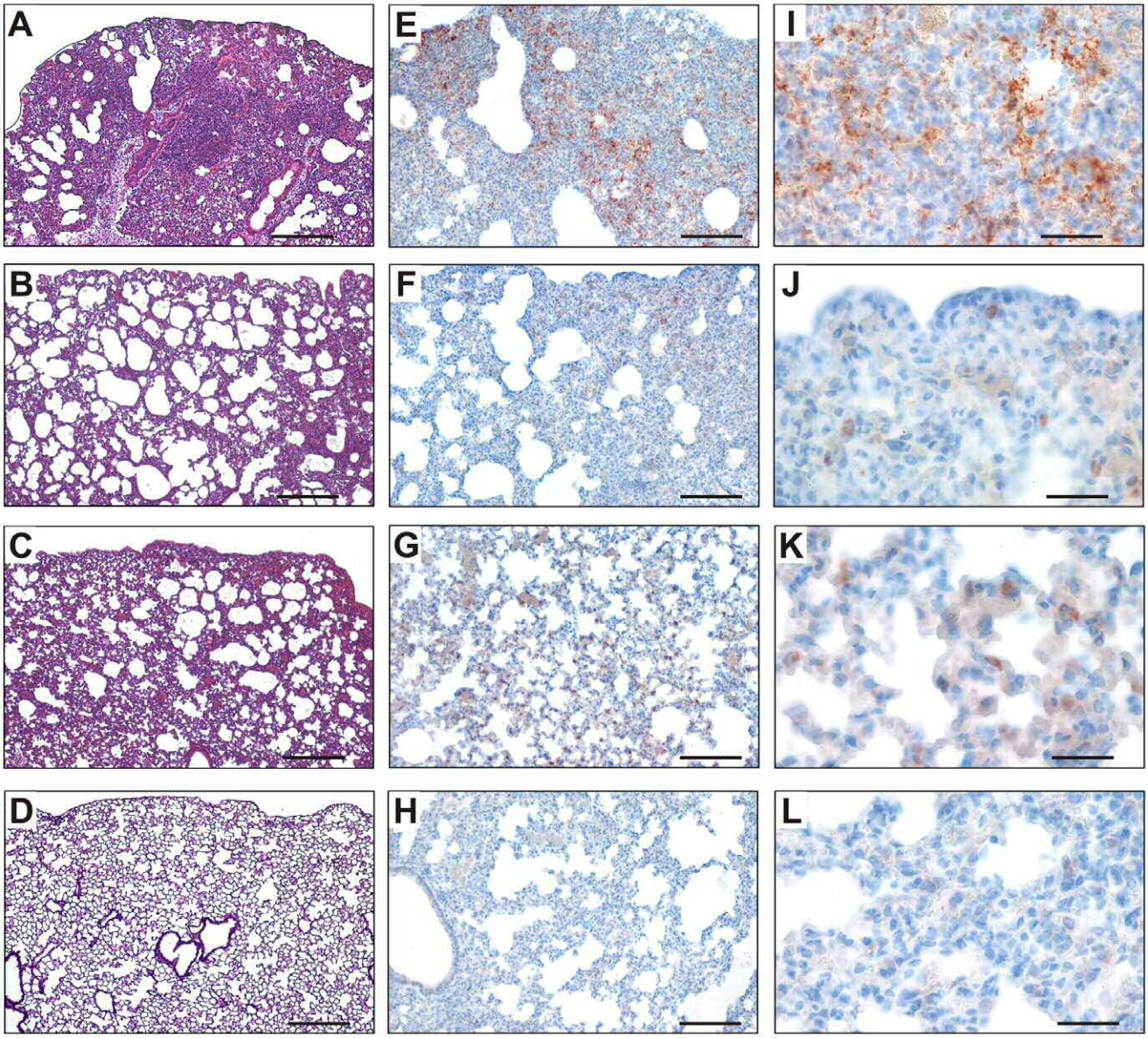
Figure 2. Inflammatory and cytotoxicity analyses during bacteriophage P3-CHA treatments. (**A–C**) 20 h after infection with strain CHA, mice were euthanized and BAL fluids were assayed for cytokines (**A** and **B**) and LDH (**C**). In the curative treatment protocols, mice were treated with PBS or bacteriophage (phage 2 h pi) 2 h post infection. In the preventative treatment protocols, mice were intranasally administered bacteriophage solution (4d phage) or heat-inactivated bacteriophage solution (4d phage 80°C) four days before infection. IL-6 (**A**), KC (**B**) concentrations in BAL fluids from mice that had received either curative or preventative bacteriophage treatments were significantly lower than the values for their respective controls untreated animals ((**A**) * $P<0.05$, (**B**) * $P<0.05$) and animals pre-treated with heat-inactivated bacteriophage solution ((**A**) ** $P<0.01$, (**B**) ** $P<0.01$). LDH (**C**) levels were significantly reduced only in mice that had received a curative treatment (* $P<0.05$). n = 5 to 7 for each condition (**A–C**). nd, not determined.
doi:10.1371/journal.pone.0016963.g002

CHA (plating efficiency of 10% compared with 100% on the PAK strain). After five consecutive passages in liquid culture with the CHA strain we obtained a bacteriophage stock that showed the same plating efficiency on both CHA and PAK strains. Subsequently, four steps of plaque purification were performed to obtain a preparation of a single isolated phage that we named P3-CHA (see Materials and Methods). Electron microscopy showed that both bacteriophages (PAK-P3 and P3-CHA) belong to the Myoviridae family of bacterial viruses (Figure 4). Their genomes were sequenced (Genbank accession numbers: HM173082 for PAK-P3, and HM173081 for P3-CHA) and analysed revealing that they are distantly related to the PAK-P1 bacteriophage [14]. Major capsid proteins were identified by mass spectrometry (Figure 4). Putative proteins encoded by their genomes were analysed and no significant similarities to proteins considered to be markers of temperate bacteriophages or toxins were identified (see Materials and Methods). This confirmed that both PAK-P3 (vB_PaeM_PAK_P3) and P3-CHA (vB_PaeM_P3_CHA) are virulent bacteriophages. We estimated the host range of these two bacteriophages with a set of 20 clinical CF strains (Table 1). The P3-CHA bacteriophage was overall more efficient than PAK-P3 on infecting *P. aeruginosa* strains isolated from both primary and chronically infected patients.

Curative treatment

We administered two different doses of P3-CHA bacteriophage intranasally (mimicking a nebulisation treatment for humans) to two groups of mice that had received a lethal dose of the CHA strain 2 h earlier and followed their survival (Figure 1A). Both doses of bacteriophage improved survival and the high dose (3×10^8 pfu) was associated with a greater rate of survival than the low dose (3×10^7 pfu) throughout the experiment (16 days). Twenty hours after inoculation (*i.e.* 18 h after bacteriophage treatment was given) we quantified bacteria, bacteriophages, cytokines, and LDH, as well as performing histological analyses. In the group treated with the high dose, the number of bacteria was over two orders of magnitude lower than in the untreated group (Figure 1C), and the number of bacteriophages was ten times higher (Figure 1D). Cytokines and LDH (Figure 2) concentrations were markedly lower in the bacteriophage-treated group than in the untreated group. Histological analyses confirmed that lung damage in the treated group was less severe than in the untreated animals. In the bacteriophage-treated mice, moderate or mild lesions of alveolitis and bronchitis were observed without necrosis or consolidation; in a blind protocol, the severity of these histological lesions was scored at 5 out of 25 (Figure 3B and M). Immunohistochemistry, using a polyclonal anti-*Pseudomonas* antibody, detected only a few bacteria (entire cells or debris) in bacteriophage-treated animals, mainly in the cytoplasm of macrophages in the lungs (Figure 3F and J). In contrast, bacteria were detected in macrophages, alveolae, and extracellular spaces of the lungs from untreated animals (Figure 3E and I). No signal was detected in uninfected animals (Figure 3H and L). These observations are consistent with the fact that bacteriophages target only extracellular bacteria and also show the role of phagocytosis in bacterial removal. These experiments indicate that a curative bacteriophage treatment acts cooperatively with the immune response to eliminate acute lung infection caused by a CF strain of *P. aeruginosa*.

We also used survival-curve analysis to assess the curative efficacy of the PAK-P3 parental bacteriophage (used in the same


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L

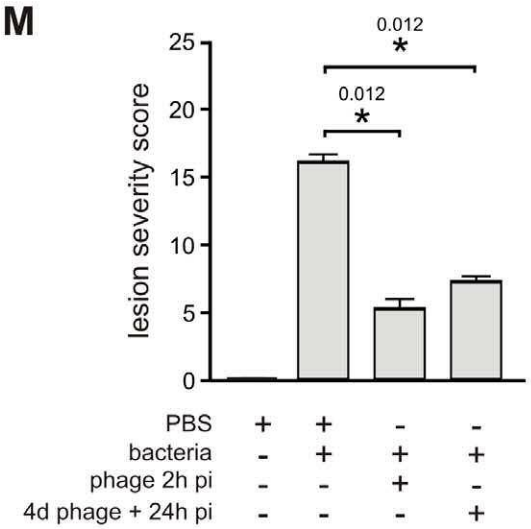

M
lesion severity score
25
20
15
10
5
0
0.012
*
0.012
*
PBS + + - -
bacteria - + + +
phage 2h pi - - + -
4d phage + 24h pi - - - +

Figure 3. Histological and immunohistochemical analyses of lung sections from mice treated or pre-treated with bacteriophage P3-CHA. (**A–D**; scale bar 200 μm) Thin sections of lungs obtained after 20 h from, (**A**) mice infected with the CHA strain, (**B**) infected mice treated with bacteriophage P3-CHA, (**C**) mice pre-treated with bacteriophage P3-CHA four days before infection, and (**D**) uninfected mice were stained with hematoxylin-eosin and Gram. Histological analyses included the determination of a lesion severity score (see materials and methods) to allow comparison (**M**). This score was significantly lower for mice given curative or preventive bacteriophage treatments than for untreated mice (* $P<0.05$). (**E–L**) Immunohistochemistry was performed with anti-*Pseudomonas* antibodies on sections obtained from the same samples as above (**E–H**; scale bar 100 μm and **I–L**; scale bar 50 μm). In lung sections from infected mice, bacteria are both intracellular and extracellular (**E** and **I**) whereas no signal can be seen in lung sections from uninfected mice (**H** and **L**). The signal was lower following either curative (**F** and **J**) or preventive (**G** and **K**) bacteriophage treatments and bacteria were only observed in macrophage cells.
doi:10.1371/journal.pone.0016963.g003

conditions as P3-CHA, Figure 5). After 8 days, only 20% of treated mice had survived. Thus, the *in vivo* protection in this model correlated with *in vitro* plating efficiency, as previously hypothesised [14]. Moreover the *in vivo* advantage of P3-CHA appears to be only due to two single nucleotide changes in the entire genome, highlighting the plasticity of the bacteriophage genomes to rapidly increase their infectivity to new hosts (see Materials and Methods).

Preventive treatment

To determine whether the P3-CHA bacteriophage could be used to prevent an infection by the CHA strain, we prepared an endotoxin-free bacteriophage solution (see Materials and Methods). This reduced the possibility of stimulating an immune response in the host, which could mask the effects of bacteriophage treatment. We first determined the rate of elimination of the P3-CHA bacteriophage from the lungs of uninfected mice and found that its concentration decreased by slightly more than half-log/day (over 500 fold decrease between day 0 and day 4, Figure 6). Only 20% of animals given 3×10^7 bacteriophages four days prior to infection with 3×10^6 bacteria were protected whereas 100% of the animals given 3×10^8 bacteriophages were protected (Figure 1B). 100% of the animals pre-treated 4 days before infection with the equivalent of 3×10^8 pfu of heat-killed P3-CHA solution died within 2 days (Figure 1B), showing that an active bacteriophage is required. Twenty hours after infection of a group of mice pre-treated with P3-CHA bacteriophage (3×10^8 pfu) four days earlier, animals were euthanized to perform histological analyses and to quantify bacteria, bacteriophages, cytokines, and LDH. Bacterial counts were lower in P3-CHA pre-treated mice than in heat-killed P3-CHA pre-treated mice (Figure 1C). Bacteriophage counts were higher in P3-CHA pre-treated mice than in non-infected P3-CHA pre-treated mice (Figure 1D). Cytokine concentrations were also significantly lower for P3-CHA pre-treated mice, whereas LDH concentrations were similar in both groups (Figure 2). Furthermore the level of both active and heat-inactivated solutions of bacteriophage gave rise to identically low levels of pro-inflammatory markers (Figure 2). Histological analyses showed that lung damage was markedly less severe in P3-CHA pre-treated mice than the controls, with histological lesions being scored at 7 out of 25 (Figure 3C and M). Immuno-histochemistry of lungs from mice that were pre-treated with P3-CHA bacteriophages showed a pattern that was similar to curative treatment. Bacterial antigens were detected only in the cytoplasm of alveolar macrophages (Figure 3G and K). These data confirmed the efficacy of the preventive bacteriophage treatment.

Discussion

A clinical strain of *P. aeruginosa* isolated from a CF patient was used to evaluate bacteriophage curative and preventive treatments on a lung infection model. Both treatments successfully rescued mice from lethal infections, underlying the potential use of bacteriophages to combat lung pathogens. We also showed that pro-inflammatory and cytotoxicity markers, as well as histology observations, were all concordant with these results for survival.

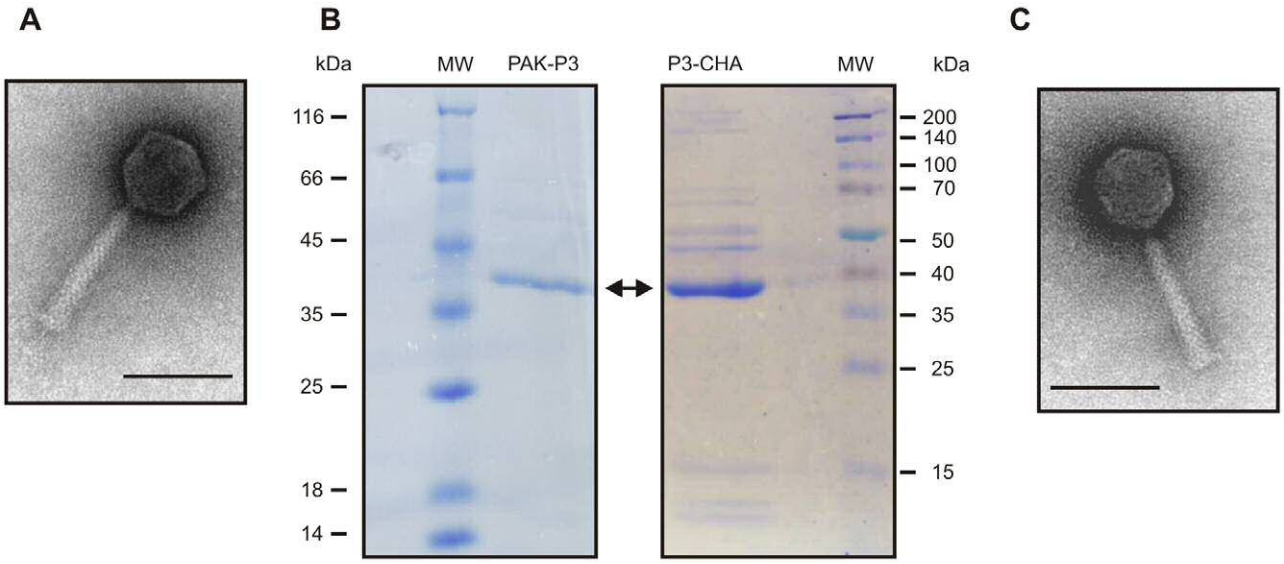
Moreover, we observed that bacterial debris released during bacteriophage treatments were not pro-inflammatory, as production of cytokines was not strongly stimulated in either the curative or the preventive treatments. A pro-inflammatory response is often used as an argument against phage therapy. Four days after administration of the preventative treatment that consisted of intranasal bacteriophage solution only, the lung concentrations of IL-6 and KC were low (Figure 2A and B). The main cause of bacterial destruction can therefore be attributed to the bacteriophage itself. However, the cytokine concentrations were still significantly higher than those measured 24 h after administration of a PBS control solution, and partial involvement of a weak immune response stimulated by the bacteriophage solution cannot thus be ruled out. Indeed, the quality of the bacteriophage preparation, particularly the elimination of endotoxins, influenced the extent of the immune response following pre-infection treatments (data not shown). This is in contrast to post-infection treatments, where the immune system has already been primed by bacteria when the bacteriophages were administered.

Humans are constantly exposed to bacterial viruses —an estimated 10^{31} are on the Earth [20]—but little is known about the immunological consequences of this. Recently, a metagenomic analysis of viral DNA present in the lungs of CF patients identified over 100 different viral genomes, and this was considered to be a low diversity compared with other environments [21]. Nevertheless, the role of the immune system in shaping viral diversity has yet to be deeply studied. Furthermore, the immune response to therapeutic bacteriophages has not been extensively investigated because most of the available data were obtained from model viruses which have little interest as therapeutic agents [22,23,24].

Bacteriophage treatments of *P. aeruginosa* chronic lung infections in animal models have still not been investigated, and no specific procedure has been developed to isolate bacteriophages with higher infectivity against chronic clinical strains. However, several lines of evidence are encouraging. First, some bacteriophages are known to possess hydrolases that degrade bacterial exopolysaccharides [13,25]. Second, several *in vitro* biofilm models have shown that bacteriophages can access and infect bacteria grown under these conditions [26,27]. Third, mucus overproduction could be controlled or reduced as recently shown using a cPLA2α inhibitor [28]. Fourth, our study suggests that the use of bacteriophages devoid of endotoxins should not induce a strong stimulation of the pro-inflammatory markers.

Finally, optimization of bacteriophages can extend their host ranges. In the present study, full sequencing of the optimized bacteriophage revealed that only two single nucleotide mutations are sufficient to improve its virulence towards a clinical strain. This indicates the advantages of rapid bacteriophage evolution over conventional drugs that can take months if not years to optimize.

Besides the present study, phage therapy on lung infection caused by *Burkholderia cenocepacia* has also been reported [17]. Although there are some dissimilarities, this might be due more to the pathogens than to the phage treatments as these two bacteria do not elicit an identical response in the host [29,30]. These



D

```
PAK-P1-ORF0054    1  MANTRSYLNDGQFYIADQTENLLIIPNTWTLVENMGVFTSEGVTQNTVQFEEIETRYGLV
PAK-P3-ORF0007    1  MRPIPSLQNN--FEYTDLTEPMILIPNVWGLTQQLGVFGVDRTTQESVTLEEITKSFGLM
Felix01-P112      1  ---MLTNSEKSRFFLADLTGEVQSIPNTYGYISNLGLFRSAPITQTTFLMDLTDWDVSLL
consensus         1  .  . .  .   *...*.*. ...***..... ..*.* .. .** .. .....  ..*.

PAK-P1-ORF0054   61  KDAIRGTRHQVASDQRRQ-LRAFAIPHFNQDDYITPEDIQGKRAFGAD-REETLNEVRAR
PAK-P3-ORF0007   59  EDIHRGARHQVGRDYDRQ-MRTFAVPHFTYDDYITPRDIQGKRAYGKQ-ELETLDQVRMR
Felix01-P112     58  DAVDRDSRKAETSAPERVRQISFPMMYFKEVESITPDEIQGVRQPGTANELTTEAVVRAK
consensus        61  ... *..*..... .*. ...*....*  ...***..***.*..*   ...*.  **..

PAK-P1-ORF0054  119  KLETIRRNWANTAEVASVSAIVTGKSYAP----AGTIEYDWYDLMGKTRKVVGFDLTNPT
PAK-P3-ORF0007  117  KLERLRGTHAATMEFARMHTLVTGKPYTPNNTVGGATGYDWYQEFGKTRFEVNFELDTPT
Felix01-P112    118  KLMKIRTKFDITREFLFMQALKGKVVDAR-----GTLYADLYKQFDVEKKTIYFDLDNPN
consensus       121  **...*  .. * *.. . ..... ...    .*.. .*.*  ..... . *.*..*.

PAK-P1-ORF0054  175  ADVMGKTEEIFVHMQDNSQDGLIRG--DFVALCSPEFFTALINHPSIKEFYKAYQASPQY
PAK-P3-ORF0007  177  TNILEKSELVYAHMQDEAYTGGVVG--DVIAICSPEFFSKLISHPTVVEAYKYYASQPQI
Felix01-P112    173  ADIDASIEELRMHMEDEAKTGTVINGEEIHVVVDRVFFSKLTKHPKIRDAYLAQQTPLAW
consensus       181  .......*....**.*.. .* ...  .........**..*. **.....*..... ...

PAK-P1-ORF0054  233  WRER-----LTARGLDLRFREFYFGNIHFIEYRG---VDPYGN--RLIPAGDAYFIP---
PAK-P3-ORF0007  235  LRER-----LRARGFDARYREFYFGNVLYIEYRGGFQGRPGGEKRRYVPAGEAVFIPG--
Felix01-P112    233  QQITGSLRTGGADGVQAHMNTFYYGGVKFVQYNGKFKDKRGKVHTLVSIDSVADTVGVGH
consensus       241   ...     . *.*.......**.*......*.* .  .... . .......* ...

PAK-P1-ORF0054  280  --------TDSGDLFARYFGPGSTFDDLGTLGKELYATERMAEDRRSILIETESNFIHVL
PAK-P3-ORF0007  288  --------SGTEDLFKTFFAPASKFEHVNTPGEESYAFEYVDPKGEFLEINSETNFINVL
Felix01-P112    293  AFPNVAMLGEANNIFEVAYGPCPKMGYANTLGQELYVFEYEKDRDEGIDFEAHSYMLPYC
consensus       301          ... ..*  ...*..... ..*.* *.*..*.. .. . .......... ..

PAK-P1-ORF0054  332  RRPQMIVRGTVNA---
PAK-P3-ORF0007  340  MYPQLVVKGKAA----
Felix01-P112    353  TRPQLLVDVRADAKGG
consensus       361   .**..*....  .
```

Figure 4. Characterization of PAK-P3 and P3-CHA bacteriophages. (**A**, **C**) Electron micrographs of PAK-P3 (**A**) and P3-CHA (**C**). Scale bar: 100 nm. (**B**) SDS-PAGE of PAK-P3 and P3-CHA proteins; only the most abundant proteins give visible signals (MW: molecular weight markers, the arrow points to the major capsid proteins). (**D**) Clustal alignment of the three major capsid proteins of PAK-P1, PAK-P3 and P3-CHA bacteriophages with their closest homologs in the database with known function (the major capsid protein of Felix 01 bacteriophage; NP_944891). Major capsid proteins of PAK-P3 and P3-CHA are 100% identical.
doi:10.1371/journal.pone.0016963.g004

studies suggest that bacterial lung infections can be treated by bacteriophages as long as the bacteria remain accessible (phage therapy is not suitable for intracellular bacteria).

The preventive treatment appears to be of lesser interest as its clinical application might not be as wide as the curative treatment. However it should not be disregarded as its efficacy was impressive; a single dose retained efficacy for up to four days. The limited clinical application is due to the fact that it is difficult to know in advance which bacterial strains will infect an invidual. Nevertheless, some individuals—such as CF or immuno-compromized patients— are known to be more susceptible to hospital-acquired infections. These infections are sometimes due to identified pathogens, as in the case of epidemic strains [31]. As a consequence, as soon as an epidemic is identified, such a population of patients could benefit from preventive treatments to reduce the probability of becoming infected.

Bacteriophages should not be considered only as a stand-alone treatment. Their use in combination with already approved treatments (like antibiotics) will be most likely the best form of application. Experimental, clinical, and regulatory data of such combined treatments are now urgently needed since antibiotic resistance is still rising [5].

Together with our previous work, we have now demonstrated that two different bacteriophages administrated intranasally are effective in treating lung infections with two different bacterial strains of *P. aeruginosa*. This extends our knowledge concerning the use of bacterial viruses in the treatment of pulmonary infections.

Materials and Methods

Ethics Statement

Animals were housed in the Institut Pasteur animal facilities accredited by the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice, in appliance of the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals. Protocols were approved by the veterinary staff of the Institut Pasteur animal facility (approval ID 10.565).

Table 1. Efficacy of plating of PAK-P3 and P3-CHA bacteriophages on CF *P. aeruginosa* strains.

Efficacy of plating relative to the reference strain, %										
	Strains from patients with primary infections									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PAK-P3	0	0	0	35	6	33	0	66	0	0
P3-CHA	0.01	0.01	0	73	40	100	0.01	100	0.007	0
	Strains from patients with chronic infections									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PAK-P3	0	20	0	0	8	0	0	0	100	0
P3-CHA	0	100	0.07	0	100	0	0	0	100	0

Efficacies of PAK-P3 and P3-CHA bacteriophages on their reference strains, respectively. PAK and CHA strains were fixed at 100%. Results are expressed as relative percentage to these references.
doi:10.1371/journal.pone.0016963.t001

Pseudomonas aeruginosa strains

The CHA strain was cultivated at 37°C in LB medium with shaking and prepared as previously described [14]. The CHA strain is resistant to tetracyclin, chloramphenicol, ampicilin, streptomycin, nalidixic acid, spectinomycin, erythromycin and rifampicin and shows an intermediate level of resistance to gentamycin and ticarcillin [18,19]. The 20 clinical CF strains were provided by P. Plésiat, Besançon, France.

Bacteriophage isolation and preparation

Bacteriophage PAK-P3 was isolated from sewage water as previously described [14]. To adapt the PAK-P3 bacteriophage to the CHA strain, a liquid culture of the CHA strain was infected with PAK-P3 (MOI of 1/1000) and incubated at 37°C with shaking. After 4 hours, the culture, showing signs of lysis, was stopped by adding few drops of chloroform. The culture was then centrifuged at 8000 g for 10 min, and the supernatant was stored at 4°C before use in the next round of amplification. This was repeated five times and the final supernatant was diluted and plated onto a Petri dish overlaid with the CHA stain. A few individual plaques were picked and resuspended in SM buffer (10 mM Tris HCl pH7, 200 mM NaCl, 0.03% gelatine) and subsequently used for four cycles of plaque purification. A final set of 10 isolated plaques were chosen and tested for their host range against a set of 20 CF strains of *P. aeruginosa* by spotting serial dilutions of bacteriophages on bacterial lawns. Each of the 10 isolated plaques showed the same host range, and one was chosen

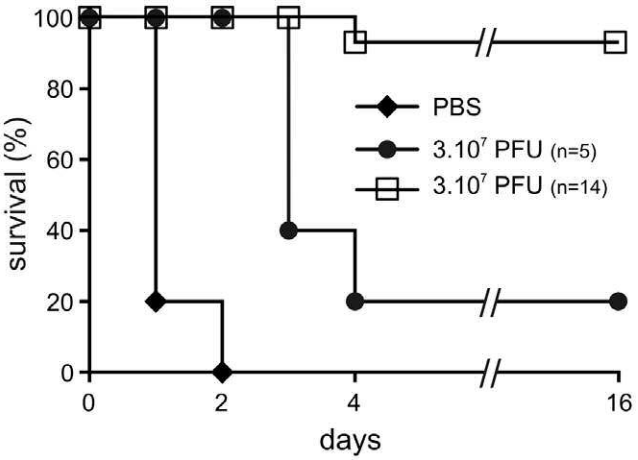


Figure 5. Survival curve of infected mice treated with bacteriophage PAK-P3 compared to P3-CHA. Mice were infected intranasally with 3×10^6 cfu (CHA strain) and 2 h later were treated with either PBS (♦) or 3×10^7 pfu of bacteriophage PAK-P3 (•), or 3×10^7 pfu of bacteriophage P3-CHA (□) also administered intranasally ($P<0.005$ for both P3-CHA and PAK-P3 bacteriophage doses compared to PBS and $P<0.05$ between P3-CHA and PAK-P3 bacteriophage doses).
doi:10.1371/journal.pone.0016963.g005

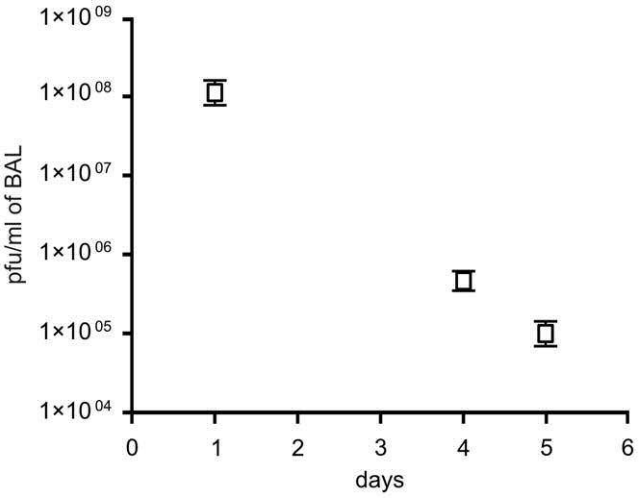


Figure 6. Persistence of P3-CHA bacteriophage in lungs of uninfected mice. Three groups of five mice were given 3×10^8 pfu of bacteriophage P3-CHA, administered intranasally. The number of bacteriophages in BAL fluids was determined 1, 4 and 5 days post-administration (n = 5).
doi:10.1371/journal.pone.0016963.g006

and named bacteriophage P3-CHA. Liquid cultures of 1 litre were used for large-scale preparation of PAK-P3 and P3-CHA using caesium chloride ultracentrifugation as described by Boulanger [32]. Bacteriophage solutions obtained were diluted in PBS for the curative treatment. Before use for the preventive treatment bacteriophage solutions were passed five times through an endotoxin-removal column (EndoTrap blue, Hyglos, Germany). The endotoxin-free bacteriophage solution contained 1×10^{-10} endotoxin units per pfu which correspond to 0.02UE per mice for the highest dose of bacteriophage given (1×10^8 pfu in 50 µl). This value is over 100 fold inferior to the limited value accepted in Europe for bacterial endotoxins contamination of products that are administrated intraveneously (5.0 UE/kg body mass/hour; European Pharmacopoeia 5.0, 2005). Endotoxin concentrations were determined using the QCL-1000® Chromogenic LAL endpoint assay (Cambrex, Walkersville, MD, USA).

Heat-inactivated bacteriophage solution was obtained by a 10 min incubation at 80°C. Inability of heated bacteriophage to form plaque on bacterial lawns was checked.

Electron microscopy observations were performed on a Jeol 1200 EXII microscope after uranyl acetate staining of caesium chloride bacteriophage preparations [33].

Serial dilutions of bacteriophages PAK-P3 and P3-CHA were spotted on bacterial lawns for each of the 20 clinical strains. Efficacy of plating was calculated by comparison with an efficacy of 100% for respectively the PAK-P3 bacteriophage on the PAK strain and the P3-CHA bacteriophage on the CHA strain.

Genomic characterisation of bacteriophages

Genome sequencing (20 to 25× coverage) was performed by Eurofins and Beckman Coulter Genomics using 454 technology with DNA prepared by standard procedures. The complete genome sequences of the PAK-P3 (vB_PaeM_PAK_P3) and P3-CHA (vB_PaeM_P3_CHA) bacteriophages are accessible in Genbank (accession numbers HM173082 and HM173081, respectively). Sequence analysis to search for temperate bacteriophage markers (similar genes) was performed on the PAK-P3 genome as described previously [14]. PAK-P3 and P3-CHA genomes were compared to search for mutations using Blast2seq tool. Two mutations were found in putative orfs 13 and 151 (nucleotide 7393 changed from A to G and nucleotide 69922 changed from G to A) leading to amino-acid substitutions Q to R and E to K, respectively in these two hypothetical proteins.

Total bacteriophage proteins were run on an SDS gel and subjected to in-gel trypsin digestion; microsequencing of the major capsid proteins was then performed by the Institut Pasteur microsequencing facility. None of the peptide sequences corresponded to any protein sequences in the databank before inclusion of our bacteriophage sequence data.

Animal Infection

Mice (8 weeks old Balb/c males) were supplied by the Centre d'élevage R. Janvier. Food and drink were provided ad libitum. Animal infections and treatments were performed as described previously [14].

Bronchoalveolar lavages (BAL; 4×0.5 ml) were performed 20 h after infection following pentobarbital euthanasia (300 mg/kg). One aliquot of the BAL fluids was centrifuged for 10 minutes at 1400 rpm and murine cytokine concentrations were determined using DuoSet ELISA kits from R&D Systems. LDH activity was estimated using the Cytotox96 kit from Promega. The release of LDH in extracellular media reflects organ toxicity. Another aliquot of the BAL fluids was centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes to separate free bacteriophages from bacteria. To determine the amount of free bacteriophages, supernatants were diluted and spotted onto plates overlaid with the CHA strain. To determine viable bacterial counts, pellets were resuspended in PBS, serially diluted and plated onto LB agar plates.

Histological and immuno-histochemistry analyses

Lungs were removed from euthanized animals, fixed in 4% buffered formaline for at least 24 h at 4°C, and then embedded in paraffin. Serial 4 µm-thick sections were stained with haematoxylin-eosin (HE) and Gram. Histological scoring of elementary lesions of alveolitis, bronchitis, necrosis, and consolidation were scored by an investigator, who was blind to the treatment group, from 0 to 5 (0: none, 1: mild, 2: moderate focal, 3: moderate focal and diffuse, 4: severe focal, 5: severe focal and diffuse extending to the whole lobule). Recruitment of lymphocytes, alveolar macrophages - monocytes and polymorphonuclear cells was similarly evaluated from 0 to 3 (0: no, 1: weak, 2: moderate and 3: severe). Addition of these individual scores gave a lesion-severity score ranging from 0 to 25. Immunohistochemistry of infected lungs was performed with a primary polyclonal anti-*Pseudomonas* antibody raised in rabbit against the PcrV protein [34]. Affinity-purified antibodies were diluted 1/4000 before use. The method used was a classical Envision Dako protocol performed with amino-ethyl–carbazol as a chromogen.

Statistical analysis

Mantel-Cox tests were performed for survival curves and one-tailed Mann-Whitney paired tests were used to compare quantifications of bacteria, bacteriophages and cytokines. Both were calculated with Prism 4.0 software (France). Error bars are s.e.m.

Acknowledgments

We are grateful to I. Attree-Delic for the gift of anti-*Pseudomonas* antibodies and to B. Polack and B. Toussaint for providing the CHA strain. We also

acknowledge the help of A. Criscuolo for bioinformatic analyses and D. Leduc for cytokine and LDH assays. We thank the BMGE team for its support and are grateful to the staff of the animal facility of Institut Pasteur.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LT LD. Performed the experiments: EM ES DM MH. Analyzed the data: MH LT LD. Wrote the paper: LD.

References

1. Jones RN (2010) Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. Clin Infect Dis 51(Suppl 1): S81–87.
2. Gomez MI, Prince A (2007) Opportunistic infections in lung disease: Pseudomonas infections in cystic fibrosis. Curr Opin Pharmacol 7: 244–251.
3. Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L (2007) Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of Staphylococcus aureus, Enterococcus spp. and Pseudomonas aeruginosa in 2010. Curr Opin Microbiol 10: 436–440.
4. Gould IM (2008) The epidemiology of antibiotic resistance. Int J Antimicrob Agents 32(Suppl 1): S2–9.
5. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, et al. (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis 10: 597–602.
6. Merril CR, Scholl D, Adhya SL (2003) The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. Nat Rev Drug Discov 2: 489–497.
7. Summers WC (2001) Bacteriophage therapy. Annu Rev Microbiol 55: 437–451.
8. Kutateladze M, Adamia R (2008) Phage therapy experience at the Eliava Institute. Med Mal Infect 38: 426–430.
9. Gorski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Lobocka M, et al. (2009) Bacteriophage therapy for the treatment of infections. Curr Opin Investig Drugs 10: 766–774.
10. Kutateladze M, Adamia R (2010) Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. Trends Biotechnol.
11. O'Flaherty S, Ross RP, Coffey A (2009) Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. FEMS Microbiol Rev 33: 801–819.
12. Sulakvelidze A, Kutter E (2005) Bacteriophage therapy in humans. In: Kutter E, Sulakvelidze A, eds. Bacteriophages: biology and applications. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 381–436.
13. Donlan RM (2009) Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. Trends Microbiol 17: 66–72.
14. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, et al. (2010) Bacteriophages can treat and prevent Pseudomonas aeruginosa lung infections. J Infect Dis 201: 1096–1104.
15. Smith HW, Huggins MB (1983) Effectiveness of phages in treating experimental Escherichia coli diarrhoea in calves, piglets and lambs. J Gen Microbiol 129: 2659–2675.
16. Wright A, Hawkins CH, Anggard EE, Harper DR (2009) A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy. Clin Otolaryngol 34: 349–357.
17. Carmody LA, Gill JJ, Summer EJ, Sajjan US, Gonzalez CF, et al. (2009) Efficacy of bacteriophage therapy in a model of Burkholderia cenocepacia pulmonary infection. J Infect Dis 2010: 264–271.
18. Dacheux D, Attree I, Schneider C, Toussaint B (1999) Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. Infect Immun 67: 6164–6167.
19. Delic-Attree I, Toussaint B, Froger A, Willison JC, Vignais PM (1996) Isolation of an IHF-deficient mutant of a Pseudomonas aeruginosa mucoid isolate and evaluation of the role of IHF in algD gene expression. Microbiology 142 (Pt 10): 2785–2793.
20. Bergh O, Borsheim KY, Bratbak G, Heldal M (1989) High abundance of viruses found in aquatic environments. Nature 340: 467–468.
21. Willner D, Furlan M, Haynes M, Schmieder R, Angly FE, et al. (2009) Metagenomic analysis of respiratory tract DNA viral communities in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis individuals. PLoS One 4: e7370.
22. Clark JR, March JB (2004) Bacterial viruses as human vaccines? Expert Rev Vaccines 3: 463–476.
23. Kurzepa A, Dabrowska K, Skaradzinski G, Gorski A (2009) Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy. Clin Exp Med 9: 93–100.
24. Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, Gorski A (2005) Bacterial viruses against viruses pathogenic for man? Virus Res 110: 1–8.
25. Glonti T, Chanishvili N, Taylor PW (2010) Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of Pseudomonas aeruginosa. J Appl Microbiol 108: 695–702.
26. Fu W, Forster T, Mayer O, Curtin JJ, Lehman SM, et al. (2010) Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa on catheters in an in vitro model system. Antimicrob Agents Chemother 54: 397–404.
27. Knezevic P, Petrovic O (2008) A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on Pseudomonas aeruginosa biofilm. J Microbiol Methods 74: 114–118.
28. Dif F, Wu YZ, Burgel PR, Ollero M, Leduc D, et al. (2010) Critical role of cytosolic phospholipase $\alpha 2$ in bronchial mucus hyper-secretion in CFTR-deficient mice. Eur Respir J.
29. Ramphal R, Balloy V, Huerre M, Si-Tahar M, Chignard M (2005) TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute Pseudomonas aeruginosa lung infections. J Immunol 175: 3927–3934.
30. Ventura GM, Balloy V, Ramphal R, Khun H, Huerre M, et al. (2009) Lack of MyD88 protects the immunodeficient host against fatal lung inflammation triggered by the opportunistic bacteria Burkholderia cenocepacia. J Immunol 183: 670–676.
31. Armstrong D, Bell S, Robinson M, Bye P, Rose B, et al. (2003) Evidence for spread of a clonal strain of Pseudomonas aeruginosa among cystic fibrosis clinics. J Clin Microbiol 41: 2266–2267.
32. Boulanger P (2009) Purification of Bacteriophages and SDS-PAGE Analysis of Phage Structural Proteins from Ghost Particles. Methods Mol Biol 502: 227–238.
33. Ackermann HW (2009) Basic phage electron microscopy. Methods Mol Biol 501: 113–126.
34. Goure J, Pastor A, Faudry E, Chabert J, Dessen A, et al. (2004) The V antigen of Pseudomonas aeruginosa is required for assembly of the functional PopB/PopD translocation pore in host cell membranes. Infect Immun 72: 4741–4750.

ARTICLE 2

Validation of nasal potential difference in *cftr* knockout and F508del-CFTR mice

Emilie Saussereau, Delphine Roussel, Siradiou Diallo, Laurent Debarbieux, Aleksander Edelman and Isabelle Sermet-Gaudelus

Soumis PlosONE

Article présenté dans la partie Résultats expérimentaux

Title: Validation of nasal potential difference in *cftr* knockout and F508del-CFTR mice

Short title: Nasal potential difference in CF mice

Authors

Emilie Lyne Saussereau[1,2,3], Delphine Roussel[2], Siradiou Diallo[2], Laurent Debarbieux[1], Aleksander Edelman[2,4] and Isabelle Sermet-Gaudelus[2,4]

1: Institut Pasteur, Molecular Biology of the Gene in Extremophiles Unit, Department of Microbiology, F-75015 Paris, France

2 : Inserm U 845, Paris, France

3: Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, rue du Docteur Roux, F-75015 Paris, France

4 : Université Paris Descartes, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris France

 # Corresponding author:

Emilie Lyne Saussereau

Institut Pasteur, 25, rue du Dr Roux, 75015 Paris

Phone: (33) 1 40 61 56 24 - Fax: (33) 1 40 61 55 91

e-mail: sauss72@hotmail.fr

ABSTRACT

Background: Treatments designed to correct cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) defects must first be evaluated in preclinical experiments in the mouse model of cystic fibrosis (CF). Mice nasal mucosa mimics the bioelectric defect seen in humans. The use of nasal potential difference (V_{TE}) to assess ionic transport is a powerful test evaluating the restoration of CFTR function. Nasal V_{TE} in CF mice must be well characterized for correct interpretation.

Methods: We performed V_{TE} measurements in large-scale studies of two mouse models of CF — B6;129 *cftr* knockout and FVB F508del-CFTR — and their respective wild-type (WT) littermates. We assessed the repeatability of the test for *cftr* knockout mice and defined cutoff points distinguishing between WT and F508del-CFTR mice.

Results: We determined the typical V_{TE} values for CF and WT mice and demonstrated the existence of residual CFTR activity in F508del-CFTR mice. We characterized intra-animal variability in B6;129 mice and defined the cutoff points for F508del-CFTR chloride secretion rescue. Hyperpolarization of more than -2.15 mV after perfusion with a low-concentration Cl^- solution was considered to indicate a normal response.

Conclusions: These data will make it possible to interpret changes in nasal V_{TE} in mouse models of CF, in future preclinical studies.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is a lethal autosomal recessive disease that affects one in 2500 newborns in France [1]. This disease is caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR)* gene, resulting in the production of a defective CFTR protein. CFTR is the main chloride (Cl^-) channel in secretory epithelia and also acts as a regulator of sodium (Na^+) transport, through inhibition of the ENaC Na^+ channel [2]. Mutations in the *cftr* gene lead to the synthesis of a non-functional CFTR, causing dehydration of the airway surface liquid, thereby impeding mucociliary clearance and creating a favorable microenvironment for bacterial infections. The most frequent mutation results in deletion of the phenylalanine residue in position 508 (F508del-CFTR). This mutation leads to the retention of the F508del-CFTR protein in the endoplasmic reticulum and impaired function of any F508del-CFTR reaching the apical membrane [3]. There is currently no curative treatment for CF. Several strategies are currently being investigated for direct correction of the mutated CFTR defects, by rescuing trafficking defects [4–6] or rendering the mutated CFTR functional [5,7]. However, these approaches must be tested in animal models. CF mice display nasal epithelium ionic transport abnormalities similar to those observed in humans with CF: abnormally high levels of Na^+ absorption and an absence of Cl^- secretion in response to perfusion with a low-concentration Cl^- solution or a solution lacking this anion [8].

Transepithelial nasal potential difference (V_{TE}) measurement is the most appropriate method for the *in vivo* exploration of ionic transport in CF [9]. This technique has been used in phase II clinical trials, as a means of assessing the restoration of CFTR

function [10,11]. It may also be very useful for preclinical studies assessing the efficacy of CFTR correctors or potentiators [6,12–14].

However, V_{TE} measurement protocols differ between studies. Data have been obtained from pooled mice of different backgrounds [15,16], for small numbers of mice and not for all V_{TE} parameters [15,17]. Only two backgrounds are well characterized [14,18–20]. Moreover, few data are available concerning variability within and between animals and no threshold for a significant, drug-related change has been validated. The aim of our study was i) to establish typical V_{TE} values, in the FVB and B6;129 backgrounds, for F508del-CFTR and *cftr*$^{-/-}$ mice, respectively, ii) to determine the repeatability of V_{TE} measurements, iii) to determine threshold V_{TE} values distinguishing between the CF and WT electrophysiological responses in F508del-CFTR mice. These data should improve the use of CF mice in preclinical studies.

MATERIALS AND METHODS

Mouse models

We studied male and female B6;129-CFTR$^{tm1\text{-}Unc}$ (*cftr*$^{-/-}$) mice, FVB mice homozygous for the F508del-CFTR mutation (F508del-CFTR) and their respective wild-type (WT) control littermates. Mice were obtained from CDTA (Orléans, France) and housed at the SPF Animal Care Facility of Necker University. The mice were 8 to 16 weeks old and weighed 20 to 28 g. All mice were fed a fiber-free diet. Colopeg (17.14 g/l; Bayer Santé Familiale, France) was administered to CF mice to prevent intestinal obstruction. Animal protocols were approved by the local ethics committee

dealing with animal welfare and conformed to European Community regulations for the use of animals in research (authorization no. P2.AE.092.09).

V_{TE} measurements

The method for nasal potential difference measurement was adapted and miniaturized from that developed by our group for use in young children [21]. Mice were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine (133 mg/kg; IMALGENE 1000, MERIAL, France) and xylazine (13.3 mg/kg; Rompun 2%, BayerPharma, France). Mice were positioned on a 45° tilt board and a paper pad was placed under the nose to prevent the mice suffocating.

Transepithelial potential was measured between an Ag/AgCl reference electrode and an Ag/AgCl exploring electrode. The two Ag/AgCl electrodes were connected to a high-impedance voltmeter (LOGAN Research Ltd, United Kingdom). The reference electrode was connected to a subcutaneous needle with an agar bridge. The exploring Ag/AgCl electrode was connected to the nasal mucosa through a double-lumen polyethylene catheter (0.5 mm in diameter) inserted into the right nostril to a depth of 4 mm. Recordings were made every second, during continuous flow, at a rate of 0.15 ml/h, of the initial Cl^- solution (140 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, pH adjusted to 7.4 with NaOH) through the lumen directly connected to the exploring electrode. The following solutions were perfused through the second lumen at a flow rate of 1.5 ml/h: (1) Cl^- solution for basal measurement, (2) 100 µM amiloride in Cl^- solution (Sigma-Aldrich, USA), to block ENaC Na^+ absorption (3) a low-Cl^- solution (140 mM sodium gluconate, 6 mM potassium gluconate, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM $MgCl_2$, 6 mM calcium

gluconate, pH adjusted to 7.4 with NaOH) containing amiloride (100 µM) to drive Cl^- secretion. Each solution was perfused for at least three minutes. Stability for at least one minute was required before each change in perfusion. The values analyzed were the means of the last 30 seconds.

Three parameters were investigated during transepithelial nasal potential difference (V_{TE}) measurements: (1) the stable maximal baseline V_{TE}, which was obtained after the equilibration of transepithelial ion transport with Cl^- solution, and the successive net voltage changes between (2) baseline V_{TE} and the Cl^- solution containing 100 µM amiloride ($\Delta V_{TE\ Amil}$); (3) Cl^- solution with amiloride and low-Cl^- solution with amiloride ($\Delta V_{TE\ LowCl^-}$).

Inhibitors and activators

CFTR is a cAMP-dependent channel. We therefore used forskolin (Sigma-Aldrich, USA), an adenylate cyclase activator, in B6;129 and FVB WT mice, for the specific activation of CFTR. The V_{TE}-based outcomes were net voltage differences between 100 µM amiloride in low-Cl^- solution and 100 µM amiloride plus 10 µM forskolin in low-Cl^- solution ($\Delta V_{TE\ Forsk.}$).

We used various inhibitors to identify the channels participating in the low-Cl^- response in B6;129 WT mice: the CFTR-specific inhibitor thiazolidone (Inh-172) (Calbiochem, Germany), 5 µM; niflumic acid, a calcium-dependent Cl^- channel inhibitor (Sigma-Aldrich, USA),100 µM and zinc chloride, a voltage-dependent Cl^- channel inhibitor, (Fluka, USA), 50 µM. These inhibitors were tested in low-Cl^-

solution containing amiloride (100 µM), and the V_{TE}-based outcomes recorded were net voltage changes after perfusion of the given inhibitor in low-Cl^- solution ($\Delta V_{TE\ Inh.}$).

We investigated the involvement of channels other than CFTR in Cl^- secretion, using broad-spectrum inhibitors of anion transporters: diphenylamine-2-carboxylic acid (DPC) and disodium 4,4′-diisothiocyanatostilbene-2,2′-disulfonate (DIDS) were tested on six B6;129 WT mice, in low-Cl^- solution containing amiloride (100 µM) and Inh-172 (5 µM). The V_{TE}-based outcomes measured were net voltage changes between amiloride plus 5 µM Inh-172 in low-Cl^- solution and amiloride plus 5 µM Inh-172 plus 200 µM DIDS (Fluka, USA) or 200 µM DPC (Fluka, USA) in low-Cl^- solution.

We assessed the effects of solvents (DMSO, ethanol, NaOH and $KHCO_3$) on voltage. None of the solvents altered Cl^- secretion at the concentration used to dissolve the various inhibitors (data not shown).

Statistical analysis

The values obtained were not normally distributed. The electrophysiological norms for ΔV_{TE} parameters are therefore expressed as medians with interquartile ranges (IQR).

We compared the V_{TE} values obtained between groups in Mann-Whitney tests.

We assessed the effects of inhibitors and activators, in Wilcoxon paired signed-rank tests comparing V_{TE} data recorded after the perfusion of low-Cl^- solution and V_{TE} data recorded after the perfusion of low-Cl^- solution plus inhibitor/activator.

The difference between two measurements for a single mice group was evaluated with the non parametric Wilcoxon paired signed-rank test. Repeatability was evaluated by the Bland-Altman method [22]. For each mouse, the difference between two measurements was calculated and plotted against the mean of the two measurements. We determined whether the differences were normally distributed in Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk normality tests. The bias was estimated by calculating the mean of all differences between the two measurements. If this mean is not close to zero, the two assays are considered to give different results. The limits of agreement were defined as the bias ± 1.96 SD.

A case-control analysis was carried out to optimize the discrimination between control mice and F508del-CFTR mice. Cutoff points were determined from the receiver operating characteristics (ROC) curve. For each parameter, we ranked the values for WT and F508del-CFTR mice. The percentage of the WT mice effectively included in each rank indicates the sensitivity of the test; the percentage of F508del-CFTR mice effectively not included in each rank indicates the specificity of the test. Cutoff points were defined as the rank associated with the best positive likelihood ratio of sensitivity/(1-specificity), favoring specificity.

RESULTS

Protocol implementation

Perfusion with Cl^- solution induced depolarization in WT mice, by about 8.7 mV (IQR 4.4) in B6;129 mice (*n* = 35) and 10.3 mV (IQR 4.1) in FVB mice (*n* = 12) (data not shown). We therefore recorded baseline V_{TE} after perfusion with Cl^- solution.

Forskolin induced no significant increase in Cl^- secretion in either B6;129 (n = 6) or FVB (n = 6) WT mice. We therefore decided not to test forskolin after perfusion with a low-Cl^- solution.

Neither niflumic acid (n = 6) nor zinc ions (n = 6) significantly inhibited chloride conductance. Inh-172 decreased Cl^- secretion significantly, by 2.3 mV (n = 6; p = 0.03). Both DIDS and DPC induced a significant additional depolarization, of about 2.2 mV (n = 6; p = 0.03, for both). As CFTR is sensitive to the broad-spectrum inhibitor DPC [23,24], but not to DIDS [24,25], we decided to inhibit Cl^- secretion by the following sequence: (1) Inh-172 in low-Cl^- solution, to inhibit CFTR specifically, (2) DIDS in low-Cl^- solution containing Inh-172, to inhibit potential anion transporters other than CFTR.

Nasal potential difference values

Typical values in B6;129 WT and CF mice

Transepithelial nasal potential difference (V_{TE}) measurements were performed in 50 WT and 50 *cftr* knockout mice (*cftr*$^{-/-}$); representative recordings are shown in Figure 1. Sex had no effect on any of the V_{TE} parameters in either of these groups. The *cftr*$^{-/-}$ mice had higher levels of sodium transport than WT mice, as shown by the higher baseline V_{TE} and much more pronounced response to amiloride perfusion, and an absence of chloride transport, as shown by the lack of response to perfusion with low-Cl^- solution (Table 1). WT mice displayed strong hyperpolarization during perfusion with the low-Cl^- solution (-7.8 mV (IQR = 3.8 mV)), which was inhibited by 20% (p<0.0001) with Inh-172 and an additional 26% (p<0.0001) with DIDS. The *cftr*$^{-/-}$

mice did not respond to Inh-172, but displayed additional depolarization, by 3.1 mV (p<0.0001) after DIDS perfusion.

Nasal potential difference in FVB and B6;129 mice

Transepithelial nasal potential difference (V_{TE}) measurements were performed on 50 F508-del and 25 WT FVB mice (Table 1). No V_{TE} difference was observed between males and females. Like *cftr*$^{-/-}$ mice, F508del-CFTR mice had higher levels of sodium transport and absent or lower levels of chloride secretion than their WT littermates.

WT B6;129 and FVB mice had similar levels of Na^+ transport, as shown by their similar baseline V_{TE} and $\Delta V_{TE\ Amil}$ values. By contrast, WT FVB mice had significantly lower levels of Cl^- secretion, as shown by their $\Delta V_{TE\ Low\ Cl^-}$ values, which were lower than those of B6;129 mice by a factor of about 1.5 (p = 0.0025). The contribution of the CFTR was similar in mice of both backgrounds, because Inh-172 treatment resulted in significant inhibition of 1.6 mV (IQR 3.1, p = 0.0039) in FVB mice and 1.6 mV (IQR 2.3) in B6;129 mice). In WT FVB mice, DIDS treatment resulted in an additional inhibition, by 2.4 mV (IQR 2.8, p = 0.0078), corresponding to 51% inhibition of chloride secretion..

F508del-CFTR mice had lower levels of sodium transport than *cftr*$^{-/-}$ mice, as shown by their significantly lower baseline V_{TE} and $\Delta V_{TE\ Amil}$ values (p = 0.0001 and p = 0.002). As in *cftr*$^{-/-}$ mice, no chloride secretion was observed.

Intermeasurement repeatability

Figure 2 shows the results of two measurements taken one to four weeks apart in 22 WT mice (A) and 21 *cftr*$^{-/-}$ mice (B).

There was no significant difference between the two series of measurements for baseline V_{TE}, $\Delta V_{TE\ Amil}$ and $\Delta V_{TE\ Low\ cl^-}$, in either WT or *cftr*$^{-/-}$ mice, as assessed by Wilcoxon paired signed-rank tests.

The repeatability of the test was assessed by the Bland-Altman method for baseline V_{TE}, $\Delta V_{TE\ Amil}$ and $\Delta V_{TE\ Low\ cl^-}$, in both WT (Figure 2C) and *cftr*$^{-/-}$ mice (Figure 2D). Differences between the two measurements were normally distributed and did not vary as a function of their arithmetic values. Intra-animal variability was defined by the limits of agreement, both in WT and *cftr*$^{-/-}$ mice, and for all V_{TE} parameters (Table 2). Bias — i.e. the mean differences — were close to zero in both WT and *cftr*$^{-/-}$ mice (Table 2).

Determination of the cutoff points separating FVB WT and F508del-CFTR mice, for V_{TE} parameters

Figure 3 shows the receiver operating characteristics (ROC) curve obtained with V_{TE} data for 25 FVB WT and 50 F508del-CFTR mice. All the areas under the curve (AUC) were very close to 1.00, demonstrating a high level of discrimination between WT and F508del-CFTR mice. This case-control analysis led to the definition of the following cutoff points, indicative of normal ion transport: baseline V_{TE} value > -6.95 mV; $\Delta V_{TE\ Amil.}$ value < 2.45 mV and $\Delta V_{TE\ LowCl^-}$ value < -2.15 mV.)

DISCUSSION

In this study, we established values for nasal potential difference endpoints in mice. We studied baseline V_{TE}, response to amiloride and to low-Cl^- solution in 129;B6 *cftr*$^{-/-}$ and FVB F508del-CFTR mice, and their respective controls. In both CF models, ENaC activity was much higher than in the corresponding WT (Baseline V_{TE}: ~ 3.5 times higher and ΔV_{TEAmil}: ~ 5 times higher) and Cl^- secretion was abolished. We assessed the variability of this test on Bland-Altman plots and determined the first cutoff points for distinguishing between WT and CF mice. These cutoff points are important for the evaluation of CFTR transport restoration in preclinical studies evaluating CFTR correctors or potentiators [6,12–14].

Protocol implementation

Protocols for V_{TE} determinations in mice vary considerably, with differences in perfusion flow rate of perfusion (from 0.018 ml/h to 3 ml/h), the position of the catheter in the nostril (2 mm to 5 mm into the nostril) and the nature of the solution used (Ringer's solution, Krebs solution, other phosphate or HEPES solutions) [14–20,26,27]. The sequences of the solutions used also differ markedly between protocols: i) Some groups initially perfuse with the Cl^- solution until stabilization is achieved, before recording baseline V_{TE} [19,20], whereas other groups do not carry out this perfusion step [17,18]. ii) The use of a CFTR activator (forskolin, isoproterenol) and CFTR-specific inhibitors during perfusion with the low-Cl^- solution is not systematic [14,17,18]. We defined a protocol taking into account the following points: i) WT mice displayed depolarization after initial Cl^- solution perfusion. We therefore decided to perfuse the epithelium with this solution until stabilization was

achieved, before recording baseline V_{TE}. ii) As no additional hyperpolarization was observed after the perfusion of forskolin solution, in either of the WT backgrounds, we decided not to use forskolin. Similar results were reported by Brady *et al.* for mice of the BALB/cJ and C3H/HeJ backgrounds [15]. Moreover, the response to forskolin (which increase cAMP level), had been shown to be small in WT mice and cannot reliably used to distinguish between WT and CF genotypes because CF mice display a small response similar to that of WT mice [15,16,18,28].

We further characterized Cl^- secretion with various inhibitors. Inh-172, a specific inhibitor of CFTR, and DIDS, a broad-spectrum inhibitor, had significant effects. Neither inhibitors of Ca^{2+}- (niflumic acid) nor inhibitors of voltage-dependent Cl^- channels (zinc chloride) affected Cl^- conductance. This suggests that neither Ca^{2+}-dependant Cl^- channels (CaCC) nor voltage-gated channels were active in the murine nasal epithelium in basal conditions.

VTE values in mice of the two backgrounds

The lack of well characterized backgrounds for V_{TE} measurements led us to investigate the FVB and B6;129 backgrounds in detail. Baseline V_{TE} was significantly higher in CF than in WT mice, consistent with the differences observed between CF patients and healthy people [21,29]. The response to amiloride perfusion was also about five times stronger in the CF models, *cftr*$^{-/-}$ and F508del-CFTR mice, than in WT mice. However, this difference was smaller in F508del-CFTR mice than in *cftr*$^{-/-}$ mice, suggesting that the F508del-CFTR protein may have retained some of its ENaC channel-regulating activity. The corresponding WT had similar baseline V_{TE}

and ΔV_{TEAmil} values. Thus, genetic background is not responsible for effects on sodium transport.

In terms of Cl^- secretion, mice of the two backgrounds were similarly sensitive to Inh-172 and DIDS. However, an interesting difference between these two backgrounds was that chloride secretion was almost entirely inhibited by Inh-172 plus DIDS in FVB mice, whereas secretion was inhibited by less than 50% in B6;129 mice (residual V_{TE} = 0.7 mV vs. 4.2 mV, respectively). Thus, in addition to CFTR, there is a DIDS-insensitive Cl^- pathway in mouse nasal epithelia, but the contribution of this pathway differs considerably between genetic backgrounds.

In response to perfusion with a low-chloride solution, hyperpolarization by at least -1.9 mV was observed in 10 % of FVB F508-del mice, but no B6;129 *cftr*$^{-/-}$ mice. This demonstrates that CFTR activity is therefore responsible for chloride secretion in wild-type B6;129 mice and also that F508del-CFTR retained a residual Cl^- transport activity.

Repeatability of V_{TE} values

Repeatability between two series of measurements within the same group was good. We used Bland and Altman plots to define the limits of agreement in B6;129 WT and *cftr*$^{-/-}$ mice, making it possible to distinguish between simple variability and changes due to treatment. These data are essential for interpreting treatment effects, taking intra-animal variability into account.

We did not calculate coefficients of variance (%CV) for the V_{TE} data because the standard deviation did not vary with the mean and some means were close to zero, making interpretation unreliable [30,31]. We did not determine correlation coefficients either, because the Bland and Altman plots indicated that the determination of these coefficients was not appropriate to this kind of analysis [22].

Cutoff points for V_{TE} values

We were able to determine cutoffs for each of the V_{TE} parameters from ROC curves. We favored specificity over sensitivity. These cutoff points make it possible to classify V_{TE} measurements as belonging to a WT or CF profile, with a high degree of discrimination. This tool is crucial for preclinical studies of new drugs for cystic fibrosis treatment, particularly given the difficulties involved in interpreting the effects of treatment due to the potential residual activity of F508del-CFTR. The low-Cl^- cut-off, -2.15 mV, is the most relevant cutoff because it directly reflects correction of the CFTR defect. This is the first attempt, to our knowledge, to determine V_{TE} endpoints for preclinical studies.

Applications for these cutoff points

We recently used the low-Cl^- cutoff to demonstrate the effect of keratin-8 siRNA treatment to restore F508del-CFTR activity [6]. It was hypothesized that keratin-8 interacts with F508del-CFTR and that disruption of this interaction would restore CFTR activity. Cl^- secretion exceeded the -2.15 mV cutoff for 50 % of the treated mice and none of the control mice, establishing proof-of-concept for the treatment. F508del-CFTR rescue can further be demonstrated by inhibition of the response with a specific inhibitor, such as Inh-172.

In summary, we report here typical V_{TE} values for mice of two backgrounds not previously investigated: B6;129 and FVB. We show that our protocol for V_{TE} measurement is repeatable and we have determined V_{TE} cutoff values for distinguishing between CF and WT responses. This study constitutes an advance in the investigation of F508del-CFTR correctors/potentiators or ENaC hyperabsorption suppressors.

REFERENCES

1. Ratjen F, Döring G (2003) Cystic fibrosis. Lancet 361: 681–689. doi:10.1016/S0140-6736(03)12567-6.

2. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, et al. (1995) CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science 269: 847–850.

3. Amaral M (2004) CFTR and chaperones. Journal of Molecular Neuroscience 23: 41–48. doi:10.1385/JMN:23:1-2:041.

4. Robert R, Carlile GW, Liao J, Balghi H, Lesimple P, et al. (2010) Correction of the Delta phe508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking defect by the bioavailable compound glafenine. Mol Pharmacol 77: 922–930. doi:10.1124/mol.109.062679.

5. Van Goor F, Straley KS, Cao D, González J, Hadida S, et al. (2006) Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L1117–1130. doi:10.1152/ajplung.00169.2005.

6. Colas J, Faure G, Saussereau E, Trudel S, Rabeh WM, et al. (2011) Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect. Human Molecular Genetics. Available:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22038833. Accessed 5 December 2011.

7. Tamanini A, Borgatti M, Finotti A, Piccagli L, Bezzerri V, et al. (2011) Trimethylangelicin reduces IL-8 transcription and potentiates CFTR function. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 300: L380–390. doi:10.1152/ajplung.00129.2010.

8. Grubb BR, Boucher RC (1999) Pathophysiology of gene-targeted mouse models for cystic fibrosis. Physiological Reviews 79: 193.

9. Goubau C, Wilschanski M, Skalická V, Lebecque P, Southern KW, et al. (2009) Phenotypic characterisation of patients with intermediate sweat

chloride values: towards validation of the European diagnostic algorithm for cystic fibrosis. Thorax 64: 683–691. doi:10.1136/thx.2008.104752.

10. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, et al. (2010) Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 182: 1262–1272. doi:10.1164/rccm.201001-0137OC.

11. Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, et al. (2010) Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. New England Journal of Medicine 363: 1991–2003.

12. Cartiera MS, Ferreira EC, Caputo C, Egan ME, Caplan MJ, et al. (2010) Partial correction of cystic fibrosis defects with PLGA nanoparticles encapsulating curcumin. Mol Pharm 7: 86–93. doi:10.1021/mp900138a.

13. Lubamba B, Lebacq J, Lebecque P, Vanbever R, Leonard A, et al. (2009) Airway delivery of low-dose miglustat normalizes nasal potential difference in F508del cystic fibrosis mice. Am J Respir Crit Care Med 179: 1022–1028. doi:10.1164/rccm.200901-0049OC.

14. Barker PM (2005) Effect of macrolides on in vivo ion transport across cystic fibrosis nasal epithelium. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 171: 868–871. doi:10.1164/rccm.200311-1508OC.

15. Brady KG, Kelley TJ, Drumm ML (2001) Examining basal chloride transport using the nasal potential difference response in a murine model. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281: L1173–1179.

16. Grubb BR, Rogers TD, Boucher RC, Ostrowski LE (2009) Ion transport across CF and normal murine olfactory and ciliated epithelium. American Journal of Physiology- Cell Physiology 296: C1301.

17. Lubamba B, Lecourt H, Lebacq J, Lebecque P, De Jonge H, et al. (2008) Preclinical evidence that sildenafil and vardenafil activate chloride transport in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 177: 506–515. doi:10.1164/rccm.200703-344OC.

18. Griesenbach U, Smith SN, Farley R, Singh C, Alton EWFW (2008) Validation of Nasal Potential Difference Measurements in Gut-Corrected CF Knockout Mice. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology 39: 490–496. doi:10.1165/rcmb.2007-0385OC.

19. Salinas DB, Pedemonte N, Muanprasat C, Finkbeiner WF, Nielson DW, et al. (2004) CFTR involvement in nasal potential differences in mice and pigs studied using a thiazolidinone CFTR inhibitor. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 287: L936.

20. Parsons DW, Hopkins PJ, Bourne AJ, Boucher RC, Martin AJ (2000) Airway gene transfer in mouse nasal-airways: importance of identification of epithelial

type for assessment of gene transfer. Gene Ther 7: 1810–1815. doi:10.1038/sj.gt.3301317.

21. Sermet-Gaudelus I, Girodon E, Roussel D, Deneuville E, Bui S, et al. (2010) Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. Thorax 65: 539 – 544. doi:10.1136/thx.2009.123422.

22. Bland JM, Altman DG (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1: 307–310.

23. Zhang Z-R, Zeltwanger S, McCarty NA (2000) Direct Comparison of NPPB and DPC as Probes of CFTR Expressed in Xenopus Oocytes. Journal of Membrane Biology 175: 35–52. doi:10.1007/s002320001053.

24. Schwiebert EM, Morales MM, Devidas S, Egan ME, Guggino WB (1998) Chloride channel and chloride conductance regulator domains of CFTR, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Proceedings of the National Academy of Sciences 95: 2674 –2679.

25. Schwiebert EM, Flotte T, Cutting GR, Guggino WB (1994) Both CFTR and outwardly rectifying chloride channels contribute to cAMP-stimulated whole cell chloride currents. American Journal of Physiology - Cell Physiology 266: C1464 –C1477.

26. Bruscia EM, Price JE, Cheng E-C, Weiner S, Caputo C, et al. (2006) Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. Proc Natl Acad Sci USA 103: 2965–2970. doi:10.1073/pnas.0510758103.

27. Egli M, Duplain H, Lepori M, Cook S, Nicod P, et al. (2004) Defective respiratory amiloride-sensitive sodium transport predisposes to pulmonary oedema and delays its resolution in mice. J Physiol (Lond) 560: 857–865. doi:10.1113/jphysiol.2004.066704.

28. Grubb BR, Gabriel SE, Mengos A, Gentzsch M, Randell SH, et al. (2006) SERCA pump inhibitors do not correct biosynthetic arrest of deltaF508 CFTR in cystic fibrosis. Am J Respir Cell Mol Biol 34: 355–363. doi:10.1165/rcmb.2005-0286OC.

29. Middleton PG, House HH (2010) Measurement of airway ion transport assists the diagnosis of cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol 45: 789–795. doi:10.1002/ppul.21253.

30. Sorensen JB (2002) The use and misuse of the coefficient of variation in organizational demography research. Sociological Methods & Research 30: 475–491. doi:10.1177/0049124102030004001.

31. Taylor SL, Payton ME, Raun WR (n.d.) Relationship between mean yield, coefficient of variation, mean square error, and plot size in wheat field experiments. Communications in Soil Science and Plant Analysis 30: 1439–1447.

FIGURES

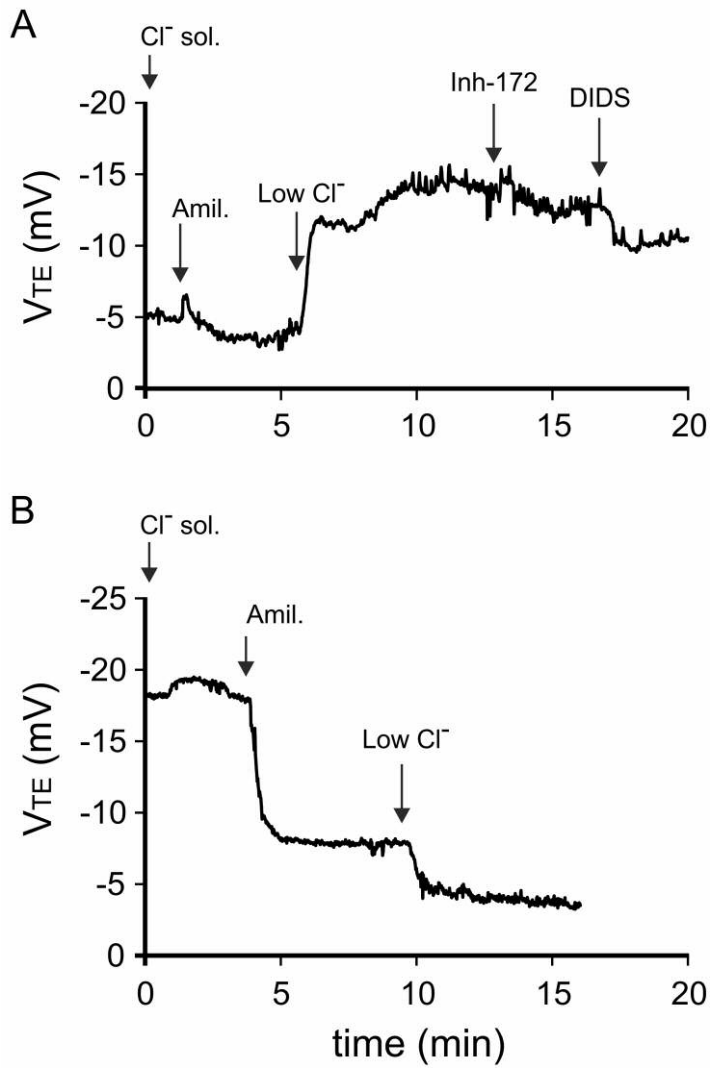


Figure 1: Representative V_{TE} recordings.

The recordings obtained with the final protocol are shown for WT (A) and *cftr*$^{-/-}$ B6;129 mice (B). Three phases was observed: baseline V_{TE} after Cl^- solution perfusion, $V_{TEAmil.}$ after the addition of amiloride (Amil.) and $V_{TELowCl^-}$ after the replacement of Cl^- solution with a solution of low Cl^- concentration (LowCl$^-$). The inhibitory effect on Cl^- secretion of inhibitor-172 and inhibitor-172 plus DIDS was demonstrated in WT mice.

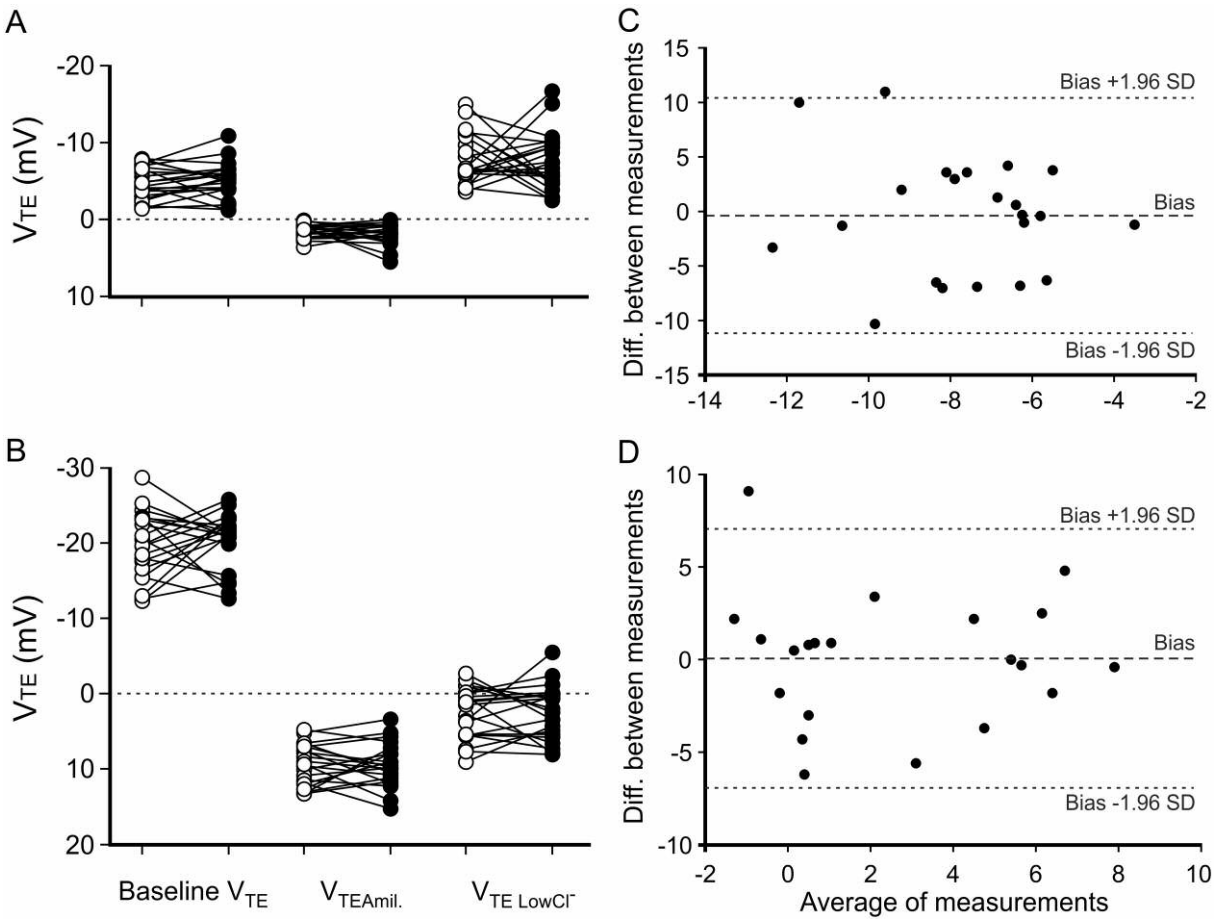


Figure 2: Reproducibility between two measurements in B6;129 mice. The first measurement (○) was obtained at least 7 days before the second measurement, (●) on 22 WT (A) and 21 *cftr*$^{-/-}$ mice (B). The difference between the two $\Delta V_{TELowCl^-}$ values was plotted against their mean, as described by Bland and Altman, for the 22 WT (C) and 21 *cftr*$^{-/-}$ (D) mice.

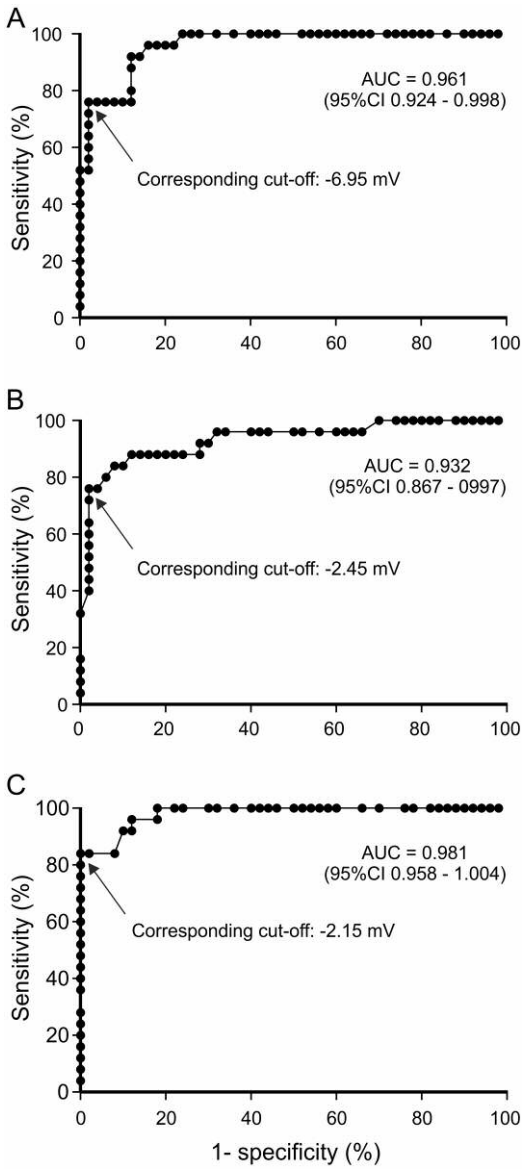


Figure 3: Cutoff point determination for NPD parameters distinguishing between FVB WT and F508del mice.

Receiver operating characteristics (ROC) curves for (A) baseline potential difference (V_{TE}), (B) amiloride response ($\Delta V_{TEAmil.}$) and (C) low Cl^- solution response ($\Delta V_{TELowCl^-}$), for WT and F508-del FVB mice are shown.

AUC: area under the curve

95% CI: 95% confidence interval

Cutoff points were determined by the best positive likelihood ratio of sensitivity/(1-specificity).

Table 1: Typical values for B6;129 and FVB V_{TE} mice. Values are given as the medians ± interquartile range (IQR) for WT and *cftr*$^{-/-}$ B6;129 mice and WT and F508-del FVB mice. Inhibitory effects were assessed for Inh-172 and for DIDS, by Wilcoxon paired signed-rank tests comparing $V_{TELowCl^-}$ and $V_{TEInh\text{-}172}$ for Inh-172 and $V_{TEInh\text{-}172}$ and V_{TEDIDS} for DIDS.

Mann-Whitney tests were used to compare groups.

	Typical values				**Comparison (*p*-value)**			
	B6;129		FVB		B6;129 (WT / cftr-/-)	FVB (WT / F508-del)	WT (B6;129 / FVB)	CF (cftr-/- / F508-del)
	WT	cftr$^{-/-}$	WT	F508del				
Baseline VTE (mV) Median (IQR)	-4.9 (3.5) *n* = 50	-20.9 (6.5) *n* = 50	-4.2 (5.2) *n* = 25	-13.3 (5.4) *n* = 50	<0.0001	<0.0001	ns	<0.0001
ΔVTE Amil (mV) Median (IQR)	1.6 (1.3) *n* = 50	9,1 (4.2) *n* = 50	1.5 (1.7) *n* = 25	7.1 (4.2) *n* = 50	<0.0001	<0.0001	ns	0.002
ΔVTE Low Cl- (mV) Median (IQR)	-7.8 (3.8) *n* = 50	3.0 (4.1) *n* = 50	-4.7 (5.3) *n* = 25	0.8 (2.4) *n* = 50	<0.0001	<0.0001	0.003	0.001
ΔVTE Inh-172 (mV) Median (IQR)	1.6 (2.3) *n* = 50	0.9 (1.7) *n* = 50	1.6 (3.1) *n* = 17	0.2 (2.0) *n* = 45	0.02	0.05	ns	ns
ΔVTE DIDS (mV) Median (IQR)	2.0 (1.7) *n* = 38	3.1 (3.1) *n* = 32	2.4 (2.8) *n* = 9	2.9 (3.9) *n* = 6	0.003	ns	ns	ns

Table 2: Parameters of the Bland-Altman plot. Values were determined for baseline potential difference (V_{TE}), amiloride response ($\Delta V_{TEAmil.}$) and low Cl^- solution response ($\Delta V_{TELowCl^-}$), from the Bland and Altman plot, for two measurements on the same 22 WT and 21 *cftr*$^{-/-}$ mice.

	Bias	SD	Limits of agreement (Bias + 1.96 SD/Bias - 1.96 SD)	% outside the limits
WT				
Baseline VTE	0.27	2.12	4.4 / -3.9	4.5
Δ VTE Amil	-0.35	1.57	2.7 / -3.4	4.5
Δ VTE Low Cl-	-0.37	5.51	10.4 / -11.2	4.5
cftr$^{-/-}$				
Baseline VTE	0.51	5.53	11.3 / -10.3	0
Δ VTE Amil	-0.16	3.05	5.8 / -6.1	4.8
Δ VTE Low Cl-	0.06	3.57	7.1 / -6.9	4.8

ARTICLE 3

Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect

Colas J, Faure G, Saussereau E, Trudel S, Rabeh WM, Bitam S, Guerrera IC, Fritsch J, Sermet-Gaudelus I, Davezac N, Brouillard F, Lukacs GL, Herrmann H, Ollero M, Edelman A

Human Molecular Genetics (2012) **21**(3) : 623-34

Résumé de l'article :

Il a précédemment été montré au sein de notre équipe une expression accrue des cytokératines 8/18 (K8/K18) dans des cellules exprimant la mutation F508del-CFTR, ainsi qu'une modification dans la localisation de ces protéines et de la protéine CFTR, relocalisée autour du réticulum endoplasmique (RE) (Davezac *et al.*, 2004). Cette relocalisation est inhibée par un traitement avec du curcumin qui permet l'adressage de la protéine F508del-CFTR à la membrane plasmique (Lipecka *et al.*, 2006).

Le but de ce travail a été de démontrer l'hypothèse qu'il existe une interaction physique entre le réseau de cytokératines K8/K18 et la protéine CFTR, et que cette interaction pourrait modifier la fonction de la protéine CFTR, notamment la protéine F508del-CFTR.
Cette étude se divise en 2 parties, (i) une étude *in vitro* réalisée grâce à des protéines recombinantes et (ii) une étude fonctionnelle dans des modèles cellulaire et murin.

Dans un premier temps, une immunoprécipitation de la protéine CFTR a été réalisée à partir de cellules HeLa exprimant de manière stable la protéine CFTR sauvage ou F508del-CFTR. Cette immunoprécipitation a été révélée sur un gel d'électrophorèse deux dimensions, où les différents spots ont été identifiés par spectrométrie de masse. Cette technique a permis de mettre en évidence une co-précipitation du couple K8/K18 avec la protéine CFTR préférentiellement au sein des cellules porteuses de la mutation F508del. Par résonance plasmodique de surface, nous avons pu démontrer que la K8 était capable d'interagir directement avec le domaine NBD1 de la protéine CFTR (siège de la mutation F508del), et que cette interaction était plus importante avec le domaine NBD1 muté. Cette interaction entre la protéine CFTR et la protéine K8 a pu être confirmée par la technique de « DNA Proximity Ligation Asssay » dans le modèle cellulaire HeLa précédemment cité. En utilisant des molécules de siRNA dirigées contre la K8, nous avons montré que l'interaction avec la protéine F508del-CFTR diminuait.

Dans un deuxième temps, des études fonctionnelles ont permis de montrer que la diminution de l'expression de la K8 par des siRNA permettait la restauration de la fonction canal chlorure de la protéine F508del-CFTR. Cela a été montré *in vitro* dans des cellules HeLa, grâce à la mesure d'efflux d'iode puis *in vivo*, chez la souris F508del-CFTR par la mesure de la différence de potentiel nasale. En effet, lorsqu'elles sont traitées par des siRNA dirigés contre la cytokératine 8, la moitié des souris présentent une sécrétion du chlorure

normale, *i.e.* l'hyperpolarisation induite par un gradient chlorure a une amplitude franchissant le seuil indicateur d'une sécrétion normale de -2.15 mV.

Ces résultats montrent que l'interruption de l'interaction de la protéine F508del-CFTR avec la K8 mène à la correction du défaut de la protéine F508del-CFTR aussi bien dans un modèle cellulaire que murin. Cela suggère que la cytokératine 8 est une nouvelle cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la mucoviscidose, chez les patients porteurs de la mutation F580del-CFTR.

Human Molecular Genetics, 2012, Vol. 21, No. 3 **623–634**
doi:10.1093/hmg/ddr496
Advance Access published on October 28, 2011

Disruption of cytokeratin-8 interaction with F508del-CFTR corrects its functional defect

Julien Colas[1,†], Grazyna Faure[2,†], Emilie Saussereau[1], Stéphanie Trudel[1], Wael M. Rabeh[3], Sara Bitam[1], Ida Chiara Guerrera[1], Janine Fritsch[1], Isabelle Sermet-Gaudelus[1], Noëlie Davezac[1,‡], Franck Brouillard[1], Gergely L. Lukacs[3], Harald Herrmann[4], Mario Ollero[1,*,¶,§] and Aleksander Edelman[1,§]

[1]Faculté de Médecine Paris-Descartes, INSERM, U845, Paris, France, [2]Groupe Récepteurs-Canaux, Institut Pasteur, CNRS, URA 2182, F-75015 Paris, France, [3]Department of Physiology, McGill University, Montreal H3G 1Y6, Canada and [4]Department of Molecular Genetics, German Cancer Research Center, D-69120 Heidelberg, Germany

Received July 8, 2011; Revised and Accepted October 24, 2011

We have previously reported an increased expression of cytokeratins 8/18 (K8/K18) in cells expressing the F508del mutation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). This is associated with increased colocalization of CFTR and K18 in the vicinity of the endoplasmic reticulum, although this is reversed by treating cells with curcumin, resulting in the rescue of F508del-CFTR. In the present work, we hypothesized that (i) the K8/K18 network may interact physically with CFTR, and that (ii) this interaction may modify CFTR function. CFTR was immunoprecipitated from HeLa cells transfected with either wild-type (WT) CFTR or F508del-CFTR. Precipitates were subjected to 2D-gel electrophoresis and differential spots identified by mass spectrometry. K8 and K18 were found significantly increased in F508del-CFTR precipitates. Using surface plasmon resonance, we demonstrate that K8, but not K18, binds directly and preferentially to the F508del over the WT human NBD1 (nucleotide-binding domain-1). *In vivo* K8 interaction with F508del-CFTR was confirmed by proximity ligation assay in HeLa cells and in primary cultures of human respiratory epithelial cells. Ablation of K8 expression by siRNA in F508del-expressing HeLa cells led to the recovery of CFTR-dependent iodide efflux. Moreover, F508del-expressing mice topically treated with K8-siRNA showed restored nasal potential difference, equivalent to that of WT mice. These results show that disruption of F508del-CFTR and K8 interaction leads to the correction of the F508del-CFTR processing defect, suggesting a novel potential therapeutic target in CF.

INTRODUCTION

Cystic fibrosis (CF) is attributed to mutations in the gene coding for the chloride channel CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) (1,2). This protein is composed of two transmembrane domains, two nucleotide-binding domains and one regulatory domain (3). Deletion of phenylalanine 508 (F508del) in the nucleotide-binding domain-1 (NBD1) is present in >70% of mutated alleles (Cystic Fibrosis Mutation Database, http://www.genet.sickkids.on.ca/app). F508del produces a partially folded, core-glycosylated immature form that is largely retained and degraded in the endoplasmic reticulum (ER) (4), but partially functional when it reaches the plasma membrane (5). This has prompted an intense search for small molecular correctors or protein substitution therapy (6–15). We have reported increased expression of cytokeratins 8/18 (K8/K18), which belong, respectively, to groups II and I of intermediate filaments (IF) (16) and are representative of one-layered

*To whom correspondence should be addressed at: INSERM U955, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, 51, avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny, 94010, Créteil, France. Tel: +33 149813667; Fax: +33 148982539; Email: mario.ollero@inserm.fr
†Contributed equally to the work. The authors wish they are regarded as joint First Authors.
‡Present address: UMR 5547 CNRS, Université Toulouse III, Toulouse, France.
¶Present address: INSERM, U955, équipe 21, Institut Mondor de Recherche Biomédicale, Université Paris Est – Créteil, 94010, Créteil, France.
§These two authors share senior authorship.

© The Author 2011. Published by Oxford University Press. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

epithelia (17), in HeLa cells expressing the F508del mutation (18). CFTR and K18 colocalization in the vicinity of the ER is reversed by curcumin, resulting in the rescue of F508del-CFTR (19). Likewise, the K18 network is altered by resveratrol, another molecule that rescues F508del-CFTR (20).

Two recent studies have revealed conformational changes within mutated NBD1. The first one shows experimentally that NBD1 destabilization occurs as a consequence of three solubilizing mutations, namely V510D, F494N and Q637R (21). The second study on NBD1 structure has revealed an increased conformational flexibility due to F508del (22). This may result in the exposure of buried hydrophobic region(s) that become(s) available for interaction with other molecules. We hypothesize that some of these interactions may contribute to F508del-CFTR retention and degradation and comprise the K8/K18 network. In accordance with these results, a very recent report shows that the mild *KRT8* allele (K8) is associated with CFTR-mediated residual chloride secretion in F508del-CFTR homozygote patients, suggesting *KRT8* as a modifier gene for CF severity CFTR mediated residual chloride secretion (23).

Based on these observations suggesting a determinant role for cytokeratin network in mutant CFTR misprocessing, we hypothesized that K8 and/or K18 interact physically with CFTR. The aim of the present work was to confirm this interaction and to study its biochemical basis and consequences on F508del-CFTR localization and function. Our results show that K8 preferentially binds to F508del-NBD1 over its wild-type (WT) counterpart, and that preventing this interaction *in vivo* leads to the functional plasma membrane expression of F508del-CFTR, both in cell lines and in F508del mice.

RESULTS

K8 and K18 form a complex with CFTR in F508del-expressing cells

To evaluate the impact of F508del on CFTR interactome, we performed 2D-gel electrophoresis of CFTR immunoprecipitates in HeLa cells stably transfected with either WT-CFTR or F508del-CFTR. Representative gels are shown in Figure 1A. Most of the proteins differentially expressed (shown in detail in Supplementary Material, Table S1) were identified as cytoskeletal, including K8, K18, β-actin and vimentin. Colocalization of K8 and CFTR was confirmed by immunofluorescence at the cytosol in WT-CFTR cells, and perinuclearly in F508del-CFTR cells (Fig. 1B). There was no apparent colocalization of CFTR, confined to the base of cilia, in nasal cells from healthy individuals (Fig. 1C, upper panel). In contrast, significant colocalization was detectable in the perinuclear area in nasal cells obtained from CF patients (Fig. 1C, lower panel).

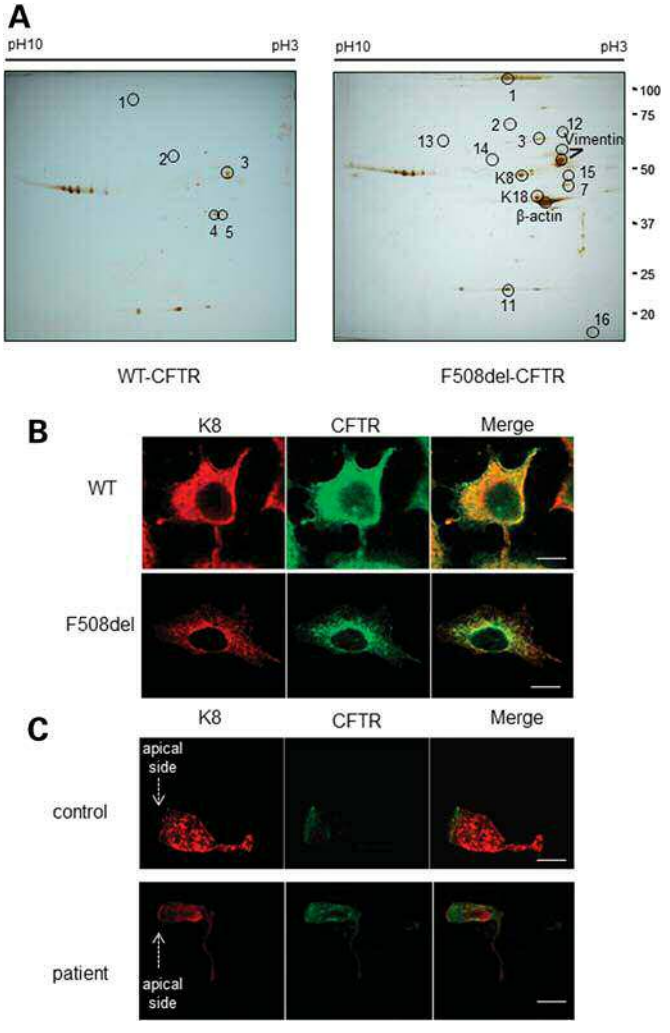


Figure 1. The K8/K18 network interacts with CFTR preferentially in F508del-expressing cells. (**A**) K8/K18 coprecipitates with CFTR preferentially in F508del-expressing HeLa cells. Cell extracts were subjected to immunoprecipitation by the 24.1 monoclonal anti-CFTR antibody. Precipitates were analyzed by 2D-electrophoresis and differentially displayed spots identified by MALDI-TOF. Protein spots designed by numbers are defined in Supplementary Material, Table S1. The gels shown are representative of three independent experiments. (**B**) Colocalization of K8 and CFTR in HeLa cells. HeLa cells stably transfected with either WT-CFTR or F508del-CFTR were subjected to CFTR and K8 immunodetection and analyzed by confocal microscopy (scale bar = 10 μm). Representative of three independent experiments. (**C**) Immunodetection of CFTR and K8 localization in cells obtained from nasal scrapings from a healthy control and from a CF patient homozygous for the F508del mutation (scale bar = 10 μm). Representative of three independent experiments.

K8, but not K18, interacts physically with NBD1

To assess K8/K18 direct binding to CFTR *in vitro*, we used surface plasmon resonance (SPR). Recombinant human NBD1, either WT or bearing the F508del mutation, was covalently bound to a sensor chip and the binding pattern of K8 and K18 was tested at 20/25°C (Fig. 2A). K8 (Fig. 2A, upper panels) increased the resonance signal in both WT- and F508del-NBD1, indicating a direct interaction, unlike K18 (Fig. 2A, bottom panels)—results confirmed in mouse NBD1 (Supplementary Material, Fig. S1). Nevertheless, K8 binding was significantly stronger on F508del-NBD1, as shown by the kinetic parameters and apparent dissociation constants (Supplementary Material, Table S2). These results suggest that K8-NBD1 binding is responsible for the interaction between CFTR and IF, and that this interaction is stronger when NBD1 is mutated. Since temperature influences the

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

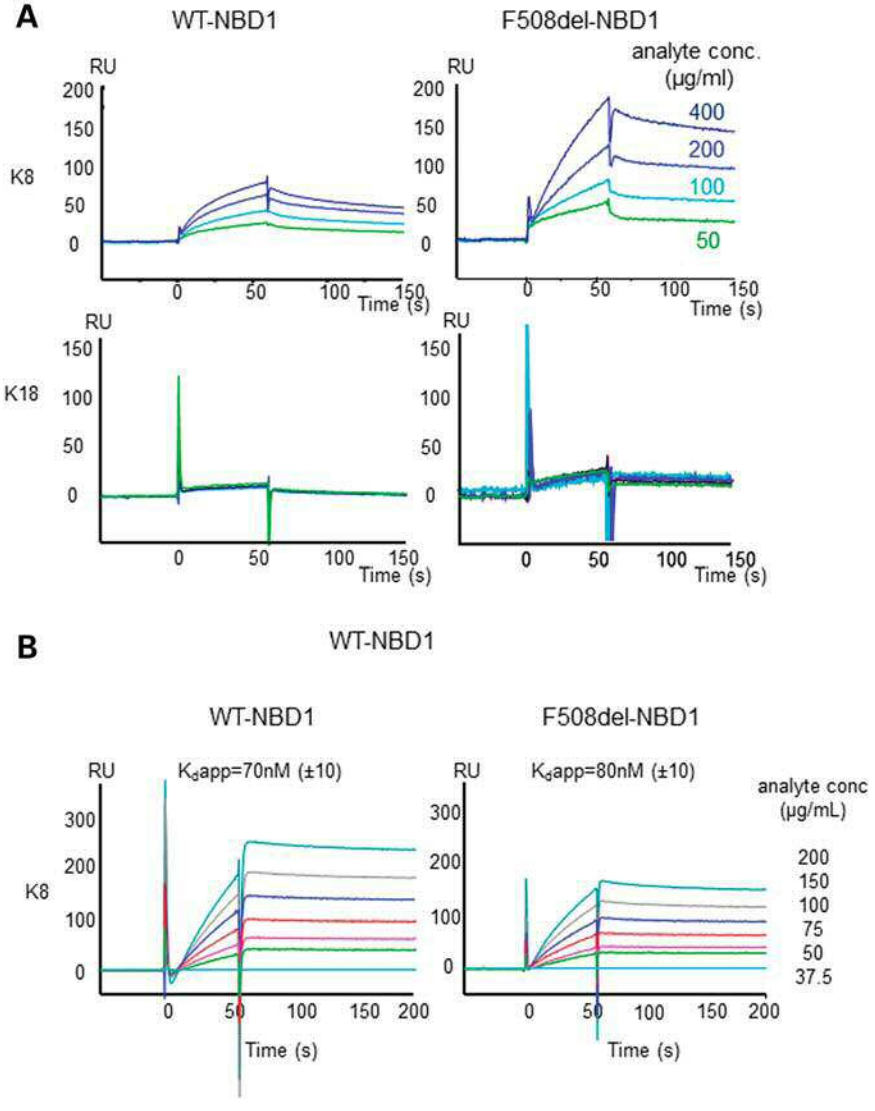


Figure 2. K8 interacts physically with NBD1. (**A**) SPR analysis of K8 and K18 binding to human NBD1 (WT or F508del-NBD1). K8, but not K18, interacts directly with NBD1, and more strongly in the presence of the F508del mutation. Experiments were performed at 20 or 25°C. Different analyte (K8 or K18) concentrations are shown. The kinetic constants were calculated using the solution affinity model from the Biacore BIAEVALUATION 3.1 software. Representative of three independent experiments. (**B**) SPR analysis of K8 binding to human NBD1, bearing or not the F508del mutation, at 7°C. K8 interacts directly with both NBD1 with the similar affinity. K_D^{app} values are shown in both cases. Different analyte (K8) concentrations are shown. Representative of three independent experiments.

conformational stability of NBD1 (5), the experiment was repeated at 7°C, at which F508del-NBD1 should present normal folding. No differences in binding affinity were found between human WT- and F508del-NBD1 at 7°C (Fig. 2B), strongly suggesting that temperature-sensitive destabilization is responsible for the higher affinity of K8 for mutated NBD1.

To search for K8–CFTR interaction *in vivo*, we used the proximity ligation assay (PLA) in transfected HeLa cells. A <40 nm proximity between both proteins was found in F508del-CFTR, but not in WT-CFTR-expressing cells (Fig. 3A), strongly suggesting that detectable physical interaction only prevails for F508del mutation. To confirm that the interaction takes place at endogenous expression levels of mutated CFTR, we performed PLA on primary human respiratory epithelia from either healthy individuals or F508del-homozygous patients (MucilAir™). Molecular proximity of K8 and CFTR was detectable in patients cells only (Fig. 3B).

K8 silencing restores F508del-CFTR function in HeLa cells and in the nasal epithelia of F508del mice

We hypothesized that inhibiting the K8–CFTR interaction by K8 silencing may restore F508del-CFTR plasma membrane localization and function. We tested the effect of K8-siRNA on PLA outcome in transfected HeLa cells using a combination of four siRNA sequences, one of which (Seq. 3)

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

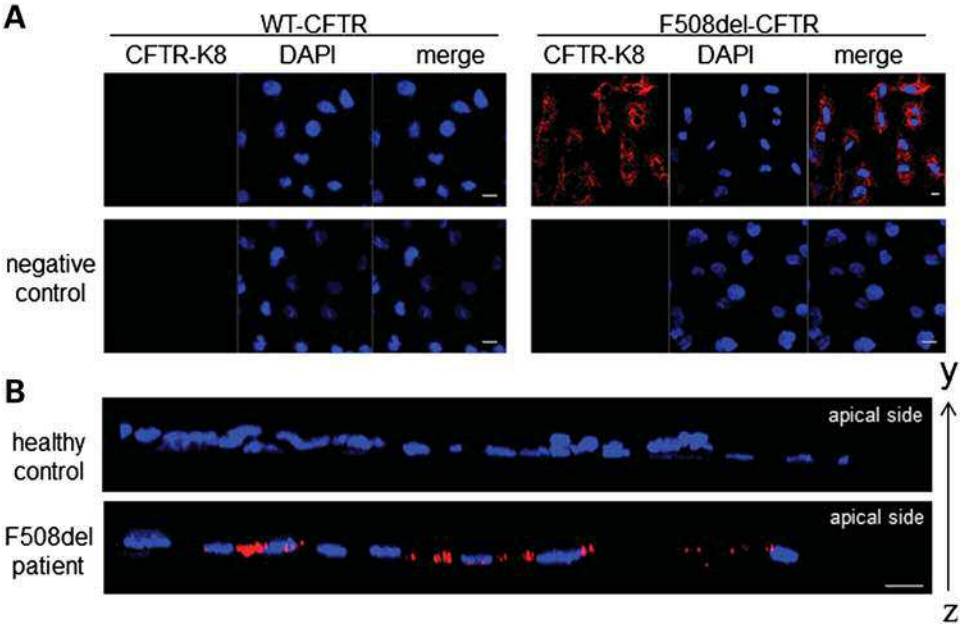


Figure 3. Differential interaction between K8 and CFTR in cells. (**A**) PLA of K8 and CFTR in HeLa cells transfected with either WT- or F508del-CFTR. The absence of primary antibody was used as a negative control (scale bar = 10 μm). Results are representative of at least six independent experiments. (**B**) PLA of K8 and CFTR in human primary respiratory epithelial cells (MucilAir^{TM}) from one healthy control and one F508del/F508del patient. A confocal image of a transversal section of the epithelium (*y*-, *z*-axes) is shown (scale bar = 10 μm). Resuts are representative of at least three independent experiments.

decreased K8 considerably and increased the expression of both B and C bands of CFTR (Fig. 4A and B). K8-siRNA (Seq. 3) treatment abolished the K8–CFTR PLA signal in F508del-expressing cells (Fig. 4B).

To evaluate the functional impact of CFTR–K8 interaction, we measured cAMP-dependent iodide efflux, as an index of CFTR-mediated plasma membrane halide transport activity (24), before and after K8-siRNA treatment in WT- and F508del-CFTR-expressing HeLa cells (Fig. 5A and B). CFTR-dependent iodide efflux was consistently increased in K8-siRNA-treated F508del-CFTR cells (Fig. 5B), while marginal elevation was detectable in WT-CFTR cells. The percent variation between $t = -1$ and $t = 0$ (where $t = -1$ indicates addition of CFTR-activating cocktail) in K8-siRNA-treated versus control F508del cells in three independent experiments was 40.9 versus 11.4, 16.4 versus 0.3 and 63.3 versus 9.7 (13.5, −12.5 and 3.7 for scramble siRNA, respectively). We have previously shown the potential therapeutic effect of siRNA targeting of K18, which activated a cAMP-dependent anion conductance consistent with CFTR activity in HeLa cells expressing F508del-CFTR (18). This seminal result pointed at the cytokeratin network as a potential therapeutic target in CF.

Our results in cells suggested that K8 ablation may correct the F508del-CFTR functional defect in the respiratory epithelium of mice. Consequently, nasal potential difference (NPD) (ΔV_{TE}) was monitored following 4 and 11 days after intranasal delivery of either lipofectamin-complexed scrambled or K8-specific siRNA. Representative experiments are shown in Figure 6 and the data presented in Supplementary Material, Table S3. As expected, basal V_{TE} values, as well as the changes induced by both the Na^+-blocker amiloride and a low Cl^--containing solution, were within the range observed previously (25). A typical recording of ΔV_{TE} in WT-CFTR is shown in Supplementary Material, Figure S2. The CFTR-related ΔV_{TE} was unmasked by the effect of CFTR inhibitor, I_{Inh172}. The fact that both B and C bands of F508del-CFTR are increased after K8-siRNA treatment (Fig. 4A) suggests the presence of the mutated channel at the plasma membrane.

In F508del mice, at day 0, basal V_{TE} values were more negative than in WT mice as previously reported (25). Consequently, ΔV_{TEamil} was larger, indicating the increase in Na^+ conductance, whereas $\Delta V_{TElowCl}$ was abolished. Comparison of results from WT (Supplementary Material, Fig. S2) and F508del mice suggests a significant contribution of CFTR to V_{TE} in WT. Changes in ΔV_{TE} before K8-siRNA treatment are shown in Figure 6A. Scramble-siRNA induced no changes either in ΔV_{TEamil} or in $\Delta V_{TElowCl}$ (Fig. 6B and E, left). Three days after K8-siRNA application to F508del mice, ΔV_{TEamil} slightly diminished, and $\Delta V_{TElowCl}$ was significantly increased by the treatment, above a cut-off value of −2.15 mV that we have established (manuscript in preparation). This cut-off value corresponds to a $\Delta V_{TElowCl}$ threshold beyond which the nasal epithelium of ΔF508 displays a WT-like Cl^- conductance. In the experiments described here, $\Delta V_{TElowCl}$ reached roughly three-fourths (78%) of WT mice values, as shown in Figure 6C, in three out of six mice (Fig. 6E, right panel). $\Delta V_{TElowCl}$ was partially inhibited by CFTR inhibitor, I_{Inh172} (Fig. 6C), supporting the conclusion that K8-siRNA treatment restored CFTR-dependent conductance. Measurement of ΔV_{TE} 6 days after K8-siRNA showed a return of V_{TE} to the original values, demonstrating a transient effect of the treatment (Fig. 6D).

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

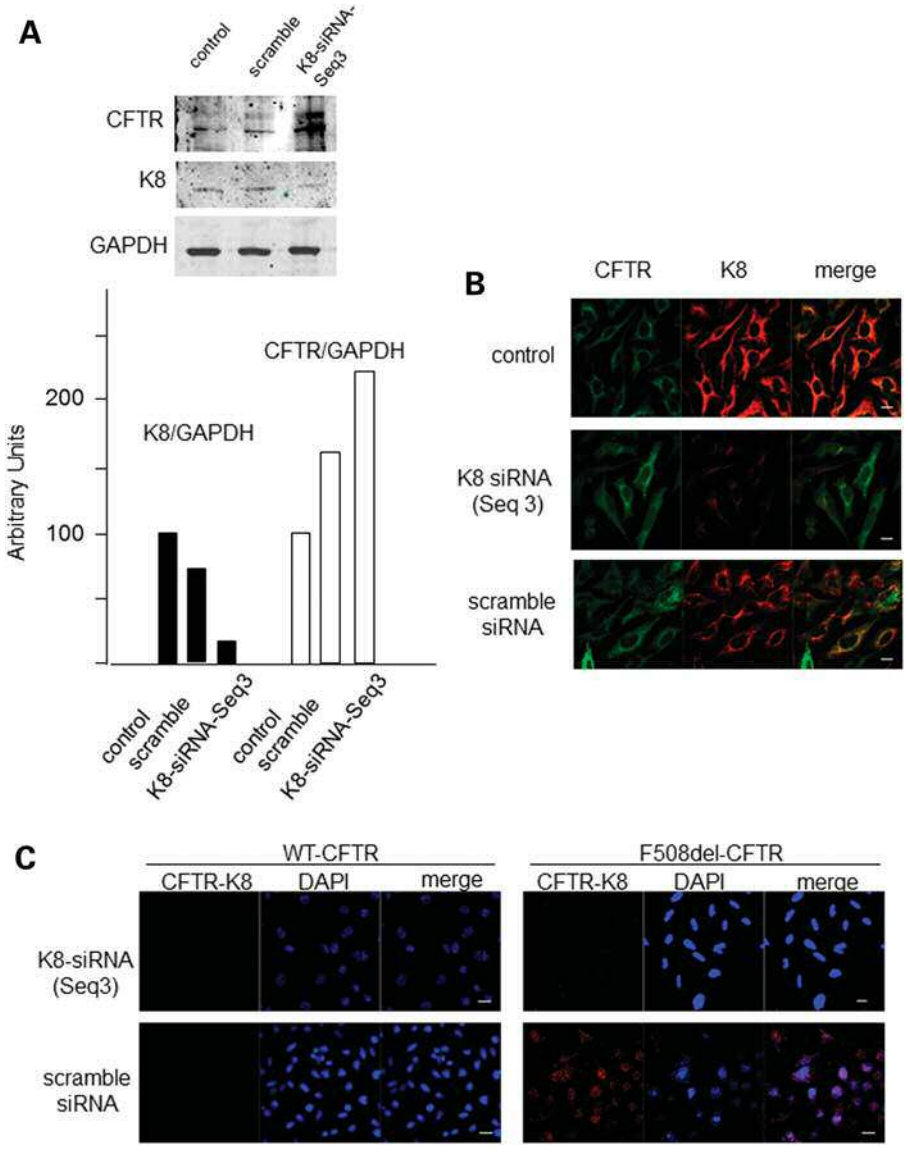


Figure 4. K8 silencing disrupts interaction with F508del-CFTR and increases F508del-CFTR expression. (**A**) Effect of siRNA treatment on K8 and CFTR protein expression in HeLa cells transfected with F508del-CFTR. Western blot on protein extracts from non-treated cells (ctrl) or treated with scramble siRNA, or with Seq. 3 of K8-siRNA). The membrane was hybridized using a monoclonal anti-K8 antibody and a polyclonal anti-CFTR antibody. A polyclonal anti-GAPDH antibody was used as a loading control. Note that CFTR expression was increased by siRNA-K8 treatment (see two bands in the top panel corresponding to B, lower, and C, upper, of CFTR). The lower panel shows the semi-quantification by densitometric analysis (representative of three independent experiments). (**B**) Immunofluorescence images of CFTR (green) and K8 (red) in HeLa cells expressing F508del-CFTR in control conditions and after treatment with either Seq. 3 K8-siRNA or with scramble siRNA. (**C**) PLA of K8 and CFTR in HeLa cells transfected with either WT- or F508del-CFTR after K8-siRNA treatment and after treatment with control scramble siRNA (scale bar = 10 μm).

DISCUSSION

The present study delineates a previously unrecognized mechanism that contributes to the F508del-CFTR intracellular retention and strongly suggests that interaction between K8 and F508del-CFTR plays an important role in the ER retention of mutant CFTR. Compelling evidence supports our model. First, we demonstrate the interaction of K8 with CFTR, using immunoprecipitation and proteomics. Second, the direct interaction of purified K8 and NBD1 is reconstituted *in vitro* using SPR. Third, the *in vitro* interaction is stronger in the presence of F508del mutation and observable in F508del- but not in WT-CFTR-expressing cells by PLA. Fourth, inhibition of K8–CFTR interaction restores the F508del-CFTR Cl^- channel function at the cell surface both in cultured cells and in the nasal respiratory epithelia of the F508del-CF mouse. Altogether, these four findings suggest that the network of IF plays a major role in the trafficking of CFTR between the different intracellular compartments.

Most of the effort in studying the functional link between cytoskeleton and CFTR has been focused so far on those proteins that participate in the actin network. Multiple immunoglobulin domains of filamin-A have been proven to interact with the N-terminus of CFTR (26,27), and suggested to play

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

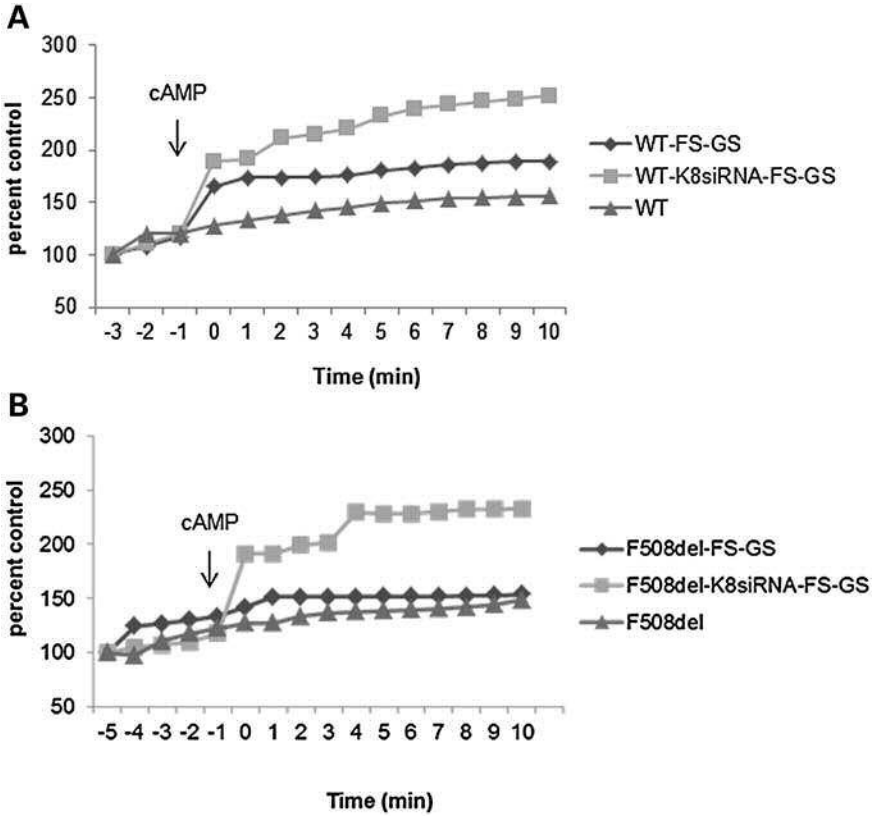


Figure 5. K8-siRNA increases iodide efflux in cells. Iodide efflux measurements in control conditions and after siRNA-K8 treatment in HeLa cells transfected with either WT-CFTR (**A**) or F508del-CFTR (**B**). FS-GS indicates the treatment of cells with CFTR activators 10 μM forskolin plus 50 μM genistein. The results are representative of at least three independent experiments.

a role in the trafficking and membrane stability of the channel (28). Myosin VI, which plays a crucial role in CFTR endocytosis (29,30), establishes its interaction via the adaptor protein alpha-AP-2 (31). Likewise, a complex including the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) RhoA, Rho kinase, ezrin and actin would stabilize F508del-CFTR at the plasma membrane (15). Moreover, we have found ezrin expression increased in nasal epithelial cells (Jeanson *et al*., manuscript under evaluation), and therefore available for this role. It is thus tempting to hypothesize that a dynamic cross-talk between the two cytoskeletal networks—actin and IF—and their respective interactions with CFTR could play a key role in determining CFTR membrane localization and functionality.

When addressing the presence of CFTR at the membrane, one crucial aspect is degradation and quality control. This ubiquitin-dependent mechanism involves chaperones, co-chaperones and ubiquitin ligases (32). Since cytokeratin degradation is mediated by a ubiquitin-proteasome machinery (33), it would be interesting to establish whether CFTR–K8 interaction plays a role in CFTR targeting towards the proteasome degradation mechanism.

One main issue in CF pathophysiology is the response of cells to inflammation. The CFTR network shown in Supplementary Material, Figure S3 and Table S4 gives a condensed view of the complexity underlying the links between inflammation, protein trafficking and ion transport processes. Only physical interactions are represented, which limits the number of proteins in the network, compared with a pioneering study on CFTR interactome (34). Our analysis shows that under normal conditions, CFTR is a node linking the eicosanoid inflammatory pathway to trafficking and ion transport (e.g. SLC26A3, PDZ-proteins, SNPA23, etc., Supplementary Material, Fig. S3A) through direct interaction with S100A10. In the case of F508del-CFTR (Supplementary Material, Fig. S3B), when most of the CFTR is in the ER and other intracellular vesicles, and assuming that all the interactions presented in Supplementary Material, Figure 3SA still occur, it can be speculated that K8–F508del-CFTR interaction may determine a preponderance of 'inflammatory connections' over 'trafficking connections'. Intriguingly, one of the reported direct interactions of K8/K18 is that with TNFR1. We have recently reported that TNFR1 is recruited in detergent-resistant microdomains (DRM) upon TNF-α stimulation in MDCK cells along with CFTR (35). This suggests that TNFR1 and CFTR would be present in the same macromolecular complex under certain conditions, along with other proteins that regulate the release of inflammatory mediators, such as ANXA1 and cPLA2 (36). We have recently shown a decreased expression of ANXA1 in cftr-knockout mice and in cells from CF patients (37), and an indirect interaction of this protein with NBD1 via the adaptor S100A10 (36). Interestingly, TNFR1 recruitment does not occur when CFTR lacks the TRL extremity, which contains the PDZ

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

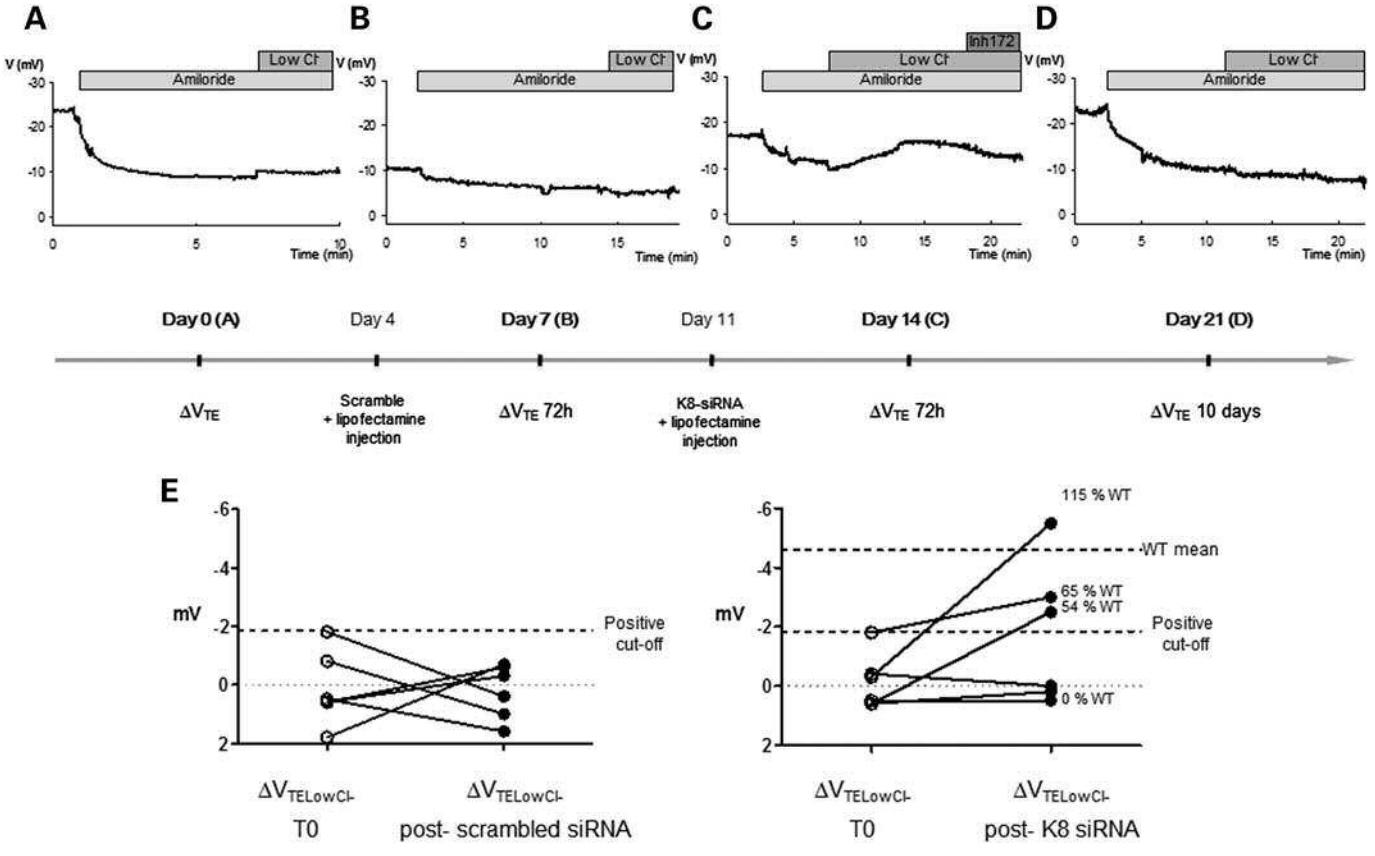


Figure 6. K8-siRNA restores NPD in mice expressing F508del-CFTR. NPD measurements in F508del-CFTR homozygous mice: (**A**) before application of siRNA, (**B**) treated with 30 μl of 20 nM scramble-siRNA, (**C**) 3 days after application of 30 μl of 20 nM K8-siRNA to nasal epithelium and (**D**) 7 days after application of K8-siRNA to nasal epithelium. Addition of Na^+-blocker amiloride depolarized V_{TE}, unmasking Na^+ conductance. Subsequent perfusion with a low-Cl^--containing solution hyperpolarized V_{TE}, showing participation of Cl^- conductances in V_{TE}. Subsequent addition of CFTR inhibitor I_{Inh172} decreased hyperpolarization by ~30%, suggesting that, in addition to CFTR, other Cl^- conductances participate in overall transepithelial Cl^- fluxes. (**E**) NPD values before and after scramble siRNA (left panel) and K8-siRNA (right panel) treatment in six mice.

domain (35). Nevertheless, we have found K8 increased in DRM preparations from CFBE cells expressing F508del-CFTR when compared with DRM from cells expressing WT-CFTR (unpublished data). The latter raises the point of K8 playing a stabilizing role within the complex, and a potential role of this interaction in the regulation of the inflammatory signaling pathway initiated by TNF-α. Another link between K8 and inflammation in CF is brought about autophagy. In fact, upregulation of phosphorylated K8 is one of the markers of defective autophagy (38), and defective autophagy has been recently reported to drive lung inflammation in CF (39).

Supplementary Material, Figure S3C represents the protein network in the absence of CFTR. This network may reflect a situation at the plasma membrane for cells expressing F508del/F508del and/or stop mutations, and suggests the hypothesis that CFTR is a hub protein linking inflammation and ion transport pathways. In the absence of CFTR, the two networks are not connected (compare Supplementary Material, Fig. S3A, B and C). Moreover, other nodes (STX1-SNPA23, PRKAA, ANXA5-ACTG1, DNAJA1, DNAJB1) are completely isolated in the absence of CFTR. This analysis represents, to our knowledge, the first clear-cut hypothesis linking inflammation, ion transport and trafficking in CF.

The importance of the K8/K18 network in the regulation of CFTR is strengthened in the context of the cell response to oxidative stress, which constitutes one of the major defects associated with CF (39,40). It has been recently reported that hypoxia induces the degradation and redistribution of cytokeratin intermediary filaments, which may be prevented by the superoxide dismutase/catalase mimetic EUK-134 (41). Because of the significance of oxidative stress responses in CF, it is tempting to hypothesize that ROS production in CF cells may be linked to the reorganization of K8 network, that modulation of ROS production may be helpful in the disruption of the unwanted interaction between F508del-CFTR and K8, and, *in fine*, in the correction of the functional defect of F508del-CFTR.

Silencing of genes has been attempted as a therapeutic strategy to ameliorate glomerulopathies (42,43) and skin disorders (44–46), to inhibit hepatitis virus infection (47,48) and Ebola virus infection (49), and suggested as an alternative strategy to treat cancer (50,51) and sepsis (52). Silencing of K8-mRNA has been tested experimentally. In a nasopharyngeal carcinoma cell line, a role of K8 in the resistance to the proapoptotic

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

effect of cisplatin has been revealed (53). Likewise, K8 knockdown has been shown to attenuate resistance to cadmium in rat lung epithelial cells (54). In the cancer cell line MCF-7, siRNA of K8 leads to decreased migration and cell adhesion, and a reversal of their multidrug-resistant phenotype (55–57). However, to our knowledge, the current study represents the first attempt to modify K8 expression outside the cancer field. We have shown in a previous report the potential therapeutic effect of siRNA targeting of K18 in cells expressing a mutated form of CFTR (18). In that study, also performed on transfected HeLa cells, siRNA treatment against K18 revealed a cAMP-dependent anion conductance, consistent with CFTR activity, in F508del-expressing cells. This seminal result prompted the suggestion that the cytokeratin network could represent a potential therapeutic target in CF, which is the original hypothesis of the present work. We have also demonstrated that K8-siRNA leads to the recovery of CFTR function when the protein is mutated, and also points at the K8/K18 network as a target. The fact that silencing of either of the two cytokeratins leads to functional correction of the CFTR defect prompts the question of the role of K8/K18 interaction dynamics as a crucial subject in future research. Further research will be necessary to define the nature and sites of interaction between K8 and CFTR, and its functional implications in those manifestations of CF not directly linked to CFTR channel dysfunction, such as inflammation and oxidative stress.

In summary, our results provide new insights into the nature of the interaction of CFTR with the cytokeratin network. More importantly, our study suggests a potential therapy in CF consisting of the use of an siRNA-based approach targeting the interaction between K8 and F508del-CFTR. This is inferred from data showing a restoration of iodide efflux due to CFTR activity in transfected HeLa cells expressing the mutated form, and most notably, a restoration of ΔV_{TE} changes due to the activation of Cl^- conductances in the nasal epithelium of mice expressing homozygously the F508del mutation. Nevertheless, as delivery of siRNA to the lungs represents a considerable challenge, further research will address pharmacological targeting of K8–CFTR interaction as well as the exploration of delivery vectors.

MATERIALS AND METHODS

Protein purification

Purification of human NBD1 was performed as follows. A 70 ml of inoculum of BL21-DE3 cells containing the SMT-3 fusion in the pET 28 expression system was grown overnight in LB medium at 37°C with kanamycin (50 μg/ml working concentration) present. Cells were induced with 0.179 g of IPTG, cooled to 15°C overnight, then harvested and pelleted at 4000 r.p.m. at 4°C for 30 min. Each pellet was resuspended in 15 ml of lysis buffer (50 mM Tris, 100 mM L-arginine, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ hexahydrate, 12.5% glycerol, 0.25 IGEPAL CA630, 2 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM ATP, pH 7.6). Suspensions were combined into 50 ml conical vials and lysed by sonication after adding lysozyme and incubating on ice for 30 min. The lysate was centrifuged at 40 000*g* for 45 min to separate the soluble and insoluble fractions, and loaded into a pre-equilibrated 5 ml bed of Ni Sepharose 6 Fast Flow resin (GE Amersham). The column was equilibrated with five column volumes (CV) of loading buffer. During this step, the elution tubes were prepared with 2 mM ATP and 2 mM 2-mercapto ethanol. The sample was loaded and bound to the column, and washed with 5 CV of washing buffer (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 60 mM imidazole, 12.5% glycerol, pH 7.6). The sample was eluted in 5 CV of elution buffer (20 mM Tris, 250 mM NaCl, 400 mM imidazole, 12.5% glycerol, pH 7.6). Samples were taken for SDS–PAGE analysis, and pooled together for concentration in a Beckman Coulter Allegra 6R centrifuge with a swinging bucket rotor, using the Amicon Ultra 15 30,000 MWCO centrifugal filters (Millipore). The protein was concentrated using 10 min spins at 4000 r.p.m. at 4°C. The SMT-3 fusion was cleaved off of NBD1 by using a 1:1000 dilution of ubiquitin-like protease on ice for 1 h. The protein was filtered using a Nalgene 0.22 μm syringe filter and injected onto a Hi Load 16/60 Superdex S200 prep grade gel filtration column (GE Amersham), and ran in S200 buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$ hexahydrate, 2 mM ATP, 2 mM 2-mercapto ethanol, 12.5% glycerol, pH 7.6). The void volume fractions were rejected and the protein was loaded back onto the Ni affinity column to remove the His-tagged SMT-3. The flow through was collected and concentrated in the same manner as before, except in a 10 000 MWCO Amicon Ultra 15 (Millipore). The protein was filtered again and injected onto the Superdex gel filtration column for buffer exchange. The flow through was collected and analyzed in a 10% SDS–polyacrylamide gel to check for purity The sample was prepared by making a dilution of protein in S200 buffer into phosphate buffer (20 mM Na_2PO_4, 150 mM NaCl, 12.5% glycerol, 1 mM DTT, pH 7.4) to give a 5 μM final concentration. Mouse NBD1 was purified according to Schmidt *et al*. (58).

Cells, cell culture and mouse models

Stably transfected HeLa cells (with pTracer alone as a control or coding for either WT-CFTR or F508del-CFTR) were grown as described before (59). Human nasal cells were obtained after informed consent by direct mucosa scraping following the protocols approved by the board of Hopital Necker. Fully differentiated human air–liquid-interface cultures (MucilAir^{TM}) were purchased from Epithelix SÀRL (Geneva, Switzerland) and cultured at 37°C and 5% CO_2 in a humidified atmosphere in a standard tissue culture incubator according to the manufacturer's recommendation. Briefly, epithelial cells were isolated from human nasal polyps, trachea or bronchus. Then, they were amplified and seeded at a high density onto microporous filters, and maintained at the air–liquid interface. The basolateral culture medium (MucilAir culture medium, Epithelix) was replaced every 2–3 days (60). Male and female homozygous for F508del-CFTR mutation (CF) on 129/FVB backgrounds and their WT control littermates were obtained from the Centre de Distribution, de Typage et d'Archivage Animal (Orléans, France) and housed at the Animal Care Facility at Necker Faculty of Medicine. After weaning, mice were fed a fiber-free diet, and Colopeg (17.14 g/l; Bayer Santé Familiale, France) was administered in water to prevent intestinal obstruction. Experiments were

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

performed on 8–16-week-old mice, in conformity with the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and in accordance with Necker Faculty of Medicine Animal Care and Use Committee (Comité Regional d'Etique pour l'Expérimentation Animale, P2.AE.099.09).

Keratin-8 silencing

A K8-siRNA pool was provided by Thermo Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). The sequences of the regions targeted are: 5′-GAAGCAACATGGACAACAT-3′ (Seq. 1)/5′-TGGAAGGGCTGACCGACGA-3′ (Seq. 2)/5′-GCACAAAGACTGAGATCTC-3′ (Seq. 3)/5′-GCCCATGCCTCCAGCTACA-3′ (Seq. 4). HeLa cells at 70% confluence were transfected with the Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The final concentration of siRNA in the culture medium was 20 nM. Cells were subjected to other assays after 72 h transfection. Control cells were incubated in the same conditions with the transfection reagent alone. Control experiments were carried out with the non-specific siRNA control (a mixture of four scrambled sequences: 5′-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3′, 5′-UGGUUUACAUGUUGUGUGA-3′, 5′-UGGUUUACAUGUUUUCUGA-3′ and 5′-UGGUUUACAUGUUUUCCUA-3′) (Thermo Scientific) under siRNA conditions or with Lipofectamine alone. Treatment of mice by siRNA was done by intranasal instillation of 30 μl of 20 nM K8-siRNA or scrambled-siRNA solution.

Immunoprecipitation

For good reproducibility, cells were plated at the same time at a density of 1 million per 60 cm^2. Cells were grown at 80% confluence and starved overnight with serum. Cells were washed twice with ice-cold PBS, scraped in PBS and counted in a Malassez cell. Cell pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% IgePal in 1× RIPA), solubilized for 40 min under continuous rotation. After that, the mixture was sonicated at 47 Hz for 5 min. To eliminate non-specific binding, a preclearing step was performed with protein A/G beads for 1 h. Then, the sample was centrifuged for 5 min at 2000*g*. The supernatant was quantified with the RCDC protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and 14 mg of protein for each HeLa cell extract was used. On these extracts, immunoprecipitation with anti-CFTR antibodies [clone 24-1 (R&D, Folsom, CA, USA) and clone mm13-4 (Abcam, Cambridge, MA, USA)] and protein A/G beads was carried out as described elsewhere (61,62). After 3 h of incubation under continuous rotation, the mixture was centrifuged. Immunoprecipitating proteins were eluted from the beads with 500 μl of 2D-electrophoresis buffer [7 M urea, 2 M thiourea, 4% w/v CHAPS, 50 mM DTT, 1% ampholytes, pH 3–10 (GE Healthcare, Orsay, France)].

Proteomics

Precipitates were analyzed by 2D-gel electrophoresis by a method adapted from Bensalem *et al*. (37). Prior to isoelectrofocusing (IEF), precipitates were filtered through 0.45 mm Vectaspin microfilters (Whatman, Maidstone, UK). Then, 450 μl of aliquots of protein precipitates were subjected to in-gel rehydration (50 V, 10 h), and IEF was performed on immobilized pH gradient strips (pH 3–10 non-linear, GE Healthcare). IEF was performed for a total of ~50 kVh on an IPGphor system (GE Healthcare). Prior to SDS–PAGE on a 10% polyacrylamide gel, strips were incubated at room temperature in equilibration buffer (50 mM Tris–HCl, pH 8.8, 6 M urea, 2% SDS) with 2% DTT for 10 min and for another 10 min with 2.5% iodoacetamide. Gels were fixed, washed and proteins were visualized by the MS-compatible silver staining method as previously described (37,63,64). Spots were excised and proteins of interest digested *in situ* with trypsin (sequencing grade; Promega, Madison, WI, USA). Digested proteins were analyzed using an Autoflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Proteins were identified using in-house Mascot server.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with cold acetone, permeabilized with 0.25% Triton and immunostained with rabbit polyclonal antibodies against C-terminal CFTR (pCterB was a gift from Genzyme, Cambridge, MA, USA) at a 1:100 dilution, and against K8 (Progen, Germany) at a 1:10 dilution. The secondary antibodies were coupled to Alexa fluor 594 anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (goat anti-mouse, Alexa; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and Alexa fluor 488 anti-rabbit IgG (goat anti-rabbit; Alexa) and used at 1:1000. The analysis was performed with a Leica TCS SP5 Confocal Microscopy System using 640 oil objectives.

Western blotting

Proteins were extracted as described previously (41). Protein extracts were mixed with 1 volume of 5× Laemmli buffer. Samples were processed as previously described (19). Briefly, they were heated at 37°C for 15 min, resolved by 8% SDS–PAGE, transferred onto PVDF membranes and blocked for 1 h with 5% non-fat milk diluted in TBS/Tween (0.1%). Blot membranes were hybridized using primary monoclonal anti-K8 (1:1000) (Progen), rabbit polyclonal anti-CFTR (1:500) (Alomone) and rabbit polyclonal anti-GAPDH (1:1000) (Santa Cruz) antibodies. Bands were visualized by incubation with IR dye-coupled secondary antibodies and analysis by Odyssey infrared imager (LI-COR Biosciences, Cambridge, UK).

Surface plasmon resonance

SPR was performed in a Biacore-2000 system (GE Healthcare). Covalent immobilization of NBD1 via primary amino groups to a CM5 sensor chip surface was performed at 7°C according to the modified protocol described by Borot *et al*. (36), using an immobilization buffer composed of 10 mM sodium acetate (pH 4.5), 3 mM Mg-ATP and 0.005% (w/v) surfactant P20. WT or mutated-NBD1 (80 μg/ml) was injected at a flow rate of 5 μl/min pendant for 4 min. A separate flow channel on the same sensor chip was subjected to blank

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

immobilization without NBD1. Interactions were monitored by injecting different concentrations of K8 or K18 in running buffer [50 mM Tris–HCl at pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT and 0.005% (w/v) surfactant P20]. Binding was assessed at 7 and 20/25°C at 30 μl/min flow rate. Association phase was followed by increasing refractive index at the sensor surface. Subsequent dissociation phase was followed by injecting running buffer alone. Between injections, surfaces were regenerated by two washes with 5 μl of 0.05% SDS (20°C) and two washes with 5 μl of 10 mM HCL (7°C). Before measurements, the recombinant domain was dialyzed in the buffer, and centrifuged immediately before runs to minimize non-specific aggregation. Association and dissociation curves were corrected for non-specific binding by subtraction of control curves obtained by injection of different analyte concentrations through the blank channel. Kinetic constants, k_{on}, k_{off} and K_D^{app}, were calculated using the Biacore BIAEVALUATION 3.1 software (Biacore AB), assuming a simple two-component model of interaction.

Proximity ligation assay

Cells were fixed with cold acetone and analyzed using the Duolink™ kit (Eurogentec, Angers, France) according to manufacturer's instructions. Briefly, slides were pre-washed in PBS, and incubated with blocking solution. Samples were then incubated with primary antibodies against C-terminal CFTR (pCterB, Genzyme), and K8 (Progen), at 1:100 and 1:10, respectively. Secondary antibodies conjugated with oligonucleotides (PLA probe MINUS and PLA probe PLUS) were added to the reaction tube and incubated. The oligonucleotides contained in the hybridization solution hybridized to the two PLA probes if they were at <40 nm. A ligase (Ligation Solution), nucleotides and polymerase were added sequentially, allowing formation of a rolling-circle amplification product detected by labeled oligonucleotides in case of proximity. The signal was visible as a distinct fluorescent dot and analyzed by fluorescence microscopy (excitation at 557 nm and emission at 563 nm) using 640 oil objectives (Leica TCS SP5 Confocal Microscopy System).

Iodide efflux test

To assess CFTR Cl^- channel activity, iodide efflux was measured in transfected HeLa cells treated either with 10 μM forskolin plus 50 μM genistein or 20 μM CFTR Inh172, according to the protocol described by Hughes *et al*. (24). Briefly, HeLa cells were cultured in 60 mm dishes at 80–90% confluence. Cells were washed five times with 4 ml of loading buffer (136 mM NaI, 3 mM KNO_3, 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 20 mM HEPES, 11 mM glucose, pH 7.4) and incubated with this buffer for 1 h at room temperature. Cells were gently washed 15 times by adding 4 ml of efflux buffer (136 mM $NaNO_3$, 3 mM KNO_3, 2 mM $Ca(NO_3)_2$, 20 mM HEPES, 11 mM glucose, pH 7.4). Then, cells were incubated with 4 ml of fresh efflux buffer (drug-free or not) and iodide efflux was recorded. An iodide-selective electrode (ISE251, Radiometer Analytical SAS, France) connected to a pH meter (PHM250, Ion Analyzer, Radiometer Analytical SAS) was used to measure the amount of iodide released by cells at 1 min intervals.

Nasal potential difference

The method was adapted and miniaturized from the technique developed for young children (65,66). Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (133 mg/kg; IMALGENE 1000, MERIAL, France) and xylazine (13.3 mg/kg; Rompun 2%, BayerPharma, France). Mice were positioned on a 45° tilt board, and a paper pad was placed under the nose to avoid mice suffocation. A subcutaneous needle was connected to an Ag^+/AgCl reference electrode by an agar bridge. A double-lumen polyethylene catheter (0.5 mm diameter) was inserted into one nostril to a depth of 4 mm. One lumen perfused by Ringer solution (140 mM NaCl, 6 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, pH 7.4) at 0.15 ml/h is connected to a measuring Ag^+/AgCl electrode. The two Ag^+/AgCl electrodes were connected to a high-impedance voltmeter (LOGAN Research Ltd, UK). The second lumen perfused solution with the following sequence: (i) Ringer solution, (ii) Ringer solution containing amiloride (100 μM), (iii) low-chloride Ringer solution (140 mM Na-gluconate, 6 mM K-gluconate, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, 1 mM $MgCl_2$, 6 mM Ca-gluconate, pH 7.4), (iv) low-chloride Ringer solution containing CFTR inhibitor I_{inh172} (5 μM, Calbiochem, Germany). Each solution was perfused for at least 3 min, and 30 s stability was required before perfusion switch. Steady-state transepithelial potential, V_{TE}, ΔV_{TEAmil} (difference between V_{TE} and transepithelial potential recorded after perfusion of amiloride-containing solution), $\Delta V_{TElowCl}$ (difference between V_{TE} and transepithelial potential recorded after perfusion with low Cl^- plus amiloride-containing solution) and $\Delta V_{TElowClInh\text{-}172}$ (difference between V_{TE} and transepithelial potential recorded after addition of CFTR inhibitor to the previous solution) were the means of 30 values recorded during stability. Data were not corrected for junction potential, which was negligible (−0.5 mV).

Statistical analysis

In NPD experiments, a cut-off value was established for −2.15 mV, after measuring NPD in 21 WT and 47 F508del mice, and evaluating ROC curves. This corresponds to a threshold V_{TE} value beyond which mice present a WT-like Cl^- conductance. The increase in $\Delta V_{TElowCl}$ was considered significant or not significant according to this threshold. NPD results are expressed as median ± interquartile range. SPR constant data are expressed as means ± SE.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr Pascale Fanen and Dr Philip Thomas for kindly providing transfected HeLa cell lines and purified mouse NBD1, respectively; Dr Gabrielle Planelles for her help in the implementation of proximity ligation assay; Meriem Garfa-Traoré and Nicolas Goudin for their technical support in imaging experiments; and Maryvonne

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

Baudouin-Legros and Diane-Lore Vieu for their technical advice and assistance.

Conflict of Interest statement. The authors declare no competing interests.

FUNDING

This work was supported by European Commission grant 'NEUPROCF' (FP6) (to A.E.); by French Agence Nationale de la Recherche grant 'EICOCF' (to A.E., M.O.); by the associations Vaincre la Mucoviscidose (to A.E., M.O.) and Mucoviscidose: ABCF2 (to A.E., I.S.-G.); Legs Poix-University of Paris 5 (to A.E., M.O.); the Canadian Institutes of Health Research; and NIH-NIDDK and Canadian Cystic Fibrosis Foundation (to G.L.L.).

REFERENCES

1. Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L. *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, **245**, 1066–1073.
2. Edelman, A., Fritsch, J. and Ollero, M. (2009) Twenty years after cystic fibrosis gene identification: where are we and what are we up to? *Pathol. Biol. (Paris)*, **59**, 131–133.
3. Ollero, M., Brouillard, F. and Edelman, A. (2006) Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions. *Proteomics*, **6**, 4084–4099.
4. White, M.B., Amos, J., Hsu, J.M., Gerrard, B., Finn, P. and Dean, M. (1990) A frame-shift mutation in the cystic fibrosis gene. *Nature*, **344**, 665–667.
5. Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E. and Welsh, M.J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*, **358**, 761–764.
6. Hegedus, T., Aleksandrov, A., Cui, L., Gentzsch, M., Chang, X.B. and Riordan, J.R. (2006) F508del CFTR with two altered RXR motifs escapes from ER quality control but its channel activity is thermally sensitive. *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 565–572.
7. Noel, S., Wilke, M., Bot, A.G., De Jonge, H.R. and Becq, F. (2008) Parallel improvement of sodium and chloride transport defects by miglustat (*n*-butyldeoxynojyrimicin) in cystic fibrosis epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**, 1016–1023.
8. Norez, C., Bilan, F., Kitzis, A., Mettey, Y. and Becq, F. (2008) Proteasome-dependent pharmacological rescue of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator revealed by mutation of glycine 622. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **325**, 89–99.
9. Pedemonte, N., Tomati, V., Sondo, E. and Galietta, L.J. (2010) Influence of cell background on pharmacological rescue of mutant CFTR. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, C866–C874.
10. Rafferty, S., Alcolado, N., Norez, C., Chappe, F., Pelzer, S., Becq, F. and Chappe, V. (2009) Rescue of functional F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by vasoactive intestinal peptide in the human nasal epithelial cell line JME/CF15. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **331**, 2–13.
11. Roxo-Rosa, M., Xu, Z., Schmidt, A., Neto, M., Cai, Z., Soares, C.M., Sheppard, D.N. and Amaral, M.D. (2006) Revertant mutants G550E and 4RK rescue cystic fibrosis mutants in the first nucleotide-binding domain of CFTR by different mechanisms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 17891–17896.
12. Schmidt, A., Hughes, L.K., Cai, Z., Mendes, F., Li, H., Sheppard, D.N. and Amaral, M.D. (2008) Prolonged treatment of cells with genistein modulates the expression and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Br. J. Pharmacol.*, **153**, 1311–1323.
13. Trzcinska-Daneluti, A.M., Ly, D., Huynh, L., Jiang, C., Fladd, C. and Rotin, D. (2009) High-content functional screen to identify proteins that correct F508del-CFTR function. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 780–790.
14. Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuis, P.D., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., Turnbull, A., Singh, A., Joubran, J., Hazlewood, A. *et al.* (2009) Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 18825–18830.
15. Favia, M., Guerra, L., Fanelli, T., Cardone, R.A., Monterisi, S., Di Sole, F., Castellani, S., Chen, M., Seidler, U., Reshkin, S.J. *et al.* (2010) Na+/H+ exchanger regulatory factor 1 overexpression-dependent increase of cytoskeleton organization is fundamental in the rescue of F508del cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in human airway CFBE41o- cells. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 73–86.
16. Brouillard, F., Fritsch, J., Edelman, A. and Ollero, M. (2008) Contribution of proteomics to the study of the role of cytokeratins in disease and physiopathology. *Proteomics Clin. Appl.*, **2**, 264–285.
17. Zatloukal, K., Stumptner, C., Fuchsbichler, A., Fickert, P., Lackner, C., Trauner, M. and Denk, H. (2004) The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J. Pathol.*, **204**, 367–376.
18. Davezac, N., Tondelier, D., Lipecka, J., Fanen, P., Demaugre, F., Debski, J., Dadlez, M., Schrattenholz, A., Cahill, M.A. and Edelman, A. (2004) Global proteomic approach unmasks involvement of keratins 8 and 18 in the delivery of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)/deltaF508-CFTR to the plasma membrane. *Proteomics*, **4**, 3833–3844.
19. Lipecka, J., Norez, C., Bensalem, N., Baudouin-Legros, M., Planelles, G., Becq, F., Edelman, A. and Davezac, N. (2006) Rescue of DeltaF508-CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) by curcumin: involvement of the keratin 18 network. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **317**, 500–505.
20. Hamdaoui, N., Baudouin-Legros, M., Kelly, M., Aissat, A., Moriceau, S., Vieu, D.L., Colas, J., Fritsch, J., Edelman, A. and Planelles, G. (2011) Resveratrol rescues a cAMP-dependent anionic transport in the cystic fibrosis pancreatic cell line CFPAC1. *Br. J. Pharmacol.*, **163**, 876–886.
21. Wang, C., Protasevich, I., Yang, Z., Seehausen, D., Skalak, T., Zhao, X., Atwell, S., Spencer Emtage, J., Wetmore, D.R., Brouillette, C.G. *et al.* (2010) Integrated biophysical studies implicate partial unfolding of NBD1 of CFTR in the molecular pathogenesis of F508del cystic fibrosis. *Protein Sci.*, **19**, 1932–1947.
22. Wieczorek, G. and Zielenkiewicz, P. (2008) DeltaF508 mutation increases conformational flexibility of CFTR protein. *J. Cyst. Fibros.*, **7**, 295–300.
23. Stanke, F., Hedtfeld, S., Becker, T. and Tummler, B. (2011) An association study on contrasting cystic fibrosis endophenotypes recognizes KRT8 but not KRT18 as a modifier of cystic fibrosis disease severity and CFTR mediated residual chloride secretion. *BMC Med. Genet.*, **12**, 62.
24. Hughes, L.K., Li, H. and Sheppard, D.N. (2004) Use of an iodide-selective electrode to measure CFTR Cl^- channel activity. Virtual Repository of Cystic Fibrosis European Network, http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr/vr/d/hughes_iodide_selective_electrode_measure_cftr_cl_activity.pdf.
25. Grubb, B.R., Rogers, T.D., Boucher, R.C. and Ostrowski, L.E. (2009) Ion transport across CF and normal murine olfactory and ciliated epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **296**, C1301–C1309.
26. Smith, L., Page, R.C., Xu, Z., Kohli, E., Litman, P., Nix, J.C., Ithychanda, S.S., Liu, J., Qin, J., Misra, S. *et al.* (2010) Biochemical basis of the interaction between cystic fibrosis transmembrane conductance regulator and immunoglobulin-like repeats of filamin. *J. Biol. Chem.*, **285**, 17166–17176.
27. Playford, M.P., Nurminen, E., Pentikainen, O.T., Milgram, S.L., Hartwig, J.H., Stossel, T.P. and Nakamura, F. (2010) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interacts with multiple immunoglobulin domains of filamin A. *J. Biol. Chem.*, **285**, 17156–17165.
28. Thelin, W.R., Chen, Y., Gentzsch, M., Kreda, S.M., Sallee, J.L., Scarlett, C.O., Borchers, C.H., Jacobson, K., Stutts, M.J. and Milgram, S.L. (2007) Direct interaction with filamins modulates the stability and plasma membrane expression of CFTR. *J. Clin. Invest.*, **117**, 364–374.
29. Swiatecka-Urban, A., Boyd, C., Coutermarsh, B., Karlson, K.H., Barnaby, R., Aschenbrenner, L., Langford, G.M., Hasson, T. and Stanton, B.A. (2004) Myosin VI regulates endocytosis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **279**, 38025–38031.

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

30. Ameen, N. and Apodaca, G. (2007) Defective CFTR apical endocytosis and enterocyte brush border in myosin VI-deficient mice. *Traffic*, **8**, 998–1006.
31. Collaco, A., Jakab, R., Hegan, P., Mooseker, M. and Ameen, N. (2010) Alpha-AP-2 directs myosin VI-dependent endocytosis of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels in the intestine. *J. Biol. Chem.*, **285**, 17177–17187.
32. Okiyoneda, T., Barriere, H., Bagdany, M., Rabeh, W.M., Du, K., Hohfeld, J., Young, J.C. and Lukacs, G.L. (2010) Peripheral protein quality control removes unfolded CFTR from the plasma membrane. *Science*, **329**, 805–810.
33. Jaitovich, A., Mehta, S., Na, N., Ciechanover, A., Goldman, R.D. and Ridge, K.M. (2008) Ubiquitin-proteasome-mediated degradation of keratin intermediate filaments in mechanically stimulated A549 cells. *J. Biol. Chem.*, **283**, 25348–25355.
34. Wang, X., Venable, J., LaPointe, P., Hutt, D.M., Koulov, A.V., Coppinger, J., Gurkan, C., Kellner, W., Matteson, J., Plutner, H. *et al.* (2006) Hsp90 cochaperone Aha1 downregulation rescues misfolding of CFTR in cystic fibrosis. *Cell*, **127**, 803–815.
35. Dudez, T., Borot, F., Huang, S., Kwak, B.R., Bacchetta, M., Ollero, M., Stanton, B.A. and Chanson, M. (2008) CFTR in a lipid raft-TNFR1 complex modulates gap junctional intercellular communication and IL-8 secretion. *Biochim. Biophys. Acta*, **1783**, 779–788.
36. Borot, F., Vieu, D.L., Faure, G., Fritsch, J., Colas, J., Moriceau, S., Baudouin-Legros, M., Brouillard, F., Ayala-Sanmartin, J., Touqui, L. *et al.* (2009) Eicosanoid release is increased by membrane destabilization and CFTR inhibition in Calu-3 cells. *PLoS One*, **4**, e7116.
37. Bensalem, N., Ventura, A.P., Vallee, B., Lipecka, J., Tondelier, D., Davezac, N., Dos Santos, A., Perretti, M., Fajac, A., Sermet-Gaudelus, I. *et al.* (2005) Down-regulation of the anti-inflammatory protein annexin A1 in cystic fibrosis knock-out mice and patients. *Mol. Cell. Proteomics*, **4**, 1591–1601.
38. Kongara, S., Kravchuk, O., Teplova, I., Lozy, F., Schulte, J., Moore, D., Barnard, N., Neumann, C.A., White, E. and Karantza, V. (2010) Autophagy regulates keratin 8 homeostasis in mammary epithelial cells and in breast tumors. *Mol. Cancer Res.*, **8**, 873–884.
39. Luciani, A., Villella, V.R., Esposito, S., Brunetti-Pierri, N., Medina, D., Settembre, C., Gavina, M., Pulze, L., Giardino, I., Pettoello-Mantovani, M. *et al.* (2010) Defective CFTR induces aggresome formation and lung inflammation in cystic fibrosis through ROS-mediated autophagy inhibition. *Nat. Cell Biol.*, **12**, 863–875.
40. Trudel, S., Kelly, M., Fritsch, J., Nguyen-Khoa, T., Therond, P., Couturier, M., Dadlez, M., Debski, J., Touqui, L., Vallee, B. *et al.* (2009) Peroxiredoxin 6 fails to limit phospholipid peroxidation in lung from Cftr-knockout mice subjected to oxidative challenge. *PLoS One*, **4**, e6075.
41. Na, N., Chandel, N.S., Litvan, J. and Ridge, K.M. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypoxia-induced degradation of keratin intermediate filaments. *FASEB J.*, **24**, 799–809.
42. Zhang, S.Y., Kamal, M., Dahan, K., Pawlak, A., Ory, V., Desvaux, D., Audard, V., Candelier, M., BenMohamed, F., Matignon, M. *et al.* (2010) c-mip Impairs podocyte proximal signaling and induces heavy proteinuria. *Sci. Signal.*, **3**, ra39.
43. Shimizu, H., Hori, Y., Kaname, S., Yamada, K., Nishiyama, N., Matsumoto, S., Miyata, K., Oba, M., Yamada, A., Kataoka, K. *et al.* (2010) siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **21**, 622–633.
44. Ritprajak, P., Hashiguchi, M. and Azuma, M. (2008) Topical application of cream-emulsified CD86 siRNA ameliorates allergic skin disease by targeting cutaneous dendritic cells. *Mol. Ther.*, **16**, 1323–1330.
45. Leachman, S.A., Hickerson, R.P., Schwartz, M.E., Bullough, E.E., Hutcherson, S.L., Boucher, K.M., Hansen, C.D., Eliason, M.J., Srivatsa, G.S., Kornbrust, D.J. *et al.* (2010) First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. *Mol. Ther.*, **18**, 442–446.
46. Gonzalez-Gonzalez, E., Ra, H., Hickerson, R.P., Wang, Q., Piyawattanametha, W., Mandella, M.J., Kino, G.S., Leake, D., Avilion, A.A., Solgaard, O. *et al.* (2009) siRNA silencing of keratinocyte-specific GFP expression in a transgenic mouse skin model. *Gene Ther.*, **16**, 963–972.
47. Watanabe, T., Umehara, T. and Kohara, M. (2007) Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59**, 1263–1276.
48. Shin, D., Kim, S.I., Park, M. and Kim, M. (2007) Immunostimulatory properties and antiviral activity of modified HBV-specific siRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **364**, 436–442.
49. Kolokoltsov, A.A., Saeed, M.F., Freiberg, A.N., Holbrook, M.R. and Davey, R.A. (2009) Identification of novel cellular targets for therapeutic intervention against Ebola virus infection by siRNA screening. *Drug Dev. Res.*, **70**, 255–265.
50. Tian, W. and Liou, H.C. (2009) RNAi-mediated c-Rel silencing leads to apoptosis of B cell tumor cells and suppresses antigenic immune response in vivo. *PLoS One*, **4**, e5028.
51. Ofek, P., Fischer, W., Calderon, M., Haag, R. and Satchi-Fainaro, R. (2010) In vivo delivery of small interfering RNA to tumors and their vasculature by novel dendritic nanocarriers. *FASEB J.*, **24**, 3122–3134.
52. Brahmamdam, P., Watanabe, E., Unsinger, J., Chang, K.C., Schierding, W., Hoekzema, A.S., Zhou, T.T., McDonough, J.S., Holemon, H., Heidel, J.D. *et al.* (2009) Targeted delivery of siRNA to cell death proteins in sepsis. *Shock*, **32**, 131–139.
53. Wang, Y., He, Q.Y., Tsao, S.W., Cheung, Y.H., Wong, A. and Chiu, J.F. (2008) Cytokeratin 8 silencing in human nasopharyngeal carcinoma cells leads to cisplatin sensitization. *Cancer Lett.*, **265**, 188–196.
54. Lau, A.T. and Chiu, J.F. (2007) The possible role of cytokeratin 8 in cadmium-induced adaptation and carcinogenesis. *Cancer Res.*, **67**, 2107–2113.
55. Long, H.A., Boczonadi, V., McInroy, L., Goldberg, M. and Maatta, A. (2006) Periplakin-dependent re-organisation of keratin cytoskeleton and loss of collective migration in keratin-8-downregulated epithelial sheets. *J. Cell Sci.*, **119**, 5147–5159.
56. Liu, F., Fan, D., Qi, J., Zhu, H., Zhou, Y., Yang, C., Zhu, Z. and Xiong, D. (2008) Co-expression of cytokeratin 8 and breast cancer resistant protein indicates a multifactorial drug-resistant phenotype in human breast cancer cell line. *Life Sci.*, **83**, 496–501.
57. Liu, F., Chen, Z., Wang, J., Shao, X., Cui, Z., Yang, C., Zhu, Z. and Xiong, D. (2008) Overexpression of cell surface cytokeratin 8 in multidrug-resistant MCF-7/MX cells enhances cell adhesion to the extracellular matrix. *Neoplasia*, **10**, 1275–1284.
58. Schmidt, A., Mendoza, J.L. and Thomas, P.J. (2011) Biochemical and biophysical approaches to probe CFTR structure. *Methods Mol. Biol.*, **741**, 365–376.
59. Jungas, T., Motta, I., Duffieux, F., Fanen, P., Stoven, V. and Ojcius, D.M. (2002) Glutathione levels and BAX activation during apoptosis due to oxidative stress in cells expressing wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J. Biol. Chem.*, **277**, 27912–27918.
60. Crespin, S., Bacchetta, M., Huang, S., Dudez, T., Wiszniewski, L. and Chanson, M. (2011) Approaches to study differentiation and repair of human airway epithelial cells. *Methods Mol. Biol.*, **742**, 173–185.
61. Fanen, P., Labarthe, R., Garnier, F., Benharouga, M., Goossens, M. and Edelman, A. (1997) Cystic fibrosis phenotype associated with pancreatic insufficiency does not always reflect the cAMP-dependent chloride conductive pathway defect. Analysis of C225R-CFTR and R1066C-CFTR. *J. Biol. Chem.*, **272**, 30563–30566.
62. Clain, J., Fritsch, J., Lehmann-Che, J., Bali, M., Arous, N., Goossens, M., Edelman, A. and Fanen, P. (2001) Two mild cystic fibrosis-associated mutations result in severe cystic fibrosis when combined in cis and reveal a residue important for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator processing and function. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9045–9049.
63. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, **68**, 850–858.
64. Bensalem, N., Masscheleyn, S., Mozo, J., Vallee, B., Brouillard, F., Trudel, S., Ricquier, D., Edelman, A., Guerrera, I.C. and Miroux, B. (2007) High sensitivity identification of membrane proteins by MALDI TOF-MASS spectrometry using polystyrene beads. *J. Proteome Res.*, **6**, 1595–1602.
65. Sermet-Gaudelus, I., Roussel, D., Bui, S., Deneuville, E., Huet, F., Reix, P., Bellon, G., Lenoir, G. and Edelman, A. (2006) The CF-CIRC study: a French collaborative study to assess the accuracy of cystic fibrosis diagnosis in neonatal screening. *BMC Pediatr.*, **6**, 25.
66. Sermet-Gaudelus, I., Girodon, E., Roussel, D., Deneuville, E., Bui, S., Huet, F., Guillot, M., Aboutaam, R., Renouil, M., Munck, A. *et al.* (2010) Measurement of nasal potential difference in young children with an equivocal sweat test following newborn screening for cystic fibrosis. *Thorax*, **65**, 539–544.

Downloaded from http://hmg.oxfordjournals.org/ at BIUS Jussieu on August 27, 2012

ARTICLE 4 (Article de revue)

Bacteriophages in the experimental treatment of Pseudomonas aeruginosa infections in mice

Emilie Saussereau et Laurent Debarbieux

Advances in virus research (2012). **83** : 123-41

Résumé de l'article :

Devant l'accroissement du nombre de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques, il existe actuellement un regain d'intérêts pour l'utilisation thérapeutique des bactériophages. *P. aeruginosa* étant un pathogène opportuniste majeur à l'origine d'infections nosocomiales et d'infections pulmonaires chroniques chez les patients CF, elle constitue une cible pour ce traitement.

En plus de l'expérience acquise en Europe de l'Est, différents modèles expérimentaux ont été développés pour évaluer l'efficacité de la phagothérapie afin de lutter contre des infections à *P. aeruginosa.*

Cette revue rassemble et discute les données concernant l'efficacité des traitements par bactériophages, curatifs et préventifs, acquises dans différents modèles murins de septicémies, d'infections cutanées et pulmonaires causées par *P. aeruginosa.*

Associées aux résultats obtenus lors des essais cliniques, les études sur des modèles expérimentaux d'infection à *P. aeruginosa* permettent de mieux appréhender une éventuelle utilisation des bactériophages dans la médecine.

CHAPTER 4

Bacteriophages in the Experimental Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice

Emilie Saussereau and **Laurent Debarbieux**[1]

Contents

I. General Background 124
A. *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen 124
B. The drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* 125
C. *Pseudomonas aeruginosa* infections targeted by bacteriophage treatments 125
II. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteriophages 127
A. Prophages (temperate bacteriophages) 127
B. Virulent bacteriophages 128
III. Experimental Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice 129
A. Treatments for septicemia 129
B. Treatment of skin infections 130
C. Treatment of lung infections 131
D. Recent advances in clinical trials on *Pseudomonas aeruginosa* ear infections 134
IV. Perspectives 136
A. Future directions in experimental phage therapy 136
B. How far can we translate current results into the development of human phage therapy? 137

Institut Pasteur, Molecular Biology of the Gene in Extremophiles Unit, Department of Microbiology, Paris, France
[1] Corresponding author, E-mail: laurent.debarbieux@pasteur.fr

Advances in Virus Research, Volume 83
ISSN 0065-3527, DOI: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00004-9
© 2012 Elsevier Inc.
All rights reserved.

Acknowledgment 137
References 137

Abstract The regular increase of drug-resistant pathogens has been a major force in the renewed interest in the use of bacteriophages as therapeutics. In addition to experience acquired in eastern Europe where bacteriophages have been used to treat bacterial infections in humans, in Western countries only experimental models have been developed until recently. The Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen causing particularly severe infections in cystic fibrosis patients. Several experimental models in mice have yielded encouraging results for the use of bacteriophages to treat or prevent septicemia, skin and lungs infections caused by *P. aeruginosa*. Now, a phase II clinical trial conducted in the United Kingdom provides evidence for the efficacy of bacteriophage treatments in chronic otitis due to antibiotic-resistant *P. aeruginosa* strains. Together with experimental models, these results provide an incentive to develop more research and clinical studies to fully appreciate the benefits of the use of bacteriophages in medicine.

I. GENERAL BACKGROUND

A. *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen

Pseudomonas is one of the most diverse genera known, with members in diverse environmental niches, such as soil, water, animals, and plants. *Pseudomonas aeruginosa* differs from other species of this genus in being pathogenic to animals (Pier and Ramphal, 2009). This Gram-negative rod-shaped bacterium is an opportunistic pathogen, causing various types of infection (e.g., skin, eyes, ears, respiratory tract, urinary tract, gut-derived sepsis). Immunocompromised patients and patients on immunosuppressive treatments, such as patients suffering from cystic fibrosis, burn wounds, AIDS, and cancer, are the most frequently infected by this organism (Asboe *et al.*, 1998; Lyczak *et al.*, 2000, 2002; Mayhall 2003; Vento *et al.*, 2008).

An ability to adapt to diverse environments is one of the key characteristics of *P. aeruginosa*. This bacterium can grow both aerobically and anaerobically, at environmental temperatures of up to 42 °C, and can make use of many different metabolic compounds, from small to complex molecules. These features have enabled this bacterium to establish itself in many different environments (Pirnay *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* is found almost everywhere, from water, to the surface of fruits and vegetables, sinks or shower heads, and, ultimately, medical devices, such as catheters (Kiska *et al.*, 2003; Morrison and Wenzel, 1984).

Several genomic studies have been carried out on *P. aeruginosa*, and nine genomes have been sequenced to date (Table I). The presence of a large number of regulatory genes and quorum-sensing components reflect the comprehensive adaptability of this microbe. Many virulence factors (from secreted proteins to surface structures) have been identified, and *P. aeruginosa* has been shown to adhere strongly to different types of surfaces (biotic and abiotic), resulting in the formation of biofilms that are difficult to eradicate with antibiotics (Bleves *et al.*, 2010; Heiniger *et al.*, 2010; Randall and Irvin, 2008).

B. The drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa strains are naturally resistant to several antibacterial drugs (Livermore, 2002). In addition, some clinical isolates have a hypermutator phenotype, facilitating the rapid evolution of resistance to drugs to which they were initially sensitive (Ferroni *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* strains can also acquire resistance from mobile genetic elements, such as plasmids (Coyne *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2009; Poole, 2005). Most *P. aeruginosa* strains are still susceptible to colistin, a polymyxin antibiotic, but increasing numbers of reports of pan-resistant strains are emerging (Bonomo and Szabo, 2006; Deplano *et al.*, 2005; Zavascki *et al.*, 2010).

The resistance mechanisms involved are diverse, ranging from enzymes targeting drugs, such as β-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes, to efflux pumps that expel drugs, changes in porin expression or mutations, or modifications to the molecules targeted by the drugs, such as the methylation of 16 S RNA, which confers resistance to aminoglycosides (Bonomo and Szabo, 2006; Falagas *et al.*, 2006; Nordmann *et al.*, 1993; Zavascki *et al.*, 2010). Hopes of discovering new effective drugs have been dashed in the last 10 years by the ability of bacteria to develop resistance mechanisms, in some cases even before the market release of the drug concerned. This has made it difficult to remain one step ahead in the fight against pathogens and has led to a revival of interest in the therapeutic application of bacteriophages, known as phage therapy (Thiel, 2004).

C. *Pseudomonas aeruginosa* infections targeted by bacteriophage treatments

To date, three experimental *P. aeruginosa* infections (septicemia, skin, and lung infections) have been used to study bacteriophage treatments. Bacterial septicemia is a general infection combining a systemic inflammatory response syndrome and bacteremia (presence of viable bacteria in the bloodstream). In the absence of treatment, septicemia may progress to septic shock and, ultimately, death. Most (65%) cases of septicemia are caused

TABLE I Listing of currently sequenced *Pseudomonas aeruginosa* genomes

Strain	Associated disease	Genome size (bp)	Prophages (putative)	Accession number	Reference
P. aeruginosa 39016	Keratitis	6,667,330	4	NZ_AEEX00000000	Stewart *et al.* (2011)
P. aeruginosa PACS2	Not specified	6,492,423	?	NZ_AAQW00000000	NCBI Genome
P. aeruginosa 2192	Cystic fibrosis	6,826,253	≥ 1	NZ_AAKW00000000	Mathee *et al.* (2008)
P. aeruginosa C3719	Cystic fibrosis	6,146,998	≥ 1	NZ_AAKV00000000	Mathee *et al.* (2008)
P. aeruginosa PAb1	Frostbite	6,078,600	?	NZ_ABKZ00000000	Salzberg *et al.* (2008)
P. aeruginosa LESB58	Cystic fibrosis	6,601,757	6	NC_011770.1	Winstanley *et al.* (2009)
P. aeruginosa PA7	Not specified	6,588,339	4	NC_009656.1	Roy *et al.* (2010)
P. aeruginosa UCBPP-PA14	Burn	6,537,648	≥ 1	NC_008463.1	Lee *et al.* (2006)
P. aeruginosa PAO1	Wound	6,264,404	≥ 2	NC_002516.2	Stover *et al.*, (2000)

by Gram-positive bacteria, such as staphylococci or enterococci, but *P. aeruginosa* is the third most frequently isolated Gram-negative bacterium in cases of nosocomial bloodstream infections, after *Escherichia coli* and *Klebsiella* sp. *P. aeruginosa* septicemia is fatal in 38.7 % of cases (Wisplinghoff *et al.*, 2004). Experimental models of *P. aeruginosa* septicemia have proved useful for assessments of the efficacy of phage therapy, as they have shown that bacteriophages can infect bacteria in a wide range of organs.

Pseudomonas aeruginosa skin infections are a serious threat in burn units of care centers. In 1983, 22% of the 887 burns patients treated at Cochin Hospital (Paris, France) had *P. aeruginosa* infections. The mortality rate was 60% for patients with burns covering more than 25% of the body surface, and being positive for blood cultures for *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* have been identified as the two main antibiotic-resistant pathogens detected in burns patients (Wibbenmeyer *et al.*, 2006). *P. aeruginosa* has also been shown to cause skin infections in immunocompromised patients (Chiller *et al.*, 2001).

Lung infections caused by *P. aeruginosa* are rare in healthy populations. Only a few cases of community-acquired *P. aeruginosa* pneumonia have been identified, mostly in elderly people (Graber Duvernay, 2002). In contrast, immunocompromised patients, such as AIDS patients, are considered to constitute a population at risk (Fichtenbaum *et al.*, 1994). Cystic fibrosis patients comprise the largest population subject to *P. aeruginosa* lung infection, with 80 to 95% of these patients dying from respiratory failure due to chronic status of this infection accompanied by airway inflammation (Lyczak *et al.*, 2002). Indeed, cystic fibrosis, a heritable genetic disease affecting 1 in 2500 people in the Caucasian population, causes a thickening of the airway surface liquid that affects mucociliary clearance, creating a favorable microenvironment for bacterial infections (Corey and Farewell, 1996). The use of bacteriophages to treat lung infections in humans was not reported in eastern European countries before the initiation of such treatments in children with cystic fibrosis in 2007 in Tbilissi (Kutateladze and Adamia, 2010). Moreover, only one report mentioning the use of a murine lung infection model to evaluate the efficacy of bacteriophage treatments was published before 2009 (Meitert *et al.*, 1987).

II. *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BACTERIOPHAGES

A. Prophages (temperate bacteriophages)

Prophages are bacteriophage genomes integrated into the host genome. The sequence of *P. aeruginosa* genomes contains several putative prophages (Table I). Based on their sequences, some prophages may appear

to be active, but it is not always possible to reactivate them *in vitro* in laboratory conditions. For example, six putative prophages were identified in the genome sequence of strain LESB58, but only four were found to be active *in vitro* (Winstanley *et al.*, 2009). However, the lack of reactivation *in vitro* of some prophages with apparently complete sequences does not necessarily imply that these prophages are no longer active. We may simply not have discovered the signals driving their release.

Prophages are a major source of new genes and, often, of new functions in bacterial genomes (Brüssow *et al.*, 2004, 2007; Cortez *et al.*, 2009). Functions identified to date include virulence factors and drug resistance mechanisms (Tinsley *et al.*, 2006). For example, the FIZ-15 prophage confers resistance to phagocytosis by macrophages and increases adhesion to human cells, whereas the Pf4 prophage contributes to biofilm formation in the PAO1 strain (Rice *et al.*, 2008; Vaca-Pacheco *et al.*, 1999; Whiteley *et al.*, 2001).

B. Virulent bacteriophages

The large number of virulent bacteriophages infecting *P. aeruginosa* that have been fully sequenced (more than 40 in 2010) bears witness to the high degree of interest in this field (Ceyssens and Lavigne, 2010). Bacteriophage genomes are much less conserved than bacterial genomes. It is therefore not possible to identify a particular subset of sequences present in all bacteriophages infecting a given bacterial species. Given the very high abundance of bacteriophages (10^{32} particles on earth) and the diversity of environments in which *P. aeruginosa* is found, the number of bacteriophages infecting *P. aeruginosa* discovered to date may represent the tip of the iceberg (Fuhrman, 1999).

Phage therapy—the use of bacteriophages to treat bacterial infections—has excited renewed interest in the last 10 years due to the increasing problem of bacterial resistance to multiple antibiotics. Phage therapy is based on the use of a specific bacteriophage infecting a specific strain. As one of the main pathogens displaying resistance to numerous drugs, *P. aeruginosa* has been the focus of several studies using bacteriophages. These studies involved isolation of a large number of bacteriophages, only a few of which were fully characterized. For obvious reasons of safety, the use of temperate bacteriophages for phage therapy is not recommended (Brüssow, 2005). Newly isolated bacteriophages must therefore be characterized to ensure that those not strictly virulent are discarded. It is possible to carry out such characterization by bioinformatics analyses, provided that the full genome sequence has been obtained (Denou *et al.*, 2009; Morello *et al.*, 2011).

III. EXPERIMENTAL PHAGE THERAPY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INFECTIONS IN MICE

A. Treatments for septicemia

1. Experimental models

Most experimental models are based on intraperitoneal injection in mice, resulting in 100% mortality within 24 to 48 hr, depending on the strain used (Hagens *et al.*, 2004; Meitert *et al.*, 1987; Soothill, 1992; Vinodkumar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). This route of infection leads to bacteremia, severe systemic congestion, splenomegaly, acute ascites, and organ hemorrhage (Meitert *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 2006). Another model of septicemia resulting from intestinal infection has also been described (Watanabe *et al.*, 2006). In this model, mice receive *P. aeruginosa* in drinking water for 3 days, together with antibiotic treatment to facilitate the intestinal implantation of *P. aeruginosa*. Cyclophosphamide is then administered by intraperitoneal injection to disrupt the intestinal mucosal barrier, allowing septicemia to develop. In this model, which more closely resembles the septicemia observed in human patients, 100% of the mice die within 9 days of the second cyclophosphamide injection.

2. Curative treatments

The renewed interest in phage therapy experiments dates back to the start of the 1980s. During this period, the first advanced study of an experimental bacteriophage-based treatment for *P. aeruginosa* septicemia treatment was carried out (Meitert *et al.*, 1987). This study showed that a single dose of 10^6 plaque-forming unit (PFU) bacteriophages, administered intravenously at the same time as the bacteria, rescued 50% of mice infected with a lethal dose of *P. aeruginosa* [1.5×10^8 colony-forming unit (CFU) intraperitoneally]. More recent studies have shown that the efficacy of bacteriophage treatment increases with the dose given (Soothill, 1992; Wang *et al.*, 2006). If the dose of bacteriophages is increased to a multiplicity of infection (MOI) of 10 to 10^4, then the administration of bacteriophages can be delayed to between 1 and 6 hr after infection, with no effect on rescue rate, which remains at 100% (Hagens *et al.*, 2004; Heo *et al.*, 2009; Vinodkumar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2006). Phosphate-buffered saline or inactivated bacteriophage solutions were used as a control, with such treatment resulting in 100% mortality.

In addition to the MOI and the timing of bacteriophage administration, the pathway used is also important. The intraperitoneal administration of bacteriophages is much more efficient than intramuscular injection or oral treatment for the treatment of experimental septicemia (Heo *et al*, 2009; Meitert *et al.*, 1987).

The efficacy of bacteriophage treatment for septicemia has also been assessed by counting bacteria in blood samples and in several organs (lungs, spleen, and liver) 1 day after the administration of bacteriophages. Bacteriophage treatment has been reported to decrease bacterial counts by a factor of 200 to 1000 (Heo *et al.*, 2009; Vinodkumar *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2006). Bacteriophage treatment also decreases cytokine levels significantly [by factors of five for interleukin (IL)-1β, eight for IL-6, and seven for tumor necrosis factor-α](Watanabe *et al.*, 2006).

3. Preventive treatments

Watanabe *et al.* (2006) did not restrict their studies to the curative treatment of septicemia. They also assessed the efficacy of bacteriophages as a preventive treatment. They showed that the administration of the curative dose *per os* 1 day before infection was ineffective, with all mice dying over the same time interval as untreated animals. This suggests that orally administered bacteriophages do not reside long enough in the body of the animals to protect them from subsequent infections. Consequently, any preventive treatment based on this route of administration is unlikely to be successful unless it is performed only within a few hours before, which reduces its interest considerably.

4. Conclusions

Studies of these experimental models of septicemia have shown that bacteriophages can infect bacteria within the body of an animal. Bacteriophages have been shown to be highly active *in vivo*, rescuing animals from infections with lethal doses of bacteria. However, these results should not be taken as proof that bacteriophages are useful for treating septicemia. As one of the key principles of phage therapy is the use of a bacteriophage able to infect the targeted pathogen, prior identification of the pathogen is required in order to select the most appropriate bacteriophage for treatment. Hospitalized patients with septicemia often require rapid treatment, and the pathogen involved is not always clearly identified. It is therefore difficult to use bacteriophages for treatment of septicemia.

B. Treatment of skin infections

1. Experimental models

In most models, a small area of mouse skin is injured by heating, and bacteria are then injected subcutaneously into the wound or applied directly onto the surface of the skin. When injected, strain PAO1 causes an infection that is fatal within 72 hr, whereas strain 4294, when applied directly to the skin, results in an infection persisting for up to 21 days, with a mortality rate of 10% (Kumari *et al.*, 2009a; McVay *et al.*, 2007; Meitert *et al.*, 1987). Both these models have been used to assess the efficacy of bacteriophages for treating infections of burn wounds.

2. Curative treatments

Direct application of bacteriophages to the burned surface, repeated 10 times every 30 minutes on the first day, results in the healing of 80% of wounds (Meitert *et al.*, 1987). The initial dose of bacteria was 200 times higher than the dose of bacteriophages used. A more recent study by McVay *et al.* (2007) compared the efficacy of bacteriophages administered by three different routes: intraperitoneally, intramuscularly, and subcutaneously. The intraperitoneal route was the most efficient, resulting in 88% survival, whereas survival rates of less than 30% were obtained with the other two routes of administration. This model included a low infectious dose (100 bacteria) and a high treatment dose (3×10^8 PFU). In contrast, Kumari *et al.* (2009a,b) used the same strain (PAO1), but with 10^7 bacteria and treatments with up to 9×10^9 PFU of bacteriophages once daily, without success, with all animals dying within 72 hr. These authors used the same animal model of burn wounds in which they had previously reported the rescue by bacteriophage treatment, within 72 hr, of up to 94% of mice infected with a lethal dose of *Klebsiella pneumoniae* (Kumari *et al.*, 2009a,b). In both studies with the PAO1 strain, the mortality rates of untreated animals were similar, despite a 10^5-fold difference in the bacterial dose used. This suggests that the two groups may have used different clones of this strain, mouse lines with different immune responses, or both.

3. Conclusions

The three articles reporting the use of bacteriophages in animal models of infected burn wounds suggest that direct applications of bacteriophage are the most effective. This led to development of a biopolymer in Georgia. This biodegradable polymer was impregnated with bacteriophages for direct application onto wounds (Markoishvili *et al.*, 2002). A case report in the United Kingdom also showed that bacteriophages applied directly onto burn wounds multiplied actively, helping heal infection of the site and making it possible to carry out skin grafts (Marza *et al.*, 2006). Direct application also ensures that the bacteriophages come into direct contact with the bacteria, increasing the likelihood of efficient treatment. Finally, the work of Kumari and colleagues (Chhibber *et al.*, 2008; Kumari *et al.*, 2010, 2011) in *K. pneumoniae* skin infection models has shown that bacteriophages are at least as efficient as antibiotics.

C. Treatment of lung infections

1. Experimental models

Two different routes of administration have been used to establish bacterial infections of lungs in mice. Bacteria may be introduced directly into the trachea or instilled intranasally. These procedures lead to the development

of acute infections, resulting in the death of mice after 24 to 72 hr, depending on the dose and virulence of the strains used (Debarbieux *et al.*, 2010; Meitert *et al.*, 1987; Morello *et al.*, 2011). A few hours after the initiation of infection, a set of inflammation and cell damage markers can be used to demonstrate the rapid progression of lung infection (Morello *et al.*, 2011; Ramphal *et al.*, 2005). Bioluminescent strains of bacteria can be used to monitor infection in a given animal over a period of time. Such strains have been used to determine the kinetics of lung infection (Debarbieux *et al.*, 2010; Ramphal *et al.*, 2008). Furthermore, 20 hr after infection with a strain of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients, histology and immunohistochemistry analyses of lung sections revealed severe lesions and massive neutrophil recruitment. Large numbers of bacteria were found to be present both within macrophages and outside cells.

2. Curative treatments

Bacteriophage treatments of acute lung infections must be administered rapidly to achieve maximum efficacy, whether an intravenous or intranasal route of administration is used. A single intravenous administration of a bacteriophage dose, which was half the infectious dose of bacteria, immediately after intranasal infection has been shown to rescue 47% of animals (Meitert *et al.*, 1987). Delays to treatment decreased survival greatly, to 27% for a delay of 2 hr and 0% for a delay of 24 hr. In the same model, a single oral administration was tested at several time points, but results obtained were not different from those obtained for intravenous administration. In contrast, a single intranasal administration of bacteriophages 2 hr after the initiation of infection resulted in survival rates of 90 to 100% (Morello *et al.*, 2011). Efficacy was lower for smaller numbers of bacteriophages and for later treatment (Debarbieux *et al.*, 2010). A bioluminescent strain of *P. aeruginosa* has been used for kinetic analyses of treatment. In the first 2 hr after bacteriophage application, no significant differences were found between groups, whereas at 4 hr, bioluminescence levels were lower in the treated group than in the untreated group (Fig. 1) (Debarbieux *et al.*, 2010). This time lag to efficacy probably corresponds to the time required for the bacteriophages to infect and kill enough hosts for a visible effect. Complementary analyses of proinflammatory markers and counts of bacteria and bacteriophages confirmed the lower levels of infection in the treated group than in the control group. Using a clinical strain of *P. aeruginosa* isolated from a cystic fibrosis patient, Morello *et al.* (2011) performed similar experiments with another bacteriophage and obtained similar results. They also carried out histology and immunohistochemistry studies and revealed that lung sections from treated animals were less damaged than those from untreated animals, with no bacterial cells in the intercellular space. These data clearly confirmed that the bacteriophages were able to reach bacteria other than

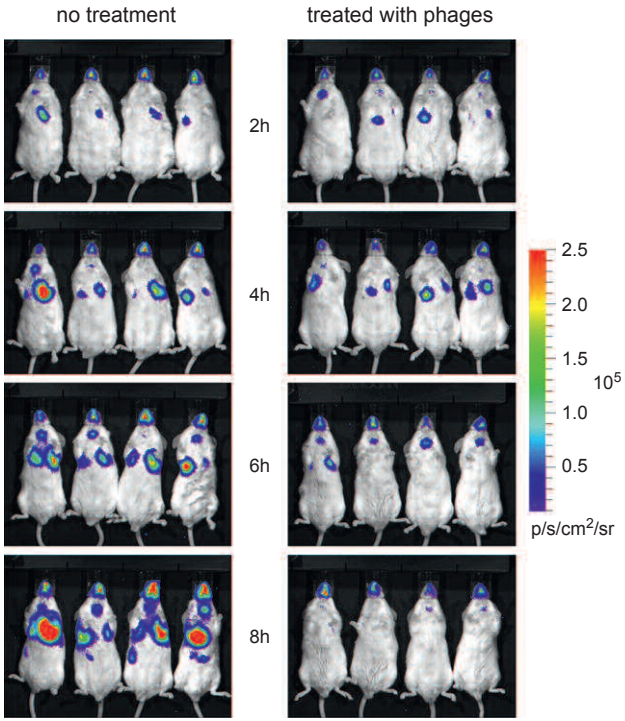


FIGURE 1 Kinetics of bacteriophage treatment of a lung infection in mice. Two groups of mice were infected intranasally with an equal amount of a bioluminescent strain of *Pseudomonas aeruginosa* at $t = 0$. Two hours later mice were slightly anesthetized by gas to record images. Right after imaging the group on the left received a phosphate-buffered saline solution while the group on the right received a bacteriophage solution, both by intranasal instillation. Then images were recorded every 2 hr. The color scale varies from low (blue) to high (red) and represents the amount of photons emitted per second per centimeter square per stearadian (p/s/cm^2/sr).

those already within macrophages, demonstrating an inability of bacteriophages to enter macrophages.

3. Preventive treatments

In their studies of curative bacteriophage-based treatments of lung infection, Debarbieux *et al.* (2010) found that the half-life of bacteriophages in lungs was reasonably high, up to 24 hr. This led to the suggestion that bacteriophages could be used for preventive treatment. The authors showed that prior treatment 24 hr before infection yielded 100% survival in animals subsequently infected with a lethal dose of bacteria (Debarbieux *et al.*, 2010). In a subsequent study, this result was extended by establishing conditions (in relation to endotoxin removal from the

bacteriophage solution) in which treatment 4 days before infection yielded survival rates of 90% (Morello *et al.*, 2011).

4. Conclusions

These studies concluded that there is no major inhibitory factor preventing bacteriophages from infecting bacteria within the lungs. Consequently, factors governing bacteriophage efficacy seem to be directly translated from *in vitro* to *in vivo* settings. For example, increasing the dose of bacteriophages results in more rapid bacterial killing, thereby increasing the survival rate. By increasing the efficacy of bacteriophage to kill a particular bacterial strain, it should be possible to improve its therapeutic potential (Morello *et al.*, 2011). Finally, although the lungs may appear to resemble a flask of broth in which bacteriophages encounter their bacterial hosts readily, this is currently an oversimplification, for two main reasons. The first of these reasons is the role of the immune system in controlling treatment efficacy. Bacteriophages may be the principal killer of bacteria in treatment conditions, but they are not the only player. The second reason is the poor representation of bacteriophages from different families used in these studies, precluding the generalization that all potentially therapeutic bacteriophages will be as effective as those described to date, despite their random isolation from the environment.

Similar models of lung infection in mice caused by either *K. pneumonia* or *Burkholderia cenocepacia* have also been studied. In the first case, for nonlethal infections, bacteriophages were administered intraperitoneally and caused a more rapid decrease in the number of bacteria over time than was observed in the control group. However, preventive treatment administered 24 hr before infection was found to be ineffective, whereas treatment 6 hr before infection did have a positive effect (Chhibber *et al.*, 2008). The lack of protection at 24 hr is not surprising because intraperitoneal injection led to the rapid elimination of bacteriophages. In the second case, the efficacy of bacteriophage treatment 24 hr after infection with *B. cenocepacia* was studied, with a comparison of intraperitoneal and intranasal routes of administration. Intraperitoneal administration was found to be slightly less effective than intranasal administration (Carmody *et al.*, 2010). Differences between this model and *P. aeruginosa* infection models may reflect the characteristics of the bacterium, as *B. cenocepacia* does not infect the lung in the same way as *P. aeruginosa* (Ventura *et al.*, 2009).

D. Recent advances in clinical trials on *Pseudomonas aeruginosa* ear infections

1. Chronic otitis in dogs

Two studies focusing on the treatment of chronic otitis in dogs have been published (Hawkins *et al.*, 2010; Marza *et al.*, 2006). Marza *et al.* (2006) published a case report study showing for the first time that topically

administered bacteriophages multiply in dog ears, curing otitis, despite the use of a low initial dose of bacteriophages (400 PFU). The second study concerned 10 dogs with chronic otitis caused by antibiotic-resistant *P. aeruginosa* strains. Dogs were treated with a single dose of 10^5 PFU of each of six different bacteriophages applied topically. Clinical signs were scored and both bacteria and bacteriophages were counted. Bacteriophage numbers increased by a factor of 100, whereas bacterial counts decreased slightly, from 3 to 1×10^9 CFU/g. The overall general condition of the dogs improved with treatment, as a 30% decrease in clinical signs was recorded. No adverse event was noted; this single treatment was found to improve the clinical condition of the dogs in the longer term, with no further detection of *P. aeruginosa* over the following 18 months (Hawkins *et al.*, 2010).

2. Chronic otitis in humans

The only advanced clinical trial in accordance with current European regulations was performed in the United Kingdom on 24 patients with unilateral chronic otitis (Wright *et al.*, 2009). In this randomized double-blind study, patients were treated with a single dose of 6×10^5 PFU of a cocktail of six bacteriophages, administered topically. Based on the mean visual analog scale scores obtained, bacteriophage treatment improved symptoms. The decrease in mean *P. aeruginosa* counts by the last day of the trial was small, from 9 to 2×10^9 CFU/g of sample. However, the bacteriophages multiplied during treatment, and some bacteriophage-treated patients displayed improvements of up to 80% at the end of the trial, with no such marked improvement observed in the placebo group. Despite the small number of bacteriophage-treated patients displaying a marked improvement, this study clearly indicates that therapeutic bacteriophages constitute an additional option for combating chronic infections. Furthermore, no serious adverse events were reported. Similarly, a phase I clinical trial on leg ulcers also confirmed an absence of adverse effects of bacteriophage treatment (Rhoads *et al.*, 2009). It should also be noted that pioneering studies of bacteriophage treatments for human *P. aeruginosa* infections have been carried out in eastern Europe since the early 1980s, but these studies either were not detailed enough or were not published in English (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

3. Animal models versus human treatments

Human and dog chronic otitis clinical trials can be compared, as treatments were similar, with the same dose of bacteriophages and the same procedure for their local application (Hawkins *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2009). Clinical signs and bacterial counts showed similar patterns of change with treatment in both studies. However, considerable variability between patients was observed in both studies. This aspect is very

important in human treatment, but tends not to be picked up in experimental phage therapy studies, which use homogeneous animal populations, such as mouse lines. Experimental phage therapy studies can therefore provide proof of concept for the feasibility of a treatment, but it is not possible to anticipate the results of similar treatments in individual human patients. Consequently, because it is highly unlikely that clinical trials will report 100% efficacy, such trials should therefore focus on demonstrating an improvement in patient status rather than percentage of complete healing.

IV. PERSPECTIVES

A. Future directions in experimental phage therapy

1. Bacteriophage characterization

The bacteriophages used in studies in animal models or in clinical trials were either isolated for that purpose from environmental sources or obtained from collections. They have been characterized to various degrees and it is therefore not possible to determine whether they are all virulent bacteriophages. Further efforts should be made to characterize these bacteriophages. For example, mass spectrometry analyses of major capsid proteins could be carried out, for rapid differentiation between known and unknown bacteriophages, with full genome sequencing then carried out for the unknown bacteriophages. A more detailed molecular approach has also been described (Merabishvili *et al.*, 2007). It should also be noted that cocktails of several bacteriophages have been used to carry out past and current clinical trials in order to prevent the development of bacteriophage-resistant bacteria.

2. Chronic infection in animal models

Animal models have some limitations, but they are an essential tool for investigations in unexplored situations. Animal models were initially established to reproduce deadly infections for the identification of treatments and, subsequently, for studies of virulence factors. Moreover, major differences have been found between closely related animals. For example, fetoplacental *Listeria monocytogenes* infections can develop in gerbils but not in mice due to a single amino acid difference in a cell receptor (Disson *et al.*, 2008). As chronic infections represent an equilibrium between a bacterial infection and its control by the host immune response, it is therefore not a simple task to reproduce this equilibrium in animals with human pathogens. Nevertheless, several models of chronic infection have been developed in recent years, with the aim of more closely mimicking the lung infections occurring in cystic fibrosis patients

in particular (Bragonzi, 2010). However, as mortality rates remained high in these experiments, larger numbers of animals need to be included to ensure that a large enough number will survive for at least a few weeks.

B. How far can we translate current results into the development of human phage therapy?

Results obtained in animal models support the development of human phage therapy. However, animal models are invariably designed to study one aspect of infection, whereas human patients often present a clinical history that cannot be reproduced in animals. For example, most, if not all, humans patients likely to benefit from bacteriophage treatment have probably been treated previously with antibiotics. Mimicking such situations with animal models would require long, tedious, and expensive studies. Are such studies really required for the development of human phage therapy? The answer to this question will depend in part on the regulations applied to bacteriophage treatments. Authorization procedures for clinical trials in Europe do not currently appear to be entirely compatible with the real evolving nature of bacteriophages (Verbeken *et al.*, 2007). However, this has not stood in the way of the completion of several trials, which will hopefully supply the regulators with additional data, enabling them to eventually adapt the current regulations (Pirnay *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2009).

ACKNOWLEDGMENT

Work in the author's laboratory is supported by the French cystic fibrosis foundation, Vaincre la Mucoviscidose, Grants IC0704 and IC1011.

REFERENCES

Asboe, D., Gant, V., Aucken, H. M., Moore, D. A., Umasankar, S., Bingham, J. S., Kaufmann, M. E., and Pitt, T. L. (1998). Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* strains in respiratory infection in AIDS patients. *AIDS (London, England)* **12:**1771–1775.

Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G. P. F., Filloux, A., and Voulhoux, R. (2010). Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *Int. J. Med. Microbiol.* **300:**534–543.

Bonomo, R. A., and Szabo, D. (2006). Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis* **43**(Suppl 2)**:**S49–S56.

Bragonzi, A. (2010). Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **300:**584–593.

Brüssow, H. (2005). Phage therapy: The *Escherichia coli* experience. *Microbiol.* **151:**2133–2140.

Brüssow, H. (2007). Bacteria between protists and phages: From antipredation strategies to the evolution of pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **65:**583–589.

Brüssow, H., Canchaya, C., and Hardt, W.-D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68:**560–602.

Carmody, L. A., Gill, J. J., Summer, E. J., Sajjan, U. S., Gonzalez, C. F., Young, R. F., and LiPuma, J. J. (2010). Efficacy of bacteriophage therapy in a model of *Burkholderia cenocepacia* pulmonary infection. *J. Infect. Dis.* **201:**264–271.

Ceyssens, P.-J., and Lavigne, R. (2010). Bacteriophages of Pseudomonas. *Future Microbiol.* **5:**1041–1055.

Chhibber, S., Kaur, S., and Kumari, S. (2008). Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice. *J. Med. Microbiol.* **57:**1508.

Chiller, K., Selkin, B. A., and Murakawa, G. J. (2001). Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **6:**170–174.

Corey, M., and Farewell, V. (1996). Determinants of mortality from cystic fibrosis in Canada, 1970–1989. *Am. J. Epidemiol.* **143:**1007–1017.

Cortez, D., Forterre, P., and Gribaldo, S. (2009). A hidden reservoir of integrative elements is the major source of recently acquired foreign genes and ORFans in archaeal and bacterial genomes. *Genome Biol.* **10:**R65.

Coyne, S., Courvalin, P., and Galimand, M. (2010). Acquisition of multidrug resistance transposon Tn6061 and IS6100-mediated large chromosomal inversions in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Microbiology* **156:**1448–1458.

Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V., and Touqui, L. (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J. Infect. Dis.* **201:**1096–1104.

Denou, E., Bruttin, A., Barretto, C., Ngom-Bru, C., Brüssow, H., and Zuber, S. (2009). T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: Potential and problems. *Virology* **388:**21–30.

Deplano, A., Denis, O., Poirel, L., Hocquet, D., Nonhoff, C., Byl, B., Nordmann, P., Vincent, J. L., and Struelens, M. J. (2005). Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* **43:**1198–1204.

Disson, O., Grayo, S., Huillet, E., Nikitas, G., Langa-Vives, F., Dussurget, O., Ragon, M., Le Monnier, A., Babinet, C., Cossart, P., and Lecuit, M. (2008). Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. *Nature* **455:**1114–1118.

Falagas, M. E., Koletsi, P. K., and Bliziotis, I. A. (2006). The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **55:**1619–1629.

Ferroni, A., Guillemot, D., Moumile, K., Bernede, C., Le Bourgeois, M., Waernessyckle, S., Descamps, P., Sermet-Gaudelus, I., Lenoir, G., Berche, P., and Taddei, F. (2009). Effect of mutator *P. aeruginosa* on antibiotic resistance acquisition and respiratory function in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **44:**820–825.

Fichtenbaum, C. J., Woeltje, K. F., and Powderly, W. G. (1994). Serious *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients infected with human immunodeficiency virus: A case-control study. *Clin. Infect. Dis.* **19:**417–422.

Fuhrman, J. A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* **399:**541–548.

Graber Duvernay, B. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* et infections bronchopulmonaires. *Presse Therm. Clim.* **139:**35–40.

Hagens, S., Habel, A., Von Ahsen, U., Von Gabain, A., and Blasi, U. (2004). Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48:**3817.

Hawkins, C., Harper, D., Burch, D., Anggård, E., and Soothill, J. (2010). Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: A before/after clinical trial. *Vet. Microbiol.* **146:**309–313.

Heiniger, R. W., Winther-Larsen, H. C., Pickles, R. J., Koomey, M., and Wolfgang, M. C. (2010). Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell. Microbiol.* **12:**1158–1173.

Heo, Y.-J., Lee, Y.-R., Jung, H.-H., Lee, J., Ko, G., and Cho, Y.-H. (2009). Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and D*rosophila melanogaster*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53:**2469–2474.

Kiska, D. L., Gilligan, P. H., and Murray, P. (2003). Pseudomonas. Manual of Clinical Microbiology, Vol. 1, pp. 719–728. Washington, DC, American Society for Microbiology Press.

Kumari, S., Harjai, K., and Chhibber, S. (2009a). Bacteriophage treatment of burn wound infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO in BALB/c mice. *Am. J. BioMed. Sci.* **1:**385–394.

Kumari, S., Harjai, K., and Chhibber, S. (2009b). Efficacy of bacteriophage treatment in murine burn wound infection induced by *Klebsiella pneumoniae*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19:**622–628.

Kumari, S., Harjai, K., and Chhibber, S. (2010). Evidence to support the therapeutic potential of bacteriophage Kpn5 in burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in BALB/c mice. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20:**935–941.

Kumari, S., Harjai, K., and Chhibber, S. (2011). Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055. *J. Med. Microbiol.* **60:**205–210.

Kutateladze, M., and Adamia, R. (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.* **28:**591–595.

Lee, D. G., Urbach, J. M., Wu, G., Liberati, N. T., Feinbaum, R. L., Miyata, S., Diggins, L. T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., Friedman, L., Li, L., *et al.* (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **7:**R90–R.

Livermore, D. M. (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa:* Our worst nightmare? *Clin. Infect. Dis.* **34:**634–640.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* **2:**1051–1060.

Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2002). Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15:**194.

Markoishvili, K., Tsitlanadze, G., Katsarava, R., Morris, J. G., Jr., and Sulakvelidze, A. (2002). A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int. J. Dermatol.* **41:**453–458.

Marza, J. A. S., Soothill, J. S., Boydell, P., and Collyns, T. A. (2006). Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns* **32:**644–646.

Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J. M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C. N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., *et al.* (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105:**3100–3105.

Mayhall, C. G. (2003). The epidemiology of burn wound infections: Then and now. *Clin. Infect. Dis.* **37:**543–550.

McVay, C. S., Velasquez, M., and Fralick, J. A. (2007). Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51:**1934–1938.

Meitert, E., Petrovici, M., Sima, F., Costache, G., and Savulian, C. (1987). Investigation on the therapeutical efficiency of some adapted bacteriophages in experimental infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Roumaines Pathol. Exp. Microbiol.* **46:**17–26.

Merabishvili, M., Verhelst, R., Glonti, T., Chanishvili, N., Krylov, V., Cuvelier, C., Tediashvili, M., and Vaneechoutte, M. (2007). Digitized fluorescent RFLP analysis

(fRFLP) as a universal method for comparing genomes of culturable dsDNA viruses: Application to bacteriophages. *Res. Microbiol.* **158:**572–581.

Morello, E., Saussereau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L., and Debarbieux, L. (2011). Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: First steps towards treatment and prevention. *PloS One* **6:**e16963.

Morrison, A. J., Jr., and Wenzel, R. P. (1984). Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **6**(Suppl. 3)**:**S627–S642.

Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., and Labia, R. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37:**962.

Pier, G. B., and Ramphal, R. (2009). Pseudomonas aeruginosa. *In* ''Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases'' (G. L. Mandell, ed.), 7th Ed, Vol. 2, pp. 2835–2860. Edinburgh, Churchill Livingstone.

Pirnay, J.-P., Bilocq, F., Pot, B., Cornelis, P., Zizi, M., Van Eldere, J., Deschaght, P., Vaneechoutte, M., Jennes, S., Pitt, T., and De Vos, D. (2009). *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PloS One* **4:**e7740.

Pirnay, J. P., De Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vaneechoutte, M., Zizi, M., Laire, G., Lavigne, R., Huys, I., Vanden Mooter, G., Buckling, A., *et al.* (2011). The phage therapy paradigm: Prêt-à-porter or sur-mesure? *Pharm. Res.*1–4.

Poirel, L., Carrër, A., Pitout, J. D., and Nordmann, P. (2009). Integron mobilization unit as a source of mobility of antibiotic resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53:**2492–2498.

Poole, K. (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49:**479–487.

Ramphal, R., Balloy, V., Huerre, M., Si-Tahar, M., and Chignard, M. (2005). TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J. Immunol.* **175:**3927–3934.

Ramphal, R., Balloy, V., Jyot, J., Verma, A., Si-Tahar, M., and Chignard, M. (2008). Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. *J. Immunol.* **181:**586–592.

Randall, T., and Irvin, R. T. (2008). Adherence of *Pseudomonas aeruginosa*. *In* ''Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory'' (B. Rehm, ed.), pp. 45–84. Wiley-VCH.

Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., and Sulakvelidze, A. (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: Results of a phase I safety trial. *J. Wound Care* **18**(237–238)**:**240–243.

Rice, S. A., Tan, C. H., Mikkelsen, P. J., Kung, V., Woo, J., Tay, M., Hauser, A., McDougald, D., Webb, J. S., and Kjelleberg, S. (2008). The biofilm life cycle and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* are dependent on a filamentous prophage. *ISME J.* **3:**271–282.

Roy, P. H., Tetu, S. G., Larouche, A., Elbourne, L., Tremblay, S., Ren, Q., Dodson, R., Harkins, D., Shay, R., Watkins, K., Mahamoud, Y., and Paulsen, I. T. (2010). Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7. *PLoS One* **5:**e8842.

Salzberg, S. L., Sommer, D. D., Puiu, D., and Lee, V. T. (2008). Gene-boosted assembly of a novel bacterial genome from very short reads. *PLoS Comp. Biol.* **4:**e1000186.

Soothill, J. S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J. Med. Microbiol.* **37:**258–261.

Stewart, R. M. K., Wiehlmann, L., Ashelford, K. E., Preston, S. J., Frimmersdorf, E., Campbell, B. J., Neal, T. J., Hall, N., Tuft, S., Kaye, S. B., and Winstanley, C. (2011). Genetic characterization indicates that a specific subpopulation of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with keratitis infections. *J. Clin. Microbiol.* **49:**993–1003.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L.,

et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406:**959–964.

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., and Morris, J. G., Jr. (2001). *Bacteriophage therapy. Antimicrob. Agents Chemother.* **45:**649.

Thiel, K. (2004). Old dogma, new tricks: 21st century phage therapy. *Nat. Biotechnol.* **22:**31–36.

Tinsley, C. R., Bille, E., and Nassif, X. (2006). Bacteriophages and pathogenicity: More than just providing a toxin? *Microbes Infect.* **8:**1365–1371.

Vaca-Pacheco, S., Paniagua-Contreras, G. L., García-González, O., and de la Garza, M. (1999). The clinically isolated FIZ15 bacteriophage causes lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr. Microbiol.* **38:**239–243.

Vento, S., Cainelli, F., and Temesgen, Z. (2008). Lung infections after cancer chemotherapy. *Lancet Oncol.* **9:**982–992.

Ventura, G. M., de, C., Balloy, V., Ramphal, R., Khun, H., Huerre, M., Ryffel, B., Plotkowski, M. C. M., Chignard, M., and Si-Tahar, M. (2009). Lack of MyD88 protects the immunodeficient host against fatal lung inflammation triggered by the opportunistic bacteria *Burkholderia cenocepacia*. *J. Immunol* **183:**670–676.

Verbeken, G., De Vos, D., Vaneechoutte, M., Merabishvili, M., Zizi, M., and Pirnay, J.-P. (2007). European regulatory conundrum of phage therapy. *Future Microbiol.* **2:**485–491.

Vinodkumar, C., Kalsurmath, S., and Neelagund, Y. (2008). Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **51:**360.

Wang, J., Hu, B., Xu, M., Yan, Q., Liu, S., Zhu, X., Sun, Z., Reed, E., Ding, L., Gong, J., Li, Q. Q., and Hu, J. (2006). Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Mol. Med.* **17:**309.

Watanabe, R., Matsumoto, T., Sano, G., Ishii, Y., Tateda, K., Sumiyama, Y., Uchiyama, J., Sakurai, S., Matsuzaki, S., Imai, S., and Yamaguchi, K. (2006). Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51:**446–452.

Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., and Greenberg, E. P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413:**860–864.

Wibbenmeyer, L., Danks, R., Faucher, L., Amelon, M., Latenser, B., Kealey, G. P., and Herwaldt, L. A. (2006). Prospective analysis of nosocomial infection rates, antibiotic use, and patterns of resistance in a burn population. *J. Burn Care Res.* **27:**152–160.

Winstanley, C., Langille, M. G. I., Fothergill, J. L., Kukavica-Ibrulj, I., Paradis-Bleau, C., Sanschagrin, F., Thomson, N. R., Winsor, G. L., Quail, M. A., Lennard, N., Bignell, A., Clarke, L., *et al.* (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of *in vivo* competitiveness in the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* **19:**12–23.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P., and Edmond, M. B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: Analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39:**309–317.

Wright, A., Hawkins, C. H., Anggård, E. E., and Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin. Otolaryngol.* **34:**349–357.

Zavascki, A. P., Carvalhaes, C. G., Picão, R. C., and Gales, A. C. (2010). Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev. Anti-Infective Ther.* **8:**71–93.

ARTICLE 5 (Article de revue)

La mucoviscidose et autres canalopathies

Aleksander Edelman et Emilie Saussereau

Archives de pédiatrie (2012). **19 Suppl.1** : S13-S16

Résumé de l'article :

La mucoviscidose est une maladie qui trouve son origine dans les différentes mutations du gène *cftr*, un canal anionique des épithéliums.

Cette revue expose les principales propriétés du canal CFTR ainsi que l'importance de ses interactions avec d'autres protéines dans la compréhension de la pathogénèse. D'autres canalopathies, causées par le dysfonctionnement de différents canaux ioniques interagissant avec CFTR ou potentiellement alternatifs à celui-ci dans la mucoviscidose, sont également décrites brièvement.

Ainsi, est mis en avant la complexité du réseau d'interaction formé autour de la protéine CFTR et l'importance d'en déterminer les différents acteurs afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Physiopathologie/
Génétique

Article

La mucoviscidose et autres canalopathies

Cystic Fibrosis and other channelopathies

A. Edelman*, E. Saussereau

INSERM U845, Université Paris-Descartes, Faculté de Médicine Necker, 156 rue de Vaugirard, 75015 Paris, France.

Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Summary

Mutations in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene, CFTR, are responsible for cystic fibrosis, CF, a channelopathie. CFTR protein is a multifunctional protein with a main function of Cl^- channel. CFTR is expressed in epithelia (upper airways, intestine, pancreas etc.). In the first part of this revue, we describe the main properties of CFTR underlying that it is not only a Cl^- channel protein but also a multifunctional protein. We present a hypothesis which postulates that CFTR is a hub protein interacting with more than 140 proteins, and through these interactions regulates a number of functions which are abnormal in CF (ion transport, inflammation etc.). In the second part of the revue we briefly present a selection of other epithelial channelopathies due to mutations in genes of other Cl^- or cation channels. Of note, these channels either interacts with CFTR or are considered as alternative channels in CF, and, as such, are targets for pharmacotherapies. We want to leave the reader with a message that to investigate channalopathies, to dissect the molecular mechanisms underlying channels'activity, allow not only to better understand basic mechanisms of channel regulation but *in fine*, to propose new targets for pharmacotherapies.
© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Résumé

La mucoviscidose est une canalopathie due aux mutations dans le gène CFTR qui code pour une protéine membranaire ayant la fonction principale de canal chlorure, Cl^-. CFTR est exprimé dans les épithéliums tels que les voies aériennes supérieures, les intestins, le pancréas, etc. Dans la première partie de la revue nous présentons les propriétés principales de CFTR, en soulignant qu'il s'agit d'une protéine multifonctionnelle. Nous présentons l'hypothèse proposant CFTR comme une protéine « hub » qui interagirait avec plus de 140 protéines et de ce fait, régulerait de nombreuses fonctions physiologiques, anormales chez les patients atteints de mucoviscidose (transport ionique, inflammation, etc.). Dans la deuxième partie, nous présentons brièvement les autres canalopathies dues à des mutations dans les gènes codant pour d'autres canaux Cl^- ou cationiques. Ces canaux soit interagissent avec CFTR soit sont considérés comme des canaux alternatifs à la protéine CFTR mutée et constituent des cibles thérapeutiques potentielles pour la mucoviscidose. Notre objectif, dans cette revue, est de souligner l'importance d'étudier les canalopathies sur le plan fondamental, de disséquer les mécanismes moléculaires d'expression et de fonctionnement des canaux/transporteurs mis en jeu, pour permettre le progrès non seulement sur ce plan fondamental mais *in fine*, proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour les différentes canalopathies.
© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.
e-mail : aleksander.edelman@inserm.fr

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.
Archives de Pédiatrie 2012;19: S13-S16

Archives de Pédiatrie 2012;19: S13-S16

1. Introduction

Une canalopathie est une maladie due à des mutations dans les gènes codant des protéine-canaux ioniques. Cette définition devrait être modifiée car certaines protéines initialement décrites comme des canaux ont en réalité une fonction d'échangeurs d'ions ou de co-transporteurs. Il faut désormais parler de canalopathies et de transportopathies. Chez l'homme, un grand nombre de mutations identifiées dans des canaux ioniques sont responsables de maladies dont la liste continue d'augmenter. Il s'agit souvent de mutations de type soit « perte de fonction » *(« loss-of function »)* soit « gain de fonction » (« *gain-of-function* ») [1]. La mucoviscidose, MV, est une maladie due à des mutations du type « perte de fonction ». Nous présentons ici l'importance de la régulation/dysrégulation des canaux et transporteurs ioniques dans le contexte de la mucoviscidose.

2. Rappels

Chaque cellule est entourée d'une membrane plasmique et possède dans son cytoplasme des vésicules entourées de membranes composées de phospholipides, de cholestérol et de protéines membranaires. Cette composition confère à ces membranes plasmiques ou vésiculaires, une perméabilité sélective leur permettant de contrôler les échanges avec le milieu extracellulaire/vésiculaire. Ainsi, une différence de concentration des ions entre les milieux intracellulaire/vésiculaire et extracellulaire/vésiculaire est maintenue (gradients chimiques) créant une séparation de charges au niveau de la membrane. Cette dernière possédant une haute résistance électrique, en résulte une force électrique, le potentiel de membrane (gradient électrique, V_m). Il existe ainsi pour chaque ion composant ces milieux, et ayant des concentrations différentes dans les deux milieux, un potentiel chimique d'équilibre de l'ion (E_{ion}) définit par l'équation de Nernst. Sa différence avec le potentiel de membrane détermine le gradient électrochimique de l'ion (E1). Ce rôle est assuré par trois type de protéines présentes dans les membranes plasmiques/vésiculaires : canaux ioniques, échangeurs, co-transporteurs et transporteurs actifs (ou pompes). Les trois premiers transportent les ions selon leur gradient électrochimique (sans utilisation de l'énergie), les transporteurs actifs utilisent l'énergie de la cellule (par ex. l'ATP). Un canal ionique transporte ~10^7-10^9 ions par seconde, un transporteur (échangeur ionique ou co-transporteur) ~ 10^5-10^8 ions par seconde, et une pompe ~10^3-10^4 ions par seconde. Il existe des canaux cationiques (qui transportent préférentiellement les cations, par exemple Na^+, K^+, H^+, Ca^{2+}), des canaux anioniques (qui transportent préférentiellement les anions, par exemple Cl^-) et des canaux non sélectifs (qui transportent à la fois anions et cations).

Les canaux, transporteurs et pompes assurent les principales fonctions des cellules : contraction musculaire, potentiel d'action dans les neurones, régulation du transport des fluides dans les épithéliums. Les canaux présents dans les organelles et vésicules intracellulaires modulent également le pH intravésiculaire.

3. CFTR, protéine multifonctionnelle et mucoviscidose

La canalopathie épithéliale probablement la plus étudiée est la mucoviscidose (MV). La MV est due à différentes mutations dans le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) [2].

La protéine CFTR, le produit de ce gène, est une protéine multifonctionnelle dont la fonction principale est celle de canal Cl^-. La mutation la plus fréquente dans la MV, la délétion d'une phénylalanine en position 508 (ΔF508) dans la protéine CFTR, conduit à la synthèse de protéines mal repliées qui s'insèrent mal ou pas dans la membrane, ce qui entraîne des anomalies du transport des fluides consécutives au défaut de transport de Cl^- dans différents organes, dont le poumon et l'intestin.

Le rôle clé des canaux Cl^- dans la régulation du transport ionique a été progressivement démontré dans les années 1980 quand les physiologistes ont découvert que le dysfonctionnement d'un canal Cl^- était associé à une sécrétion anormale des fluides chez les patients atteints de la MV. Il est admis que la protéine CFTR est localisée dans la membrane apicale des épithéliums de transport de fluides (épithélium respiratoire des voies aériennes, épithélium intestinal...) et constitue un facteur limitant pour l'absorption du Na^+ et des fluides. Le transport de Na^+ s'effectue par le canal Na^+ sensible à l'amiloride, ENaC. Il est aussi admis que CFTR régule directement ou indirectement ce canal de manière négative. Lorsque CFTR n'est pas fonctionnel, ENaC est hyperactif conduisant à une hyperabsorption de Na^+, observée dans la MV. Dans les épithéliums, a également lieu une sécrétion de Cl^- assurée par les canaux Cl^- dépendants de Ca^{2+} dont le gène d'un des principaux à été récemment identifié (TMEMA16A et B, [3]), ou encore des canaux Cl^- voltage dépendant tel que ClC2. Cependant, leur activité n'est pas suffisante pour assurer le transport de Cl^- et par conséquent de fluide lorsque CFTR n'est pas fonctionnel [4,5].

Par ailleurs, CFTR régule de façon indirecte le canal K^+- ATP dépendant, ROMK, localisé à la membrane basolatérale de l'épithélium.

Enfin, CFTR est aussi perméable à d'autres anions tels les HCO_3^- ou encore le glutathion. Le bicarbonate participe à la régulation du pH luminal (surtout important dans le poumon et le pancréas), le glutathion dans la réponse au stress oxydant. Il apparaît de plus en plus que les anomalies des fonctions liées au transport de HCO_3^- et du glutathion sont particulièrement importantes chez les patients atteints de MV. La conséquence de ces dysfonctionnements de la protéine CFTR dans le poumon sont : une sécrétion des fluides anormale, une sécrétion de mucines anormale, l'épaississement du mucus, une réponse anormale à l'infection bactérienne et une inflammation chronique. Au niveau cellulaire (épithélial), il est aussi observé un défaut d'exocytose et d'endocytose, de l'inflammation anormale (production de cytokine et de prostaglandines), un métabolisme mitochondrial du glutathion anormal, un défaut de la dépéroxidation des lipides, un défaut du cytosquelette lié au routage des protéines, etc. La protéine CFTR est donc une protéine multifonctionnelle.

L'hypothèse de plus en plus admise qui permet de rendre compte des si nombreuses anomalies liées au dysfonctionnement d'une seule protéine (CFTR) postule que CFTR est une protéine d'ancrage ou « hub » dans un réseau de protéines dont les fonctions sont variées, incluant des protéines de transport ionique, des protéines d'inflammation, de stress oxydant du cytosquelette et des protéines « adaptatrices ». Cette hypothèse prend en compte l'existence d'au moins 140 protéines qui interagissent directement au 1er ou 2e degré avec CFTR. Parmi les protéines qui interagissent au 1er degré sont retrouvés les canaux Cl^-, ClC^{3-}, SLC26A8, un échangeur Cl^-/HCO^{3-}, les protéines adaptatrices NHERF1 et 2, S100A10, ou encore une protéine de cytosquelette, la kératine 8 (qui interagit seulement avec F508delCFTR). C'est par l'intermédiaire de ces protéines que les liens avec d'autres protéines de transport (échangeur Na/H, canaux TRPC) et d'inflammation (annexine 1, phospholipase cytosolique) sont faits. De façon indépendante, il a été montré que les canaux K-ATP, ORCC et canaux à eau (aquaporine 3) sont régulés par CFTR. Il est très vraisemblable qu'une protéine CFTR anormale ne soit plus

1 *La valeur de E détermine si un transporteur est passif ou actif : pour un cation si V_m-E_{ion} > 0 correspond au flux sortant-passif (pour un anion flux entrant-passif).*

capable d'interagir correctement avec ses partenaires, entraînant le dysfonctionnement dans d'autres fonctions cellulaires.
Il est donc clair que le dysfonctionnement de CFTR seul ne suffit pas à comprendre l'ensemble des symptômes de la maladie dont l'inflammation chronique et la variabilité des troubles observés, et qu'il est nécessaire d'étudier son interactome différentiel, préciser les sites d'interaction, pour identifier les cibles de nouvelles pharmacothérapies.

4. Autres canalopathies

Outre la mucoviscidose, d'autres canalopathies/transportopathies ont été identifiées. Les mutations ont été trouvées aussi bien dans des gènes codant des transporteurs anioniques que cationiques. Leurs études nourrissent les recherches sur la mucoviscidose et *vice versa*. Il nous a paru opportun de les présenter brièvement en se limitant aux canaux chlorure de type ClC, aux canaux cationiques de type TRP, et au canal ENaC. Notons que certaines des protéines-canaux associées avec ces autres maladies génétiques interagissent avec CFTR.

4.1. Transporteurs anioniques

Les autres canaux Cl^- outre CFTR, dont les mutations sont associées à des maladies génétiques sont de trois types, les canaux voltage dépendants (ClC) [6], canaux Cl^- dépendant du calcium et les canaux récepteurs. Les mutations dans les gènes de ces protéines sont principalement impliquées dans les maladies épithéliales, osseuses et neurologiques.
La famille des canaux *ClC* comprend neuf protéines membranaires, dont certaines sont des canaux et d'autres des échangeurs. Les mutations dans les gènes *ClC* ont été décrites dans les maladies suivantes :
• les myotonies de Thompson (maladie génétique autosomale dominante) ou de Becker (maladie génétique autosomale récessive) sont caractérisées par une contraction musculaire excessive. Elles sont dues aux mutations dans le gène ClC-1 [7] ;
• les mutations dans les gènes des canaux ClCkb/barttin provoquent certaines formes du syndrome de Bartter, une maladie rénale caractérisée par la perte rénale des sels et une hypotension chronique. ClC-Kb, encodée par le *CLCNKB*, est exprimée dans le rein et permet l'absorption de sodium dans la partie distale du néphron. Elle est également exprimée dans l'oreille interne et les mutations au sein des gènes des canaux ClCKa/CLCKb et barttin sont responsables de surdité en altérant une sensibilité au Ca^{2+} des canaux ClCK ;
• la maladie de Dent, une maladie rénale caractérisée par une perte rénale des protéines, responsable d'une protéinurie, une hypercalciurie et une hyperphosphaturie, par le développement de calculs rénaux et dans certains cas par une insuffisance rénale [8]. Il s'agit de mutations dans le gène codant la protéine ClC-5, un échangeur $H^+/2Cl^-$ [7] ;
• différentes formes des céroïdes-lipofuscinoses neuronales dont la maladie de Kuf, maladies dégénératives de surcharge lysosomale caractérisées par une détérioration progressive neurologique et mentale [7], sont dues à des mutations sur différents gènes dont certains sont des protéines-canaux, par exemple *CLCN6* (CLC-6) ;
• l'ostéopétrose, une maladie osseuse caractérisée par une hyperminéralisation. Elle est associée aux mutations dans le gène *ClCN7*. La protéine ClC-7 est exprimée dans les ostéoclastes et localisée dans les membranes lysosomales au contact avec la matrice osseuse. Il a été proposé que ClC-7 régule l'activité de la pompe H^+ ATPase et/ou qu'il participe à l'insertion des lysosomes dans la membrane plasmique [8].

4.2. Canaux cationiques TRP : maladies rénales et neurologiques [9-11]

Les différents membres d'une superfamille de canaux cationiques souvent sélectifs aux cations divalents, Ca^{2+} et Mg^{2+}, appelés canaux TRP (*transient receptor potential cation channels*) sont associés à de nombreuses canalopathies. Les TRPs participent à la régulation de l'homéostasie et aux différentes voies de signalisation. À ce jour, 28 membres de cette famille ont été identifiés. Ils sont divisés en six sous-familles selon l'homologie de structure et de fonction : TRP cannonique (TRPC), TRP- dépendant de la mélastatine (TRPM), TRP liés au récepteur de vanilloïde (TRPV), l'ankyrine (TRPA), mucolipine (TRPML) et polycystine (TRPP). Les canaux TRP sont exprimés dans de nombreux tissus, les mutations de neuf d'entre eux sont associées à différentes maladies génétiques rénales ou neurologiques. Parmi elles :
• la mucolipidose de type IV (MLIV), une maladie neurodégénérative développée rapidement après la naissance. Les mutations dans le gène TRPML (*MCOLN1*), qui code pour la protéine TRPML1, sont du type « perte de fonction ». Sa fonction est celle de canal Ca^{2+} mais elle pourrait transporter les protons et assurer une acidification des lysosomes. Les mutations dans *MCOLN1* conduisent à la perte de sélectivité et de perméabilité de TRPML1 [9] ;
• la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est une maladie génétique qui se développe tardivement dans la vie [12]. Elle est associée aux mutations dans les gènes PKD1 et PKD2 qui codent pour les canaux cationiques TRPP1 (*polycystin 1*) et TRPP2 (*polycystin 2*) [10]. TRPP1 et TRPP2 forment un complexe, TRPP1 étant le régulateur de TRPP2 [10] ;
• hyalinose segmentaire et focale (HSF), une maladie génétique autosomale dominante qui est associée à des mutations « gain de fonction » dans le gène TRPC6 entre autres, qui code pour un canal cationique non-sélectif [10,13] ;
• hypomagnésémie avec hypocalcémie secondaire (HHS) est une maladie génétique rare récessive et autosomale, liée aux mutations « perte de fonction » dans le gène TRPM6 [13]. Elle est caractérisée par une magnésurie basse consécutive à un défaut d'absorption intestinale et aux pertes rénales de Mg^{2+}. Une diminution d'expression des canaux TRPC1 a été décrite dans le rein et le foie des patients présentant la néphropathie diabétique [10].

4.3. Canal Na^+ ENaC [14]

Le canal Na^+ sensible à l'amiloride, ENaC, est un canal exprimé dans le néphron (tubule distal), l'intestin (colon), l'épithélium respiratoire des voies aériennes... Les mutations du type « perte de fonction » dans n'importe quelle sous-unité d'ENaC sont associées au pseudo-hypoaldosteronisme (PHA), une anomalie de la réponse tubulaire rénale à l'aldostérone, alors que les mutations « gain de fonction » sont associées au syndrome de Liddle, une maladie autosomale dominante conduisant rapidement à l'hypertension.

5. Conclusions

Les canalopathies constituent une nouvelle entité physiopathologique associée à des maladies génétiques multifactorielles. Le concept des protéines *hubs* conduit à s'intéresser aux réseaux protéiques et à leur rôle dans la symptomatologie de ces pathologies. La mucoviscidose peut être considérée comme modèle pour cette approche et pour étudier les nouvelles cibles thérapeutiques contre les autres canalopathies épithéliales.

Déclarations d'intérêts

Les auteurs ont déclaré n'avoir aucun conflit d'intérêts pour cet article.

Références

[1] Planells-Cases R, Jentsch TJ. Chloride channelopathies. Biochim Biophys Acta 2009;1792:173-89.
[2] Ollero M, Brouillard F, Edelman A. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions. Proteomics 2006;6:4084-99.
[3] Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. Science 2008;322:590-4.
[4] Fritsch J, Edelman A. Modulation of the hyperpolarization-activated Cl- current in human intestinal T84 epithelial cells by phosphorylation. J Physiol 1996;490 (Pt 1):115-28.
[5] Hubner CA, Jentsch TJ. Ion channel diseases. Hum Mol Genet 2002;11:2435-45.
[6] Jentsch TJ. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. Crit Rev Biochem Mol Biol 2008;43:3-36.
[7] Poet M, Kornak U, Schweizer M, et al. Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein ClC-6. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:13854-9.
[8] Wellhauser L, D'Antonio C, Bear CE. ClC transporters: discoveries and challenges in defining the mechanisms underlying function and regulation of ClC-5. Pflugers Arch 2010;460:543-57.
[9] Kiselyov K, Soyombo A, Muallem S. TRPpathies. J Physiol 2007;578: 641-53.
[10] Woudenberg-Vrenken TE, Bindels RJ, Hoenderop JG. The role of transient receptor potential channels in kidney disease. Nat Rev Nephrol 2009;5:441-9.
[11] Torres VE, Harris PC. Autosomal dominant polycystic kidney disease: the last 3 years. Kidney Int 2009;76:149-68.
[12] Boucher C, Sandford R. Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD, MIM 173900, PKD1 and PKD2 genes, protein products known as polycystin-1 and polycystin-2). Eur J Hum Genet 2004;12:347-54.
[13] Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, et al. TRPM6 and TRPM7-Gatekeepers of human magnesium metabolism. Biochim Biophys Acta 2007;1772:813-21.
[14] Rotin D. Role of the UPS in Liddle syndrome. BMC Biochem 2008;9 (Suppl 1):S5.