UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE : SSBCV

UMR1282 Infectiologie Santé Publique

Equipe Signalisation, Portage et Virulence Bactérienne

THÈSE présentée par :

Marianne NICOLAS

soutenue le : **21 septembre 2023**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**
Discipline / Spécialité : Sciences de la vie et de la santé – Microbiologie

Biocontrôle de la colibacillose aviaire par les bactériophages

THÈSE dirigée par :

Mme SCHOULER Catherine	Directrice de recherche, INRAE-ISP, Tours

PRÉSIDENT :

M. LANOTTE Philippe	PU-PH, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M. DOZOIS Charles	Professeur, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval (Canada)
M. FROISSART Rémy	Chargé de recherche, CNRS, Marseille

JURY :

M. DOZOIS Charles	Professeur, INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Laval (Canada)
M. FROISSART Rémy	Chargé de recherche, CNRS, Marseille
Mme HERVE Virginie	Maître de conférences, CEPR, Tours
M. LANOTTE Philippe	PU-PH, Université de Tours
Mme TORRES-BARCELO Clara	Maître de conférences, INRAE-PaVé, Avignon
Mme SCHOULER Catherine	Directrice de recherche, INRAE-ISP, Tours

Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterai remercier les membres de mon jury de m'avoir accordé de leur temps pour évaluer ce travail. Merci à Rémy Froissart et à Charles Dozois d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Merci à Clara Torres-Barcello et Virginie Hervé d'avoir accepté d'examiner cette thèse. Et merci à Philippe Lanotte d'avoir accepté de présider le jury.

Cathy, merci de m'avoir offert l'opportunité de réaliser une thèse sur un sujet aussi passionnant. Merci pour ton encadrement bienveillant, tes conseils avisés, ta disponibilité et ta confiance. Ton soutien sur le plan professionnel autant que personnel m'a été d'une grande aide. Merci également de m'avoir permis de présenter mes résultats dans des congrès scientifiques reconnus dans le milieu des phages (et pour tes conseils de gestion du stress lors des vols !). Enfin, merci de m'avoir transmis toute ta rigueur professionnelle. Sans toi, cette thèse n'aurait pas été aussi bien construite.

Je remercie tous les membres de l'équipe SPVB de m'avoir accueilli et de m'avoir épaulé malgré mon sujet atypique au sein de l'équipe. Les pauses thé avec vous tous vont me manquer. Je remercie particulièrement Isabelle Virlogeux-Payant et Philippe Velge de m'avoir fait profiter de leurs conseils scientifiques, Jérôme Trotereau pour ses conseils techniques très rigoureux et Pierrette Menanteau pour toute son aide technique. Merci également à l'ex-équipe PCA, notamment Angélina Trotereau avec qui je n'ai passé que deux mois mais qui m'a énormément appris sur la technicité des phages.

Je remercie Sébastien Leclercq, Eric Morello et Francis Repoila pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon projet de recherche et pour leurs conseils enrichissants lors de mon comité de thèse scientifique. Aussi, merci à Pierre Germon pour nos discussions et ses conseils sur mon futur professionnel lors du comité de suivi individuel.

Merci à la Plateforme d'Infectiologie Expérimentale, notamment aux animaliers pour leur travail soigné sur les animaux et leur disponibilité.

Je souhaite remercier toutes les personnes du service d'appui qui ont contribué au bon déroulement de ce travail, particulièrement Brigitte Lambert, Véronique Legros, Karine Breheret, Katia Tondellier, Céline Musset, Stéphanie Salmon et Diana Fontaine.

Merci aux deux stagiaires qui ont participé à ce projet : Camille Hagnéré et Amélie Heslot-Fouquer. Je remercie également les stagiaires qui sont passés au sein de l'équipe SPVB durant ces années et avec qui j'ai passé de bons moments, en particulier Anne-Sophie Huguet.

Ensuite, un grand merci à toutes les personnes de l'unité avec qui j'ai pu passer des moments plus conviviaux en dehors du laboratoire. Merci aux anciens et actuels thésards : Michaël, Lorna, Cassandra, Morgane, Marine, Michel, Joshua, Mégane et Anne-Emmanuelle. Un merci plus personnel aux collègues et amis pour tous les déjeuners en 213 et les soirées jeux de société – pizza – au bar - escalade (rayer la mention inutile) : Morgane, Marine, Joshua, Elise, Morgane (n°2), Tiffany, Mégane et Michel. J'espère continuer à vous voir et partager de bons moments avec vous !

Un grand merci à Lorna, avec qui j'ai partagé le bureau et la thématique de recherche pendant trois ans. Merci pour ton soutien tant professionnel que personnel et ton optimiste à toute épreuve. Je n'oublierai pas ces moments et je te souhaite tout mon courage pour la suite. Tu n'as jamais été aussi proche de la fin qu'aujourd'hui.

Merci à mes amis, notamment à Alice pour son amitié et nos soirées qui m'ont toujours permis de décompresser. Je remercie mes parents, mes frères Gauthier et Hugues et aussi ma belle-famille pour leur soutien sans faille durant mon parcours. Merci d'avoir cru en moi. Un merci particulier à mon frère Hugues pour toutes les après-midis, les soirées et les sorties ensembles.

Enfin, mes derniers remerciements à Pierre qui partage ma vie depuis neuf ans. Même loin des yeux, tu as été mon pilier durant ces années de thèse. Merci pour ton soutien, ta (grande) patience, le temps que tu as passé à relire ce manuscrit morceau par morceau sans râler, tes supers gâteaux, et d'avoir cru en moi plus que moi-même. J'ai hâte de partager la suite à tes côtés.

Table des matières

Liste des figures 1
Liste des tableaux 2
Liste des abréviations 3
Introduction 2
Etat de l'art 6
Chapitre 1 : *Escherichia coli* et la colibacillose aviaire 6
1.1. *Escherichia coli* : une espèce bactérienne à multiples facettes 6
1.2. La colibacillose aviaire : une diversité de pathologies 8
1.3. Diversité des souches APEC 12
1.3.1. Une diversité de sérotypes 12
1.3.2. Une diversité de facteurs de virulence 12
1.4. Le potentiel zoonotique des souches APEC 13
1.5. Les moyens de lutte contre la colibacillose aviaire 14
1.5.1. Mesures de biosécurité 14
1.5.2. Vaccination 14
1.5.3. Traitements 16
Chapitre 2 : Les bactériophages 18
2.1. Généralités 18
2.2. Interactions phage-bactérie 19
2.2.1. Le cycle lytique 20
2.2.2. Mécanismes de résistance des bactéries et contre-attaques des phages 26
2.2.2.1. Prévention de l'adsorption phagique 28
2.2.2.2. Prévention de l'entrée de l'ADN phagique 28
2.2.2.3. Dégradation de l'ADN phagique 29
2.2.2.4. Interférence avec l'assemblage des phages 30
2.2.2.5. Interruption du cycle infectieux 30
2.3. Evolution et interaction phage-phage 31
2.4. Zoom sur quelques genres taxonomiques des coliphages 32
2.4.1. Genre Tequintavirus 33
2.4.2. Genres Tequatrovirus, Mosigvirus et Dhakavirus 34
2.4.3. Genre Justusliebigvirus 35
2.4.4. Genre Phapecoctavirus 36
2.4.5. Genre Nonagvirus 36
2.4.6. Genre Felixounavirus 37

Chapitre 3 : La phagothérapie 38
3.1. Principales caractéristiques à prendre en compte lors de l'utilisation des phages 38
3.1.1. Mode de vie strictement lytique 38
3.1.2. La gamme d'hôtes des phages 39
3.1.3. Sécurité et stabilité des suspensions phagiques 39
3.1.4. Administration des phages 40
3.1.5. Développement de la résistance aux phages 41
3.1.6. Interactions avec le système immunitaire 42
3.2. Utilisation des phages en thérapie 44
3.2.1. Les cocktails de phages 44
3.2.2. Protéines dérivées des phages 46
3.2.3. Phagothérapie combinée aux antibiotiques 47
3.3. Essais de phagothérapie contre la colibacillose aviaire 48
3.3.1. Essais thérapeutiques 48
3.3.2. Essais préventifs 54
Contexte et objectifs de la thèse 58
Résultats 62
Chapitre 4 : Isolement et caractérisation d'une collection de phages contre les souches *Escherichia coli* pathogènes aviaires et construction d'un cocktail de phage efficace *in vivo* 62
4.1. Isolement et caractérisation d'une nouvelle collection de phages contre *Escherichia coli* pathogène aviaire (Article 1) 62
4.2. Résultats complémentaires 89
4.2.1. Matériel et méthodes 89
4.2.1.1. Isolement des protéines structurales des phages du genre *Phapecoctavirus* 89
4.2.1.2. Analyse protéomique 89
4.2.1.3. Extraction et purification du peptidoglycane 90
4.2.1.4. Zymogramme 90
4.2.2. Résultats 92
Chapitre 5 : Evaluation de l'efficacité de cocktails de phages à prévenir et traiter la colibacillose aviaire 95
5.1. Evaluation de l'efficacité d'un cocktail de 8 phages 95
5.1.1. Matériel et méthodes 96
5.1.1.1. Souches bactériennes utilisées et conditions de croissance 96
5.1.1.2. Sélection des phages et préparation 96
5.1.1.3. Expérimentation animale 96
5.1.1.4. Quantification de la charge bactérienne 99

5.1.1.5. Quantification de la charge phagique 99
5.1.1.6. Identification des phages 99
5.1.1.7. Résistance aux phages des bactéries réisolées 100
5.1.1.8. Test de létalité sur embryon de poulet 100
5.1.1.9. Analyses statistiques 100
5.1.2. Résultats 101
5.1.2.1. Les phages n'ont pas réduit le taux de mortalité et le développement des lésions des poussins infectés 101
5.1.2.2. Une diminution de la colonisation intestinale de la souche BEN4358 s'est produite dans le groupe ayant reçu les phages dans l'eau de boisson 102
5.1.2.3. La résistance aux phages induit une altération de la virulence des bactéries 105
5.1.2.4. La combinaison des phages REC et ESCO3 permet une survie de tous les embryons infectés 106
5.1.3. Conclusion 107
5.2. Evaluation de l'efficacité d'un cocktail de 4 phages 109
5.2.1. L'administration in ovo d'un cocktail de phages prévient partiellement la colibacillose chez les poussins (Article 2) 109
5.2.2. Détermination de l'efficacité préventive et thérapeutique du cocktail de 4 phages 123
5.2.2.1. Matériel et méthodes 123
5.2.2.1.1. Expérimentation animale 123
5.2.2.1.2. Identification des phages des poussins décédés 125
5.2.2.1.3. Enrichissement des échantillons caecaux 125
5.2.2.2. Résultats : 126
5.2.2.2.1. Deux phages sont majoritairement détectés suite à l'infection des poussins 126
5.2.2.2.2. L'application des phages seuls n'a pas réduit le taux de mortalité 127
5.2.2.2.3. L'inoculation des phages *in ovo* uniquement a permis une diminution de la colonisation intestinale de la souche BEN4358 128
5.2.2.2.4. Le phénotype de résistance varie en fonction du traitement 130
5.2.2.3. Conclusion 131
Discussion et perspectives 133
6.1. Comment obtenir un cocktail de phages efficace contre la colibacillose aviaire ? 134
6.1.1. Limite du spectre d'hôtes des bactériophages 134
6.1.2. Résistance des bactéries aux bactériophages 137
6.1.3. L'efficacité des phages *in vivo* 138
6.2. Comment appliquer les phages aux oiseaux ? 140

6.2.1. L'administration des phages 140
6.2.2. La posologie des phages 141
6.2.3. La temporalité d'application 142
6.3. Quel est l'avenir de la phagothérapie au sein des élevages avicoles ? 142
6.3.1. Vers une approche prêt-à-porter ? 142
6.3.2. Explorer le potentiel des phages pour de nouvelles approches thérapeutiques ? 144
Bibliographie 147
Annexes 169
1. Communications dans des congrès 169
2. Communications auprès du public 169
3. Formations suivies 170

Liste des figures

Figure 1 : Principales infections associées à la colibacillose chez le poulet 9
Figure 2 : Diversité morphologique et génomique des phages 19
Figure 3 : Représentation schématique des cycles lytique et lysogénique des phages 20
Figure 4 : Vue d'ensemble des mécanismes de résistance aux phages des bactéries et des stratégies mises en place par les phages pour les contrecarrer 27
Figure 5 : Classification des coliphages (n = 1454) selon la taxonomie attribuée par ICTV 33
Figure 6 : Schéma des modules structuraux des phages ESCO5, REC, ESCO37, ESCO13 et ESCO25 .. 93
Figure 7 : Détection par zymogramme d'enzymes de capsides des phages ESCO5, ESCO37 et REC dégradant le lysozyme 94
Figure 8 : Schéma du protocole expérimental pour évaluer l'efficacité prophylactique et thérapeutique du cocktail de 8 phages 97
Figure 9 : Représentation de l'inoculation des œufs embryonnés au 17ème jour d'embryogenèse .. 98
Figure 10 : Mortalité et développement de lésions fibrineuses des séreuses des poussins des différents groupes 102
Figure 11 : Présence et identification des phages dans les organes des poussins survivants ayant reçu le cocktail de huit phages 103
Figure 12 : Concentration bactérienne dans les organes des poussins survivants 104
Figure 13 : Résistance aux phages des clones réisolés des caeca et impact sur leur virulence 105
Figure 14 : Test d'efficacité de différentes combinaisons de phages *in ovo* 106
Figure 15 : Schéma du protocole expérimental pour évaluer l'efficacité prophylactique du cocktail de 4 phages 110
Figure 16 : Schéma du protocole expérimental pour évaluer l'efficacité prophylactique et thérapeutique du cocktail de 4 phages 124
Figure 17 : Présence et identification des phages dans les organes des poussins décédés durant l'expérience 126
Figure 18 : Mortalité et développement de lésions fibrineuses des séreuses des poussins des différents groupes 127
Figure 19 : Présence et identification des phages dans les organes des poussins survivants ayant reçu le cocktail de quatre phages 128
Figure 20 : Concentration bactérienne dans les organes des poussins survivants 129
Figure 21 : Résistance aux phages des clones réisolés des caeca 130

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition en quelques espèces bactériennes du microbiote fécal d'animaux sains ... 6

Tableau 2 : Liste des coliphages possédant une ou plusieurs polysaccharidases 23

Tableau 3 : Liste des récepteurs ciblés par les coliphages 25

Tableau 4 : Compilation des essais thérapeutiques par les phages contre des poulets infectés par APEC 50

Tableau 5 : Compilation des essais préventifs par les phages contre des poulets infectés par APEC. 54

Tableau 6 : Analyse par spectrométrie de masse des protéines structurales des Phapecoctavirus… 92

Liste des abréviations

Abi : Abortive infection system

ADN : Acide désoxyriblonucléique

AIEC : Adherent-invasive *E. coli*

APEC : Avian pathogenic *Escherichia coli*

ARN : Acide ribonucléique

Cas : CRISPR-associated

ColV : Colicine V

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DAEC : Diffuse adhering *E. coli*

DO : Densité optique

DPBS : Dulbecco's phosphate-buffered saline

ED : Embryogenic day

EIEC : Enteroinvasive *E. coli*

EOP : Efficiency of plating

EPEC : Enteropathogenic *E. coli*

ETEC : Enterotoxigenic *E. coli*

ExPEC : Extra-intestinal pathogenic *E. coli*

FAO : Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture

HGT : Transfert horizontal de gène

HMC : Hydrométhyl-cytosine

IC : Intracrânien

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses

IM : Intramusculaire

IO : Intra-œsophagien

IT : Intratrachéal

IPEC : Intestinal pathogenic *E. coli*

kb : Kilo paire de base

kDa : Kilo dalton

LB : Lysogeny Broth

LPS : Lipopolysaccharide

MOI : Multiplicy of infection

Nal : Acide nalidixique

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NMEC : Neonatal meningitis *E. coli*

OCDE *:* Organisation de Coopération et de Développement Économiques

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OMV : Vésicules de la membrane externe

ORF : Open reading frame

PAS : Phages-antibiotiques-synergie

pb : Paire de base

PCR : Polymerase chain reaction

PFIE : Plateforme Expérimentale d'Infectiologie

PI : Post-infection

PICI : Phage-inductible chromosol islands

RBP : Receptor-binding protein

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

RM : Restriction/modification

SAT : Sac aérien thoracique

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate - polyacrylmide gel electrophoresis

SEPEC : Sepsis-associated *E. coli*

SIE : Système d'exclusion de surinfection

STEC : Shiga toxin-producing *E. coli*

TA : Toxine-antitoxine

UFC : Unité formant colonie

UFP : Unité formant plaque

UPEC : Uropathogenic *E. coli*

VAL : Virion-associated lysin

Introduction

Dans le monde, les volailles constituent la première source en apport de protéines animales en alimentation humaine, que ce soit à travers la consommation de viande de volaille (129 millions de tonnes [Mt] en 2019) ou d'œufs (90 Mt en 2021). Parmi les volailles, le poulet représente la plus haute part du marché mondial (90%), suivi de la dinde (5%) et du canard (4%). En 2019, l'Europe fait partie des principaux producteurs de volailles (14,8 Mt) derrière les Etats-Unis (22,5 Mt) et la Chine (22,4 Mt). Des organismes tels que l'OCDE (organisation de coopération et de développement économiques) et la FAO (organisation pour l'alimentation et l'agriculture) estiment que dans les prochaines décennies, la production de viande de volaille va continuer de croître, au contraire de la production des viandes porcines et ovines. Le cycle de production relativement court et à faible coût, les qualités nutritionnelles de la chair de volaille et des œufs, ainsi que l'absence d'interdits religieux sont les principaux facteurs de ce développement. En raison de certaines conditions d'élevage et de la densité des oiseaux, beaucoup de maladies infectieuses affectent les volailles, telles que des infections bactériennes. Parmi elles, la colibacillose aviaire, causée par les souches *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC), est l'une des infections bactériennes les plus rencontrées chez les volailles. En raison de la grande diversité génétique des souches APEC, les vaccins disponibles sont peu capables de protection croisée, les rendant peu efficaces pour protéger les volailles de la colibacillose. Le traitement de la maladie repose donc essentiellement sur les antibiotiques, favorisant l'émergence de souches multi-résistantes. Afin de lutter contre ces bactéries résistantes et de réduire l'utilisation d'antimicrobiens dans les filières avicoles, il est nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Le potentiel thérapeutique des bactériophages (phages), virus infectant des bactéries, avait déjà été observé au début du 20^{e} siècle et est de nouveau évalué dans les pays occidentaux. L'application de phages pour contrôler une infection bactérienne est appelée phagothérapie. Cette méthode a déjà montré des résultats très prometteurs, que ce soit en thérapie humaine, vétérinaire ou en tant qu'antimicrobien de surface. Suite aux directives de l'Organisation

Mondiale de la Santé (OMS) visant à réduire l'utilisation d'antibiotique chez les animaux destinés à l'alimentation humaine, de plus en plus d'éleveurs demandent à pouvoir utiliser les phages pour contrôler les pathologies infectieuses. Cependant, l'absence de cadre réglementaire spécifique aux phages bloque leur utilisation : étant qualifiés de « médicaments biologiques », les phages doivent être évalués par des données pharmaceutiques, pharmaco-toxicologiques et cliniques précises avant de se voir accorder une autorisation de mise sur le marché. Mais ce qui est valable pour un phage sur une bactérie donnée ne le sera pas avec un autre phage ou une bactérie différente. Un nouveau cadre réglementaire doit être écrit pour une future utilisation des phages. En pathologie aviaire, plusieurs études ont été menées afin d'évaluer la capacité de la phagothérapie dans le traitement de la colibacillose. Lors de ces essais expérimentaux, les phages sont inoculés individuellement à chaque animal très peu de temps après le challenge infectieux. Une utilisation préventive serait plus adaptée aux conditions de terrain, avec une administration en masse des phages aux troupeaux. Cependant, les essais expérimentaux visant à prévenir la colibacillose aviaire sont peu nombreux et n'ont pas démontré une réelle efficacité. De plus, les données expérimentales acquises suite à ces essais se cantonnent majoritairement au suivi de la mortalité et la détermination de la concentration bactérienne dans certains organes à la fin des expériences. Peu d'entre eux examinent la présence de lésions fibrineuses des séreuses, la présence et la quantification des phages ou encore l'apparition de la résistance au sein des oiseaux traités. Ces données seraient nécessaires afin de mieux évaluer le potentiel des phages et expliquer les succès ou les échecs des essais de phagothérapie.

L'injection *in ovo* est couramment utilisée en filière avicole pour vacciner les oiseaux. L'hypothèse testée au cours de ce travail de thèse était : est-ce qu'une administration des phages *in ovo* pourrait protéger de la colibacillose les poussins lors de leur première semaine de vie, période à laquelle ils sont particulièrement susceptibles à l'infection ?

Afin d'introduire les travaux expérimentaux effectués au cours de ce projet de recherche, ce manuscrit comprend une revue bibliographique divisée en trois chapitres. Le premier présente la pathogénèse des souches APEC, leurs caractéristiques et les moyens de lutte actuels contre la colibacillose aviaire. Le second chapitre est consacré à la biologie des bactériophages, les interactions phage-bactérie et à la présentation de certains genres

taxonomiques. Enfin, l'utilisation thérapeutique des phages, notamment dans le contrôle de la colibacillose aviaire, est développée dans le troisième chapitre.

Le travail expérimental réalisé lors du projet de thèse est divisé en deux chapitres. Le premier a permis de caractériser une collection de coliphages au niveau morphologique, taxonomique, génomique et du spectre d'hôtes. Le deuxième chapitre s'est concentré à évaluer l'efficacité préventive et thérapeutique de deux cocktails de phages chez les poussins d'une semaine. Une discussion des résultats obtenus et des axes d'améliorations est ensuite présentée.

Etat de l'art

Chapitre 1 : *Escherichia coli* et la colibacillose aviaire

1.1. *Escherichia coli* : une espèce bactérienne à multiples facettes

E. coli est un habitant normal du microbiote intestinal chez les vertébrés homéothermes : c'est la bactérie commensale anaérobie facultative prédominante dans l'intestin (1). Elle est largement représentée dans les fèces des vertébrés, dans des proportions variant selon l'espèce animale (**Tableau 1**). *E. coli* est une des premières bactéries colonisatrices à la naissance des nourrissons, atteignant jusqu'à 10^9 UFC/g de selles (2). De même, elle domine dans les caeca durant la première semaine de vie des poussins (3,4). Chez les poulets adultes en bonne santé, *E. coli* représente 0,1% du microbiote intestinal total, et est principalement localisé dans les caeca (4,5).

Tableau 1 : Composition en quelques espèces bactériennes du microbiote fécal d'animaux sains

Les valeurs correspondent aux moyennes obtenues chez 10 individus en log UFC/g de fèces. D'après Sorum et Sunde (6).

	Lapin	Cheval	Veau	Mouton	Porc	Poulet	Humain	Souris	Chien	Chat
E. coli	2,7	4,1	4,3	6,5	6,5	6,6	6,7	6,8	7,5	7,6
Clostridium perfringens	0	0	2,3	4,3	3,6	2,4	3,2	0	8,4	7,4
Entérocoques	4,3	6,8	5,3	6,1	6,4	7,5	5,2	7,9	7,6	8,3
Bacteroides spp.	8,6	0	0	0	5,7	0	9,7	8,9	8,7	8,9
Lactobacilles	0	7	2,4	3,9	8,4	8,5	8,8	9,1	4,6	8,8

Certaines souches d'*E. coli* ont acquis des facteurs de virulence, leur conférant la capacité de proliférer en dehors de leur réservoir et de se multiplier dans divers environnements biologiques (cerveau, circulation sanguine, tractus respiratoire, tractus urinaire, tractus digestif, etc.). Ces souches d'*E. coli* pathogènes sont capables de provoquer un large spectre de maladies chez de nombreuses espèces. Selon les signes cliniques provoqués, ces souches ont été classées en deux groupes : les pathogènes intestinaux causant des maladies entériques/diarrhéiques, et les pathogènes extra-intestinaux. Ces deux groupes sont eux-mêmes divisés en plusieurs pathotypes selon le mécanisme pathologique, les facteurs de

virulence exprimés, et l'hôte infecté. Les IPEC (*Intestinal pathogenic E. coli*), responsables de diverses pathologies intestinales, sont divisés en sept pathotypes dont les mécanismes d'action sont décrits dans la revue de Geurtsen *et al.* (7) : EPEC (*Enteropathogenic E. coli*), ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*), EIEC (*Enteroinvasive E. coli*), STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*), EAEC (*Enteroaggregative E. coli*), DAEC (*Diffuse adhering E. coli*) et AIEC (*Adherent-invasive E. coli*). Les ***E. coli* pathogènes extra-intestinaux**, appelées ExPEC (*Extra-intestinal pathogenic E. coli*), sont quant à eux divisés en cinq pathotypes :

- Les UPEC (*UroPathogenic E. coli*) provoquent des infections des voies urinaires (cystites et pyélonéphrites). Ces infections sont parmi les plus communes chez les humains, et touchent environ 150 millions de personnes chaque année (8). Il a été montré que des souches responsables de cystites dominaient le microbiote intestinal des patients infectés (9). Ainsi, l'infection commence par une souche UPEC résidant dans l'intestin qui contamine la zone péri-urétrale, suivie d'une colonisation du tractus urinaire et d'une migration vers la vessie. Une cystite ou une infection asymptomatique se développe. Certaines souches vont ensuite remonter jusqu'aux reins, produisant une inflammation (pyélonéphrite). Ces bactéries vont parfois traverser la barrière épithéliale et entrer dans la circulation sanguine, causant une septicémie (10).

- Les NMEC (*Neonatal Meningitis E. coli*) sont la première cause de méningite néonatale bactérienne à Gram négatif, et provoquent des taux élevés de mortalité et de morbidité (10 à 30%) chez les nourrissons. Les bactéries passent du sang au système nerveux par translocation à travers la barrière hémato-encéphalique (7,10).

- Les SEPEC (*Sepsis-associated E. coli*) sont responsables de septicémies. Dans la littérature, aucune recherche n'a été trouvée étudiant spécifiquement les SEPEC.

- Les **APEC** (*Avian pathogenic E. coli*) induisent la colibacillose chez les volailles. Les souches APEC, complexes autant dans leur génétique que dans leur pathogénèse, sont un problème économique majeure dans l'industrie avicole. Aucune étude n'a rapporté l'impact économique mondiale de la colibacillose aviaire. Toutefois, une étude menée aux Pays-Bas en 2013 a rapporté une perte totale de 7,4 millions d'euros (secteurs production de viande et d'œufs) (11).

Historiquement, ces trois grands groupes de souches d'*E. coli* (commensales non-pathogènes, IPEC et ExPEC) sont distribués en 6 groupes phylogénétiques (A, B1, B2, C, D et E) sur la base de leur polymorphisme enzymatique (12). Des études plus précises ont montré que les souches commensales non-pathogènes sont majoritairement classées dans les groupes A et B1, les souches du pathotype IPEC dans les groupes A, B1 et D, tandis que les souches ExPEC sont principalement associées aux groupes B2 et D (13,14). Néanmoins, la classification phylogénique réalisée sur la base du génome entier est plus robuste et plus significative (15).

1.2. La colibacillose aviaire : une diversité de pathologies

La colibacillose est l'une des principales maladies infectieuses chez les oiseaux de production, qui peut prendre de nombreuses formes, et qui entraine de graves pertes économiques dues à la mortalité et à la morbidité. En tant que résident normal du microbiote intestinal des volailles, *E. coli* est omniprésent dans les troupeaux. Chez les poulets, il y a 10^6 UFC d'*E. coli* par gramme de matières fécales, et 10 à 15% de la population colibacillaire du tractus digestif aviaire appartiendraient à des souches potentiellement pathogènes. Ainsi, la contamination est essentiellement horizontale par le biais de l'environnement contaminé. La source la plus importante d'infection des œufs est la contamination fécale de leur coquille après la ponte. L'eau et les aliments peuvent être contaminés et introduire des souches pathogènes dans les troupeaux. Les rongeurs, les ténébrions, et les mouches domestiques adultes peuvent aussi être une source d'introduction d'*E. coli* (16,17).

Les souches APEC peuvent induire des maladies en primo-infection, telles que les infections du sac vitellin et l'omphalite. Mais elles sont principalement reconnues pour induire des maladies secondaires et opportunistes, lorsque les défenses de l'hôte sont compromises par une altération des barrières muqueuses, du système immunitaire ou bien par un stress. Ces facteurs de susceptibilité sont nombreux, allant des pathogènes provenant de l'extérieur aux pratiques d'élevage inappropriées. Les facteurs biotiques les plus fréquemment rapportés sont *Mycoplasma* spp., le virus de l'entérite hémorragique, le virus de la bronchite infectieuse, ainsi que leurs souches vaccinales (18). Parmi les facteurs abiotiques, le taux élevé de poussière et d'ammoniac sont les plus décrits (18). Ces agents prédisposants entrainent une déciliation des cellules épithéliales de la trachée ou une réponse immunitaire altérée.

En fonction de l'âge et de l'espèce aviaire, la colibacillose peut prendre de nombreuses formes systémiques (colisepticémie) ou localisées (infection du sac vitellin, cellulite, salpingite/péritonite, etc.) (**Figure 1**) (19). Les signes cliniques, la morbidité et la mortalité varient selon le type de maladie produite par APEC.

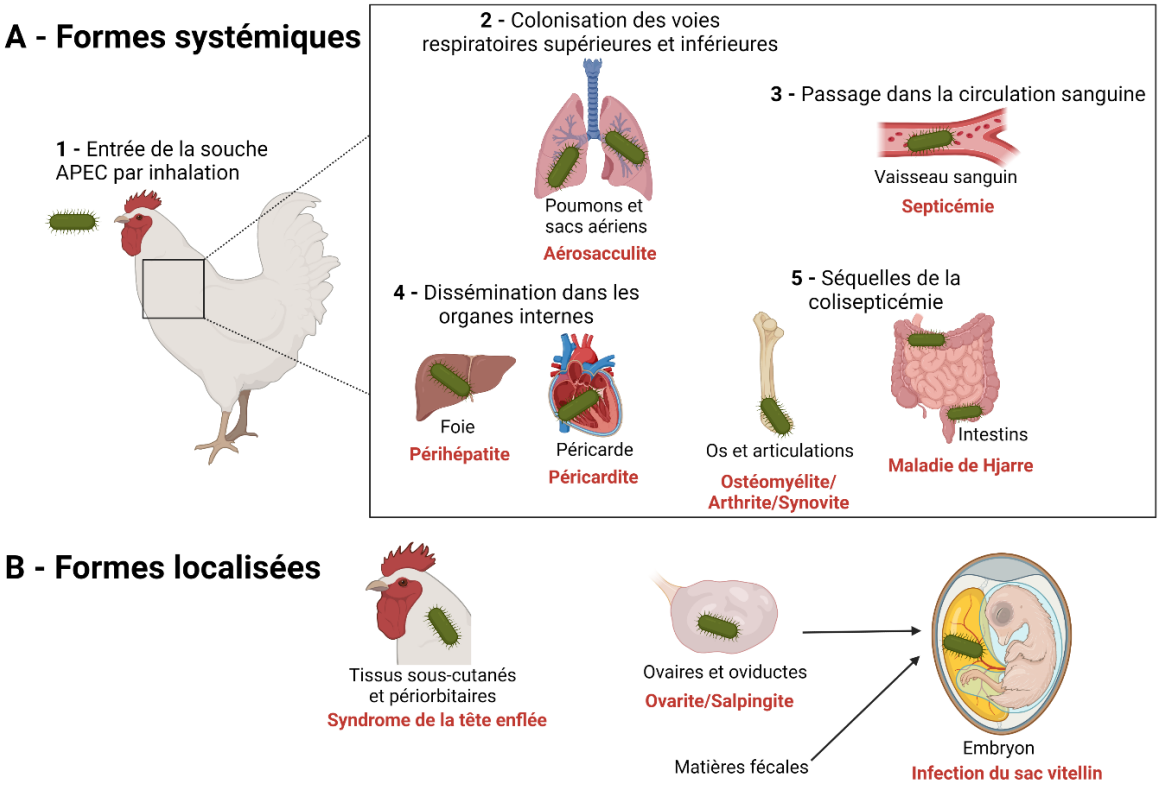


Figure 1 : Principales infections associées à la colibacillose chez le poulet

Les tissus/organes touchés sont indiqués en noir en dessous de chaque illustration. Les dommages causés à l'organe (ou le nom de la pathologie le cas échéant) sont indiqués en rouge. Figure réalisée avec le logiciel BioRender.

La colibacillose touche les espèces aviaires dès le stade embryonnaire, par primo-infection du **sac vitellin**. La contamination peut se produire dans l'oviducte chez les poules pondeuses atteintes de salpingite, mais plus principalement par contamination fécale de la coquille de

l'œuf lors de la ponte. Les bactéries pénètrent ensuite dans le vitellus à travers les membranes coquillères et la membrane vitelline. 0,5 à 6% des œufs seraient contaminés par APEC (20). Les poussins peuvent également être infectés pendant ou peu après l'éclosion, et présenter une **omphalite** ou une septicémie. C'est la cause la plus importante de mortalité chez les jeunes poussins (jusqu'à 3 semaines d'âge).

La **cellulite à coliforme**, aussi appelée dermatite chronique, est une inflammation de la peau de l'abdomen touchant principalement les poulets de chair de 2 à 3 semaines d'âge (21). Les oiseaux sont infectés à la suite d'une lésion cutanée, permettant aux APEC présents dans la litière de se propager. Cette infection localisée touche plus souvent les mâles, qui ont un plus grand risque de dommages physiques à cause de leur plumage plus lent à se développer (18). Cela n'entraine pas de mortalité. Les lésions sont découvertes lors de la transformation de la viande, entrainant un déclassement des carcasses.

La **colibacillose à départ respiratoire** (ou colisepticémie) est l'expression principale de la pathologie. Elle est essentiellement présente chez les oiseaux de 2 à 12 semaines, et peut causer un taux de mortalité de 50% (20). La contamination est provoquée par inhalation de particules de poussières contaminées par *E. coli* excrété de l'intestin. En effet, la poussière présente dans l'environnement des élevages peut contenir jusqu'à 10^6 colibacilles par gramme (22). Les lésions de la muqueuse respiratoire induites par des agents prédisposants, pouvant être accompagnées d'une immunodépression, vont favoriser la colonisation des souches APEC dans le tractus respiratoire supérieur des volailles. Il y a ensuite colonisation du tractus respiratoire inférieur, c'est-à-dire des poumons et des sacs aériens (cf. encadré 1). Suite à leur entrée dans le sang, les bactéries vont coloniser les organes internes tels que le cœur, le foie et la rate. Les oiseaux symptomatiques vont souffrir d'hyperthermie (42 à 44°C) et de détresse respiratoire. Les lésions typiques de la colibacillose aviaire sont l'épaississement et une perte de transparence des sacs aériens ainsi que des lésions fibrineuses des séreuses, telles qu'une aérosacculite, une périhépatite, une péricardite, et une septicémie, pouvant entrainer la mort des oiseaux touchés. Les infections systémiques entrainent une mortalité plus élevée, et des lésions/signes cliniques plus nombreux et plus graves que les infections localisées (18). Toutefois, dans certains cas, la mort est trop rapide pour que ces lésions macroscopiques se développent.

Encadré 1 : Les sacs aériens sont des structures pneumatisées rattachées aux poumons. Ils sont présents tout le long du corps en nombre variable selon l'espèce et aident à la régulation de la température corporelle ainsi qu'à la redistribution du poids de l'oiseau pendant le vol. La principale voie d'infection de la colibacillose se fait dans la zone d'échange de gaz entre les poumons et les sacs aériens. Leur paroi n'est soutenue que par une fine couche de tissu conjonctif, permettant aux bactéries d'entrer dans la circulation sanguine. Les poules possèdent 9 sacs aériens : 2 sacs cervicaux, 2 sacs crâniens, 2 sacs thoraciques, 2 sacs abdominaux et un sac claviculaire.

Des troubles locomoteurs, tels que l'ostéomyélite (infection osseuse), l'arthrite (inflammation articulaire) et la synovite (inflammation de la gaine synoviale) sont parfois observés comme séquelles de la colisepticémie. De même, la maladie de Hjarre (ou coligranulome), caractérisée par des granulomes dans le foie, les caeca, le duodénum et le mésentère, est une forme rare de la colisepticémie, et peut entrainer jusqu'à 75% de mortalité (18).

Le **syndrome de la tête enflée** (*Swollen Head Syndrome*) est caractérisé par une inflammation aiguë à subaiguë des tissus sous-cutanés de la tête et des tissus périorbitaires. L'infection se produit chez les volailles de 4 à 6 semaines d'âge (23). Tout comme la forme systémique, cette colonisation est secondaire à des teneurs élevées en ammoniac ou une infection virale. Malgré la faible morbidité (1%), le taux de mortalité est élevé chez les volailles de plus de 6 mois.

L'**ovarite** (inflammation des ovaires) et la **salpingite** (inflammation de l'oviducte) sont des maladies le plus souvent chroniques. Ce sont toutefois des causes fréquentes de mortalité chez les poules pondeuses et reproductrices. Elles apparaissent suite à une infection du sac aérien abdominal gauche, les bactéries atteignant les ovaires ou l'oviducte par contiguïté de tissu (18).

1.3. Diversité des souches APEC

1.3.1. Une diversité de sérotypes

L'espèce *E. coli* est subdivisée en nombreux sérotypes, basés sur le profil des structures antigéniques de surface (24). Actuellement, plus de 180 antigènes somatiques O, 60 antigènes flagellaires H et 80 antigènes capsulaires K ont été identifiés. L'antigène O définit le sérogroupe, une classification plus communément utilisée pour les études épidémiologiques.

Les souches APEC présentent une grande diversité de sérogroupes. En Europe, il a été montré que 56,5% des isolats cliniques d'oiseaux atteints par la colibacillose appartenaient aux six sérogroupes suivants : O1, O2, O5, O8, O18 et O78 (25). Des études ont identifié d'autres sérogroupes comme étant présents chez les volailles, tels que O24, O25, O65, O86, O111, indiquant que d'autres sérogroupes deviennent émergents (26–28).

1.3.2. Une diversité de facteurs de virulence

Les APEC possèdent de multiples facteurs de virulence, ce qui leur permet de s'adapter à divers environnements, de disséminer dans divers sites biologiques, afin de provoquer diverses infections dans divers hôtes. Plus de 150 gènes et protéines ont été identifiés comme facteurs de virulence chez les souches APEC (29). Guabiraba et Schouler (19) ont rapporté ceux dont l'implication dans la pathogénèse a été démontrée *in vivo*. Ces gènes peuvent être portés par le chromosome, mais la majorité d'entre eux se trouvent sur de grands plasmides de virulence nommés Colicine V (ColV) (30,31). La présence de ces plasmides ColV a été associée à la colibacillose, et est donc considérée comme un trait déterminant des APEC (30). Ces facteurs de virulence remplissent des fonctions clés dans la pathogénèse. Cependant, aucun trait de virulence unique n'a pu être déterminé pour identifier spécifiquement les APEC, rendant compliqué le diagnostic, actuellement basé sur l'association des facteurs de virulence (25). Les différentes associations de ces facteurs de virulence reflètent la diversité du pouvoir pathogène des APEC.

Les facteurs de virulence jouent divers rôles dans les infections par les APEC. Par exemple les **adhésines**, des appendices ou composants de la surface bactérienne, permettent de coloniser et d'adhérer aux cellules/surfaces, et sont donc essentielles aux premiers stades de l'infection.

Les **invasines** permettent aux bactéries d'adhérer et d'envahir les cellules hôtes. Le fer est un nutriment essentiel à la croissance et à la prolifération des bactéries dans l'hôte. Dans les liquides biologiques, le fer libre est en faible quantité (10^{-24} mol/L) par rapport au besoin de la bactérie (10^{-6} mol/L) (32). Les bactéries ont donc développé des **systèmes de captation du fer**, soit par voie directe à travers des transporteurs, soit par voie indirecte par des petites molécules appelées sidérophores, qui sont des chélateurs de fer ferrique. L'absence de sidérophores conduit à une diminution de la persistance de la bactérie dans le sang et à une diminution des lésions du tractus respiratoire et des organes profonds dans un modèle de colisepticémie (33). Les **protectines** ont un rôle dans l'échappement et la résistance aux défenses immunitaires de l'hôte. Ces protectines comprennent la capsule bactérienne, des composants du lipopolysaccharide (LPS) et des protéines de la membrane externe. D'autres facteurs de virulence ont été identifiés, comprenant les systèmes de sécrétion, les systèmes à deux composants, les régulateurs transcriptionnels, les gènes associés au métabolisme (29,34). Ainsi, il est clair que les souches APEC possèdent un arsenal de facteurs de virulence remplissant de multiples fonctions clés pour la pathogénèse.

1.4. Le potentiel zoonotique des souches APEC

De nombreuses études alertent sur le potentiel zoonotique des souches APEC. Ces inquiétudes sont justifiées pour deux raisons. La première est l'importante similitude génétique partagée entre les souches APEC et les souches ExPEC isolées de l'homme. Phylogénétiquement, les souches ExPEC sont classées dans les mêmes groupes et sont très difficiles à différencier selon leur pathotype (35). De plus, les facteurs de virulence décrits précédemment sont pour la grande majorité présents dans les souches UPEC et NMEC (34), et le génotypage par les facteurs de virulence a montré un chevauchement des génomes considérable entre 108 souches APEC, UPEC et NMEC, sans qu'aucune distinction ne soit possible (36). La deuxième raison vient de la capacité des souches APEC et ExPEC à provoquer des infections avec des signes cliniques similaires en modèle expérimental. En modèles murins, les souches APEC ont la capacité de provoquer des infections urinaires similaires aux UPEC et des méningites néonatales similaires au NMEC (37,38). A l'inverse, chez les poussins d'un jour, des souches ExPEC humaines ont provoqué une colibacillose similaire à celle causée par des souches APEC

(35). Cependant, le risque zoonotique des souches d'*E. coli* aviaire est difficile à démontrer. Le délai entre l'exposition à la souche APEC et le développement de maladie peut être long, le temps que des conditions propices à l'infection se présentent. De plus, le flux continu de souches *E. coli* dans les voies gastro-intestinales rend compliqué l'établissement d'une source (39).

1.5. Les moyens de lutte contre la colibacillose aviaire

1.5.1. Mesures de biosécurité

E. coli faisant partie du microbiote intestinal des oiseaux dès la naissance, les souches APEC sont maintenues dans l'environnement par contamination fécale de l'eau, des aliments, de la litière et de la poussière. Ainsi, il est difficile d'endiguer totalement la colibacillose des élevages. Néanmoins, des moyens de gestion prophylactiques permettent de réduire l'incidence et la propagation de la colibacillose au sein des troupeaux. L'élimination des œufs fêlés ou souillés et une fumigation/désinfection dans les 2 heures suivant la ponte permet de réduire la contamination fécale des œufs. Afin d'empêcher l'introduction de nouvelles souches APEC dans les élevages, plusieurs applications sont nécessaires : désinfection des aliments et de l'eau, de l'équipement et des locaux, ainsi que la lutte contre les différents vecteurs, comme les rongeurs, les ténébrions et les mouches domestiques adultes. Afin de lutter contre l'importante exposition à la poussière et à l'ammoniac, des facteurs prédisposant à la colibacillose, il est recommandé de maintenir une bonne qualité d'air et une ventilation adéquate. Pour rappel, des infections virales, comme le virus de la bronchite infectieuse, sont aussi parmi les facteurs de susceptibilité à la colibacillose les plus fréquemment signalés. Les oiseaux sont vaccinés contre certaines infections virales dès le stade embryonnaire. Cette technologie d'administration de masse est actuellement utilisée dans plus de 90% des éclosoirs américains (40). Indirectement, cela permet de prévenir les infections APEC chez les oiseaux vaccinés.

1.5.2. Vaccination

De nombreuses équipes ont tenté de développer un vaccin contre la colibacillose. Un vaccin efficace contre les APEC doit idéalement avoir trois caractéristiques : induire une protection

croisée contre plusieurs sérogroupes, être délivré par une méthode d'immunisation de masse (eau de boisson, pulvérisation par aérosol, *in ovo*) et être administré le plus tôt possible afin que les volailles développent une réponse immunitaire protectrice lorsqu'elles sont les plus vulnérables à l'infection. Les candidats vaccins développés et testés chez les volailles peuvent être divisés en plusieurs catégories. Les vaccins inactivés contiennent l'agent pathogène rendu inoffensif ou un fragment de celui-ci. Ils sont efficaces contre un défi homologue, mais moins ou pas contre une souche d'un sérogroupe différent (11,41,42). Les vaccins sous-unitaires, contenant des protéines purifiées de l'agent infectieux, sont ceux ayant montré le plus d'efficacité contre les défis hétérologues (43–46). Ils induisent une meilleure réponse immunitaire, mais leur mode d'administration individuel ne permet pas leur utilisation dans les élevages où des milliers de volailles sont présentes. Les vaccins constitués de vésicules de la membrane externe (OMV), dont l'intérêt est en expansion depuis quelques années, ont démontré leur efficacité. Mais seule leur administration intramusculaire a été testée, et trop peu d'études sont disponibles pour véritablement conclure sur le potentiel de ces vaccins (47–49). Les vaccins vivants atténués, constitués des bactéries vivantes dont le pouvoir pathogène a été diminué, sont pour le moment les meilleurs candidats pour lutter contre la colibacillose aviaire, puisqu'ils sont généralement disponibles pour une administration de masse. Mais peu d'entre eux ont démontré une efficacité contre une souche hétérologue (50–53).

Trois vaccins sont actuellement commercialisés pour utilisation chez les poulets. Le vaccin Nobilis ® *E. coli* (MSD Animal Health) est un vaccin sous-unitaire, contenant les antigènes fimbrial F11 et flagellaire FT. L'impact de ce vaccin sur 20000 poulets de chair a été déterminé (54). Selon les recommandations, les poulets ont été vaccinés par voie intramusculaire à l'âge de 12 semaines avec un rappel à 18 semaines. Aucune différence dans le taux de mortalité totale (toute infection confondue) n'a pu être observée entre les groupes vaccinés et non-vaccinés (13,6 et 13,7% respectivement). Cependant, la mortalité due à *E. coli* était significativement plus faible dans le groupe vacciné par rapport au groupe non-vacciné (8,2% et 24,6% respectivement) (54). Le vaccin Poulvac® *E. coli* (Zoetis) est un vaccin vivant atténué basé sur une souche O78:K80 Δ*aroA*. Selon les recommandations du fabricant, il peut être administré soit par pulvérisation grossière sur les poussins d'un jour d'âge, soit dans l'eau de boisson à partir de 5 jours d'âge. Plusieurs études ont démontré l'efficacité de ce vaccin à

réduire la mortalité et les lésions colibacillaires sur le terrain (55) ou contre une provocation expérimentale avec une souche homologue (56). De plus, le vaccin peut être administré aux poules pondeuses sans altérer la ponte et sans que la souche vaccinale ne survive dans les œufs destinés à la consommation humaine (57). Le vaccin a aussi montré son efficacité dans 37 élevages de dindes français, permettant une diminution significative du taux de mortalité, du taux de condamnation des carcasses, et une amélioration du poids moyen (58). Cette étude a été réalisée dans des élevages atteints de colibacillose récurrente à une souche APEC O78 (souche homologue) et dans des élevages atteints d'épidémies sporadiques, indiquant que le vaccin Poulvac® *E. coli* permettrait une protection croisée. Le vaccin vivant Nisseiken Avian Colibacillosis Vaccine® contient une souche O78 Δ*crp* et a montré une efficacité contre le même sérotype, mais pas contre une souche hétérologue (53).

En résumé, des efforts restent à faire pour développer un vaccin efficace contre la colibacillose aviaire. Les facteurs de virulence récemment identifiés comme étant associés aux APEC pourraient servir de base pour de nouveaux vaccins candidats.

1.5.3. Traitements

Dans le contrôle des infections APEC chez les volailles, de nombreuses classes d'antibiotiques ont été largement utilisées dans le monde entier. Parallèlement à leur utilisation, les bactéries ont développé des résistances. Kathayat *et al*. (29) ont compilé les rapports de résistance antimicrobienne d'APEC dans 24 pays entre 2015 et 2020. A part deux antibiotiques (apramycine et oxacilline), les isolats APEC présentaient des résistances à presque tous les antibiotiques testés (18 familles comprenant 52 antibiotiques au total). Les antibiotiques dont la résistance était la plus fréquemment rapportée appartenaient aux aminopénicillines (ampicilline), fluoroquinolones (ciprofloxacine), polymyxines (colistine), phénicolés (chloramphénicol), aminosides (gentamicine et streptomycine), quinolones (acide nalidixique), tétracyclines et aux sulfamides-triméthoprimes (29). En plus du risque de plus en plus élevé d'échec thérapeutique chez les volailles porteuses de ces isolats, l'inquiétude réside dans la transmission de cette antibiorésistance chez les animaux et les hommes. En effet, la résistance aux antimicrobiens est généralement transmissible par des éléments génétiques mobiles (plasmides, intégrons, transposons) et il a été observé que les souches *E. coli*

commensales provenant de volaille, de porc et de bovin présentaient des gènes de résistance à au moins trois composés ou classes d'antimicrobiens (59). Ces bactéries multirésistantes peuvent être transmises à l'homme par la chaine alimentaire.

Aujourd'hui, certains pays comme ceux de l'Union Européenne mettent en place des stratégies afin de restreindre l'utilisation thérapeutique des antibiotiques, notamment ceux étant utilisés en dernier recours en médecine humaine. Cette prise de conscience quant à la limite de l'antibiothérapie a augmenté l'intérêt pour des méthodes alternatives. Par exemple, différents probiotiques ont démontré leur efficacité à prévenir les infections APEC. Leur administration se fait dès le jour de l'éclosion, étant donné la colonisation précoce d'*E. coli* chez les oiseaux. L'administration d'une souche de *Lactobacillus plantarum* dans l'alimentation des poulets de chair (2.10^9 UFC/kg d'aliment) a réduit le nombre d'*E. coli* dans le contenu caecal, a augmenté le poids corporel et a augmenté la concentration d'IgA dans la muqueuse iléale (60). De même, une combinaison d'une souche de *L. plantarum* et de fructooligosaccharides (prébiotique) a amélioré la santé intestinale des poulets infectés par une souche APEC O78 (61). Des cocktails de probiotiques sont déjà commercialisés pour renforcer le statut immunitaire des volailles. Un d'entre eux, nommé Gro-2-max (BioNatural America Institute), a été testé en combinaison avec un vaccin vivant atténué contre *Salmonella* pour prévenir une infection à une souche APEC O78:K80. Ce traitement combiné a permis de diminuer les signes d'aérosacculite, de périhépatite et de péricardite, et a diminué la charge bactérienne dans le sang (62). Une autre méthode est l'utilisation de produits d'exclusion compétitive, qui a permis de réduire la colonisation intestinale des souches APEC antibiorésistantes (63), ainsi que leur excrétion fécale (64). Enfin, l'utilisation des bactériophages, virus infectant naturellement les bactéries, est également une alternative pour lutter contre la colibacillose aviaire.

Chapitre 2 : Les bactériophages

2.1. Généralités

Les bactériophages (phages) font partie de l'ensemble des virus. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires, utilisant la machinerie de leur bactérie hôte pour se multiplier. En tant que tels, ils sont inoffensifs pour les cellules eucaryotes, qu'elles soient humaines, animales ou végétales. Les phages sont présents dans tous les écosystèmes où les bactéries se trouvent : l'eau (10^5-10^7 UFP/mL), les sols forestiers (10^9 UFP/g), les sols désertiques (10^3 UFP/g), le tractus gastro-intestinal humain (10^9 UFP/g de fèces, représentant 97,7% du virome), etc. (65,66). Ainsi, les phages sont considérés comme les entités biologiques les plus abondantes de la planète, avec 10^{31} particules virales estimées.

Il existe une diversité impressionnante de phages, que ça soit au niveau morphologique ou génomique (**Figure 2**). Jusqu'ici, le phénotype morphologique était utilisé pour classer les phages, mais ce système a été remplacé au profit de l'analyse des séquences nucléiques. La majorité des phages isolés (>85%) sont « les phages à queue », appartenant (anciennement) à l'ordre des *Caudovirales*. Le classement taxonomique de ces phages étant en plein changement (cf. partie 2.4.), les trois familles « historiques » qu'étaient les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae* seront désignées uniquement par leur morphologie (myovirus, siphovirus et podovirus, respectivement). Dans la suite de ce chapitre, seuls les phages à queue seront évoqués, et plus généralement les phages infectant *E. coli* (coliphages). Ils sont constitués d'une capside icosaédrique qui renferme un ADN double brin linéaire. La taille de l'acide nucléique peut varier entre 2 et 500 kb, avec un nombre de gènes par conséquent assez faible. Reliés à la capside, il y a une queue hélicoïdale qui a une architecture complexe et spécifique à chacun des trois morphotypes décrits (65). C'est d'ailleurs la morphologie de la queue qui a servi de base à l'ancienne classification de ces phages. Les myovirus possèdent une queue contractile, les siphovirus sont caractérisés par une longue queue non-contractile, et les podovirus ont une queue courte non-contractile. A l'extrémité de la queue se trouvent la pointe de queue et des fibres de queue.

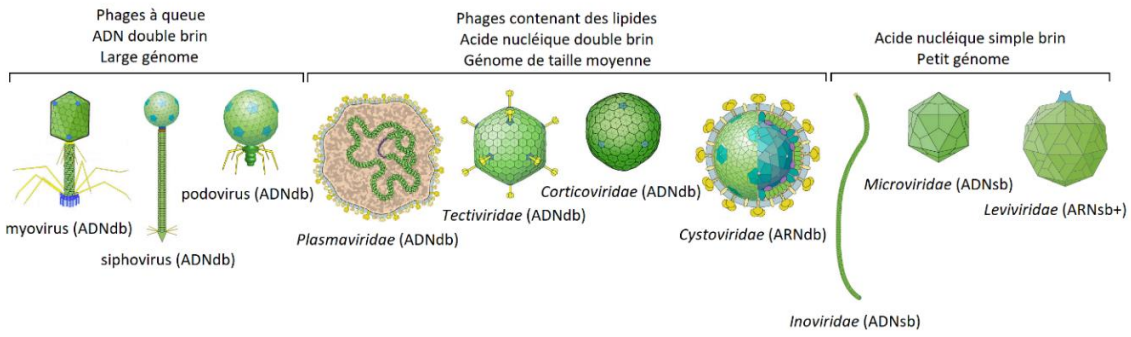


Figure 2 : Diversité morphologique et génomique des phages

La morphologie (pour les phages à queue) ou le nom de la famille de chaque phage est indiqué. Les phages ont été ordonnés selon la taille des génomes : large (14 à 500 kb), moyen (10,5 à 16 kb) ou petit (3,5 à 10,5 kb) Les images proviennent de ViralZone SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Figure basée sur Hyman et Abedon (67).

2.2. Interactions phage-bactérie

Les phages à queue peuvent être divisés en deux groupes principaux selon leur cycle de multiplication : les phages virulents (lytiques) et les phages tempérés (lysogènes) (**Figure 3**). Les phages virulents ne vont effectuer que le cycle lytique, qui sera détaillé ci-dessous, tandis que les phages tempérés sont capables d'effectuer le cycle lytique et le cycle lysogène. Ce dernier mode d'infection se caractérise par l'intégration de l'ADN du phage dans le génome bactérien. L'ADN du phage incorporé, appelé prophage, est ainsi transmis aux bactéries filles lors de la multiplication. Suite à des changements environnementaux (pH, température, présence d'antibiotique, etc.) provoquant un état de stress pour la bactérie hôte, le prophage est capable de s'exciser du génome et d'enclencher un cycle lytique. Outre ces deux cycles principaux, il existe des états intermédiaires. Certains phages peuvent enclencher un cycle pseudolysogénique, un état dans lequel l'ADN phagique injecté dans la bactérie hôte ne s'intègre pas et reste dans le cytoplasme (68). Le phage est transmis à une des bactéries filles lors de la division bactérienne. Le cycle lytique ou lysogénique aura lieu lorsque les conditions seront de nouveau favorables. Ce phénomène interviendrait dans des conditions de famine cellulaire, dans lesquelles les nutriments sont limités (69). Enfin, lorsque plusieurs phages s'accumulent à la surface d'une même bactérie, les dommages causés par les enzymes portées

par les phages sur la paroi et la membrane peuvent provoquer la mort bactérienne. Ce phénomène est appelé lyse par l'extérieur et est répandu chez les phages (70).

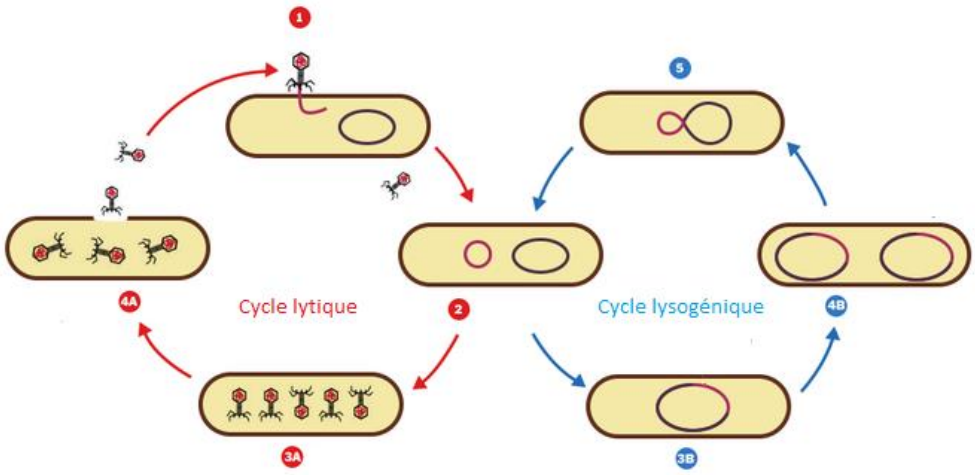


Figure 3 : Représentation schématique des cycles lytique et lysogénique des phages

1. Un phage s'adsorbe aux récepteurs de la surface bactérienne et injecte son génome dans le cytoplasme bactérien. **2.** Selon le phage, il entre soit dans un cycle lytique, soit dans un cycle lysogénique. **3a.** Dans le cas d'un cycle lytique, synthèse des protéines virales et réplication du génome phagique grâce à la machinerie cellulaire de la bactérie, puis assemblage des nouveaux virions. **4a.** Lyse de la bactérie et libération des nouveaux virions, qui peuvent recommencer le cycle lors d'une rencontre avec une nouvelle bactérie hôte. **3b.** Dans le cas d'un cycle lysogénique, l'ADN du phage est intégré dans le chromosome bactérien en tant que prophage. **4b.** Réplication du prophage lors de la division bactérienne, se propageant dans la descendance bactérienne. **5.** Excision du prophage suite à un signal extérieur (stress) et enclenchement du cycle lytique.

2.2.1. Le cycle lytique

S'il est complet, le cycle lytique va systématiquement aboutir à la multiplication du phage et à la lyse de la bactérie. Les phages strictement virulents sont limités à ce cycle de vie lytique et sont donc ceux sélectionnés pour la phagothérapie (cf. partie 3.1.6.). Les différentes étapes sont illustrées dans la **figure 3**. Seule l'étape de l'adsorption du phage est détaillée.

L'adsorption est une étape clé, puisqu'elle permet d'amorcer le cycle lytique par la liaison spécifique du phage et des récepteurs situés sur la bactérie hôte. Elle consiste généralement en trois étapes, la première étant le contact initial. Les phages ne pouvant pas se déplacer librement dans l'environnement, leur multiplication dépend de la probabilité de rencontrer

des bactéries par collision aléatoire, causée par le mouvement et la dispersion (71). Ainsi, leur capacité à rester infectieux dans l'environnement est essentielle, et dépend de la stabilité et de la résistance de leur capside dans un milieu et de la densité de bactéries sensibles. Ce contact est suivi de deux étapes de liaison (réversible et irréversible) au(x) récepteur(s). Pendant l'étape réversible, le phage va s'accrocher à un récepteur de surface. Cela va lui permettre de ne pas poursuivre l'infection si les conditions environnementales ne sont pas favorables, mais aussi de se maintenir à la surface bactérienne pendant qu'il se lie de manière irréversible soit à la même protéine, soit à un autre récepteur (71). Ces étapes de fixation sont assurées par la queue des phages, et plus précisément par des protéines de liaison aux récepteurs (*Receptor-Binding Protein*, RBP) sous la forme de fibres de queue ou de pointes de queue (72). Les RBP sont les principaux déterminants de la spécificité d'hôtes des phages. Les phages ayant plusieurs RBP peuvent reconnaitre plusieurs récepteurs et ainsi augmenter leur spectre d'hôtes, comme le phage phi92 qui peut infecter *E. coli* et *Salmonella* Typhimurium (73).

Certains RBP possèdent en plus une activité enzymatique. En effet, avant de se fixer à la surface bactérienne en se liant à son récepteur, un phage doit surmonter une variété de polymères saccharidiques servant de barrière physique pour protéger la bactérie. Parmi eux, il y a les polysaccharides capsulaires (antigène K), les exopolysaccharides sécrétés lors d'un stress (acide colanique) ou lors de la production de biofilm, et le lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est divisé en trois parties : le lipide A, le polysaccharide central et le polysaccharide de l'antigène O. Cet antigène est une chaine composée de plusieurs unités de résidus de sucre, très variable selon la souche bactérienne et s'étend de la membrane externe à l'extérieur de la cellule bactérienne, bloquant l'accès à la membrane externe. Les phages ont développé une variété d'enzymes pour dégrader ces différents polymères et accéder ainsi à la surface bactérienne. Ces polysaccharidases, plus communément appelées dépolymérases, clivent spécifiquement les liaisons osidiques des polysaccharides. Cela permet également aux phages d'utiliser ces polymères comme récepteur primaire (74). Selon leur mode d'action, les dépolymérases sont divisées en deux classes, les lyases et les hydrolases (75). Les lyases, qui clivent les liaisons glycosidiques sans utiliser de molécules d'eau, sont elles-mêmes divisées en trois groupes : les hyaluronidases, les alginates lyases et les pectates lyases. Quant aux

hydrolases, qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques, elles sont divisées en six groupes : les neuraminidases/sialidases, les lévanases, les xylosidases, les dextranases, les rhamnosidases et les peptidases. Ces enzymes sont nombreuses et variées au sein des phages : sur 143 génomes de phages déposés dans les bases de données infectant 24 genres bactériens différents, 160 dépolymérases putatives ont été identifiées (75). Les coliphages possédant des activités polysaccharidases sont cités dans le **tableau 2**. La majorité des phages d'*E. coli* cible la capsule K1, l'antigène capsulaire le plus représenté au sein de l'espèce bactérienne. D'autres antigènes capsulaires et certains antigènes O sont aussi ciblés par ces dépolymérases, montrant la diversité d'enzymes mises en place par les coliphages pour infecter leur hôte.

Tableau 2 : Liste des coliphages possédant une ou plusieurs polysaccharidases

Phages	Classe d'enzyme	Spécificité	Référence
Phage n°3	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(76)
Phage n°9	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(76)
Phage n°a	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(76)
Phage n°d	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(76)
Phage n°A	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(76)
Phage n°D	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(76)
Phage n°E	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(76)
K1E	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(77)
K1F	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(78)
PK1A	Endosialidase	*E. coli* K1	(79)
PK1B	Endosialidase	*E. coli* K1	(79)
PK1C	Endosialidase	*E. coli* K1	(79)
PK1D	Endosialidase	*E. coli* K1	(79)
PK1E	Endosialidase	*E. coli* K1	(79)
E	Neuraminidase	*E. coli* K1	(80)
K1H	Sialidase	*E. coli* K1	(81)
phi92	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K1	(82)
K1-5	Endosialidase Lyase	*E. coli* K1 *E. coli* K5	(77)
χK3	N.D.	*E. coli* K3	(83)
phiK5	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K5 et K95	(84)
phi20	Endo-N-acetylneuraminidase	*E. coli* K5 et K20	(84)
Phi1092	Hydrolase	*E. coli* K6-like	(85)
χK7	N.D.	*E. coli* K7	(83)
χK12	N.D.	*E. coli* K12	(83)
χK13	N.D.	*E. coli* K13, K20 et K23	(83)
ϕ12-W	Hydrolase	*E. coli* K12	(86)
ϕ12-S	Hydrolase	*E. coli* K12	(86)
ϕ82-W1	Hydrolase	*E. coli* K12	(86)
ϕ82-W2	Hydrolase	*E. coli* K12	(86)
K29	N.D.	*E. coli* K29	(87)
K30	Glycanase	*E. coli* K30	(88)
Phi95	Hydrolase	*E. coli* K95	(85)
Ω8	Endo-a-1,3- mannosidase	*E. coli* O8 et O93	(89)
« Dpo10 »	Pectate lyase	*E. coli* O157	(90)
PHB19	Hydrolase	*E. coli* O91	(91)
HK620	Endo-N-acétylglucosaminidase	*E. coli* O18A1	(92)
EcoO78	N.D.	Biofilm *E. coli*	(93)

N.D. : non-déterminé

Les récepteurs secondaires des coliphages sont très souvent des protéines de la membrane externe et les résidus de sucres du polysaccharide central du LPS (71,94). Les appendices, tels que le flagelle, peuvent aussi servir de récepteurs. Le **tableau 3** rapporte les récepteurs identifiés chez les coliphages, avec au total 22 récepteurs décrits. Malgré la diversité de protéines bactériennes de la membrane externe, les phages utilisent très souvent les mêmes récepteurs. Ces récepteurs sont les protéines fortement exprimées par la bactérie, pour ainsi éviter d'entrer en compétition avec d'autres molécules pendant l'adsorption. Chez *E. coli*, le niveau d'expression des récepteurs bactériens était presque 100% supérieur à celui des autres protéines (94). Il n'est donc pas étonnant que des phages éloignés phylogénétiquement partagent les mêmes récepteurs. Il a plusieurs fois été observé que les récepteurs étaient presque exclusivement des protéines de la membrane externe chez les siphovirus, des résidus de sucres du LPS chez les podovirus, tandis que les myovirus utilisent l'un ou l'autre sans préférence apparente (71,94). Les porines et les transporteurs sont les principales protéines de la membrane externe utilisées par les phages. Le LPS étant retrouvé dans la plupart des souches d'*E. coli*, un de ses composants est très souvent la cible des phages lors de l'adsorption, en tant que récepteur primaire ou secondaire (95). Certains sont spécifiques de certains antigènes O, comme le phage T5 qui reconnait les types O8 et O9 en tant que récepteur primaire, puis la protéine FhuA (96). D'autres utilisent les résidus de sucres du polysaccharide central du LPS en tant que récepteur secondaire, comme T4 (97). Récemment, l'antigène commun entérobactérien (ECA) a été identifié comme récepteur primaire de plusieurs phages. Ce polymère de surface est très conservé au sein de la famille des Entérobactéries et a une fonction encore mal comprise. Suite à la biosynthèse de l'ECA, trois formes sont retrouvées : l'ECA lié au LPS et l'ECA lié à des phosphatidylglycérides sont situés à la surface bactérienne, et l'ECA cyclique est situé dans le périplasme (98). Cet antigène jouerait un rôle essentiel dans la physiologie et l'interaction avec l'environnement de la bactérie. Les phages ciblant l'ECA pourraient contourner la barrière de l'antigène O et avoir une gamme d'hôtes plus large, ce qui est intéressant en phagothérapie.

Tableau 3 : Liste des récepteurs ciblés par les coliphages

Récepteur	Fonction	Localisation	Exemple de phage (référence)
BamA	Assemblage des protéines de la membrane externe (gène essentiel)	Membrane externe	Φ24$_B$ (99)
BtuB	Transporteur de la vitamine B12	Membrane externe	EPS7 (100)
Acide colanique	Structure semblable à une capsule, produite en réponse à un stress	Extracellulaire	NST1 (101)
Capsule	Antigène K, facteur de virulence et barrière physique contre le système immunitaire de l'hôte	Extracellulaire	PNJ1809-36 (102)
ECA	Antigène commun entérobactérien conservé	Extracellulaire	N4 (103)
FadL	Protéine de transport d'acides gras à longue chaine	Membrane externe	T2 (104)
FepA	Transporteur de fer (système enterobactine)	Membrane externe	H8 (105)
FhuA	Transporteur du ferrichrome	Membrane externe	T5 (106)
Flagelle	Motilité	Extracellulaire	χ (107)
LamB	Maltoporine (transport du maltose et des maltodextrines)	Membrane externe	λ (108)
LptD	Protéine d'assemblage du LPS	Membrane externe	AugustePiccard (95)
LPS	Facteur de virulence et barrière physique contre des attaques chimiques, maintien de l'intégrité de la membrane externe	Extracellulaire et membrane externe	T7 (109)
NfrA	Sécrétion d'exopolysaccharides	Membrane externe	N4 (110)
OmpA	Porine, maintien de l'intégrité de la membrane externe	Membrane externe	K3 (111)
OmpC	Porine assurant la diffusion non-spécifique de petits solutés (sucre, ion, acide aminé)	Membrane externe	T4 (112)
OmpF	Porine assurant la diffusion non-spécifique de petits solutés (sucre, ion, acide aminé)	Membrane externe	T2 (104)
OmpP	Porine	Membrane externe	Ox2hl2hl.1 (113)
PhoE	Porine facilitant la diffusion du phosphate et des composés contenant du phosphore	Membrane externe	TC45 (114)
TolC	Canal membranaire externe pompant des composés exogènes toxiques (comme les antibiotiques et les détergents) et des métabolistes intracellulaires (entérobactine)	Membrane externe	TLC (115)
TonB	Transducteur soutenant le transport actif des complexes fer-sidérophores et de la vitamine B12	Membranes externe et interne	T1 (116)
Tsx	Porine assurant l'absorption des nucléosides et des désoxynucléosides	Membrane externe	T6 (117)
YncD	Transporteur putatif de la membrane externe du fer	Membrane externe	IME347 (118)

La fixation irréversible du phage à son récepteur bactérien lors de l'adsorption déclenche des changements structurels dans la capside. Cela va déclencher l'activité enzymatique des muréines hydrolases, des lysines associées au virion (VAL : *Virion-Associated Lysin*) plus communément appelées lysozymes. L'activation du lysozyme va permettre la dégradation locale du peptidoglycane de l'hôte, afin que le phage puisse injecter son génome dans la bactérie. Simultanément, un signal est transmis dans la queue du phage, entrainant l'ouverture du connecteur entre la capside et la queue. L'ADN est ainsi transporté à travers le canal de la queue jusqu'au cytoplasme bactérien, tandis que le « corps » du phage reste accroché à la bactérie.

2.2.2. Mécanismes de résistance des bactéries et contre-attaques des phages

Dans la nature, les bactéries sont constamment exposées aux phages, et doivent continuellement développer des mécanismes de défense afin de survivre et de maintenir la population. Parallèlement, les phages développent des mécanismes afin de s'adapter et infecter ces nouvelles bactéries résistantes (**Figure 4**). Les bactéries et les phages sont donc impliqués dans un processus permanent de coévolution. Ce processus peut prendre deux formes différentes : la « course à l'armement » et la « reine rouge ». Dans le premier modèle, la fréquence d'un allèle bactérien lié à la valeur adaptative bactérienne augmente rapidement, remplaçant l'ancien allèle. Le modèle de la « reine rouge » est régi par une sélection négative dépendante de la fréquence : les fréquences de sélection des allèles du phage suivent celles de la bactérie, et l'allèle permettant la plus grande résistance/infectiosité est sélectionné (119). Ces deux modèles de coévolution jouent un rôle dans la diversité des deux organismes et dans la régulation des populations bactériennes dans l'environnement (120). Les mécanismes de résistances mis en place par la bactérie sont multiples et agissent à différentes étapes du cycle de vie des phages. De nombreux systèmes de défenses anti-phage sont encore découverts par les nouvelles technologies disponibles aujourd'hui, mais sont encore à caractériser dans leurs mécanismes et ne seront pas abordés dans cette partie (121,122).

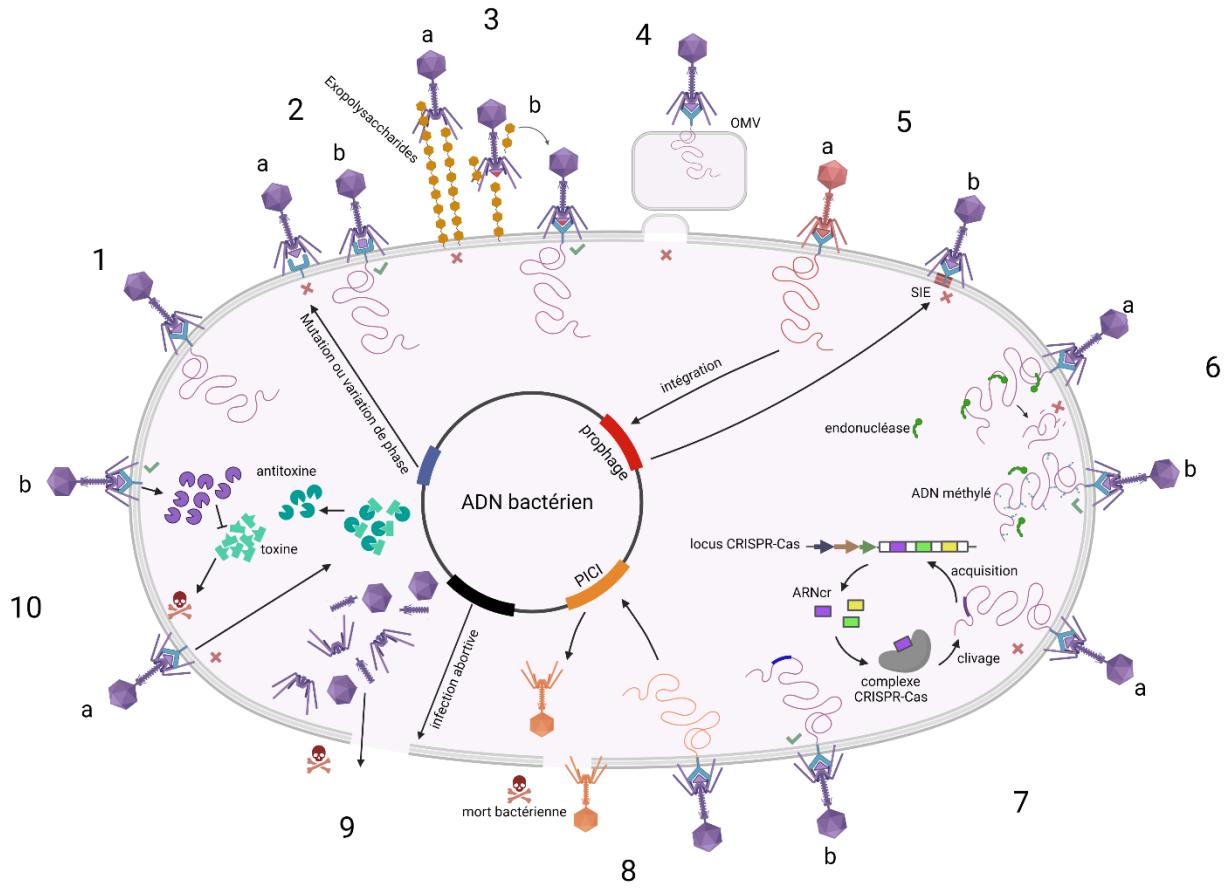


Figure 4 : Vue d'ensemble des mécanismes de résistance aux phages des bactéries et des stratégies mises en place par les phages pour les contrecarrer

1. Adsorption et injection de l'ADN phagique dans le cytoplasme. **2a.** Altération du récepteur bactérien par mutation ou variation de phase afin de bloquer l'adsorption. **2b.** Modification du RBP du phage pour reconnaitre son nouveau récepteur. **3a.** Blocage du récepteur par surproduction d'exopolysaccharides. **3b.** Dégradation des EPS par une polysaccharidase (en rouge) afin de libérer l'accès au récepteur. **4.** Production de vésicules de la membrane externe (OMV) pour leurrer les phages. **5a.** Intégration du prophage dans le génome bactérien. **5b.** Expression des protéines du système d'exclusion de surinfection (SIE) afin de bloquer l'entrée de l'ADN d'un autre phage. **6a.** Dégradation de l'ADN phagique non-méthylé par l'endonucléase d'un système restriction-modification (RM) de la bactérie. **6b.** Si l'ADN du phage infectant est méthylé au site de reconnaissance de l'endonucléase, celle-ci ne peut pas le couper. **7a.** Le système CRISPR-Cas intègre les séquences d'ADN étranger, les intègre dans son locus, et va produire des enzymes capables de reconnaitre ces séquences pour les dégrader. **7b.** Modification du site de reconnaissance par mutation. **8.** Le système PICI va produire des particules de phages contenant une séquence PICI (phages orange), pour propager ce système de défense aux bactéries voisines. **9.** L'infection par un phage active l'expression du mécanisme d'infection abortive, qui interrompt le cycle lytique. Lyse de la bactérie et libération des particules de phages non-assemblées. **10a.** L'infection par le phage déséquilibre le complexe toxine-antitoxine, libérant la toxine ce qui induit la mort bactérienne. **10b.** L'antitoxine codée par le phage empêche l'activité de la toxine bactérienne. Figure réalisée avec le logiciel Biorender.

2.2.2.1. Prévention de l'adsorption phagique

Afin de prévenir la première étape du cycle viral, les bactéries peuvent modifier ou masquer le récepteur phagique ou l'altérer par acquisition de mutations (**Figure 4.2a**) (123). En contrepartie, les phages peuvent modifier leur RBP par mutation ponctuelle et ainsi soit cibler un nouveau récepteur, soit s'adapter au récepteur modifié par la bactérie (**Figure 4.2b**). Par exemple, le coliphage PP01 muté au niveau de son RBP a pu infecter son hôte dépourvu de son récepteur OmpC (124). De même, des mutations dans la fibre de queue du phage lambda lui ont permis de reconnaitre un nouveau récepteur (OmpF) ou son récepteur LamB muté (125,126). Afin de bloquer le récepteur, les bactéries peuvent surproduire des polysaccharides extracellulaires, constituant une barrière physique pour le phage (**Figure 4.3a**) (123). Il a été montré que ce mécanisme appelé « mucoïdie » engendrait une résistance non-spécifique, c'est-à-dire que la bactérie mucoïde pouvait résister à plusieurs phages lytiques différents (127). Pour dégrader cette barrière, certains phages expriment une polysaccharidase (**Figure 4.3b**). Un autre mécanisme est la variation de phase en inhibant l'expression du récepteur ciblé par le phage (128). Cette variation de phase est génétique, mais peut être aléatoire, réversible et temporaire, engendrant une population bactérienne avec différents phénotypes. Cela permet aux bactéries de résister à un phage sans pour autant perdre définitivement une protéine pouvant être essentielle à leur survie ou à leur virulence. Chez des phages infectant *Campylobacter jejuni*, il a été observé une variation de phase de deux des quatre RBP, leur permettant de contourner ce mécanisme par la présence de phages phénotypiquement divers (129). Enfin, une dernière stratégie consiste à sécréter des vésicules de la membrane externe (OMV) afin de servir de leurres, les phages infectant ces OMV à la place des bactéries (**Figure 4.4**) (130).

2.2.2.2. Prévention de l'entrée de l'ADN phagique

Les systèmes d'exclusion de surinfection (SIE) se composent généralement de protéines codées par les phages eux-mêmes, qu'ils soient virulents ou tempérés. Pour un phage lytique, cela permet d'empêcher l'infection ultérieure d'autres phages pendant la réalisation de son cycle complet. Par exemple, le phage T4 utilise deux protéines pour bloquer l'entrée de l'ADN

des phages T2, T4 et T6 : la protéine Imm modifie la conformation du site d'injection de l'ADN du phage, et la protéine Sp inhibe la dégradation locale du lysozyme (131). Dans la majorité des cas, les SIE sont codés par des gènes de prophages afin de protéger son hôte bactérien (**Figure 4.5**). *Salmonella* Typhimurium portant le phage lysogène P22 utilise le système SieA afin de bloquer l'infection de phages lytiques (132).

2.2.2.3. Dégradation de l'ADN phagique

Les bactéries possèdent plusieurs mécanismes de défense afin de dégrader l'ADN phagique. Ces systèmes de défenses peuvent être innés, comme les systèmes de restriction-modification (RM), ou adaptatifs comme les systèmes CRISPR-Cas.

Les systèmes (RM) sont présents dans environ 75% des génomes bactériens (133). Ils peuvent être comparés à une réponse immunitaire innée puisqu'ils permettent de distinguer l'ADN soi de l'ADN non-soi. Sur la base des protéines les composant et du mode de reconnaissance et de clivage, ils sont divisés en quatre types (I, II, III et IV) (134). Excepté le type IV, les systèmes RM ont deux composants : une méthyltransférase qui méthyle l'ADN bactérien à des sites spécifiques reconnus par l'endonucléase de restriction, qui elle va cliver l'ADN étranger non-méthylé à son site de reconnaissance. Lorsque l'ADN non-méthylé du phage pénètre dans une bactérie contenant un système RM, l'endonucléase intervient pour le fragmenter (**Figure 4.6a**). D'autres systèmes sont similaires aux systèmes RM, avec des mécanismes plus complexes en raison de la présence de gènes supplémentaires, et sont détaillés dans Hampton *et al*. (135). Les phages ont mis au point plusieurs stratégies pour faire face à ces systèmes, la plus connue étant celle du phage T4, dont le génome possède des bases modifiées (hydrométhyl-cytosine, HMC) à la place de la cytosine, empêchant la reconnaissance du génome par les endonucléases (**Figure 4.6b**) (123). L'évolution d'un système RM chez *E. coli* lui permet de reconnaitre ces bases atypiques, mais le phage peut glycosyler HMC pour échapper une fois de plus à la dégradation.

Les systèmes CRISPR-Cas (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated genes*) sont des systèmes immunitaires adaptatifs procaryotes, présents dans environ 42% des bactéries (136). Ce locus est composé (entre autres) de petits fragments

d'ADN étrangers acquis par la bactérie lors d'une infection. Ces séquences (*spacers*) sont transcrites en ARN et vont servir de sondes. Si l'ADN complémentaire étranger est présent au sein de la bactérie, l'ARN spécifique va s'hybrider, déclenchant l'activité endonucléasique de l'enzyme Cas (**Figure 4.7a**). Malgré ce mécanisme à première vue infaillible, les phages sont capables d'y résister soit en modifiant la séquence ciblée par l'acquisition de mutations ponctuelles (**Figure 4.7b**), soit en codant des gènes anti-CRISPR (137,138).

2.2.2.4. Interférence avec l'assemblage des phages

Les îlots chromosomiques inductibles par les phages (*Phage-Inductible Chromosol Islands*, PICI) sont des éléments génétiques mobiles. Lors de l'infection, l'îlot est excisé du chromosome bactérien, se réplique et s'empaquète dans des capsides produites, empêchant l'encapsidation du génome viral (139). La bactérie sera lysée, mais libérera des particules phagiques non-fonctionnelles (**Figure 4.8**). Très répandus dans les bactéries à Gram positif, des exemples ont été découverts chez les Entérobactéries (140,141).

2.2.2.5. Interruption du cycle infectieux

Les systèmes anti-phages d'infection abortive (Abi) permettent d'interrompre le cycle de vie d'un phage par le suicide de la bactérie hôte. L'infection phagique ainsi avortée permet de protéger la population bactérienne adjacente (**Figure 4.9**). Le plus caractérisé est le système RexAB du phage lambda, dans lequel la protéine RexA est activée lors de la réplication de l'ADN d'un phage infectant, permettant l'activation de RexB qui va dépolymériser la bactérie, entrainant sa mort (142). Chez *E. coli*, ce système permet de protéger la bactérie lysogène d'une attaque par d'autres coliphages. D'autres mécanismes existent et sont détaillés dans Lopatina *et al.* (143). Il existe aussi des systèmes toxine-antitoxine (TA) impliqués dans la défense contre les bactéries et présentant un phénotype Abi. L'équilibre entre la toxine et l'antitoxine est rompu lors du détournement de la machinerie transcriptionnelle de l'hôte, aboutissant à la mort bactérienne (**Figure 4.10a**) (144). Certains phages produisent une antitoxine inhibant les toxines d'*E. coli* (par exemple T4), d'autres produisent une protéine empêchant la dégradation de l'antitoxine (par exemple T7) (**Figure 4.10b**) (145,146).

2.3. Evolution et interaction phage-phage

Les génomes de phages peuvent être considérés comme un ensemble de modules, c'est-à-dire un gène ou des groupes de gènes avec des fonctions servant à une même tâche. Sans s'y limiter, un génome de phage lytique se compose généralement de quatre modules fonctionnels : métabolisme de l'ADN, régulation de la transcription, morphogénèse (gènes de structures et d'encapsidation de l'ADN) et lyse de la bactérie. Cette organisation modulaire médie le bon déroulement du cycle viral (147,148). La région précoce est transcrite suite à la reconnaissance de l'ARN polymérase bactérienne, ce qui permet aux protéines précoces de contrôler le métabolisme de l'hôte et de cibler d'autres processus bactériens pour se protéger. Suite à ces étapes, le génome phagique va être répliqué, puis les gènes tardifs codant les protéines structurales vont permettre l'assemblage des virions. Enfin, les gènes appartenant au module de lyse vont dégrader les différentes membranes pour libérer la descendance.

Ces modules sont des segments génétiques interchangeables par transferts horizontaux de gènes (HGT) expliquant la mosaïcité des génomes phagiques. Le mosaïsme signifie que des génomes peuvent avoir des régions fortement similaires entrecoupées de régions sans aucune homologie (65,149). Ces mécanismes conduisant au HGT sont au nombre de trois : la recombinaison non-homologue, homéologue ou homologue. Par les processus de recombinaison non-homologue, des échanges de fragments d'ADN de taille importante peuvent avoir lieu entre phages non-apparentés. Ainsi, des phages appartenant à la même famille ou infectant la même bactérie hôte peuvent avoir des régions avec peu ou pas de similarités (150). La majorité des recombinants serait éliminée suite à ces recombinaisons non-homologues. En effet, ces mécanismes étant aléatoires à travers le génome, cela peut augmenter la taille du génome du phage au-delà des limites imposées par la taille de la capside ou rendre le phage non-fonctionnel par la perturbation des blocs de gènes. La recombinaison homéologue a lieu entre des séquences d'ADN divergentes, mais quelque peu apparentées (151,152). Enfin, la recombinaison homologue est le mécanisme le plus fréquent et a lieu, comme son nom l'indique, entre deux molécules d'ADN partageant des séquences similaires/identiques. Ce processus est initié suite à une cassure de l'ADN double-brin et est médié par des recombinases. Chez les coliphages lytiques, deux recombinases ont été

identifiées : UvsX (T4) et Gp2.5 (T7) (153). Cela conduit à une descendance avec des caractéristiques combinées des deux phages parentaux. Par exemple, lorsque des myovirus étaient combinés en cocktail contre des souches UPEC pendant plusieurs cycles, les phages récupérés avaient une efficacité lytique plus large suite à la recombinaison homologue (154). Lors de ces différents événements, les phages peuvent acquérir des gènes non-essentiels à leur cycle de vie, appelés « morrons ». Lorsqu'ils sont maintenus par sélection positive au sein du génome, les morrons peuvent jouer un rôle dans l'adaptabilité des phages à de nouveaux environnements ou profiter à l'hôte dans le cas des phages lysogènes (155,156). Ces échanges génétiques ont lieu lors de la co-infection de deux phages dans une même bactérie hôte. Deux phages lytiques ou un phage lytique et un phage tempéré peuvent infecter une bactérie au même moment, ou bien un phage virulent peut infecter une bactérie lysogène. Lors de l'infection et de la dégradation du génome bactérien, les phages lytiques peuvent acquérir l'ADN du prophage. A l'inverse, les prophages peuvent obtenir de l'ADN de phage virulent lors du clivage du génome par un système de défense anti-phage. Ainsi, les phages présentent une diversité génomique et des relations évolutives complexes.

2.4. Zoom sur quelques genres taxonomiques des coliphages

Comme décrit dans la partie 2.1, les phages à queue ont été classés en trois familles selon la morphologie de leur queue. Devant l'absence de marqueur universel des phages, à l'instar du 16S chez les bactéries, cette classification a perduré même après le développement du séquençage. Cependant, elle ne permettait pas de comprendre l'étendue de la diversité génomique des phages. L'évolution des techniques de biologie moléculaire, telle que la métagénomique virale, a permis de prendre en compte la proximité génétique des phages, et la classification de l'International Commitee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) a été mis à jour en 2022 (157). Cette nouvelle version a aboli l'ordre des *Caudovirales*, ainsi que les trois familles historiques, l'utilisation des termes « myovirus », « siphovirus » et « podovirus » étant toujours autorisée pour décrire la morphologie. Désormais, les phages à queue sont réunis dans la classe *Caudoviricetes*, composée de 33 familles. L'élimination des trois familles a cependant laissé 37 sous-familles et 631 genres en tant que *Caudoviricetes* non-classés aujourd'hui (157). Les coliphages sont classés en 109 genres, donnant un aperçu de la grande

diversité des phages infectant *E. coli* (**Figure 5**). Etant donné cette impressionnante répartition des coliphages, il ne sera présenté que les genres taxonomiques rencontrés dans ces travaux.

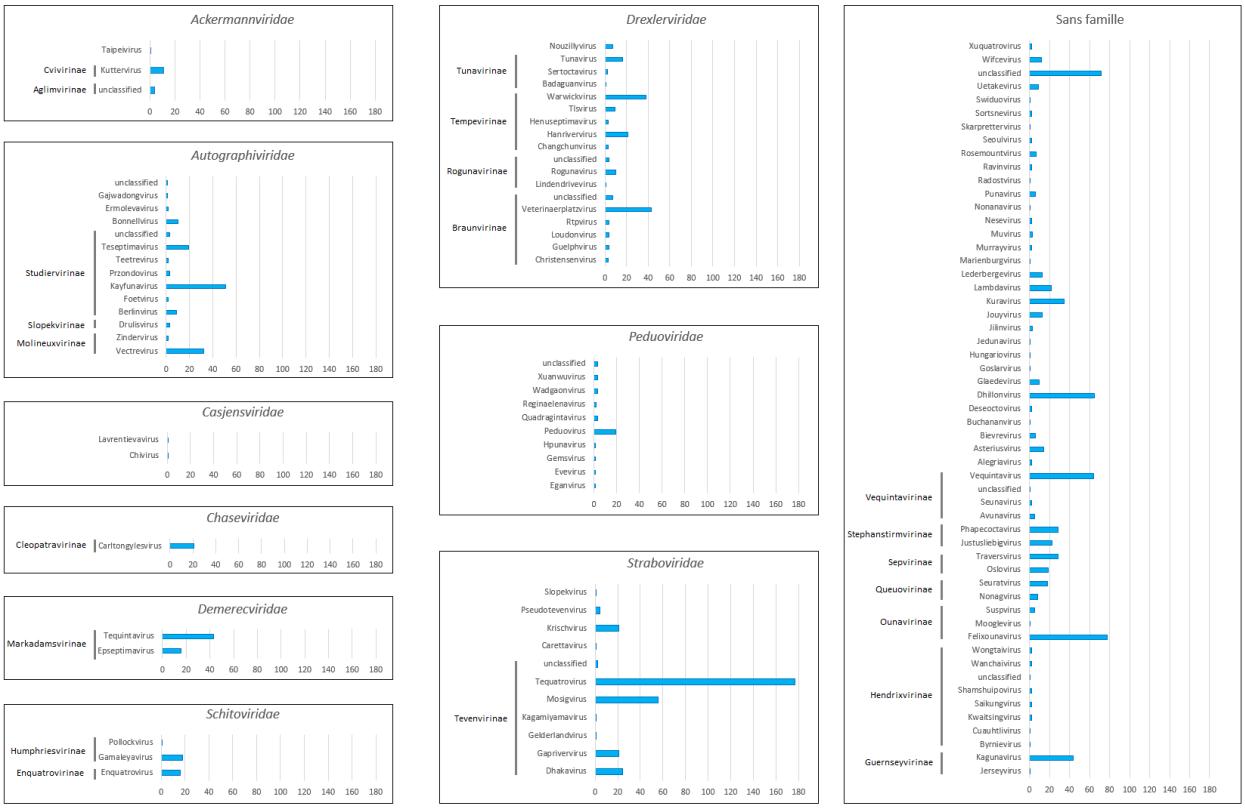


Figure 5 : Classification des coliphages (n = 1454) selon la taxonomie attribuée par ICTV

Les phages sont classés selon la famille (titre de chaque case), la sous-famille (texte à gauche) et les genres. Le nombre de phages appartenant à chaque genre taxonomique est indiqué par les barres bleues. Résultats de recherche avec le terme « *Escherichia* » dans la classe des *Caudoviricetes* sur le site NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser).

2.4.1. Genre *Tequintavirus*

Les *Tequintavirus* appartiennent aux *Demerecviridae*, une famille ratifiée en 2019 pour inclure les « grands » siphovirus (158). La longueur des génomes varie entre 101 665 et 121 750 pb, avec une teneur moyenne en GC de 39,2%. Le phage modèle de ce genre taxonomique est le phage T5. A l'extrémité de sa pointe de queue sont attachées trois longues fibres de queue latérales. Ces fibres sont responsables de la liaison réversible du phage T5 avec certaines souches d'*E. coli*, se liant à l'antigène O de type O8 ou O9 (96). Cette interaction avec le LPS n'est pas nécessaire pour le déroulement complet du cycle lytique, mais augmente le taux

d'adsorption du phage (96,159). Ensuite, la fibre de queue centrale, médiée par le RBP pb5, se lie de manière irréversible à la protéine FhuA (106). Cependant, au vu de la diversité des antigènes O, il existe une grande diversité génétique au niveau des RBP des phages appartenant au genre *Tequintavirus*. Par exemple, le *Tequintavirus* AKFV33 isolé des matières fécales de bovins, est spécifique des *E. coli* O157:H7 (160). Le phage Sds2, isolé des fèces d'âne, est capable de lyser certaines souches d'*E. coli* et de *Salmonella*, avec une haute spécificité pour les souches de *Salmonella* Abortus equi (161). Il a été montré que la majorité des *Tequintavirus* ciblait comme récepteur secondaire la protéine BtuB, et que quelques autres se liaient à FhuA ou à FepA (95). Chez plusieurs phages apparentés à T5, des différences dans les gènes codant les fibres de queue et le RBP ont été observées, expliquant les différences importantes de gammes d'hôtes des phages de type T5 (162).

Le phage T5 est insensible à plusieurs systèmes RM d'*E. coli*, alors que plusieurs sites de restriction (dont EcoRI) sont présents dans son génome (163). Une hypothèse serait que T5 exprimerait précocement une protéine de liaison à l'ADN afin de se protéger de la dégradation de son génome par les enzymes de restriction bactérienne (164). Maffei *et al.* (95) ont pu confirmer cette résistance aux systèmes RM sur les 4 phages *Tequintavirus* obtenus dans leur collection. De même, ils partagent l'extrême sensibilité du phage T5 au système Abi Fun/Z.

2.4.2. Genres *Tequatrovirus*, *Mosigvirus* et *Dhakavirus*

Ces trois genres appartiennent à la sous-famille des *Tevenvirinae*, de grands myovirus dans lesquels ont été placés trois des phages « T pairs » T2, T4 et T6. Ces trois phages appartiennent au genre *Tequatrovirus*, dans lesquels les génomes font entre 163 825 et 172 360 kb, avec une teneur moyenne en GC de 35,44%. Les phages du genre *Mosigvirus* ont pour modèle le phage RB69, et ont une taille de génome comprise entre 160 570 et 186 570 kb avec une teneur en GC d'environ 37,5%. Enfin, le genre *Dhakavirus* est représenté par le phage JS98, et comprend des phages de 155 101 à 172 379kb avec une teneur moyenne en GC de 39,0%. Ces phages infectent une grande variété de bactéries à Gram négatif. Des *Tequatrovirus* ont été isolés dans de nombreux environnements (eaux usées, tractus vaginal humain, fèces de volaille, de porc, de bovin) et sont les coliphages les plus représentés dans les bases de données (**Figure 6**). Ils montrent des activités lytiques contre les genres bactériens *E. coli* (APEC, UPEC, STEC),

Salmonella, *Yersinia*, *Shigella* et *Citrobacter* (162,165–170). Un d'entre eux, le phage KFS-EEC3, est efficace contre trois des genres bactériens cités (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* et *Shigella sonnei*) (170). De même, les *Mosigvirus* sont actifs contre des souches *E. coli* et *Salmonella* (166,171). Les phages du genre *Dhakavirus* sont moins représentés et n'ont été isolés que sur des souches d'*E. coli* (172,173). La gamme d'hôtes extrêmement diversifiée de ces phages pourrait s'expliquer par le caractère hypervariable de l'adhésine responsable de la reconnaissance avec l'hôte. Les phages de cette famille ont généralement de longues fibres de queue qui s'ancrent de manière réversible sur une protéine de la membrane externe. Ces protéines identifiées comme récepteur primaire sont nombreuses : Tsx (récepteur de T6), FadL (récepteur de T2), OmpA, OmpC (récepteur de T4) et OmpF (95). Cette liaison au récepteur se fait via une protéine adhésine située à l'extrémité des fibres de queue. Les motifs hypervariables de l'adhésine suggèrent une stratégie évolutive efficace capable de générer de la diversité et de changer facilement sa spécificité (174). Le noyau du LPS est le récepteur secondaire des *Tevenvirinae*.

Comme décrit plus haut (cf. partie 2.2.2.3.), le phage T4 et les autres *Tequatrovirus* ont modifié la cytosine en hydrométhyl-cytosine, résistants ainsi aux systèmes RM. Il a été montré que les *Mosigvirus* ont une modification épigénétique similaire (arabinosyl-hydrométhyl-cytosine) (175). Aucune étude n'a été réalisée sur les *Dhakavirus*, mais leur affiliation à la même sous-famille que les *Tequatrovirus* et les *Mosigvirus* suggèrerait un mécanisme équivalent. La sensibilité des *Tevenvirinae* aux systèmes Abi dépendait dudit système : résistance au système RexAB, sensibilité aux système Fun/Z et Tin (95).

2.4.3. Genre *Justusliebigvirus*

Les *Justusliebigvirus* sont un des genres nouvellement créés par l'ICTV en 2023 (157). Auparavant, ils étaient classés dans la sous-famille *Vequintavirinae* sans assignation à un genre. Le genre *Justusliebigvirus* a pour phage modèle phi92 et comprend des phages de 145 392 à 149 506 kb avec une teneur moyenne en GC de 37,5%. Le phage phi92 porte cinq RBP différentes, lui permettant d'avoir un appareil d'adsorption multivalent et d'infecter de nombreuses souches d'*E. coli* (encapsulées ou non) et de *Salmonella* (73). Une RBP (gp143) est similaire à 54% à l'endosialidase de K1F et est une endo-N-acetylneuraminidase (appelée

EndoN92) digérant la capsule K1 (73,176). Phi92 pouvant lyser des souches *E. coli* K92, il avait été proposé une activité enzymatique de la fibre gp150. Mais il a été démontré qu'endoN92 a la capacité de digérer K92 aussi, bien qu'avec une plus faible activité que pour K1 (176). Le gène codant l'EndoN92 n'a pas été retrouvé dans les génomes des phages apparentés (certains ayant une protéine de queue putative à la même position) (172). Les autres RBP de phi92 ne sont pas encore caractérisées, mais étant donné que le phage peut lyser des souches non-encapsulées, au moins une d'entre elles se lie à une protéine de surface. Maffei *et al.* (95) ont observé que les *Justusliebigvirus* semblaient utiliser l'ECA et le premier glucose lié à l'heptose du noyau externe du LPS, conservé chez les souches d'*E. coli*.

Les phages de ce genre taxonomique codent une voie de biosynthèse du dTDP-rhamnose, faisant penser à la modification de la cytosine dans l'ADN des *Tequatrovirus* (172). Cependant, ils étaient sensibles aux systèmes RM testés. Comme les phages T4, ils étaient sensibles au système Abi Fun/Z, mais résistants aux autres systèmes (95).

2.4.4. Genre *Phapecoctavirus*

Le genre *Phapecoctavirus* a pour modèle le phage phAPEC8, isolé d'un échantillon d'eau à proximité d'un élevage de volaille (177). Depuis, d'autres phages apparentés ont été isolés de divers échantillons (eaux usées, fèces humaines, fèces aviaires) contre diverses entérobactéries (*E. coli* APEC et STEC, *Campylobacter jejuni*, *Klebsiella pneumoniae* ou *Proteus mirabilis*) (162,178). Les *Phapecoctavirus* ont une taille de génome comprise entre 144 998 et 156 300 kb et une teneur moyenne en GC de 39,0%. Ils sont classés dans la sous-famille des *Stephanstirmvirinae*, comme les *Justusliebigvirus*. Ainsi, ils partageraient des caractéristiques communes, comme les récepteurs primaires et secondaires, ainsi que la résistance ou sensibilité à certains systèmes de défenses anti-phages (95). La protéine de queue gp095 de phAPEC8 est très homologue à EndoN92 du phage phi92 (96,17% d'identité), suggérant que phAPEC8 code une endo-N-acetylneuraminidase spécifique à K1.

2.4.5. Genre *Nonagvirus*

Le coliphage 9g, extrait des excréments de cheval, est le phage type du genre *Nonagvirus* (179). Ces phages sont de petits siphovirus entre 56 702 et 66 754 kb, avec une teneur

moyenne en GC de 43,6%. La caractéristique principale du genre *Nonagvirus* est la présence d'un groupe de gènes codant pour la voie métabolique de la biosynthèse de la queuosine. Ainsi, dans leur génome, la 7-déazaguanine de la 2'-désoxyguanosine est modifiée en 2'-désoxyarchaosine (180,181). Comme les phages de type T4, cette modification pourrait expliquer la résistance de ces phages à certains systèmes RM (95,179,182).

Comme récepteur primaire, il a été suggéré les motifs glycanes de l'antigène O, sans toutefois dépendre de cette interaction pour initier le cycle viral. Cela expliquerait leur capacité à infecter différentes espèces d'entérobactéries, telles qu'*E. coli*, *Salmonella* ou *Klebsiella* (95,179,183), d'autant qu'il a été montré d'importantes variations dans les gènes codant les fibres de queue putatives de différents *Nonagvirus* (162). Les protéines identifiées en tant que récepteur secondaire sont LptD et LamB. Certains *Nonagvirus* codent un RBP qui n'a pu être apparié avec aucun récepteur connu, suggérant qu'ils ciblent une autre protéine (95).

2.4.6. Genre *Felixounavirus*

Les phages du genre *Felixounavirus* ont une taille de génome entre 82 361 et 89 817 kb, avec une teneur moyenne en GC de 38,9%. Le phage FelixO1 a été le plus étudié de ce groupe et est connu pour sa très grande capacité lytique contre les différents sérovars de *Salmonella* (184). Cette caractéristique est observée sur d'autres *Felixounavirus*, par exemple le phage 35FD qui a lysé 17 sérovars différents (185). Ces phages peuvent aussi lyser d'autres entérobactéries, comme *E. coli* ou *Shigella* (172,186). Le mécanisme de reconnaissance des *Felixounavirus* n'a pas encore été élucidé, bien que le récepteur somatique du phage FelixO1 soit le LPS (187).

Chapitre 3 : La phagothérapie

3.1. Principales caractéristiques à prendre en compte lors de l'utilisation des phages

L'utilisation de phages pour traiter les infections bactériennes a été imaginée dès la découverte des phages il y a plus d'un siècle par Félix d'Hérelle. Suite à la découverte et à la commercialisation des antibiotiques, la phagothérapie a été abandonnée dans les pays occidentaux, excepté certains pays de l'Europe de l'Est. Aujourd'hui, l'émergence et la dissémination de souches multirésistances aux antibiotiques alertent sur l'utilisation de ces molécules au large spectre d'activité et mettent des patients dans des situations d'impasses thérapeutiques. Cela posé, il y a eu un regain d'intérêt pour la phagothérapie afin de servir d'alternative aux antibiotiques et de nombreux exemples d'utilisations thérapeutiques des phages ont été décrits. Cependant, malgré les nombreux avantages des phages par rapport aux antibiotiques, plusieurs difficultés persistent et entravent la démocratisation de la phagothérapie. Afin de mieux appréhender l'utilisation des phages en thérapie, cette partie décrit les principaux facteurs à prendre en compte : leur caractère lytique, leur gamme d'hôtes, la sécurité et la stabilité des solutions phagiques, leur voie d'administration, l'émergence de bactéries résistantes aux phages, et l'interaction avec le système immunitaire.

3.1.1. Mode de vie strictement lytique

Afin d'exclure tout risque d'échange génétique horizontal, les phages utilisés en thérapie doivent être strictement lytiques. En effet, les phages tempérés ont la capacité de transférer des gènes de virulence ou de résistance aux antibiotiques entre les génomes bactériens (188). De plus, une fois intégrés dans le génome bactérien suite au cycle lysogénique, les prophages peuvent conduire à une modification phénotypique de la bactérie, comme une virulence accrue ou une meilleure capacité d'adaptation environnementale. Un exemple bien connu est l'acquisition de la toxine Shiga chez les souches *E. coli* O157:H7 (STEC) (189). La bactérie porteuse du prophage peut aussi acquérir une immunité de surinfection, pouvant la rendre résistante à l'attaque de certains phages (lytiques ou tempérés) (190). Aujourd'hui, le séquençage permet de vérifier rapidement l'absence de gènes de virulence bactériens et des gènes liés à la lysogénie, telles que les intégrases, les transposases ou les recombinases spécifiques. Il est également conseillé de réaliser une analyse phylogénétique basée sur le

génome complet pour déterminer si le phage se situe dans un taxon de phage lytique ou de phage tempéré, dans l'éventualité où une des protéines associées à la lysogénie serait absente.

3.1.2. La gamme d'hôtes des phages

Par rapport aux antibiotiques, les phages ont un spectre d'hôtes très étroit, limitant leur impact sur le microbiote. Ils sont généralement spécifiques d'une espèce bactérienne, et ne ciblent souvent qu'un nombre restreint de souches au sein de cette espèce (191). Certains phages ont un spectre d'action plus large et peuvent infecter plusieurs espèces bactériennes (73,192). Cette spécificité d'hôtes oblige à identifier préalablement la ou les espèces bactériennes à traiter. De plus, il est compliqué d'exploiter le spectre d'hôtes des phages disponibles dans les bases de données, parfois parce que cela n'a pas été déterminé, souvent par le manque de caractérisation génomique, sérotypique et phénotypique des souches bactériennes testées. Un phage peut ainsi être décrit comme ayant un spectre d'hôtes large, mais n'avoir été testé que contre des souches appartenant au même groupe clonal ou au même groupe sérotypique. Récemment, une base de données répertoriant les interactions phage-bactérie a été développée, et répertorie 17067 interactions entre 771 phages et 1955 bactéries (https://viralhostrangedb.pasteur.cloud/) (193). Mais un cycle complet nécessite une adsorption réussie suite à la reconnaissance du récepteur et la résistance aux systèmes de défenses anti-phages médiés par la bactérie. Il serait donc nécessaire de déterminer ces deux facteurs afin de mieux comprendre les interactions phage-bactérie, comme cela a été fait pour les phages de la collection BASEL (95).

3.1.3. Sécurité et stabilité des suspensions phagiques

Contrairement aux antibiotiques qui peuvent induire une toxicité rénale ou hépatique, il n'a jamais été rapporté que les bactériophages strictement lytiques avaient des effets nuisibles sur l'hôte. Cependant, le processus d'amplification des phages implique leur propagation sur des bactéries vivantes en culture. Ce lysat est ensuite centrifugé puis filtré afin d'éliminer les bactéries restantes et les débris bactériens. Malgré ces étapes, il y a un risque de maintien d'endotoxines (par exemple le LPS), qui, lorsqu'elles sont administrées, engendrent une réaction pro-inflammatoire pouvant induire un choc septique (194). Il est donc nécessaire de

purifier ce lysat brut pour une utilisation thérapeutique en toute sécurité. Néanmoins, les méthodes utilisées en laboratoire (comme la précipitation avec du polyéthylène glycol et une séparation dans un gradient de chlorure de césium par ultracentrifugation) sont lentes, et ne peuvent pas être réalisées sur de grands volumes (>10 litres) (195). Gill et Hyman (195) ont détaillé plusieurs procédés de purification de phages compatibles avec la production industrielle. Afin d'éliminer les endotoxines, des kits de purification minimale sont commercialisés et se sont révélés efficaces pour purifier un cocktail de 3 phages sans effet indésirable sur des kératinocytes humains ou de lapin (196). Toutefois, pour éviter cet inconvénient et garantir l'innocuité du produit, il est recommandé d'utiliser des souches non-virulentes et ne produisant pas de toxines (197).

Le produit final doit ensuite être stocké dans une forme d'application garantissant la stabilité des phages. Ces formulations sont multiples (liquide, poudre, comprimé, système de pulvérisation). La majorité des phages sont stables à des températures comprises entre 4 et 60°C, et à des pH compris entre 6 et 8, mais certains procédés nécessitent des étapes avec des températures et des pH spécifiques, et la stabilité d'un phage peut varier selon le procédé choisi. De même, certains contenants peuvent induire de l'instabilité chez les phages. Il a été observé que dans des contenants en plastique, des additifs potentiellement toxiques peuvent être libérés dans le milieu, ou bien les phages peuvent s'adsorber sur les surfaces (198).

Ainsi, ces caractéristiques de stabilité sont essentielles à déterminer pour chaque phage, pour permettre le maintien de particules virales infectieuses pendant le stockage et de garantir que la bonne concentration soit administrée lors du traitement.

3.1.4. Administration des phages

Plusieurs voies d'administration des phages ont été évaluées chez les volailles : injection parentérale (intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée, intrapéritonéale), gavage oral, inhalation ou incorporation dans l'alimentation ou l'eau de boisson. L'administration parentérale est la plus utilisée dans les études expérimentales, en raison de la distribution rapide des phages dans la circulation sanguine (199). Mais cela nécessite de traiter individuellement chaque oiseau, ce qui n'est pas faisable sur le terrain. L'administration orale permet de cibler les infections gastro-intestinales, mais la stabilité des phages est compromise par l'environnement acide de l'estomac. L'inhalation et l'administration par l'eau de boisson

permettent de traiter un grand nombre d'animaux, mais les phages sont dispersés dans l'air et dans l'eau. Une méta-analyse réalisée sur 12 études étudiant la phagothérapie chez les volailles a décrit que l'administration par alimentation semblait plus efficace par rapport aux administrations par gavage oral, eau de boisson ou aérosol (200). L'administration par pulvérisation aérosol ne montrait pas de réduction significative des bactéries (200).

En plus de la voie d'administration, des facteurs, tels que le temps d'application des phages après l'infection et la dose de phages administrée, peuvent influencer le succès de la phagothérapie. Le traitement est généralement plus efficace lorsqu'il est administré immédiatement après l'infection, plutôt que quelques heures ou jours post-infection. Cette différence peut être due au temps nécessaire aux phages de se rendre au site d'infection et de s'y reproduire en quantité suffisante avant que l'infection bactérienne n'ait fait de dégâts irréversibles. La dose de phages à administrer pour contrôler une infection bactérienne dépend de la multiplicité d'infection (MOI, nombre de phages / nombre de bactéries). La MOI est importante à déterminer pour connaitre le seuil d'efficacité du phage : une quantité trop faible ne permettra pas aux phages de se reproduire efficacement et de réduire la population bactérienne. Elle est dépendante des constantes virales du phage : taux d'adsorption, période de latence, nombre de virions libérés par cellule (*burst size*). Cependant, ces paramètres varient selon le phage ou la souche bactérienne, et aussi entre les conditions *in vitro* et *in vivo* (201). En raison de leur complexité, ces facteurs sont peu abordés dans les études expérimentales, alors que leur détermination permettrait de choisir les phages les plus efficaces pour le traitement.

3.1.5. Développement de la résistance aux phages

Les mécanismes de résistance aux phages sont multiples (cf. partie 2.2.2.) et leur apparition peut entrainer l'échec de la phagothérapie. Le développement de variants résistants aux phages est presque inévitable. En effet, une analyse de données expérimentales a montré que des mutants apparaissaient dans 82% des études ciblant le milieu intestinal et dans 50% des études ciblant des infections aiguës (septicémie et méningite) (202). Plusieurs stratégies thérapeutiques permettent de réduire le développement de résistance (cf. partie 3.2.). La fréquence d'apparition de résistance est plus faible en phagothérapie (10^{-7} à 10^{-8} par cellule bactérienne) par rapport à l'antibiothérapie (10^{-5} par cellule bactérienne) (203). Mais ces taux

varient selon le phage, les récepteurs ciblés et les systèmes anti-phage présents dans la souche bactérienne utilisée. Sur une souche de *Yersinia pestis*, aucun clone résistant au phage ϕA1122 n'a été isolé, tandis que la résistance au phage L-413C était fréquemment observée (10^{-4} par cellule bactérienne) (204). La détermination de la fréquence de mutations spontanées entrainant une résistance au phage devrait être idéalement réalisée avant une thérapie, afin de sélectionner le meilleur phage candidat.

Malgré ce mécanisme évolutif naturel, le développement de résistance au phage peut entrainer des coûts évolutifs importants au sein de la bactérie. Les traits bactériens pouvant être altérés sont la division bactérienne, l'absorption des nutriments, la virulence, l'antibiorésistance, la formation de biofilm et la motilité (205). L'ampleur du compromis que subit la bactérie dépend du mécanisme de résistance et du contexte environnemental (206). Ces altérations peuvent profiter à l'hôte, puisque la pathogénèse et la croissance de la bactérie peuvent être amoindries. Ainsi, il est important de comprendre les interactions phage-bactérie au niveau de la résistance pour une application réussie de la phagothérapie. Lorsque des clones APEC résistants à un phage étaient récupérés *in vitro*, 62% présentaient une diminution de la croissance (207). Mais une partie des clones résistants n'avaient aucune mutation par rapport à la souche sauvage, et la majorité des mutations que présentaient les autres clones a été trouvée dans des gènes non liés à la résistance au phage, comme des gènes impliqués dans la croissance bactérienne, dans la dégradation des acides gras, dans des voies de régulation, et plusieurs protéines hypothétiques (207). Ces données donnent un aperçu de la complexité des interactions entre un phage et son hôte. Une meilleure compréhension permettrait d'optimiser la phagothérapie, en administrant des phages ciblant des facteurs de virulence importants pour altérer la bactérie en cas de résistance.

3.1.6. Interactions avec le système immunitaire

Des réponses immunitaires anti-phages ont été identifiés chez l'homme et les animaux. En tant que corps étrangers, les phages peuvent être reconnus par le système immunitaire, entrainant leur élimination et réduisant l'efficacité du traitement. Cette réponse dépend de la localisation de l'infection bactérienne (208). L'environnement naturel des phages étant l'intestin, aucune réaction n'est observée lors des thérapies visant à diminuer la concentration bactérienne intestinale. Cependant, la circulation sanguine et les organes internes étant

habituellement exempts de phages, leur présence peut déclencher une réponse immunitaire. Quelle que soit la voie d'administration, les phages peuvent pénétrer dans la circulation sanguine et disséminer jusqu'au site d'infection (209). Lors de leur passage dans la circulation sanguine, les phages sont rapidement éliminés par le système réticulo-endothélial. Par exemple, 99% des particules infectieuses du phage T7 étaient éliminés après 60min chez des souris saines ayant été traitées par voie intraveineuse, tandis que chez des souris immunodéprimées sur la même période de temps, le phage est resté stable (210). De plus, des anticorps neutralisants sont produits suite à l'exposition au phage et inhibent leur efficacité pour lyser les bactéries *in vivo* (211). La production des anticorps spécifiques anti-phage est considérée comme l'un des facteurs les plus limitants de la phagothérapie, notamment dans les études testant des administrations répétées de phages. Des poulets pré-immunisés avec le phage TM1 puis traités avec le même phage le jour de l'infection par une souche APEC O78 n'ont pas vu de réduction significative de la mortalité (37%) par rapport aux poulets infectés non-traités (43%), contrairement aux poulets non-pré-immunisés et traités par TM1 qui ont été partiellement protégés (20%) (212). Toutefois, l'immunogénicité varie selon le phage utilisé (212,213). Ces résultats suggèrent qu'il serait nécessaire de tester l'immunogénicité de chaque phage, notamment lors des essais de traitement d'infections non-intestinales.

Bien que la stimulation du système immunitaire puisse entraver le traitement, il a été montré que l'immunité innée était essentielle au succès de la phagothérapie. Chez les patients traités par les phages, il était observé une diminution des neutrophiles matures et une augmentation des précurseurs de neutrophiles, suggérant une activation du système immunitaire inné par les phages (214). Cet état de fait a été confirmé en modèle murin : des souris déficientes en neutrophiles n'étaient pas protégées d'une infection à *Pseudomonas aeruginosa* suite au traitement par le phage PAK_P1 (100% de mortalité à 1 jour post-infection), tandis que les souris immunocompétentes étaient parfaitement protégées (215). Cette synergie entre le système immunitaire et les phages va permettre de prendre en charge les bactéries résistantes aux phages et aux antibiotiques simultanément. Il a été montré que la résistance d'une souche de *Klebsiella pneumoniae* à un phage ciblant la capsule a permis de la rendre sensible à la phagocytose (216).

En résumé, plusieurs caractéristiques sont essentielles à déterminer pour choisir le meilleur phage candidat pour une utilisation thérapeutique. Le phage doit être lytique, avec idéalement un spectre d'hôtes large et des paramètres pharmacocinétiques (taux d'adsorption, temps de latence et *burst size*) élevés pour enclencher rapidement le cycle infectieux. A l'inverse, son immunogénicité et sa fréquence de développement de résistance doivent être faibles afin de ne pas entraver le déroulement de la phagothérapie. La sécurité et la stabilité du produit final doivent être garanties pour l'individu traité.

3.2. Utilisation des phages en thérapie

Outre la « monothérapie », c'est-à-dire l'utilisation d'un seul phage, il existe d'autres stratégies d'application des phages afin d'optimiser la phagothérapie. Parmi ces approches, l'utilisation de cocktails de phages, d'enzymes phagiques ou d'une combinaison avec les antibiotiques permet d'optimiser la phagothérapie.

3.2.1. Les cocktails de phages

L'étroite spécificité des interactions phage-bactérie est une limite non-négligeable en phagothérapie. L'utilisation d'un mélange contenant plusieurs phages différents, aussi appelé cocktail de phages, permet d'augmenter la couverture globale des phages. En raison de leur plus large éventail de cibles bactériennes, les cocktails peuvent être utilisés sans identifier préalablement l'agent pathogène impliqué chez l'individu à traiter. Contrairement à certaines idées reçues, il ne suffit pas de mélanger aléatoirement un grand nombre de phages pour avoir un cocktail efficace. Merabishvili *et al.* (197) donnent les principales lignes directrices pour sélectionner les phages d'un cocktail. En plus du caractère strictement virulent, de leur capacité lytique contre une souche bactérienne visée, et d'une bonne stabilité, les interactions phage-bactérie sont importantes à prendre en compte. Les phages doivent présenter la gamme d'hôtes le plus large possible contre l'espèce bactérienne ciblée. Cette gamme d'hôtes peut être élargie par la méthode Appelmans, qui permet l'adaptation du phage par coévolution suite à des passages en séries sur différentes souches bactériennes (197,217,218). Idéalement, le cocktail doit être composé de phages taxonomiquement distincts, ciblant des récepteurs bactériens différents, afin de minimiser l'apparition de variants résistants. Il est en effet plus difficile pour la bactérie de modifier/protéger plusieurs récepteurs simultanément,

et le mécanisme de résistance mise en place pour un phage ne bloquera pas les autres phages actifs contre la bactérie (191). *In vitro*, il a été observé que la résistance à deux phages individuels apparaissait après 6-8h d'incubation, tandis que 30h ont été nécessaires pour l'apparition de variants résistants à la combinaison de ces deux phages (219).

L'efficacité des phages individuels à lyser la bactérie cible n'est pas une garantie de l'efficacité du cocktail, puisqu'un mélange de phages peut produire des effets synergiques ou antagonistes (160). Ainsi, les interactions phage-phage doivent également être prises en compte. Une interaction synergique peut se produire lorsqu'un phage produisant une dépolymérase permet à un autre phage d'accéder plus facilement à son récepteur, augmentant son taux de croissance (81,220). Une combinaison de phages ciblant des récepteurs différents permet également une meilleure efficacité que ceux ayant la même cible : il a été observé qu'un cocktail de deux phages ciblant le LPS et le pilus de type 4 de *P. aeruginosa* avait une efficacité supérieure aux paires de phages ciblant le LPS ou le pilus de type 4 seul (221). Les phages ciblant le même récepteur peuvent en effet entrer en compétition pour s'adsorber sur la bactérie. La co-infection de la même cellule bactérienne par plusieurs phages peut aussi entrainer une concurrence pour des ressources cellulaires limitées (222). Ces réactions antagonistes réduisent l'efficacité d'un phage individuel, et peuvent entrainer une gamme d'hôtes plus étroite du cocktail par rapport aux gammes d'hôtes des phages individuels (223).

En thérapie, l'utilisation de cocktails de phage peut être envisagée de deux façons. Un cocktail sur-mesure, personnalisé selon l'agent pathogène identifié, permet d'apporter les phages les plus actifs contre la souche isolée. Cependant, cette approche n'est appropriée que dans les cas où le pronostic vital n'est pas menacé (comme les infections chroniques), laissant le temps nécessaire pour isoler et tester des phages sur l'isolat bactérien. Dans le cas d'un pronostic plus engagé, comme lors d'une infection aiguë, un cocktail prêt-à-porter est plus adapté. Cela consiste en l'administration d'un cocktail préalablement construit, dans le but d'obtenir la plus large couverture possible pour une maladie bactérienne. Mais si la souche responsable de l'infection est épidémiologiquement minoritaire, il est possible que le cocktail soit inefficace.

Chez la volaille, plusieurs produits à base de bactériophages sont actuellement commercialisés pour éradiquer les bactéries responsables de zoonoses les plus signalées par l'UE (224). Ces produits sont détaillés dans la revue de Żbikowska *et al.* (225). Mais aucun cocktail n'est

encore disponible pour traiter ou prévenir la colibacillose chez les volailles. Un produit industriel a cependant prouvé son efficacité lors d'un essai à grande échelle, mais n'a pas d'autorisation d'utilisation. Ce cocktail BAFACOL (Proteon Pharmaceuticals) est composé de 5 phages actifs contre un grand panel de sérogroupes APEC. Une expérimentation a montré que lorsque BAFACOL était administré en tant qu'additif alimentaire tous les deux jours pendant toute la durée de l'expérience, les poulets de chairs infectés oralement par deux souches APEC (O2 et O78) étaient mieux protégés (4,2% de mortalité) que le groupe n'ayant pas reçu le cocktail (20% de mortalité) (226).

3.2.2. Protéines dérivées des phages

L'utilisation de certaines protéines dérivées des phages ayant un potentiel antimicrobien a aussi été étudiée. Ces protéines peuvent être réparties en deux catégories : les lysines (VAL et endolysines) et les dépolymérases, dégradant le peptidoglycane et les polysaccharides respectivement. Le peptidoglycane étant une structure très conservée au sein des bactéries Gram négatif, les lysines peuvent avoir une large gamme d'hôtes. Les dépolymérases ont un spectre d'hôtes plus étroit, les bactéries pouvant produire une grande diversité de polysaccharides (capsule, LPS, EPS).

Parmi les VAL, la muramidase Cpl-1 de la bactérie Gram positif *Streptococcus pneumoniae* a démontré son efficacité antimicrobienne en modèle murin, avec une survie de 100% des individus en 48h, contre 20% des souris non-traitées (227). Fait intéressant, l'administration intraveineuse de Cpl-1 stimulait la génération d'anticorps neutralisants, réduisant leur demi-vie à environ 20min. Cependant, il a été constaté que ces anticorps ralentissent mais ne bloquent pas totalement l'activité bactéricide des enzymes. Des souris pré-immunisées contre l'enzyme Cpl-1 ont été provoquées par *S. pneumoniae* puis traitées par voie intraveineuse avec 200µg d'enzyme 10 heures post-infection : il a été observé une réduction du nombre de bactéries dans le sang au même titre que chez les souris naïves (227). Malheureusement, les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes aux lysines exogènes en raison de leur membrane externe. L'ajout de facteurs déstabilisants la membrane (EDTA, acides) était nécessaire pour que l'endolysine Lys68 démontre sa grande capacité lytique contre 13 espèces bactériennes différentes (228). Les recherches se portent donc sur le développement d'« artilysines », des lysines modifiées avec des perméabilisant membranaires. Par exemple,

l'Artilysine® Art-175 a montré une activité hautement bactéricide contre les isolats d'*E. coli* résistants à la colistine provenant d'échantillons d'animaux diarrhéiques (229). Les lysines ciblant des régions hautement conservées de la paroi bactérienne, aucun phénomène de résistance bactérienne n'a été rapporté, même après une administration répétée des lysines (230,231).

Les dépolymérases, contrairement aux lysines, ne semblent pas posséder d'activité bactéricide. Leur potentiel serait plutôt décrit comme « anti-virulent » : la dégradation des polysaccharides bactériens, responsables de facteurs de virulence et de la formation de biofilm, réduit la virulence et la résistance des bactéries au système immunitaire. Par exemple, l'administration de la dépolymérase EndoE (dégradant la capsule K1) a permis une protection complète des rats nouveau-nés infectés par une souche *E. coli* K1. En dégradant la capsule, la viabilité bactérienne n'était pas impactée, mais les souches étaient devenues sensibles au système du complément (232). Chez des poulets colonisés par *Salmonella* Typhimurium, la dépolymérase P22sTsp a permis de réduire significativement la colonisation intestinale de la bactérie (233). Même si la résistance aux dépolymérases est très peu rapportée par rapport aux phages entiers, ce phénomène n'est pas à exclure et a déjà été observé (234).

3.2.3. Phagothérapie combinée aux antibiotiques

En 2007, il a été découvert que des faibles concentrations d'antibiotiques peuvent stimuler la production de phages lytiques dans les cellules bactériennes, démontrant une synergie entre les phages et les antibiotiques (235). Ce phénomène est appelé PAS (Phages-Antibiotiques-Synergie). Ainsi, il a été observé que la production du coliphage ΦMFP était augmentée de plus de 7 fois par une souche UPEC lorsqu'une concentration sublétale de céfotaxime (céphalosporine) était ajoutée (235). Les antibiotiques testés avaient pour mode d'action l'inhibition de la division cellulaire. Cela entraine une filamentation des bactéries, avec un état physiologique altéré, qui permettrait une production et un assemblage plus rapide des phages lytiques. De plus, la lyse bactérienne est accélérée par la présence des antibiotiques, augmentant le taux de propagation des phages. Depuis, ce phénomène a été rapporté chez d'autres souches ExPEC. Dans des échantillons d'urine, la combinaison du phage ECA2 et de ciprofloxacine a permis une réduction significative du nombre de bactéries (7,8 log UFC/mL) plus important que le phage ou l'antibiotique seul (3,9 et 1,2 log/UFC/mL respectivement)

(236). Chez des poulets infectés expérimentalement par une souche APEC O2, la combinaison d'un cocktail de 2 phages et de l'enrofloxacine a permis une protection complète des oiseaux (237). Les différentes combinaisons phage-antibiotique testées avec un résultat positif sont nombreuses et sont résumées dans la revue de Li *et al.* (238). Il est cependant important de tester ces combinaisons en amont des tests cliniques, car certaines d'entre elles ne montrent aucun effet synergique, voire entrainent des effets antagonistes (238). La combinaison des deux antimicrobiens peut aussi permettre la re-sensibilisation des souches à un antibiotique. Par exemple, un phage ciblant la porine M de la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* a entrainé l'émergence de clones résistants par modification du mécanisme de la pompe à efflux. Ces bactéries sont ainsi devenues sensibles aux antibiotiques ciblant ces systèmes d'efflux, montrant que la phagothérapie pourrait permettre de prolonger la durée de vie des antibiotiques actuels (239).

3.3. Essais de phagothérapie contre la colibacillose aviaire

Les études faisant état d'essais de phagothérapie pour lutter contre la colibacillose ont été passées en revue afin de mettre en évidence les conditions de traitements et les facteurs liés à l'efficacité de la phagothérapie. Les essais thérapeutiques sont détaillés dans le **tableau 4**, tandis que les essais préventifs sont décrits dans le **tableau 5**.

3.3.1. Essais thérapeutiques

Les essais décrits comme curatifs sont au nombre de 16. Pour des raisons de compréhension, les études décrivant plusieurs expérimentations, différentes dans la voie d'infection ou la voie d'administration des phages, ont été séparées en deux lignes sur le tableau, ramenant le total des essais à 20. Parmi ces 20 expérimentations, 19 étaient expérimentales, et seule une a testé les effets de la phagothérapie sur le terrain. Excepté deux essais, tous ont observé une réduction significative de la mortalité, concluant à un succès de la phagothérapie.

Infection	Traitement		Principaux résultats	Références
Sérotype Concentration Voie d'infection	Phage Concentration Voie d'inoculation	Temps post-infection		
APEC K1 10^6 UFC IM	Phage R 10^6, 10^4 ou 10^2 UFP IM	Simultanément	Absence de mortalité et de morbidité lorsque le phage était administré à 10^6 ou 10^4 UFP, pas de réduction significative lorsque 10^2 UFP étaient utilisés	(240)
APEC K1 10^3 UFC IC	Phage R 10^8 UFP IM	Simultanément	Absence de mortalité et de morbidité, réduction de la charge bactérienne (cerveau, sang et rate), phage détecté dans la rate 5 jours post-infection	(240)
APEC O2 10^4 UFC SAT	Cocktail de 2 phages 10^8 UFP Aérosol	2h ou 24h ou 48h	Réduction significative de la mortalité lors de la pulvérisation à 2 hpi, aucun phage détecté dans le sang après 24h	(241)
APEC O2 10^4 UFC SAT	Cocktail de 2 phages 10^8 UFP IM	Immédiatement après provocation ou 24h ou 48h	Réduction significative de la mortalité indépendamment du moment du traitement, présence des phages dans le sang après 24h	(241)
APEC O2 10^4 UFC SAT	Cocktail de 2 phages 10^9 UFP IM	Injections uniques ou multiples (même jour, 24h ou 48h)	Réduction significative de la mortalité indépendamment du moment du traitement et du nombre d'injections	(242)
APEC O2 10^4 UFC SAT	Cocktail de 2 phages + antibiotique (eau de boisson) 10^8 UFP IM	Immédiatement après provocation	Réduction significative de la mortalité et de la morbidité par le cocktail seul, absence de mortalité et réduction de la morbidité par la combinaison phage et antibiotique	(237)
APEC O2 10^4 UFC SAT	Phages SPR02 ou DAF6 10^8, 10^6, 10^4 ou 10^2 UFP IM	Immédiatement après provocation	Réduction significative de la mortalité uniquement par traitement à 10^8 UFP avec le phage SPR02	(243)
APEC O2 10^6 UFC SAT	Phage SPR02 10^8 UFP IM	Immédiatement après provocation	Réduction significative de la mortalité	(244)
N.D. 10^8 UFC SAT	Phage F78E 10^9 UFP/mL Aérosol et orale	Immédiatement après provocation	Réduction significative de la mortalité et de la morbidité, aucun isolat résistant au phage détecté	(245)
11 troupeaux infectés par naturellement par *E. coli*	Cocktail de 3 phages 10^7 UFP/mL Aérosol et eau de boisson		Réduction significative de la mortalité (< 0,5% en 3 semaines d'observation) chez 10 troupeaux	(245)
APEC O78:K80 10^8 UFC IT	Phage 10^{10} UFP IT	2h	Réduction significative de la mortalité et de la morbidité, réduction de la charge bactérienne dans le foie, le cœur, la rate et le sang à la fin de l'expérience	(246)
APEC O2 10^8 UFC IT	Phage SPR02 10^9 UFP Aérosol	Immédiatement après provocation	Aucune réduction de la mortalité	(247)
APEC O2 10^8 UFC IT	Phage SPR02 10^8 UFP IT	Immédiatement après provocation	Réduction significative de la mortalité	(247)
APEC O78 10^8 UFC IT	Cocktail de 4 phages 10^9 UFP IT ou IO ou eau de boisson	2h	Aucune différence dans la mortalité et la morbidité, faible concentration des phages jusqu'à 4 jours post-infection, peu de variants de résistance	(248)
APEC O2 10^7 UFC Pulvérisation de la litière	Phage SPR02 10^8 UFP Pulvérisation de la litière		Réduction significative de la mortalité	(249)
APEC O1:K1 10^8 UFC IT	Phage KAZ14 nu ou encapsulé 10^6 UFP/mL Orale	2h	Réduction significative de la mortalité avec le phage encapsulé, réduction significative de la charge bactérienne dans les matières fécales et de l'excrétion	(250)
APEC O78:K80 et O2:K1 10^8 UFC SAT	Cocktail de 4 phages 10^{10} UFP SAT	8h	Réduction significative de la mortalité et de la morbidité, réduction significative de la charge bactérienne dans les poumons, le cœur, la rate et le foie	(251)
APEC O78:K80 10^7 UFC SAT	Pré-immunisation avec phage TM1 Traitement : TM1 ou TM3 10^{10} UFP SAT	Pré-immunisation : 7 et 6 jours avant infection Traitement : 8h	Réduction significative de la mortalité et de la morbidité et réduction significative de la charge bactérienne après traitement avec le phage TM3	(212)
APEC O78 10^8 UFC/mL IT	Phage 10^8 UFP IT	Immédiatement après infection	Pas de mortalité, réduction significative de la morbidité et de la charge bactérienne dans les poumons	(252)
N.D. 10^7 UFC IM	Phage CE1 10^8 UFP IM	2h	Protection complète des oiseaux, augmentation de l'efficacité de la réponse immunitaire de l'hôte	(253)

Sans surprise, les souches bactériennes utilisées pour l'infection expérimentale des poulets appartiennent aux sérogroupes APEC prédominants : O1 (n = 1), O2 (n = 7) et O78 (n = 5). Dans trois essais expérimentaux, aucune information sur le sérogroupe n'a été rapportée. Néanmoins, l'indication d'une souche APEC K1 peut laisser supposer qu'il s'agit du sérogroupe O1 et O2 (240). Etant donné que les phages sont sélectionnés sur la bactérie d'épreuve en amont de l'expérience, ce paramètre n'influe pas sur l'efficacité de la phagothérapie. Mais la majorité des essais s'est intéressée au traitement d'une seule souche APEC. Or, même si une seule souche est généralement responsable de l'infection chez un animal malade, les volailles sont en permanence en contact avec des isolats potentiellement pathogènes appartenant à plusieurs sérogroupes (cf. partie 1.2.). Seule une étude expérimentale a testé l'efficacité d'un cocktail de phage contre deux souches APEC combinées (251). Le développement de cocktails ciblant plusieurs sérogroupes APEC serait intéressant pour des approches prêt-à-porter commerciales, et permettrait, en plus du contrôle de l'infection, de réduire ou d'éliminer les souches potentiellement pathogènes présentes dans l'intestin des volailles, réduisant les risques d'infection et de contamination des autres animaux. Oliveira *et al.* (245) sont les seuls à avoir réalisé une expérience à grande échelle sur 11 troupeaux de poulets à griller infectés par *E. coli*. Le cocktail de trois phages a permis de réduire le taux de mortalité en dessous de 0,5% chez 10 troupeaux, démontrant son efficacité. Mais aucune information n'est disponible sur la ou les souches isolées des troupeaux, ni sur une potentielle réduction de la population d'*E. coli* dans l'intestin. Les phages composants le cocktail ayant une grande capacité lytique contre un panel de souches APEC (O2, O5, O15, O78, O88 et O103), cela suggère qu'ils pourraient être capables de contrôler une partie des souches APEC présentes dans l'intestin des poulets (254).

Tableau 4 : Compilation des essais thérapeutiques par les phages contre des poulets infectés par APEC

Légendes : IM : intramusculaire, IC : intracrânienne, SAT : sac aérien thoracique, IT : intratrachéale, IO : intra-œsophagienne, N.D. : non-déterminé.

Excepté une étude, tous les essais ont été réalisés avec des phages nus, sans méthode de préparation protectrice (cf. partie 3.2.2.). En comparant l'efficacité thérapeutique du myovirus KAZ14 nu ou encapsulé dans du chitosane, le taux de mortalité et la concentration bactérienne dans les caeca étaient plus réduits par le traitement avec le phage encapsulé (16,7% et $7,9 \times 10^2$ UFC) par rapport au phage nu (50% et $1,8 \times 10^5$ UFC) et aux poulets infectés non-traités (58% et $2,3 \times 10^9$ UFC) (250). Il est impossible de conclure au travers d'une seule étude que l'encapsulation phagique aurait permis d'obtenir de meilleurs résultats dans les autres essais, d'autant qu'à part celle-ci, les phages n'étaient pas administrés par voie orale, ne justifiant pas ce mode de préparation du produit phagique. Cependant, cette stratégie semble prometteuse pour contrôler l'infection et réduire drastiquement l'excrétion de la souche APEC ciblée afin d'éviter une contamination de l'environnement du troupeau.

Les cocktails sont présentés comme ayant une meilleure efficacité thérapeutique, due à la plus grande diversité de phages mais aussi à la diminution de l'apparition de variants résistants. La majorité des essais expérimentaux présentés ici a utilisé un seul phage (n = 13). Aucune différence d'efficacité n'est observée en comparant ces études avec celles utilisant un cocktail de phage (n = 6).

L'administration répétée des phages est un facteur pouvant impacter négativement l'efficacité du traitement. Une étude a testé cette approche en inoculant un cocktail de phage (SPR02 et DAF6) soit une fois immédiatement après infection, soit immédiatement après infection et à 1 et 2 jours post-infection (242). La réduction du taux de mortalité des oiseaux n'était pas significativement différente entre les deux approches. Cependant, l'administration répétée (0, 1 et 2 jours post-infection) a permis une protection complète des oiseaux, contrairement à l'administration unique (44% de réduction). Les auteurs en concluent donc que plusieurs traitements valent mieux qu'un seul (242). C'est en désaccord avec ce qu'ont observé Naghizadeh *et al*. (212), mais l'administration ayant été faite après l'infection et sur un laps de temps relativement court, on peut supposer que l'hôte n'a pas eu le temps de produire des anticorps neutralisants contre le phage.

La MOI, c'est-à-dire la concentration de phage administrée par rapport au nombre de bactéries, est un paramètre important en phagothérapie (cf. partie 3.1.3.). La majorité des

essais testant les phages à des MOI ≥ 10 observent un effet positif sur les poulets (80% de succès sur 15 essais), tandis que ceux testant des MOI ≤ 1 sont moins efficaces (44% de succès sur 9 essais). Huff *et al*. (243) ont démontré l'importance de la MOI en testant plusieurs concentrations du phage SPR02 pour contrôler l'infection APEC chez des oiseaux : une réduction significative de la mortalité n'a été observé uniquement avec une MOI de 10000. Cette différente d'efficacité peut s'expliquer par le temps nécessaire pour le phage de se multiplier et d'atteindre son seuil d'efficacité (c'est-à-dire que l'inactivation des bactéries par les phages doit dépasser la multiplication bactérienne). Les constantes virales varient selon le phage, la souche et l'environnement (cf. partie 3.1.3.), ce qui complique la détermination de la MOI pour contrôler efficacement l'infection.

Plusieurs voies d'administration ont été testées dans ces essais : intramusculaire (n = 8), intratrachéale (n = 4), intra-œsophagienne (n = 1), orale (n = 2), dans le sac aérien thoracique (n = 2), par pulvérisation (n = 4) et dans l'eau de boisson (n = 1). Ainsi, la majorité des essais a choisi des voies d'administration individuelles (n = 17), qui ne sont pas pratiques pour traiter des troupeaux entiers de volailles. Parmi eux, ceux ayant entrainé une protection complète des oiseaux sont les essais ayant inoculé les phages directement au site d'infection. En effet, cela favorise un titre élevé de phages au site d'infection, ce qui permet un contrôle direct de la souche APEC. C'est ce qu'ont démontré Huff *et al*. (247), qui n'ont observé aucune diminution de la mortalité par pulvérisation aérosol des phages, tandis que leur administration au site d'infection a diminué le taux de mortalité. Excepté deux cas, tous les essais ayant suivi ce mode opératoire ont été un succès. Dans Barrow *et al.* (240), l'administration de 10^2 UFP du phage R au site d'infection n'a pas eu d'effet significatif sur la mortalité des poussins. Cela s'explique par la MOI trop faible (0,0001), puisque des MOI supérieures ont parfaitement protégé les oiseaux. Tsonos *et al.* (248) ont testé trois voies d'administration, dont la voie intratrachéale qui était aussi la voie d'infection. Malgré une MOI de 10, le cocktail de 4 phages n'a pas protégé les poussins de la souche APEC.

Concernant le temps entre l'infection et le traitement, toutes les études expérimentales ont choisi d'administrer les phages le même jour que l'infection. Parallèlement, deux études ont testé l'administration d'un cocktail de deux phages 24h ou 48h post-infection, avec une diminution de la mortalité lorsque les phages étaient administrés par voie intramusculaire,

mais pas lors d'un traitement par pulvérisation aérosol (241,242). Cela confirme que la voie d'inoculation est importante pour contrôler efficacement l'infection. L'administration des phages immédiatement après l'infection (n = 11) permet d'empêcher l'apparition de dégâts irréversibles dans les organes et d'éviter une propagation systémique de la bactérie. Lorsque la MOI était faible, il n'était pas observé de protection chez les oiseaux traités (240,244). Un autre essai n'a pas fonctionné suite à l'administration du phage SPR02 par aérosol (247). La pulvérisation par aérosol ne permet pas de contrôler la quantité de phages inhalée par chaque oiseau, et le temps nécessaire aux phages pour atteindre le site d'infection à une quantité suffisante a pu être trop long. Pourtant, l'administration d'un cocktail de phage contenant SPR02 par pulvérisation aérosol 2h après l'infection avait permis de réduire la mortalité dans une autre expérience (241). Mais la conception expérimentale différait sur l'inoculum bactérien (10 000 fois moins de bactéries), ce qui a pu retarder la mise en place de l'infection et permettre aux phages de se multiplier au site d'infection à temps.

Le développement de la résistance aux phages a été très peu étudié dans les essais de phagothérapie contre la colibacillose. Seules deux études ont déterminé si des mutants étaient apparus au cours du traitement. Oliveira *et al*. (245) n'ont trouvé aucun variant résistant suite au traitement par le phage F78E. Tsonos *et al.* (248) n'ont trouvé que très peu de variants résistants (deux clones) contre les phages de leur cocktail, ce qui n'explique pas l'échec de leurs trois essais de phagothérapie. Il n'est donc pas possible de déterminer si le développement de résistance au phage est responsable de certains des échecs rapportés dans ces études.

En résumé, les facteurs ayant un fort impact sur la phagothérapie sont la MOI et la voie d'administration des phages. Toutefois, très peu d'essais ont été réalisés, et certains paramètres importants sont peut-être encore inconnus. Des études déterminant systématiquement le développement de résistance et la vérification de la multiplication du phage *in vivo* permettraient d'expliquer certains résultats obtenus suite à la phagothérapie. Une seule étude a testé un essai randomisé sur le terrain, avec un résultat extrêmement encourageant. Mais la majorité de ces essais, bien que prometteurs, utilisent une approche curative avec des voies d'application non-réalisables dans la production commerciale de volailles. Des essais préventifs seraient plus intéressants pour prévenir l'infection et réduire la

contamination du troupeau. La prévention des signes cliniques permettrait aussi de réduire les pertes économiques causées par les carcasses endommagées.

3.3.2. Essais préventifs

Les essais décrits comme préventifs sont au nombre de 4. Comme ci-dessus, ceux décrivant plusieurs expérimentations ont été séparés en plusieurs lignes, pour un total de 7 essais.

Tableau 5 : Compilation des essais préventifs par les phages contre des poulets infectés par APEC

Infection	Prévention		Principaux résultats	Références
Sérotype Concentration Voie d'infection	Phage Concentration Voie d'inoculation	Temps pré-infection		
O2 10^4 UFC SAT	Phage SPR02 10^8 ou 10^4 UFP SAT	Simultanément	Réduction ou absence de la mortalité et de la morbidité selon la dose inoculée, souche non-détectable dans le foie et les sacs aériens	(255)
O2 10^4 UFC SAT	Phage SPR02 10^8 ou 10^4 UFP Eau de boisson	Pendant 7 jours avant infection	Pas de réduction de la mortalité et de la morbidité	(255)
O2 10^4 UFC SAT	Phage SPR02 10^8 ou 10^4 UFP Eau de boisson	Pendant 7 jours avant et après infection	Pas de réduction de la mortalité et de la morbidité	(255)
O2 10^6 UFC SAT	Cocktail de 2 phages 10^7 UFP/mL Aérosol	Même jour ou 24h avant ou 72h avant	Réduction significative de la mortalité lorsque la prévention était le même jour que l'infection	(256)
O2 10^6 UFC SAT	Phage SPR02 10^8 UFP IM	7 jours avant et même jour	Pas de réduction significative de la mortalité	(244)
Commensale 10^8 UFC Orale à 6 jours	Cocktail de 6 phages 10^4 UFP/mL Eau de boisson	Quotidiennement dès la naissance et jusqu'à la fin de l'expérience (35 jours)	Aucune réduction de la charge intestinale de la souche modèle, peu de résistance aux phages	(257)
Commensale 10^4 UFC Orale à 7 jours	Cocktail de 4 phages 10^6 UFP/mL Eau de boisson	Quotidiennement dès la naissance et jusqu'à la fin de l'expérience (35 jours)	Réduction des *E. coli* fécaux mais pas de la souche modèle, aucun clone résistant	(257)

Légendes : IM : intramusculaire, SAT : sac aérien thoracique.

Cinq essais visaient à protéger les oiseaux d'une infection à APEC. Ces essais venant du même groupe de recherche, le protocole d'infection des oiseaux est fait avec la même souche APEC dans le sac aérien thoracique. Parmi ces expériences, seules deux ont obtenu des résultats positifs contre la colibacillose. Mais la notion de « préventif » est mal utilisée et leur protocole expérimental s'apparente plus à un traitement. Dans le premier cas, les poussins ont été infectés avec une culture d'*E. coli* mélangée avec le phage SPR02 24h avant, ce qui a permis

une réduction de la mortalité des poussins (MOI 1), voire une protection complète (MOI 10000), en plus de l'élimination de la bactérie dans les organes profonds (255). L'ajout du phage dans la culture bactérienne un jour avant l'expérience a pu permettre de réduire drastiquement l'inoculum bactérien. Il est donc très envisageable que les poussins n'aient pas reçu la dose décrite (10^4 UFC), voire qu'ils n'aient reçu aucune bactérie dans le cas de la coculture avec une MOI de 10000, tuant probablement toutes les bactéries avant l'infection. Dans le deuxième cas, une protection partielle des oiseaux est observée lorsqu'un cocktail de 2 phages est administré par aérosol le même jour que l'infection (256).

Les autres expériences administrant les phages avant l'infection, que ce soit par l'eau de boisson ou par voie intramusculaire, n'ont permis aucune protection des oiseaux infectés. Dans Huff *et al.* (255), les phages ont été administrés dans l'eau de boisson sans ajout d'antiacide ou encapsulation pour les protéger des conditions extrêmes rencontrées dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi, une possibilité serait que les phages aient été dégradés avant l'entrée dans l'intestin, et que le peu de phages encore présents ait été éliminé par l'hôte. Il est aussi possible que les phages n'aient pas pu disséminer jusqu'au site d'infection avant que la bactérie passe dans la circulation sanguine, induisant une infection systémique. Dans Huff *et al.* (244), les poussins ont reçu les phages par voie intramusculaire 7 jours avant l'infection et le même jour que l'infection. Il est possible qu'une réponse immunitaire anti-phage se soit développée entre les deux administrations, entravant l'efficacité du phage SPR02 pour contrôler l'infection à APEC.

Les deux autres essais proviennent de la même étude, et sont différents des autres puisqu'ils ne visent pas à contrôler une infection. Une souche commensale a été inoculée oralement pour s'implanter dans l'intestin des poussins d'une semaine. Deux cocktails de phages ont été testés et administrés quotidiennement dans l'eau de boisson jusqu'à la fin de l'expérience, afin de déterminer s'ils pouvaient empêcher l'infection ultérieure du troupeau par de la matière fécale contaminée (257). Aucun des cocktails n'a permis une réduction de la souche modèle APEC E28, alors que la multiplication des phages dans l'intestin a été vérifiée. La résistance aux phages n'est pas en cause n'ont plus : seulement 2% des isolats ont montré une sensibilité réduite aux phages dans l'essai à 6 phages, tandis qu'aucun clone résistant n'a été détecté dans l'essai à 4 phages. De façon surprenante, un établissement retardé des *E. coli*

fécaux totaux s'est produit chez les poulets supplémentés par le cocktail de 4 phages. Aucune explication n'a pu être fournie, mais les interactions des souches bactériennes au sein du microbiote intestinal doivent être plus étudiées pour mieux comprendre les effets des phages.

En résumé, la complexité des interactions entre les phages, les bactéries et l'hôte, ainsi que la diversité de protocoles expérimentaux, rend difficile l'interprétation des paramètres influant sur la phagothérapie. Différentes variables doivent être déterminées pour une meilleure compréhension : la caractérisation complète des phages utilisés, le développement de résistance, les interactions des phages avec l'hôte (microbiote et système immunitaire), et les interactions phage-bactérie *in vivo*. Pour une future application commerciale des phages, il serait plus intéressant de déterminer leur efficacité préventive.

Contexte et objectifs de la thèse

E. coli est une bactérie capable de coloniser une large gamme d'hôtes, d'organes et d'environnements différents. Les souches *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) peuvent causer de multiples infections chez toutes les espèces aviaires, à tout âge confondu. Prises ensemble, ces infections à *E. coli* entrainent de graves pertes économiques dans l'industrie avicole. La diversité génétique des souches APEC rend les essais de vaccination souvent inefficaces, et face à l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques, il est urgent de trouver une alternative thérapeutique efficace. L'intérêt des bactériophages en tant qu'agents de biocontrôle ne cesse d'augmenter. En effet, les phages présentent une importante diversité, sont omniprésents dans la nature, et peuvent lyser spécifiquement une espèce/souche bactérienne donnée en s'auto-répliquant, autant de qualités qui font défaut aux antibiotiques actuels. Compte tenu de leur spécificité, il est essentiel d'isoler et de caractériser de manière approfondie des phages lytiques, dans le but de développer des collections et d'y puiser les phages susceptibles d'infecter une souche d'intérêt. Dans la littérature, les phages spécifiques aux souches APEC sont soit uniquement caractérisés, soit testés dans leur efficacité lytique (*in vitro* et/ou *in vivo*), mais aucune étude ne combine ces deux pans essentiels à la phagothérapie.

Le potentiel thérapeutique et préventif des phages a été démontré dans des essais de lutte contre la colibacillose aviaire. Bien que présentant des résultats prometteurs, ces études sont peu nombreuses et des données sont insuffisantes. Dans la majorité des essais curatifs, les oiseaux ont été traités individuellement par les phages, ce qui est inapplicable sur le terrain. Des méthodes d'administration de masse ont été testées, notamment dans des essais préventifs, mais n'ont pas montré de résultats significatifs. Afin de garantir un faible coût et une facilitation d'utilisation des phages en élevages avicoles, il est essentiel que les phages puissent être administrés à tout le troupeau. Les suivis de la mortalité et de la morbidité des oiseaux ont été les principaux paramètres observés dans les essais expérimentaux, concluant, en fonction des résultats, au succès ou à l'échec de la phagothérapie. Des données telles que

les quantités de bactéries vivantes et des phages dans les organes, et le développement de résistance aux phages sont souvent manquantes, alors qu'elles pourraient permettre de mieux comprendre certains résultats obtenus suite à l'administration des phages et d'estimer les risques.

Une voie d'administration de masse jamais explorée en phagothérapie est l'injection *in ovo*, déjà couramment employée en filière avicole pour vacciner les oiseaux. Ainsi, ce travail de thèse s'est attaché à déterminer si les phages administrés *in ovo* pouvaient protéger les poussins d'une semaine atteint de colibacillose. Dans ce but, nous avons travaillé à partir d'une collection de phages isolés avant le début de ce projet de thèse. La démarche expérimentale de ce travail a été scindée en deux objectifs.

Le premier objectif a été de **caractériser une collection de phages spécifiques des APEC**. La détermination de la morphologie, de la taxonomie et du contenu génomique de chaque phage nous a permis d'observer l'importante diversité au sein de la collection. Les genres de phages représentés dans ce panel avaient déjà été décrits dans la littérature, sauf un (*Nouzillyvirus*) qui a été défini par l'ICTV en 2020 à partir d'un phage de la collection. Le spectre d'hôtes des phages a été réalisé à partir de l'importante collection de souches APEC constituée au laboratoire, issues majoritairement de volailles françaises atteintes de colibacillose. Par l'obtention de ces différentes données, un cocktail de phages a été conçu et évalué *in vitro* et dans un modèle d'œufs embryonnés (258) infectés par une souche APEC O2:K1.

Le second objectif du projet de thèse avait pour objectif de **déterminer expérimentalement l'efficacité préventive et thérapeutique de deux cocktails de phages chez des poussins d'une semaine d'âge**, période critique de développement de l'infection. Une voie d'administration de masse afin de prévenir et traiter les infections bactériennes aviaires est l'administration des phages dans l'eau de boisson. Cette méthode n'a jamais montré d'efficacité dans le traitement ou la prévention de la colibacillose aviaire. Cependant, des résultats significatifs ont été observés dans le contrôle de *Salmonella*, une entérobactérie proche d'*E. coli*. De plus, les résultats de la phagothérapie dépendent fortement des phages utilisés. Ainsi, lors des essais curatifs, les cocktails de phages ont été administrés dans l'eau de boisson dès l'éclosion, et ce jusqu'à la fin de l'expérience. Lors des essais préventifs, les phages ont été inoculés au

stade embryonnaire. Cette méthode s'inspire des vaccins *in ovo* déjà largement utilisés dans les écloseries. Ainsi, cette voie d'administration, encore jamais explorée en phagothérapie, permettrait d'inoculer les phages rapidement à un nombre important d'embryons et de protéger les poussins dès l'éclosion. Outre le suivi de la mortalité des poussins durant les expérimentations, les oiseaux survivants ont été euthanasiés puis autopsiés afin de déterminer plusieurs paramètres peu observés ensemble lors des essais publiés dans la littérature : présence de lésions associées à la colibacillose aviaire, concentration bactérienne et phagique dans les organes, et présence de clones résistants aux phages.

Résultats

Chapitre 4 : Isolement et caractérisation d'une collection de phages contre les souches *Escherichia coli* pathogènes aviaires et construction d'un cocktail de phage efficace *in vivo*

4.1. Isolement et caractérisation d'une nouvelle collection de phages contre *Escherichia coli* pathogène aviaire (Article 1)

Les souches APEC sont responsables de la principale maladie bactérienne extra-intestinale chez les volailles. En raison du peu de vaccins disponibles et de l'augmentation des bactéries multi-résistantes aux antimicrobiens, d'autres stratégies préventives et thérapeutiques doivent être développées pour lutter contre cette infection. Des modèles expérimentaux ont démontré l'efficacité des phages (seuls ou en combinaison) à traiter la colibacillose. Ce travail présente une collection de nouveaux coliphages, dont la caractérisation a été réalisée afin de déterminer leur taxonomie, leur contenu génétique et leur gamme d'hôtes. Suite à cela, un cocktail de phage a été construit pour évaluer son efficacité à contrôler l'infection APEC dans un modèle d'embryons de poulet.

Avant mon arrivée au laboratoire, 42 phages avaient été isolés de plusieurs échantillons environnementaux. Leur génome a été analysé par profil de restriction enzymatique et/ou par séquençage, permettant d'identifier 18 espèces de phages différents. Un phage supplémentaire (REC) a été obtenu suite à la recombinaison homologue de deux phages (ESCO5 et ESCO37) lors d'une coculture avec une souche APEC O1.

Les analyses morphologiques et taxonomiques des 19 coliphages que j'ai réalisés ont révélé qu'ils appartenaient à deux morphotypes (myovirus et siphovirus) et à neuf genres différents : *Justusliebigvirus*, *Phapecoctavirus, Felixounavirus, Dhakavirus, Mosigvirus, Tequatrovirus, Nonagvirus, Tequintavirus* et *Nouzillyvirus*. Ce dernier groupe taxonomique a été défini en 2020 à partir d'un des phages de notre collection (ESCO41).

L'annotation automatique des génomes a été faite par Prokka sur la plateforme Galaxy Migale d'INRAE. Ce logiciel étant destiné à annoter les génomes procaryotes, et non les virus, une annotation manuelle a été réalisée. A l'aide de la base de données de NCBI, puis d'outils tels que VIRFam et PHROG, les fonctions putatives des gènes et leur appartenance à un module ont été prédites. L'absence de gènes associés à la lysogénie suggère que les 19 coliphages sont strictement lytiques. Une importante synténie a été observée suite à la comparaison des phages appartenant au même genre taxonomique.

Le spectre d'hôtes des 19 coliphages a été déterminé sur un panel de 30 souches APEC appartenant aux principaux sérogroupes associés à la colibacillose aviaire, deux souches *E. coli* de laboratoire et trois sérovars de *Salmonella*. Certains phages ne lysaient aucune souche APEC, tandis que d'autres présentaient une plus large gamme d'hôtes en lysant jusqu'à 37% des bactéries testées. Les récepteurs et les enzymes phagiques, déterminant de l'adsorption, sont discutés dans cette partie afin de comprendre la spécificité de chaque phage.

Suite à ces différentes caractérisations, un cocktail de 8 phages appartenant à 8 genres taxonomiques a été construit. Ses propriétés lytiques ont été testées contre la souche APEC O2:K1 BEN4358, virulente dans un essai de mortalité chez des embryons de poulet. *In vitro*, le cocktail de phage a complètement inhibé la croissance de BEN4358. Dans un modèle *in ovo*, le cocktail a permis à 90% des embryons de poulet de survivre à l'infection à BEN4358, contrairement à ceux n'ayant pas reçu les phages.

Pour conclure, 19 nouveaux phages capables de lyser des souches APEC ont été isolés et caractérisés. Ces phages présentaient des caractéristiques distinctes entre genre, mais aussi entre espèces, expliquant certaines variations dans le spectre d'hôtes. Ces résultats démontrent l'importance d'une caractérisation taxonomique et génomique complète des phages. Le cocktail de 8 phages construit a montré une grande efficacité lytique contre la souche APEC BEN4358 et serait un candidat prometteur au biocontrôle de la colibacillose aviaire.

En complément de ces résultats, une analyse approfondie des protéines structurales des cinq *Phapecoctavirus* a été effectuée. Ce genre taxonomique étant relativement récent, aucune étude ne s'est encore focalisée sur leur caractérisation. Ainsi, une analyse de spectrométrie

de masse a été réalisée afin de confirmer la présence des protéines structurales et associées au virion prédites *in silico*.

Pour la réalisation de cette étude, Angélina Trotereau a isolé les phages, fait les analyses RFLP et envoyé les ADN extraits à séquencer. Grâce à ces données, j'ai pu déterminer la morphologie des phages au microscope électronique, leur taxonomie, puis annoter manuellement les génomes. L'analyse comparative des génomes par le logiciel EasyFig a été effectuée par Antoine Culot. J'ai ensuite réalisé le spectre d'hôtes, puis les tests d'efficacité *in vitro* et *in ovo* du cocktail de phage. Ces travaux ont été publiés dans *Microbiology Spectrum* en 2023.

4.2. Résultats complémentaires

4.2.1. Matériel et méthodes

4.2.1.1. Isolement des protéines structurales des phages du genre *Phapecoctavirus*

Les protéines de la capside des phages ESCO5, ESCO13, ESCO25, ESCO37 et REC ont été isolées comme suit : 200 µL de suspension phagique purifiée au CsCl ont été mélangés avec 500 µL de méthanol 99,9%, 375 µL de chloroforme et 250 µL de tampon (Tris 10 mM, $MgSO_4$ 10 mM, NaCl 150 mM [pH 7,5]). Les échantillons ont été homogénéisés puis centrifugés à 16000 x g pendant 5 min à 4°C (Eppendorf centrifuge 5415-R). La phase aqueuse a été éliminée et 500µL de méthanol sont ajoutés afin de précipiter les protéines. Suite à une nouvelle centrifugation à 16000 x g pendant 5 min à 4°C, le surnageant est éliminé. Le culot contenant les protéines phagiques est mis à sécher puis repris dans de l'eau MilliQ.

4.2.1.2. Analyse protéomique

Dix microgrammes d'extraits protéiques de chaque phage ont été déposés sur un gel SDS-PAGE et migrés sur 0,5 cm afin d'obtenir des bandes courtes. Le gel a ensuite été coloré au bleu de Coomassie, et chaque bande a été découpée et envoyée pour analyse à la plateforme PAPPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest). Les bandes ont été lavées avec du dithiothréitol (10 mM) et de l'iodoacétamide (55 mM). Les échantillons ont été digérés une nuit à 37°C par de la trypsine (200 ng) dans un tampon de bicarbonate (50 mM). Les peptides ont ensuite été extraits avec 0,5% d'acide trifluoroacétique (TFA) dans 50% d'acétonitrile (ACN), avant d'être séchés et remis en suspension dans 80µL de 0,1% de TFA dans 2% d'ACN. L'analyse par chromatographie liquide-spectrométrie de masse (LC-MS/MS) a été réalisée dans un spectromètre de masse Q-Exactive Plus couplé au système NanoLC Ultra.

4.2.1.3. Extraction et purification du peptidoglycane

Le peptidoglycane des souches BEN5202 et Cp6Salp3 a été purifié séparément. Une culture bactérienne d'une nuit a été diluée au 1:50 dans du milieu LB et incubée à 37°C avec agitation à 180 rpm pendant 18 h. La culture a ensuite été autoclavée à 115°C pendant 20 min afin d'inactiver les bactéries, puis centrifugée à 3800 x g pendant 30 min à 10°C (Beckman GS-15R Centrifuge). Après élimination du surnageant, le culot est conservé à -20°C.

4.2.1.4. Zymogramme

Pour la réalisation des zymogrammes, les culots de peptidoglycane ont été suspendus dans de l'eau MilliQ afin d'obtenir une concentration de 156 mg/mL de substrat. Ce mélange a été incorporé dans un gel SDS-PAGE à 12%. Une fois le gel polymérisé, 15 µL de protéines de capside phagique des phages ESCO5, ESCO37 et REC ont été déposés. Après électrophorèse, les gels ont été lavés avec de l'eau MilliQ, puis transférés dans un tampon de renaturation (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 150 mM [pH 7], $MgCl_2$ 10 mM, Triton X-100 0,1 %) pendant 48 h à température ambiante. Après rinçage dans de l'eau MilliQ pendant 12 h, les gels ont été colorés avec du bleu de méthylène (0,1% de bleu de méthylène, 0,001% KOH) pendant 3 h à température ambiante, puis décolorés avec de l'eau MilliQ afin que les bandes d'activités enzymatiques apparaissent.

n° ligne	Fonction prédite	n° ORF					Peptides *				
		ESCO5	REC	ESCO37	ESCO13	ESCO25	ESCO5	REC	ESCO37	ESCO13	ESCO25
1	Inconnue	ESCO5_259	REC_00083	ESCO37_00245	ESCO13_00027	ESCO25_254			3	2	
2	Inconnue	ESCO5_238	REC_00105	ESCO37_00223		ESCO25_00275			3		
3	Protéine phosphatase putative à sérine/thréonine	ESCO5_00199	REC_00144	ESCO37_00184	ESCO13_00087	ESCO25_00030	2			2	
4	Inconnue	ESCO5_00195	REC_00148	ESCO37_00180	ESCO13_00091	ESCO25_00034	5	3	6	6	
5	Inconnue	ESCO5_00191	REC_00152	ESCO37_00176	ESCO13_00195	ESCO25_00038					3
6	Lysozyme putatif	ESCO5_00188	REC_00155	ESCO37_00173	ESCO13_00098	ESCO25_00041	3		3	3	
7	Endonucléase	ESCO5_00169	REC_00174	ESCO37_00158	ESCO13_00116	ESCO25_00059			5		
8	3'-5' exonucléase	ESCO5_00165	REC_00178	ESCO37_00154	ESCO13_00120	ESCO25_00063					5
9	Exonucléase putative RdgC	ESCO5_00162	REC_00181	ESCO37_00151	ESCO13_00123	ESCO25_00066			2		
10	Protéine portale potentielle	ESCO5_00120	REC_00222	ESCO37_00110	ESCO13_00163	ESCO25_00105	45	35	46	41	26
11	Inconnue	ESCO5_00119	REC_00223	ESCO37_00109	ESCO13_00164	ESCO25_00106	4	3	4	5	2
12	Protéine d'échafaudage putative	ESCO5_00118	REC_00224	ESCO37_00108	ESCO13_00165	ESCO25_00107	11	12	22	19	4
13	Protéine putative de stabilisation/décoration de la tête	ESCO5_00117	REC_00225	ESCO37_00107	ESCO13_00166	ESCO25_00108	64	51	81	76	26
14	Protéine de tête majeure putative	ESCO5_00116	REC_00226	ESCO37_00106	ESCO13_00167	ESCO25_00109	191	155	218	204	102
15	Protéine de capuchon de la queue putative	ESCO5_00114	REC_00228	ESCO37_00104	ESCO13_00169	ESCO25_00111	7	6	18	14	7
16	Inconnue	ESCO5_00113	REC_00229	ESCO37_00103	ESCO13_00170	ESCO25_00112			3	3	
17	Inconnue	ESCO5_00112	REC_00230	ESCO37_00102	ESCO13_00171	ESCO25_00113	5	2	5	5	2
18	Protéine de complétion de la queue Tc1	ESCO5_00111	REC_00231	ESCO37_00101	ESCO13_00172	ESCO25_00114	10	8	12	7	2
19	Protéine structurelle putative	ESCO5_00110	REC_00232	ESCO37_00100	ESCO13_00173	ESCO25_00115	58	46	57	65	27
20	Protéine structurelle putative	ESCO5_00109	REC_00233	ESCO37_00099	ESCO13_00174	ESCO25_00116	22	18	22	21	11
21	Inconnue	ESCO5_00108	REC_00234	ESCO37_00098	ESCO13_00175	ESCO25_00117			2		
22	Inconnue	ESCO5_00107	REC_00235	ESCO37_00097	ESCO13_00176	ESCO25_00118	57	51	60	57	28
23	Inconnue	ESCO5_00106	REC_00236	ESCO37_00096	ESCO13_00177	ESCO25_00119	21	16	24	18	9
24	Inconnue	ESCO5_00105	REC_00237	ESCO37_00095	ESCO13_00178	ESCO25_00120	4	4	6	5	2
25	Plaque de base putative	ESCO5_00104	REC_00238	ESCO37_00094	ESCO13_00179	ESCO25_00121	20	16	22	25	10
26	Pointe centrale de la plaque de base	ESCO5_00103	REC_00239	ESCO37_00093	ESCO13_00180	ESCO25_00122	13	6	17	13	5
27	Inconnue	ESCO5_00102	REC_00240	ESCO37_00092	ESCO13_00181	ESCO25_00123	5	4	7	6	4
28	Inconnue	ESCO5_00101	REC_00241	ESCO37_00091	ESCO13_00182	ESCO25_00124	11	10	12	13	7
29	Fibre de la queue	ESCO5_00100	REC_00242	ESCO37_00090	ESCO13_00183	ESCO25_00125	37	30	46	36	22
30	Gaine non contractile de la queue	ESCO5_00099	REC_00243	ESCO37_00089	ESCO13_00184	ESCO25_00126	27	17	27	22	12
31	Endo-N-acetylneuraminidase	ESCO5_00098	REC_00244				61	46			
32	Inconnue	ESCO5_00096	REC_00246	ESCO37_00087	ESCO13_00186	ESCO25_00128	27	20	32	31	13
33	Protéine structurelle	ESCO5_00095	REC_00247	ESCO37_00086	ESCO13_00187	ESCO25_00129	17	8	19	18	5
34	Protéine putative à domaine gpH	ESCO5_00094	REC_00248	ESCO37_00085	ESCO13_00188	ESCO25_00130	23	18	26	29	8
35	Protéine putative dégradant l'acide colanique	ESCO5_00091	REC_00251	ESCO37_00082	ESCO13_00191	ESCO25_00133	62	45	55	59	36
36	Protéine de pointe de queue	ESCO5_00090	REC_00252	ESCO37_00081	ESCO13_00192	ESCO25_00134	10	3	13	10	4
37	Inconnue	ESCO5_00089	REC_00253	ESCO37_00080	ESCO13_00193	ESCO25_00135	21	15	22	16	14
38	Protéine de liaison à l'ADN simple brin	ESCO5_00088	REC_00254	ESCO37_00079	ESCO13_00194	ESCO25_00136		2	19	13	9
39	Inconnue	ESCO5_00069	REC_00273	ESCO37_00060	ESCO13_00213	ESCO25_00155		3	6	5	
40	ATPase putative	ESCO5_00016	REC_00030	ESCO37_00007	ESCO13_00266	ESCO25_00208					2

4.2.2. Résultats

Afin de confirmer la présence des protéines prédites structurales et des enzymes muralytiques et dépolymérases dans la capside des cinq phages *Phapecoctavirus*, les protéines des capsides des phages ont été extraites. Les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse pour chaque phage, et les résultats combinés sont présentés dans le **tableau 6**.

Sans surprise, la majorité des protéines détectées étaient des protéines structurales. Les gènes codant ces protéines et faisant partie du module structural des *Phapecoctavirus* sont représentés dans la **figure 6**. La capside était constituée de multiples copies de la protéine de tête majeure (**Tableau 6**, ligne 14), de la protéine portale assurant l'entrée et la sortie de l'ADN (ligne 10), et de protéines accessoires renforçant la stabilité de la capside (ligne 13). La queue est composée des protéines de complétion reliant la tête et la queue (ligne 18), la gaine (ligne 30), la protéine du capuchon à l'extrémité distale de la queue (ligne 15), et la plaque centrale (*baseplate*) (lignes 25 et 26) où sont rattachées la pointe de queue et les fibres de queue (lignes 29 et 36). La protéine putative à domaine gpH (ligne 34) est probablement aussi une fibre de queue, et est annotée en ce sens dans plusieurs *Phapecoctavirus* disponibles dans les bases de données (par exemple NC_052656 et NC_047994). Les protéines d'échafaudage, assurant l'assemblage de la capside (ligne 12), ont aussi été détectées. D'autres protéines structurales ont été identifiées dans la capside des cinq phages (lignes 19, 20 et 33), ainsi que plusieurs protéines de fonction inconnue (lignes 11, 17, 22, 23, 24, 27, 28, 32 et 37).

Certaines protéines prédites *in silico* dans le module structural des cinq phages n'ont pas été systématiquement détectées, par exemple une protéine de fonction inconnue codée par les cinq phages (ligne 21) et qui n'a été identifiée que chez ESCO37. Ces résultats peuvent être dus à une faible abondance de ces protéines dans les particules phagiques, ou bien à une incompatibilité des procédures d'extraction des protéines structurales. Par ailleurs, quatre

---

Tableau 6 : Analyse par spectrométrie de masse des protéines structurales des *Phapecoctavirus*

Les n° d'ORF correspondant à chaque phage sont indiqués pour chaque protéine identifiée par l'analyse de spectrométrie de masse. Les cases colorées en vert correspondent aux ORF positives suite à l'analyse.

* Nombre de séquences peptidiques uniques déterminant une protéine.

protéines (deux de fonction inconnue, une prédite structurale et une putative d'assemblage des fibres de queue) faisant partie du module structural n'ont été retrouvées dans la capside d'aucun des phages (**Figure 6**). Ce résultat suggère fortement qu'elles ne sont pas structurales et ne font pas partie de la capside. Elles pourraient avoir un rôle dans l'assemblage des particules virales au sein de la bactérie. Des protéines non-attribuées au module structural et réparties sur la longueur du génome ont aussi été identifiées dans cette analyse. Excepté chez ESCO5, la protéine de liaison à l'ADN simple brin était présente (ligne 38). D'autres protéines, comme des exonucléases et des endonucléases, ont été détectées.

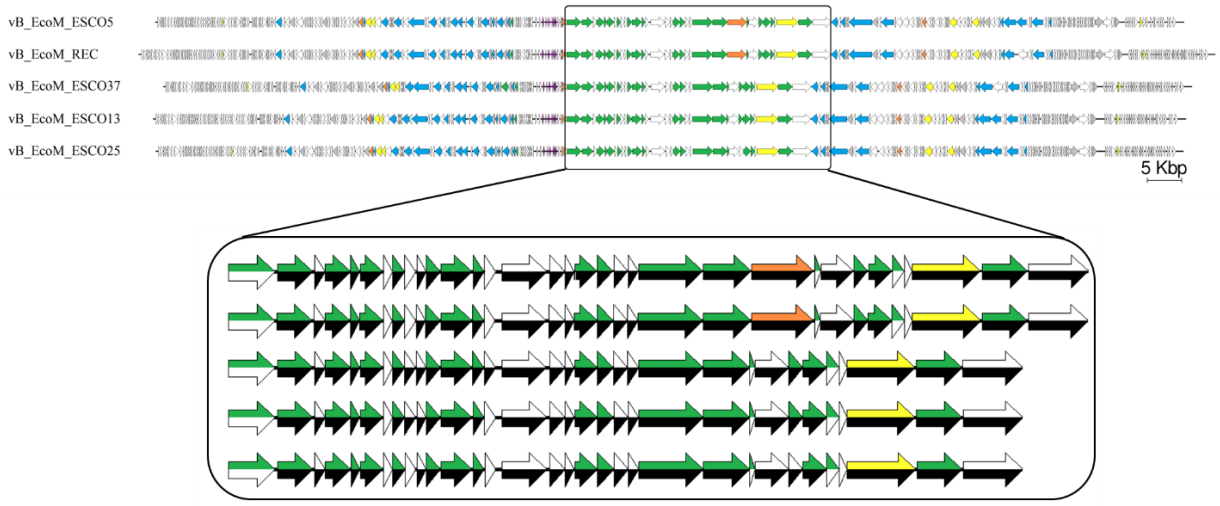


Figure 6 : Schéma des modules structuraux des phages ESCO5, REC, ESCO37, ESCO13 et ESCO25

Cette représentation est reprise de la figure 3 de l'article ci-dessus. Les flèches représentent les ORFs et leur direction. Sur la moitié supérieure des ORFs sont représentées leur fonction : protéines de structure (vert), protéines de lyse (orange), protéines morron (jaune) et de fonction inconnue (blanc). La partie inférieure des ORFs colorée en noir signifie que la protéine a été identifiée par l'analyse de spectrométrie de masse.

Les cinq capsides de phages possèdent également des enzymes : une protéine de queue dégradant l'acide colanique (ligne 35), le lysozyme pour dégrader le peptidoglycane (ligne 6) et l'endo-N-acetylneuraminidase chez ESCO5 et REC (ligne 31). De façon surprenante, les lysozymes de REC et d'ESCO25 n'ont pas été détectés dans l'analyse de spectrométrie de masse. Les lysozymes d'ESCO5, ESCO37 et ESCO13 étant détectés avec des faibles fractions peptidiques (entre 3 et 6), il est possible que leur absence dans les deux autres phages soit due à un problème de détection. Afin de prouver expérimentalement que le lysozyme des *Phapecoctavirus* est fonctionnel et sa présence au sein du phage REC, un zymogramme a été réalisé avec comme substrat le peptidoglycane de la souche APEC O1 Cp6Salp3 (**Figure 7A**) et de la souche APEC O2 BEN5202 (**Figure 7B**). Les zones de clairance distinctes sur les gels correspondent au poids moléculaire du lysozyme (≃ 18,7 kDa), concluant que ESCO5, ESCO37 et REC possèdent bien cette enzyme au sein de leur capside.

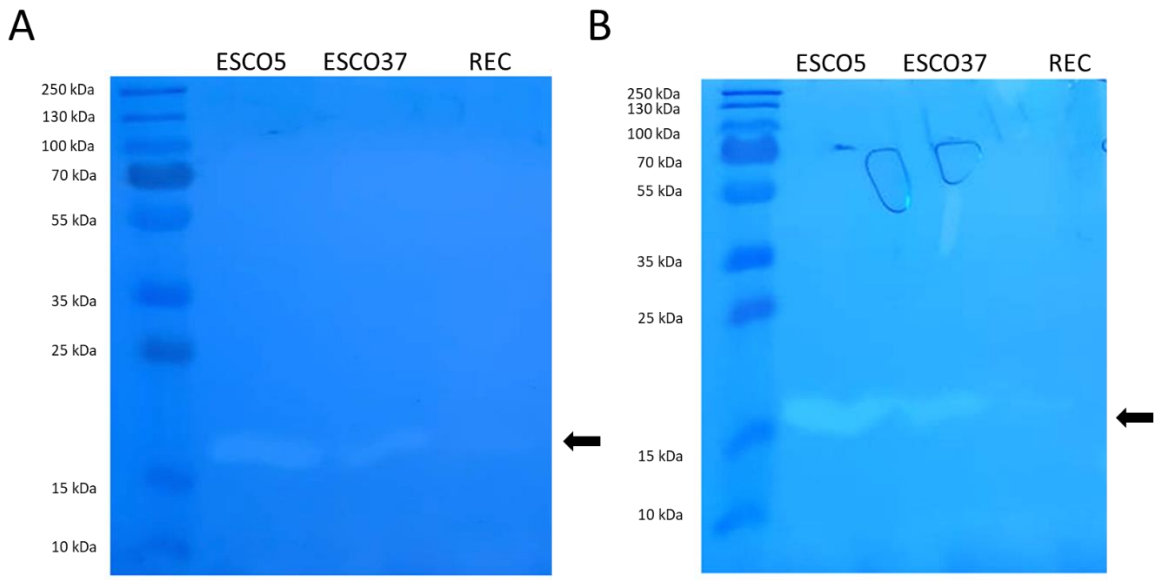


Figure 7 : Détection par zymogramme d'enzymes de capsides des phages ESCO5, ESCO37 et REC dégradant le lysozyme

Zymogramme sur gel contenant du peptidoglycane (156 mg/mL) de la souche Cp6Salp3 (**A**) et de la souche BEN5202 (**B**). La zone de clairance, indiquée par une flèche, correspond à une activité enzymatique de dégradation du peptidoglycane. La taille des marqueurs de taille est indiquée sur la gauche de chaque zymogramme.

Chapitre 5 : Evaluation de l'efficacité de cocktails de phages à prévenir et traiter la colibacillose aviaire

Dans le chapitre précédent, il a été démontré qu'une combinaison de phages était efficace *in vitro* et *in ovo* contre la souche APEC BEN4358. Bien que ces alternatives soient plus éthiques que les expérimentations sur animaux vivants, il est nécessaire de confirmer ces résultats sur la volaille, ce qui permettra aussi d'étudier les interactions entre la bactérie, les phages et l'hôte. Ce nouveau chapitre a pour objectif d'étudier l'efficacité des phages à prévenir et traiter la colibacillose aviaire chez le poussin d'une semaine, période critique du développement de l'infection. Pour cela, il a été décidé d'observer et de déterminer différents facteurs, peu étudiés ensemble dans les rapports traitant de la phagothérapie contre APEC. Les résultats combinés de ces différents facteurs nous permettraient de comprendre les raisons du succès ou de l'échec de la phagothérapie contre la colibacillose aviaire. Ces différents paramètres sont les suivants :

- Suivi de la mortalité
- Détermination de la morbidité des poussins survivants
- Concentration bactérienne dans le foie (organe cible de la colibacillose) et dans les caeca (réservoir des souches APEC)
- Concentration et identification phagique dans ces mêmes organes
- Développement de la résistance des bactéries aux phages

5.1. Evaluation de l'efficacité d'un cocktail de 8 phages

Le cocktail de 8 phages décrit dans le chapitre précédent a montré des résultats plus qu'encourageants dans le contrôle *in vitro* et *in ovo* de la souche APEC BEN4358. Fort de ce constat, la capacité de ce cocktail à contrôler la colibacillose chez le poussin d'une semaine a été évaluée. L'efficacité prophylactique des 8 phages a été examinée en inoculant le cocktail au stade embryonnaire, tandis que l'efficacité prophylactique et thérapeutique a été testée en administrant le cocktail dans l'eau de boisson durant toute l'expérience.

5.1.1. Matériel et méthodes

5.1.1.1. Souches bactériennes utilisées et conditions de croissance

Les souches BEN4358, BEN3573, BEN3992 et DH5α, dont les caractéristiques sont décrites dans l'article n°1, ont été utilisées. Sauf indication contraire, les souches bactériennes ont été cultivées dans du milieu Lysogeny Broth (LB, formule Miller) à 37°C sous agitation à 180 rpm, puis conservée à -80°C dans 15% (v/v) de glycérol.

5.1.1.2. Sélection des phages et préparation

Les phages REC, ESCO3, ESCO47, ESCO58, ESCO9, ESCO10, ESCO30 et ESCO41 ont été précédent isolés et caractérisés (259). Afin d'obtenir un titre élevé de phages, les cultures bactériennes (REC et ESCO3 : BEN4358 ; ESCO41 : BEN3573 ; ESCO58 : BEN3992 ; ESCO47, ESCO9, ESCO10 et ESCO30 : DH5α) en phase de croissance logarithmique ($DO_{600nm} \simeq 0,4$) dans 5 mL de LB ont été supplémentées en $MgSO_4$ (10 mM) et $CaCl_2$ (1mM) et infectées à partir d'une solution phagique (MOI = 0,1). Après 15 min à température ambiante sans agitation pour permettre l'adsorption des phages, les cultures ont été incubées à 37°C sous agitation (180 rpm) pendant 4 h. Après une centrifugation à 3800 x g pendant 10 min, le surnageant a été filtré à travers un filtre de 0,2 µm, puis conservé à 4°C.

Chaque lysat a été purifié en gradient de chlorure de césium (CsCl) selon la méthode décrite dans le matériel et méthodes de l'article n°1.

5.1.1.3. Expérimentation animale

Considérations éthiques : Les animaux utilisés au cours de ces travaux ont été hébergés dans les isolateurs de la Plateforme Expérimentale d'Infectiologie (PFIE) située au centre INRAE Val de Loire. Les procédures ont été évaluées par le comité d'éthique en expérimentation animale du Centre Val de Loire et approuvées par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Les poussins ont reçu de la nourriture et de l'eau *ad libitum* pendant toute la durée de l'expérience. Un contrôle biquotidien a été pratiqué par les animaliers afin d'euthanasier les oiseaux présentant des signes cliniques trop importants.

Plan expérimental : L'essai a été réalisé à partir d'œufs embryonnés SPF (*Specific Pathogen Free*) de la race White Leghorn (PA-12), incubés à 37,8°C et 45% d'humidité dans un incubateur à œuf (MG316 neptenus, FIEM). Au 19ème jour d'embryogenèse (ED19 pour *embryonic day* 19), les œufs ont été transférés dans les isolateurs de la PFIE. L'éclosion a lieu à ED21, et la durée maximale de l'expérimentation était de 8 jours. Les œufs embryonnés ont été divisés en cinq lots : 'Phages', 'EC', 'EC + PhagesIO', 'EC + PhagesEau' et 'EC + Antibiotique', qui sont détaillés dans la **figure 8** avec le plan expérimental.

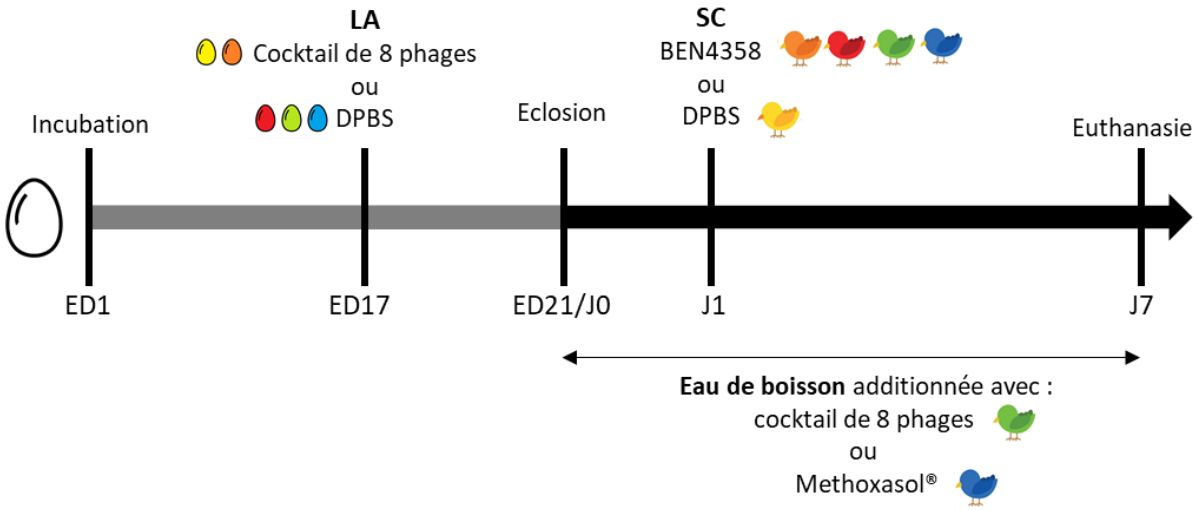


Figure 8 : Schéma du protocole expérimental pour évaluer l'efficacité prophylactique et thérapeutique du cocktail de 8 phages

Le lot 'Phages' (jaune) permet de contrôler l'innocuité des phages, et a reçu le cocktail de 8 phages *in ovo* puis du DPBS à un jour d'âge. Le lot 'EC' (rouge) est le contrôle de létalité de la souche APEC, et a été inoculé avec du DPBS *in ovo* puis infecté par la souche BEN43558 à un jour d'âge. Le lot 'EC + PhagesIO' (orange) a reçu le cocktail de phages à ED17 et a été infecté par la souche BEN4358 le lendemain de l'éclosion, afin d'évaluer l'efficacité préventive des phages. Pour déterminer l'efficacité préventive et curative des phages, le lot 'EC + PhagesEau' (vert) a reçu du DPBS *in ovo*, a été infecté par BEN4358 à un jour d'âge, et a reçu de l'eau additionnée en phages pendant toute la durée de l'expérience. Enfin, le lot 'EC + Antibiotique' (bleu) a été inoculé avec du DPBS *in ovo*, puis infecté par BEN4358 à un jour d'âge, et a reçu de l'eau additionnée avec du Methoxasol® pendant toute la durée de l'expérience. La flèche grise représente l'incubation au stade embryonnaire, et la flèche noire débute à partir de l'éclosion. LA : liquide allantoïque ; SC : sous-cutané.

Inoculation *in ovo* : Un cocktail de phages à une concentration finale de 3,3 × 10^8 UFP/mL a été obtenu en mélangeant à volume égal les lysats des 8 phages sélectionnés. A ED17, la coquille a été désinfectée avec de l'éthanol à 70% puis percée au sommet de la poche d'air, sans toucher la membrane, avec une aiguille stérile de calibre 18. Ensuite, 100 µL du cocktail de phages ou 100 µL de DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) ont été inoculés dans le liquide allantoïque avec une seringue reliée à une aiguille stérile de calibre 25 (**Figure 9**). Le trou ainsi formé a été scellé à l'aide d'un autocollant. Les œufs ont été réincubés dans les mêmes conditions.

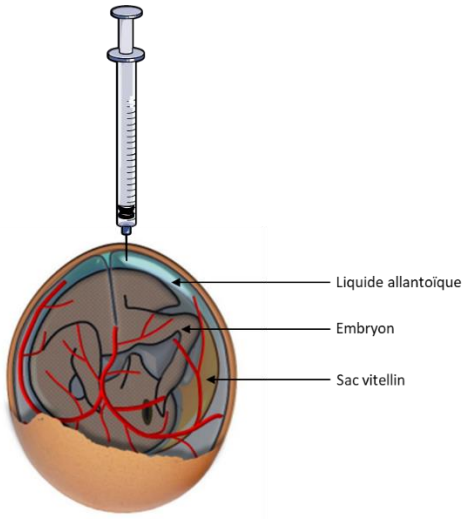


Figure 9 : Représentation de l'inoculation des œufs embryonnés au 17ème jour d'embryogenèse

Supplémentation de l'eau de boisson : Les solutions de phages purifiées ont été associées à volume égal à une concentration finale de 1,6 × 10^{10} UFP/mL. De l'eau du robinet non-stérile a été additionnée avec le cocktail de phage (1,9 × 10^8 UFP/L) ou avec l'antibiotique METHOXASOL® 20 mg/100 mL (Sigma, France) (1/5000). L'eau de boisson a été mise en place dès l'éclosion et a été renouvelée quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience.

Infection sous-cutanée : La souche BEN4358 a été mise en culture pendant une nuit. La densité optique a été mesurée et l'inoculum a été préparé par dilution dans du DPBS afin d'obtenir un inoculum à 1,5 × 10^5 UFC/mL. L'inoculum a été vérifié par étalement sur gélose TSA (Tryptone Soja Agar) incubée une nuit à 37°C, puis dénombré.

Le lendemain de l'éclosion, les poussins d'un jour ont été bagués, puis infectés par inoculation sous-cutanée avec 200 µL de l'inoculum de BEN4358 (soit 30600 UFC par oiseau) ou avec 200 µL de DPBS.

Sept jours post-infection, tous les poussins survivants ont été euthanasiés par dislocation cervicale et autopsiés. Un morceau du foie et un des caeca ont été prélevés et placés dans des tubes Miltenyi préalablement remplis de 3,5 mL d'eau physiologique. Après pesée, les organes ont été homogénéisés pendant 1 min par le GentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec, France).

Score des lésions macroscopiques : Les lésions fibrineuses macroscopiques du foie, du sac aérien gauche, du poumon gauche et du péricarde ont été observées et notées de 0 à 2.

5.1.1.4. Quantification de la charge bactérienne

A partir des organes homogénéisés, des dilutions en série (facteur 10) ont été réalisées dans de l'eau physiologique. Cent microlitres de chaque dilution sont étalés sur gélose Drigalski supplémentée ou non avec de l'acide nalidixique (30 mg/mL, Sigma) afin de sélectionner la souche BEN4358. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C et dénombrées le lendemain.

5.1.1.5. Quantification de la charge phagique

Afin de séparer les phages des bactéries et des débris biologiques, 1 mL d'échantillon d'organe homogénéisé a été centrifugé pendant 10 min à 9300 x g (Eppendorf, Centrifuge 5415R), puis filtré à travers une plaque filtrante multi-puits de 0,2 µm (Millipore). L'échantillon filtré ainsi que des dilutions successives de facteur 10 ont été déposés sur des tapis bactérien de BEN4358 et de DH5α puis incubés une nuit à 37°C.

5.1.1.6. Identification des phages

L'identification des phages a été réalisée par PCR. Pour chaque échantillon, le spot obtenu suite au dépôt de l'échantillon filtré sur tapis bactérien a été collecté et mélangé dans 100 µL

d'eau stérile, chauffé à 99°C pendant 10 min, et laissé pendant 1h30 à température ambiante. Les réactions PCR ont été réalisées avec chaque couple d'amorces conçus dans le travail précédent (259). Après électrophorèse, les produits PCR ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1%.

5.1.1.7. Résistance aux phages des bactéries réisolées

Une colonie de chaque échantillon positif a été réisolée pour déterminer la sensibilité aux phages individuels par une analyse de l'efficacité de lyse (EOP, *efficiency of plating*). Des dilutions en série de chaque phage ont été déposées sur les tapis bactériens des clones réisolés et de la souche sauvage BEN4358. Les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C, puis les plages de lyses ont été dénombrées. La valeur d'EOP est obtenue en divisant le titre phagique sur la bactérie testée par le titre obtenu chez la souche de référence. Selon les valeurs, les bactéries ont été définies comme sensibles (EOP ≥ 0,5), modérément résistantes (0,01 ≤ EOP < 0,5) ou résistantes (0,0001 < EOP < 0,01) (260).

5.1.1.8. Test de létalité sur embryon de poulet

Afin de déterminer la virulence des clones réisolés des poussins survivants et l'efficacité de plusieurs solutions de phages, un test de létalité sur embryon de poulet a été réalisé selon la méthode décrite par Trotereau et Schouler (258). A ED12, les œufs embryonnés ont été inoculés avec 100 µL d'inoculum à 2×10^3 UFC/mL de BEN4358 ou de clone réisolé. Deux heures après l'infection par BEN4358, des embryons ont été inoculés soit avec 100 µL de DPBS, de ceftiofur (2,5 µg/mL), du cocktail de 8 phages, du lysat REC, du lysat ESCO3 ou d'une combinaison de REC et ESCO3, ajustés à 4×10^4 UFP/mL. Comme témoins négatifs, des œufs ont été inoculés uniquement avec 100 µL de DPBS ou 100 µL de la souche BEN5048. Les œufs ont été mirés quotidiennement pendant six jours pour contrôler la mortalité des embryons.

5.1.1.9. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 6.07 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). Le test log-rank a été appliqué pour les courbes de survie, représentées par des courbes de Kaplan-Meir. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour les autres analyses. Le seuil de significativité a été considéré à des valeurs $p < 0,05$.

5.1.2. Résultats

5.1.2.1. Les phages n'ont pas réduit le taux de mortalité et le développement des lésions des poussins infectés

Dans l'essai prophylactique, le cocktail de 8 phages a été inoculé *in ovo* à ED17. Le taux de mortalité à 7 jours post-infection entre les poussins uniquement infectés du groupe 'EC' (75%) et le groupe 'EC + PhagesIO' (80%) n'était pas significativement différent (**Figure 10A**). Les lésions fibrineuses associées à la colibacillose aviaire ont été observées dans un poussin survivant de chaque groupe (**Figure 10C**). Celui du groupe 'EC' présentait des lésions intermédiaires au foie, au péricarde et au sein du sac aérien gauche, tandis que le poussin du groupe 'EC + PhagesIO' présentait uniquement des lésions intermédiaires au foie.

Dans l'essai prophylactique et thérapeutique, les phages ont été administrés quotidiennement dans l'eau de boisson. Le taux de mortalité du groupe 'EC + PhagesEau' (80%) n'était pas significativement différent de celui du groupe infecté et non-traité par les phages. Une différence significative a été observée dans la mortalité entre le groupe 'EC' et le groupe 'EC + Antibiotique' (15%) ($p < 0,001$) (**Figure 10B**). Trois des poussins survivants du groupe 'EC + PhagesEau' présentaient des lésions intermédiaires : deux au foie, et un au péricarde et au sac aérien. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes 'EC' et 'EC + PhagesEau', probablement en raison du faible nombre de poussins survivants (**Figure 10D**). Aucun des poussins survivants supplémentés par l'antibiotique n'a développé de lésions.

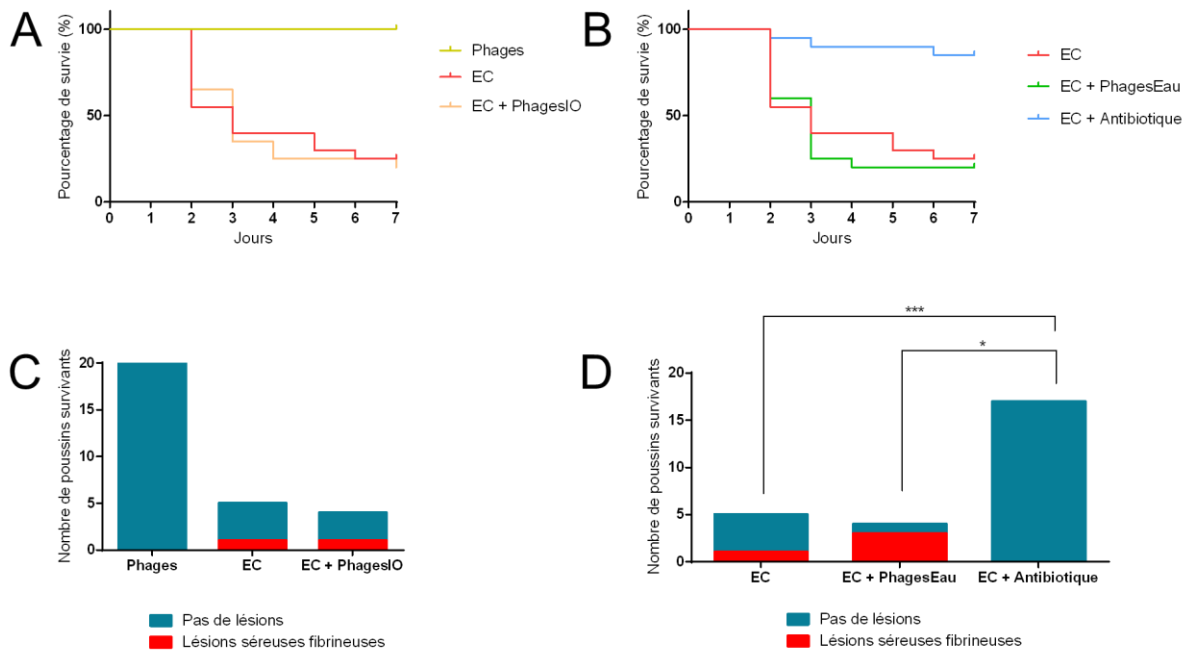


Figure 10 : Mortalité et développement de lésions fibrineuses des séreuses des poussins des différents groupes

Courbes de survie Kaplan-Meier des poussins des groupes (**A**) 'Phages' (n = 20), 'EC' (n = 20) et 'EC + PhagesIO' (n = 20) et (**B**) 'EC' (n = 20), 'EC + PhagesEau' (n = 20) et 'EC + Antibiotique' (n = 20). Les *p* values ont été calculées par le test log-rank ($p < 0,05$). Présence ou absence de lésions macroscopiques fibrineuses des séreuses associées à la colibacillose chez les poussins survivants des groupes (**C**) 'Phages' (n = 20), 'EC' (n = 5) et 'EC + PhagesIO' (n = 4) et (**D**) 'EC' (n = 5), 'EC + PhagesEau' (n = 4) et 'EC + Antibiotique' (n = 17). Les données ont été analysées à l'aide d'un test de Mann-Whitney à un niveau de signification de $p < 0,05$.

5.1.2.2. Une diminution de la colonisation intestinale de la souche BEN4358 s'est produite dans le groupe ayant reçu les phages dans l'eau de boisson

Les phages étaient présents dans les caeca des poussins survivants des groupes 'EC + PhagesIO' et 'EC + PhagesEau', dans une concentration moyenne de $2,31 \times 10^7$ UFP/g et $9,64 \times 10^6$ UFP/g, respectivement. L'identification des phages par PCR a montré qu'ESCO3 était présent dans la totalité des poussins survivants des deux groupes (4/4) et REC était détecté dans 6 poussins sur 8. Les autres phages composant le cocktail n'ont pas été détectés (**Figure 11**). Un poussin du groupe 'EC + PhagesEau' contenait ESCO3 dans le foie à une concentration de $4,0 \times 10^3$ UFP/g. Aucun phage n'a été détecté dans le groupe 'Phages' non-infecté.

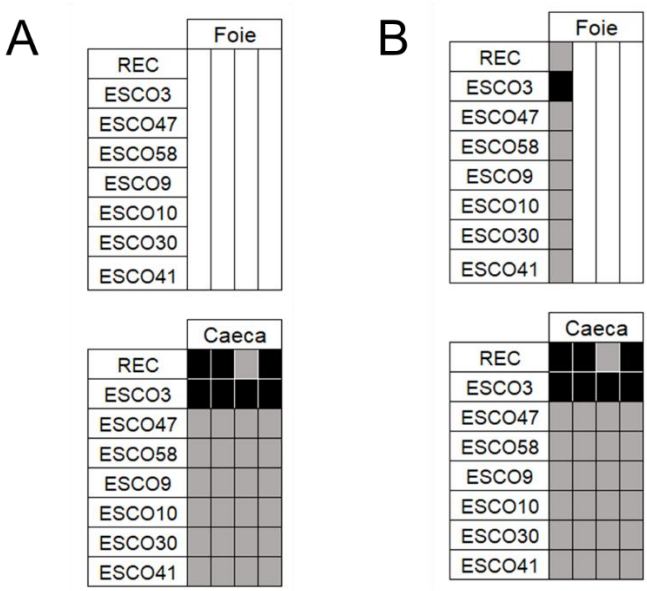


Figure 11 : Présence et identification des phages dans les organes des poussins survivants ayant reçu le cocktail de huit phages

Les phages ont été détectés et identifiés dans le foie et les caeca des poussins survivants des groupes (**A**) 'EC + PhagesIO' et (**B**) 'EC + PhagesEau'. Chaque colonne représente un poussin. Le titre des phages dans les deux organes a été déterminé par tests ponctuels. Les spots d'échantillon non-dilués des organes positifs aux phages ont été collectés, mélangés puis bouillis dans de l'eau stérile pour effectuer une PCR, afin d'identifier la présence ou l'absence de chaque phage individuel. Les colonnes blanches représentent les organes négatifs aux phages ; les cases grises représentent les PCR négatives dans les organes positifs aux phages ; et les cases noires représentent les PCR positives dans les organes positifs aux phages.

La charge bactérienne de BEN4358 a été déterminée dans le foie et les caeca des poussins survivants des groupes infectés. Excepté dans le groupe 'EC + Antibiotique', BEN4358 a été détectée dans les foies de certains poussins survivants des autres groupes (**Figure 12**). Parmi les groupes 'EC', 'EC + PhagesIO' et 'EC + PhagesEau', les poussins présentant des lésions au foie (n = 4) n'étaient pas systématiquement ceux ayant une charge bactérienne détectée dans ledit organe (n = 1). Cela indique que les lésions observées ne sont pas corrélées à la charge bactérienne de BEN4358 au sein des organes. Le poussin du groupe 'EC + PhagesEau' présentant la plus grande concentration bactérienne dans le foie ($1{,}66 \times 10^4$ UFC/g) était celui dans lequel ESCO3 était détecté.

Aucune différence significative n'a été observée entre la charge moyenne intestinale de BEN4358 des groupes 'EC' ($3{,}55 \times 10^9$ UFC/g) et 'EC + PhagesIO' ($2{,}68 \times 10^9$ UFC/g) (**Figure 12A**). Cependant, une réduction significative de 0,7 unité logarithmique de la charge

bactérienne des caeca a été observée entre les groupes 'EC' et 'EC + PhagesEau' (6,12 × 10^8 UFC/g) (**Figure 12B**). Les poussins survivants du groupe 'EC + Antibiotique' étaient ceux présentant la plus faible concentration moyenne de BEN4358 dans les caeca (2,29 × 10^8 UFC/g). Aucune autre entérobactérie que BEN4358 n'a été détectée chez les poussins survivants d'aucun groupe. Ainsi, le ratio entre les *E. coli* totaux et la souche BEN4358 dans les caeca n'a pas pu être obtenu.

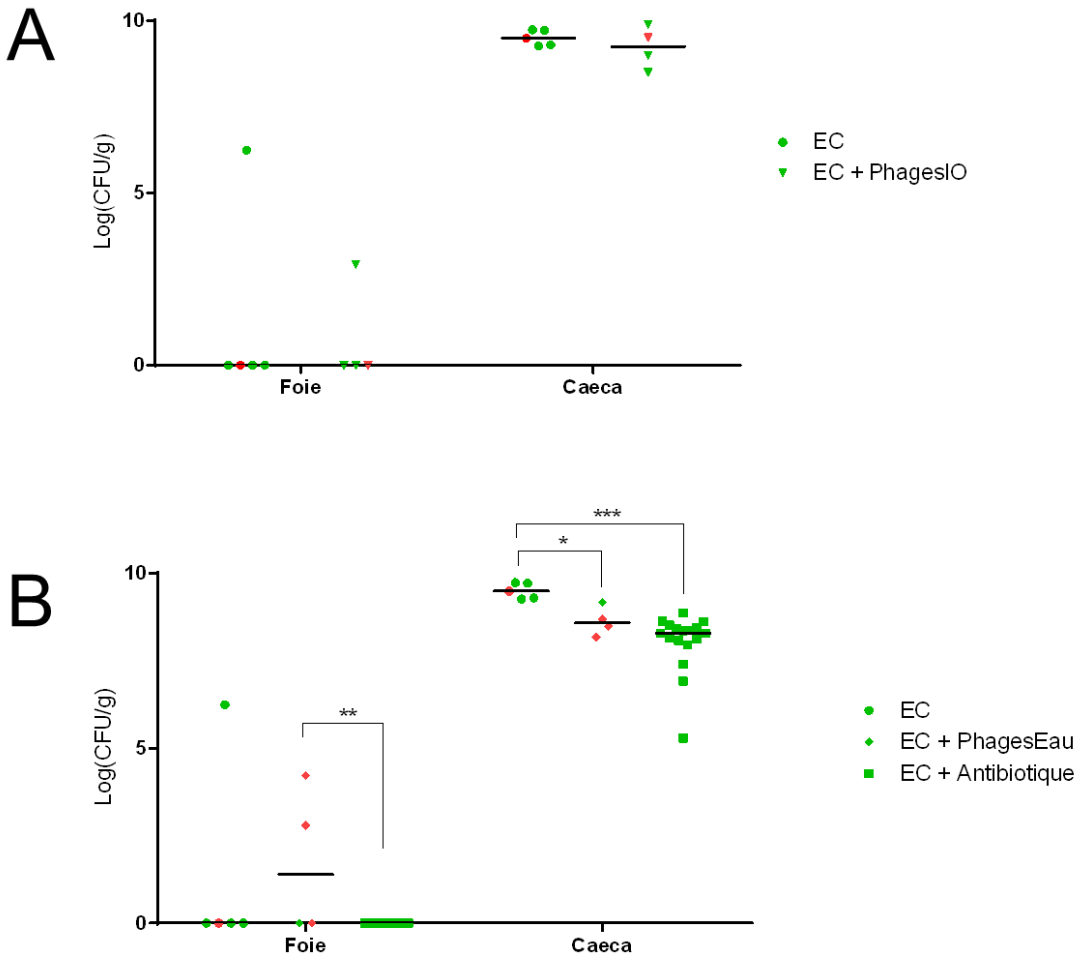


Figure 12 : Concentration bactérienne dans les organes des poussins survivants

Concentration bactérienne dans le foie et les caeca des poussins survivants des groupes (**A**) EC' et 'EC + PhagesIO' et des groupes (**B**) 'EC', 'EC + PhagesEau' et 'EC + Antibiotique'. Chaque symbole représente un poussin. L'absence (vert) ou la présence (rouge) de lésions macroscopiques fibrineuses associées à la colibacillose est rapportée. Les données ont été analysées à l'aide d'un test de Mann-Whitney à un niveau de signification de $p < 0,05$.

5.1.2.3. La résistance aux phages induit une altération de la virulence des bactéries

La sensibilité aux phages des clones réisolés à partir des caeca des poussins survivants ayant reçu les phages a été déterminée. Les clones provenant des poussins du groupe 'EC + PhagesIO' étaient tous totalement résistants à ESCO3 et ESCO10 et partiellement résistants à ESCO47 (**Figure 13A**). Des résistances partielles à REC et ESCO58 ont aussi été observées. Les clones provenant du groupe 'EC + PhagesEau' étaient tous totalement résistants à ESCO3 et ESCO10 et partiellement résistants à REC (**Figure 13B**). Le clone 775 était également totalement résistant à ESCO58 et partiellement résistant à ESCO47. Le clone 791 était partiellement résistant à ESCO47, ESCO58 et ESCO9, et était celui présentant la plus faible susceptibilité au cocktail de 8 phages.

La virulence de trois clones (771, 775 et 791) provenant des deux groupes a été évaluée dans un test de létalité sur embryon de poulet (**Figure 13C**). Les clones 771 et 775 ont induit la mort de 30 et 40% des embryons, respectivement, et présentaient une différence significative avec la souche sauvage qui induisait la mort de 80% des embryons ($p < 0,05$). De même, le clone 791 n'a induit que 20% de mortalité, et était donc significativement moins virulent que la souche BEN4358 ($p < 0,01$).

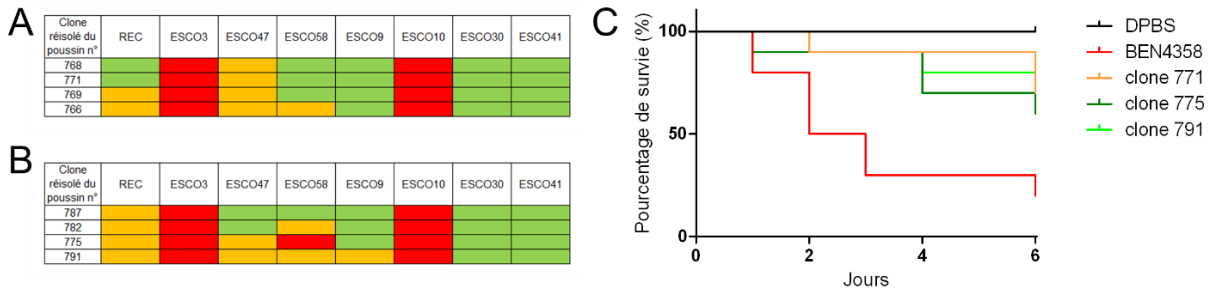


Figure 13 : Résistance aux phages des clones réisolés des caeca et impact sur leur virulence

EOP des phages composant le cocktail sur les colonies réisolées des caeca des poussins survivants des groupes (**A**) 'EC + PhagesIO' et (**B**) 'EC + PhagesEau'. L'EOP est le nombre d'UFP obtenu sur un clone réisolé divisé par le nombre d'UFP obtenu sur la souche BEN4358 de type sauvage. (**C**) Courbes de survie Kaplan-Meier des œufs embryonnés inoculés avec du DPBS (courbe noire), 266 UFC de la souche BEN4358 (courbe rouge), 241 UFC du clone 771 provenant du lot 'EC + PhagesIO' (courbe orange), 191 UFC du clone 775 (courbe vert foncé) et 156 UFC du clone 791 (courbe vert clair) provenant du lot 'EC + PhagesEau'.

5.1.2.4. La combinaison des phages REC et ESCO3 permet une survie de tous les embryons infectés

Le cocktail de 8 phages n'a permis aucune diminution de la mortalité et de la morbidité des poussins, peu importe son mode d'administration. Etant donné que les phages REC et ESCO3 étaient majoritairement présents chez les poussins survivants, nous avons voulu déterminer si ces deux phages, seuls ou en combinaison, étaient efficaces contre la souche APEC BEN4358. Comme démontré précédemment, à 6 jours post-infection, le cocktail de phage a permis la survie de 90% des embryons, au contraire de la souche sauvage qui induit la mort de 80% d'entre eux ($p < 0,001$). Le traitement des embryons par le phage REC a aussi permis 90% de survie ($p < 0,001$). Le traitement par le phage ESCO3 n'a montré aucun effet protecteur par rapport aux embryons uniquement infectés. Cependant, la combinaison REC + ESCO3 a permis une protection complète des embryons infectés par la souche APEC ($p < 0,001$).

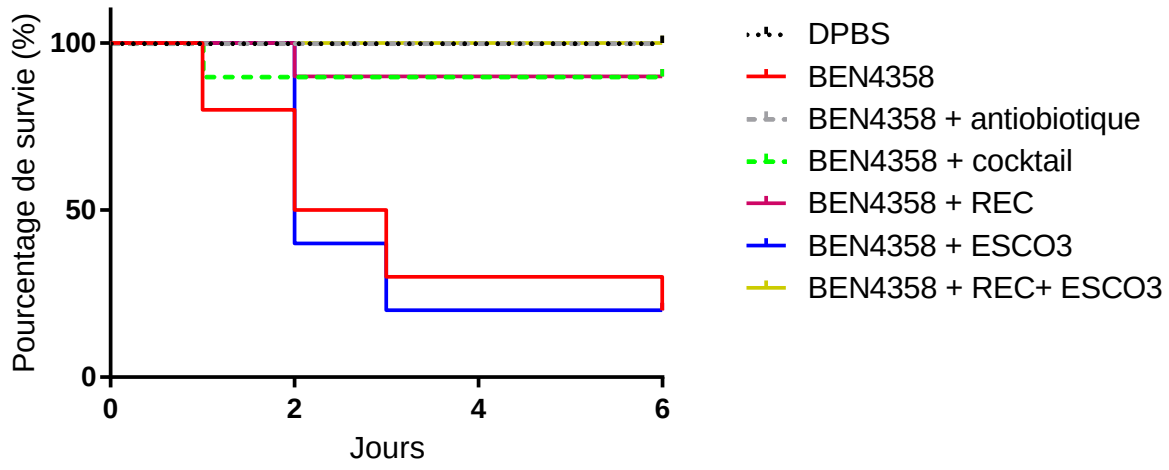


Figure 14 : Test d'efficacité de différentes combinaisons de phages *in ovo*

Courbes de survie Kaplan-Meier des œufs embryonnés inoculés avec du DPBS (courbe noire), 266 UFC de la souche BEN4358 uniquement (courbe rouge), BEN4358 et 2,5 µg/mL de ceftiofur (courbe pointillée grise), ou le cocktail de 4 phages (courbe pointillée verte), ou REC (courbe bordeaux), ou ESCO3 (courbe bleue) ou une combinaison de REC et d'ESCO3 (courbe jaune).

5.1.3. Conclusion

Les résultats obtenus suite à l'expérimentation animale suggèrent que le cocktail de 8 phages n'est pas apte à contrôler la colibacillose aviaire chez les poussins d'une semaine. Les phages inoculés *in ovo* ou administrés dans l'eau de boisson n'ont conduit à aucune diminution du taux de mortalité des poussins infectés et du développement des lésions fibrineuses colibacillaires. Ainsi, les phages n'ont ni prévenu ni contrôlé l'infection bactérienne. Une réduction significative de la charge intestinale de la souche BEN4358 a été observée chez les poussins survivants ayant reçu les phages via l'eau de boisson. Ces résultats indiquent que les phages ont été capables de lyser BEN4358 *in vivo*.

La présence de variants résistants dans les caeca des poussins survivants montre une évolution des bactéries suite à la pression de sélection induite par les phages. Quel que soit le mode d'administration, ces clones étaient invariablement totalement résistants aux phages ESCO3 et ESCO10. Les variants résistants testés dans un modèle d'œufs embryonnés présentaient une diminution significative de leur virulence par rapport à la souche parentale BEN4358.

Lors de l'identification des phages dans les organes des poussins survivants, nous avons observé que seuls deux phages du cocktail étaient encore détectés (REC et ESCO3) et s'étaient multipliés *in vivo*. L'absence d'ESCO9, ESCO10, ESCO30 et ESCO41 était prévisible puisque ces phages ne sont pas capables de se multiplier spécifiquement sur la souche BEN4358. Cependant, les phages ESCO47 et ESCO58 présentent une activité lytique contre cette souche APEC, et leur absence nous a interpellés. Ceci peut être dû soit à un manque de stabilité de ces phages dans des conditions *in vivo*, soit à une concentration insuffisante pour initier leur multiplication.

Pour la suite des travaux, il nous a donc paru plus pertinent de n'inclure que les quatre phages lytiques contre BEN4358 dans le cocktail administré aux oiseaux. Etant donné que la combinaison des phages REC et ESCO3 suffit à protéger totalement les embryons, cela permettra à ces deux phages d'être à une concentration plus élevée au sein de l'hôte. De même pour les deux autres phages lytiques (ESCO47 et ESCO58), qui pourront potentiellement se multiplier. De plus, le faible nombre de poussins survivants dans les

groupes dû à la pathologie très sévère induite nous a conduit à diminuer la concentration de l'inoculum, afin d'avoir plus de survivants, et donc d'échantillons à analyser.

5.2. Evaluation de l'efficacité d'un cocktail de 4 phages

Le dernier objectif était d'évaluer *in vivo* l'efficacité préventive et thérapeutique d'un cocktail de quatre phages. Suite aux résultats observés dans la partie précédente, nous avons fait le choix de prioriser les quatre phages lytiques à la souche inoculée aux poussins : REC, ESCO3, ESCO47 et ESCO58. En effet, chez les poussins infectés, le cocktail de huit phages n'a pas permis de contrôler la colibacillose aviaire. Cependant, qu'ils aient été inoculés au stade embryonnaire 5 jours avant l'infection ou bien administrés quotidiennement dans l'eau de boisson, au moins deux des phages lytiques se sont multipliés jusqu'à 7 jours post-infection. Cet état de fait est confirmé par l'émergence de variants résistants aux phages dans les caeca des poussins survivants. La combinaison des quatre phages lytiques contre BEN4358 va permettre une plus forte concentration de ces phages et nous a paru plus pertinente pour la suite de ces travaux. Dans cette partie, deux expérimentations animales ont été réalisées afin de répondre à l'objectif posé.

5.2.1. L'administration *in ovo* d'un cocktail de phages prévient partiellement la colibacillose chez les poussins (Article 2)

L'objectif de ce travail était de tester si le cocktail de quatre phages inoculé *in ovo* était capable de protéger les poussins infectés par la souche BEN4358 le lendemain de l'éclosion.

La stabilité des quatre phages composant le cocktail a été déterminée *in vitro*, tout d'abord dans les conditions thermiques correspondant à l'incubation des œufs embryonnés et à la température corporelle des poulets (37°C et 41°C, respectivement), puis dans du liquide intestinal simulé. Excepté ESCO58 dont l'infectivité était réduite à 37°C, les phages étaient relativement stables dans les différentes conditions testées. Ces résultats prometteurs nous ont conduits à les inoculer ensemble à ED17 afin de déterminer leur transmission jusqu'au poussin nouvellement éclos. La quantification et l'identification des phages dans le sac vitellin et les caeca de 25 poussins ont été réalisées. Bien qu'étant présent de manière hétérogène, 88% des poussins étaient positifs à au moins un phage et les quatre phages étaient détectés dans 64% des poussins nouveau-nés.

Fort de constat, la capacité du cocktail de quatre phages à contrôler la colibacillose a été évaluée. Par manque d'isolateurs disponibles, seul le potentiel prophylactique a été déterminé. Ainsi, le cocktail a été administré dans le liquide allantoïque des embryons à ED16. Comme précédemment, les poussins d'un jour d'âge ont été infectés par BEN4358, mais avec un inoculum dix fois plus faible. Les différents lots sont présentés dans la **figure 15**.

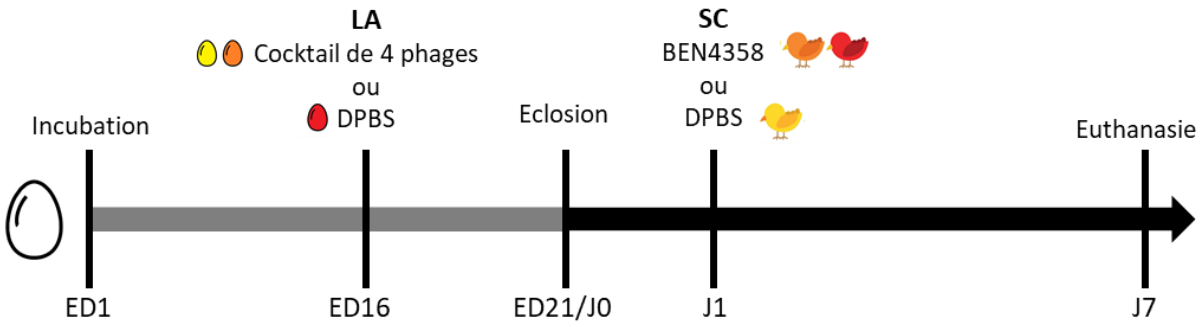


Figure 15 : Schéma du protocole expérimental pour évaluer l'efficacité prophylactique du cocktail de 4 phages

Le lot 'Phages' (jaune) permet de contrôler l'innocuité des phages, et a reçu le cocktail de 4 phages *in ovo* puis du DPBS à un jour d'âge. Le lot 'EC' (rouge) est le contrôle de létalité de la souche APEC, et a été inoculé avec du DPBS *in ovo* puis infecté par la souche BEN43558 à un jour d'âge. Le lot 'EC + Phages' (orange) a reçu le cocktail de phages à ED16 et a été infecté par la souche BEN4358 le lendemain de l'éclosion, afin d'évaluer l'efficacité préventive des phages. La flèche grise représente l'incubation au stade embryonnaire, et la flèche noire débute à partir de l'éclosion. LA : liquide allantoïque ; SC : sous-cutané.

La réduction de la concentration de l'inoculum bactérien nous a permis d'avoir plus de poussins survivants. Comme les résultats précédents, le taux de mortalité entre les groupes 'EC' et 'EC + Phages' n'était pas statistiquement différent. Cependant, tandis que plus de la moitié des survivants du groupe 'EC' présentaient des lésions fibrineuses associées à la colibacillose, aucun des 13 poussins survivants n'en avait, suggérant que les phages ont prévenu le développement de l'infection. De façon identique à l'essai réalisé avec le cocktail de huit phages, REC et ESCO3 étaient les seuls phages détectés dans les caeca des poussins survivants. Toutefois, une réduction de 0,9 log de la charge intestinale moyenne de BEN4358 a pu être observée par rapport au groupe infecté uniquement. La sensibilité envers les phages des clones réisolés des caeca des poussins du groupe 'EC + Phages' a été mesurée par analyse de l'EOP. Il ressort que tous les clones présentaient une résistance complète à ESCO3, excepté

un clone resté sensible au cocktail entier. Certains variants étaient également partiellement résistants à REC ou totalement résistants à ESCO47. De façon surprenante, un clone présentait une totale résistance aux quatre phages du cocktail. Il apparait que ceux présentant une résistance (partielle ou totale) au phage REC étaient affectés dans leur virulence dans un modèle d'œufs embryonnés. La capsule K1 et l'antigène O2, faisant partie des facteurs de virulence majoritairement ciblés par les phages lors de l'adsorption, étaient encore exprimés par les variants résistants, indiquant qu'un ou plusieurs autres facteurs de virulences seraient impactés et responsables de la résistance aux phages.

Pour conclure, ces travaux démontrent pour la première fois que des phages inoculés *in ovo* peuvent être transmis aux poussins nouvellement éclos. Le cocktail de phage a permis à certains poussins d'être protégés du développement de la colibacillose aviaire et d'avoir une concentration intestinale de la souche APEC diminuée. De la résistance aux phages s'est développée, et certains variants présentaient une altération de la virulence. Ces observations suggéreraient une réduction de la propagation environnementale de la souche APEC et une pathogénèse diminuée dans le cas d'une contamination.

Cet article a été soumis dans *Poultry Sciences* en mai 2023. La nécropsie et la préparation des échantillons ont été réalisées avec l'aide de Pierrette Menanteau et Catherine Schouler.

5.2.2. Détermination de l'efficacité préventive et thérapeutique du cocktail de 4 phages

Etant donné les résultats prometteurs obtenus suite à l'inoculation de quatre phages *in ovo*, nous avons souhaité confirmer ces résultats dans une nouvelle expérimentation. L'efficacité prophylactique et thérapeutique du cocktail a également été déterminée en combinant l'inoculation des phages au stade embryonnaire et leur administration quotidienne dans l'eau de boisson. De plus, la synergie entre les phages et un antibiotique a été testée.

5.2.2.1. Matériel et méthodes

Le matériel et les méthodes utilisés dans cette partie sont identiques à ceux présentés ci-dessus (cf. partie 5.2.1.). Ainsi, seuls les protocoles divergents seront présentés ici.

5.2.2.1.1. Expérimentation animale

Plan expérimental : Les œufs embryonnés SPF de la race White Leghorn (PA-12) utilisés pour cette étude ont été incubés et manipulés comme décrit dans l'article n°2. Ils ont été divisés en cinq lots : 'Phages', 'EC', 'EC + PhagesIO', 'EC + PhagesIOEau' et 'EC + Phages + Antibiotique', qui sont détaillés dans la **figure 16** avec le plan expérimental.

Inoculation *in ovo* : Le cocktail de quatre phages était à une concentration finale de $4{,}3 \times 10^7$ UFP/mL. A ED17, 100 µL du cocktail de phages ou 100 µL de DPBS ont été inoculés dans le liquide allantoïque.

Supplémentation de l'eau de boisson : Les solutions de phages purifiés ont été associées à une concentration finale de $2{,}3 \times 10^9$ UFP/mL. De l'eau du robinet a été additionnée avec le cocktail de phage ($4{,}6 \times 10^5$ UFP/L) ou avec l'antibiotique Bactrim® 40 mg/200 mL (1/10000). L'eau de boisson a été mise en place dès l'éclosion et a été renouvelée quotidiennement pendant toute la durée de l'expérience.

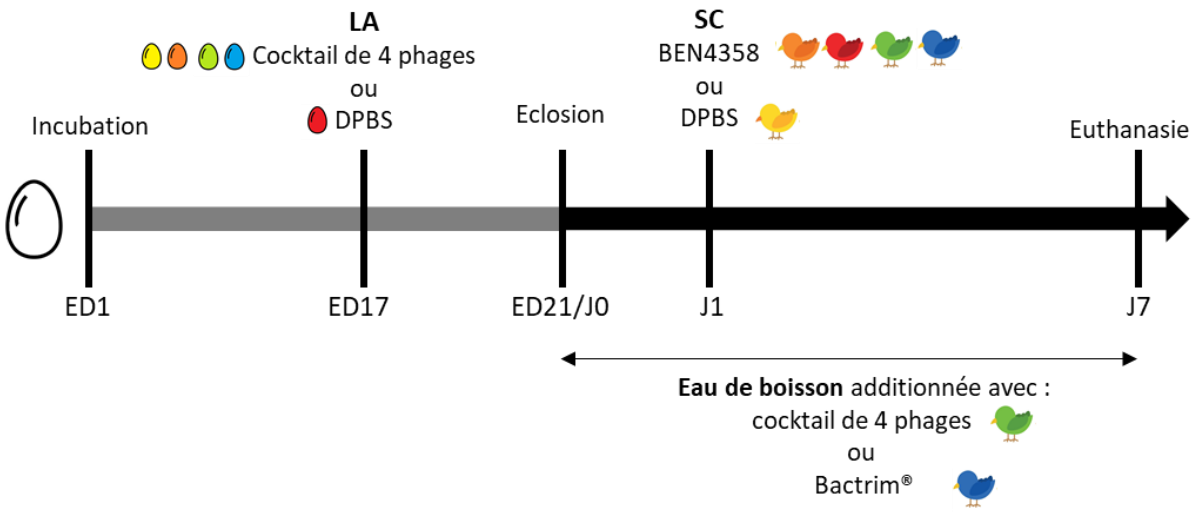


Figure 16 : Schéma du protocole expérimental pour évaluer l'efficacité prophylactique et thérapeutique du cocktail de 4 phages

Le lot 'Phages' (jaune) a reçu le cocktail de 4 phages *in ovo* puis du DPBS à un jour d'âge. Le lot 'EC' (rouge) a été inoculé avec du DPBS *in ovo* puis infecté par la souche BEN43558 à un jour d'âge. Le lot 'EC + PhagesIO' (orange) a reçu le cocktail de phages à ED17 et a été infecté par la souche BEN4358 le lendemain de l'éclosion, afin d'évaluer l'efficacité préventive des phages. Pour déterminer l'efficacité préventive et curative des phages, le lot 'EC + PhagesIOEau' (vert) a reçu du le cocktail *in ovo*, a été infecté par BEN4358 à un jour d'âge, et a reçu de l'eau additionnée en phages pendant toute la durée de l'expérience. Enfin, le lot 'EC + Phages + Antibiotique' (bleu) a été inoculé avec les phages *in ovo*, puis infecté par BEN4358 à un jour d'âge, et a reçu de l'eau additionnée avec du Bactrim® pendant toute la durée de l'expérience. La flèche grise représente l'incubation au stade embryonnaire, et la flèche noire débute à partir de l'éclosion. LA : liquide allantoïque ; SC : sous-cutané.

<u>Infection sous-cutanée :</u> La souche BEN4358 a été mise en culture pendant une nuit. La densité optique a été mesurée et l'inoculum a été préparé par dilution dans du DPBS afin d'obtenir un inoculum à 1,5 × 10^5 UFC/mL. L'inoculum a été vérifié par étalement sur gélose TSA, incubée une nuit à 37°C, puis dénombré.

Le lendemain de l'éclosion, les poussins d'un jour ont été bagués, puis infectés par inoculation sous-cutanée avec 200 µL de l'inoculum de BEN4358 (soit 30600 UFC par oiseau) ou avec 200 µL de DPBS.

Les poussins des groupes 'EC + PhagesIO', 'EC + PhagesIOEau' et 'EC + Phages + Antibiotique' décédés durant l'expérience ont tous été nécropsiés afin de récupérer un morceau du foie et un des caeca. Sept jours post-infection, les poussins survivants ont été euthanasiés par

dislocation cervicale et nécropsiés. Les mêmes organes ont été prélevés et préparés comme décrit précédemment.

Score des lésions macroscopiques : Les lésions fibrineuses macroscopiques du foie, du sac aérien gauche, du poumon gauche et du péricarde ont été observées et notées de 0 à 2.

5.2.2.1.2. Identification des phages des poussins décédés

Les échantillons d'organes prélevés sur les poussins morts durant l'expérimentation ont été analysés afin d'identifier les phages présents. L'identification par PCR a été réalisée comme décrit plus haut (cf. partie 5.1.1.6.).

5.2.2.1.3. Enrichissement des échantillons caecaux

Une culture de la souche BEN4358 en phase de croissance logarithmique ($DO_{600nm} \simeq 0,4$) a été diluée dans du milieu LB afin d'obtenir un inoculum de 9×10^6 UFC/mL. Les puits d'une plaque alvéolaire (Thermo Scientific) ont été remplis avec 150 µL de culture bactérienne, 50 µL d'échantillon caecal provenant des poussins du lot 'Phages', et 100 µL de milieu LB enrichi en $MgSO_4$ (10 mM) et en $CaCl_2$ (1 mM). Pour chaque condition, trois puits ont été testés simultanément. La plaque a été incubée dans le Microbiology Reader Bioscreen à 37°C sous agitation. La densité optique (DO_{600nm}) des puits a été mesurée toutes les 10 minutes pendant 24 h.

5.2.2.2. Résultats :

5.2.2.2.1. Deux phages sont majoritairement détectés suite à l'infection des poussins

Précédemment, il a été démontré que les quatre phages inoculés *in ovo* à ED17 étaient présents dans la majorité des poussins nouvellement éclos. Cependant, 8 jours plus tard, uniquement deux phages (REC et ESCO3) étaient détectés chez les poussins survivants. Afin de déterminer à quel moment les deux autres phages du cocktail (ESCO47 et ESCO58) n'étaient plus détectés, les organes des poussins ayant reçu les phages *in ovo* décédés durant l'expérience ont été analysés (**Figure 17**). Seulement trois des poussins étaient négatifs aux phages. Dans les trois groupes, REC et ESCO3 étaient majoritairement présents dès 1 jour post-infection chez les poussins positifs aux phages (97% et 87%, respectivement). ESCO47 n'était détecté dans aucun poussin, et ESCO58 dans seulement deux d'entre eux (7%) au 3ème jour post-infection.

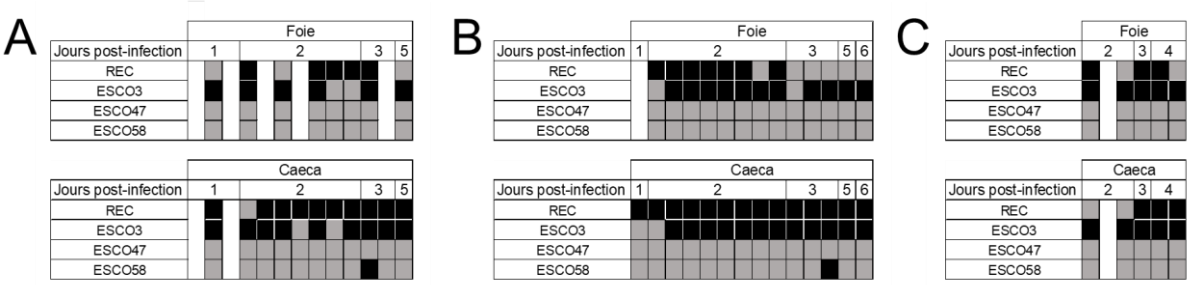


Figure 17 : Présence et identification des phages dans les organes des poussins décédés durant l'expérience

Les phages ont été détectés et identifiés dans le foie et les caeca des poussins décédés des groupes (**A**) 'EC + PhagesIO', (**B**) 'EC + PhagesIOEau' et (**C**) 'EC + Phages + Antibiotique'. Chaque colonne représente un poussin. Le jour post-infection correspondant au décès de chaque poussin est indiqué. Le titre des phages dans les deux organes a été déterminé par tests ponctuels. Les spots d'échantillon non-dilués des organes positifs aux phages ont été collectés, mélangés puis bouillis dans de l'eau stérile pour effectuer une PCR, afin d'identifier la présence ou l'absence de chaque phage individuel. Les colonnes blanches représentent les organes négatifs aux phages ; les cases grises représentent les PCR négatives dans les organes positifs aux phages ; et les cases noires représentent les PCR positives dans les organes positifs aux phages.

5.2.2.2.2. L'application des phages seuls n'a pas réduit le taux de mortalité

Lorsque le cocktail de 4 phages a été inoculé *in ovo* à ED17, le taux de mortalité à 7 jours post-infection n'était pas significativement différent entre les groupes 'EC' (70%) et 'EC + PhagesIO' (65%) (**Figure 18A**). Aucun des poussins survivants du groupe 'EC + PhagesIO' n'avait de lésions fibrineuses des séreuses. Un poussin du groupe uniquement infecté présentait une lésion intermédiaire au sac aérien et une lésion sévère au péricarde (**Figure 18C**).

Dans une application préventive et thérapeutique, les phages ont été inoculés *in ovo* puis administrés dans l'eau de boisson durant toute l'expérience. Ce groupe 'EC + PhagesIOEau' présentait le même taux de mortalité (70%) que le groupe 'EC' (**Figure 18B**). De plus, deux des poussins survivants présentaient des lésions intermédiaires au foie, et l'un d'entre eux avait également développé des lésions modérées au péricarde (**Figure 18D**). Seule la combinaison des phages avec l'antibiotique a permis une diminution significative de la mortalité des poussins (30%) ($p < 0,01$) (**Figure 18B**). Aucun poussin survivant de ce dernier groupe n'a développé de lésions.

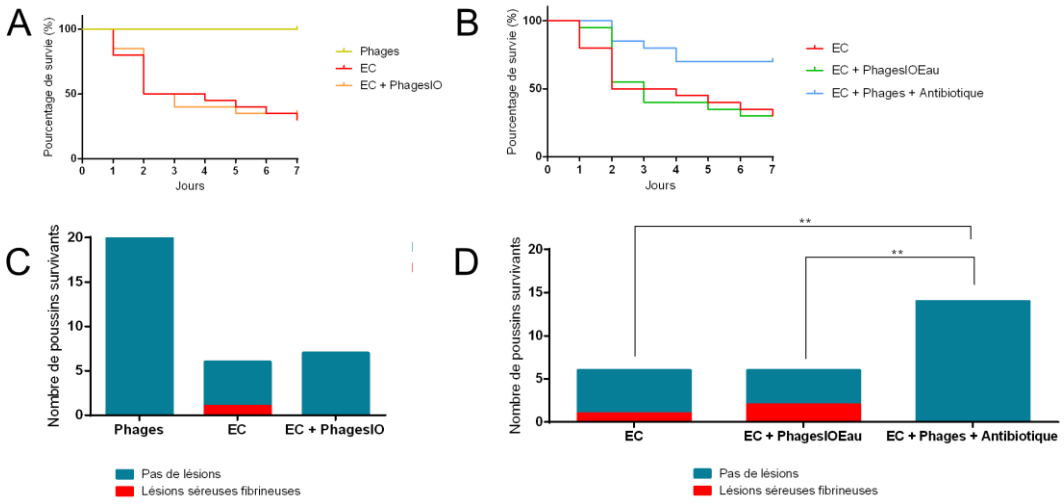


Figure 18 : Mortalité et développement de lésions fibrineuses des séreuses des poussins des différents groupes

Courbes de survie Kaplan-Meier des poussins des groupes (**A**) 'Phages' (n = 20), 'EC' (n = 20) et 'EC + PhagesIO' (n = 20) et (**B**) 'EC' (n = 20), 'EC + PhagesIOEau' (n = 20) et 'EC + Phages + Antibiotique' (n = 20). Les *p* values ont été calculées par le test log-rank ($p < 0,05$). Présence ou absence de lésions macroscopiques fibrineuses des séreuses associées à la colibacillose chez les poussins survivants des groupes (**C**) 'Phages' (n = 20), 'EC' (n = 6) et 'EC + PhagesIO' (n = 7) et (**D**) 'EC' (n = 6), 'EC + PhagesIOEau' (n = 6) et 'EC + Phages + Antibiotique' (n = 14). Les données ont été analysées à l'aide d'un test de Mann-Whitney à un niveau de signification de $p < 0,05$.

5.2.2.2.3. L'inoculation des phages *in ovo* uniquement a permis une diminution de la colonisation intestinale de la souche BEN4358

Des phages ont été détectés dans les caeca de tous les poussins survivants des groupes 'EC + PhagesIO', 'EC + PhagesIOEau' et 'EC + Phages + Antibiotique' (concentration moyenne de 6,12 × 10^6 UFP/g, 2,31 × 10^7 UFP/g et 1,5 × 10^7 UFP/g, respectivement). L'identification par PCR a de nouveau montré la présence de REC et ESCO3 uniquement. Les deux phages étaient présents dans tous les poussins du groupe 'EC + PhagesIO' (**Figure 19A**). Dans le groupe 'EC + PhagesIOEau', ESCO3 était détecté dans tous les caeca tandis que REC n'était présent que dans 4 échantillons sur 6. Un des poussins contenait REC dans le foie à une concentration de 1,18 × 10^4 UFP/g (**Figure 19B**). De façon surprenante, seul le phage ESCO3 a été retrouvé dans les caeca du groupe 'EC + Phages + Antibiotique' (**Figure 19C**). Ce même phage était présent dans le foie des trois poussins positifs aux phages.

Les échantillons des caeca des poussins du groupe 'Phages' étaient négatifs aux phages. Après enrichissement des échantillons par coculture avec la souche BEN4358, deux oiseaux se sont révélés positifs. L'identification par PCR a montré que REC était présent dans les deux poussins, et ESCO3 dans l'un d'entre eux (données non montrées).

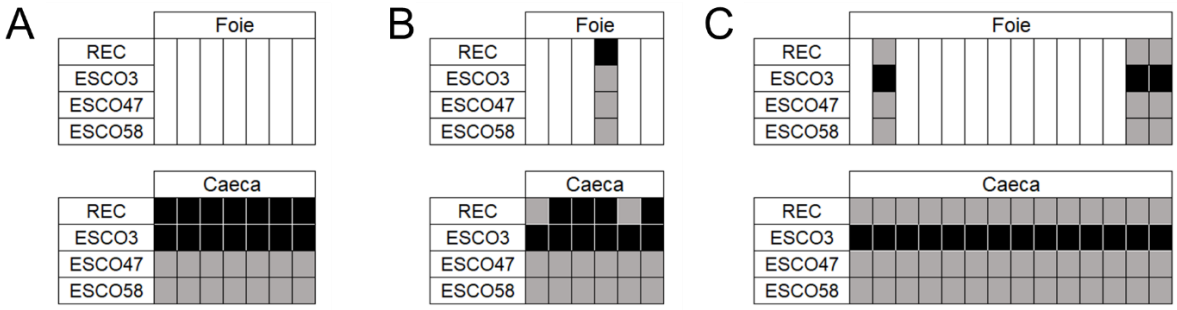


Figure 19 : Présence et identification des phages dans les organes des poussins survivants ayant reçu le cocktail de quatre phages

Les phages ont été détectés et identifiés dans le foie et les caeca des poussins survivants des groupes (**A**) 'EC + PhagesIO', (**B**) 'EC + PhagesIOEau' et (**C**) 'EC + Phages + Antibiotique'. Chaque colonne représente un poussin. Le titre des phages dans les deux organes a été déterminé par tests ponctuels. Les spots d'échantillon non-dilués des organes positifs aux phages ont été collectés, mélangés puis bouillis dans de l'eau stérile pour effectuer une PCR, afin d'identifier la présence ou l'absence de chaque phage individuel. Les colonnes blanches représentent les organes négatifs aux phages ; les cases grises représentent les PCR négatives dans les organes positifs aux phages ; et les cases noires représentent les PCR positives dans les organes positifs aux phages.

Dans le foie, la souche BEN4358 a été détectée dans un poussin de chaque groupe infecté (**Figure 20**). Dans le lot 'EC + PhagesIOEau', le poussin positif avait une concentration de 1,2 × 10^2 UFC/g. Ce poussin présentait des lésions modérées au foie, tout comme un autre du même lot qui, pourtant, n'avait pas de bactéries détectées dans cet organe. Le poussin ayant le foie positif à ESCO3 ne contenait pas de bactéries. Dans le lot 'EC + Phages + Antibiotique', le poussin présentant 3,5 × 10^5 UFC/g de bactéries dans le foie était aussi celui avec la plus haute concentration d'ESCO3 dans ledit organe (1,99 × 10^6 UFP/g).

Dans les caeca, la charge moyenne de BEN4358 était significativement plus faible dans le groupe 'EC + PhagesIO' (2,65 × 10^7 UFC/g) que dans le groupe 'EC' (8,92 × 10^8 UFC/g) (**Figure 20A**). Aucune réduction significative n'a pas être observée entre le groupe 'EC' et le groupe 'EC + PhagesIOEau' (2,81 × 10^9 UFC/g). Au contraire, une augmentation significative a été observée entre le lot uniquement infecté et le groupe 'EC + Phages + Antibiotique' (1,82 × 10^9 UFC/g) (**Figure 20B**).

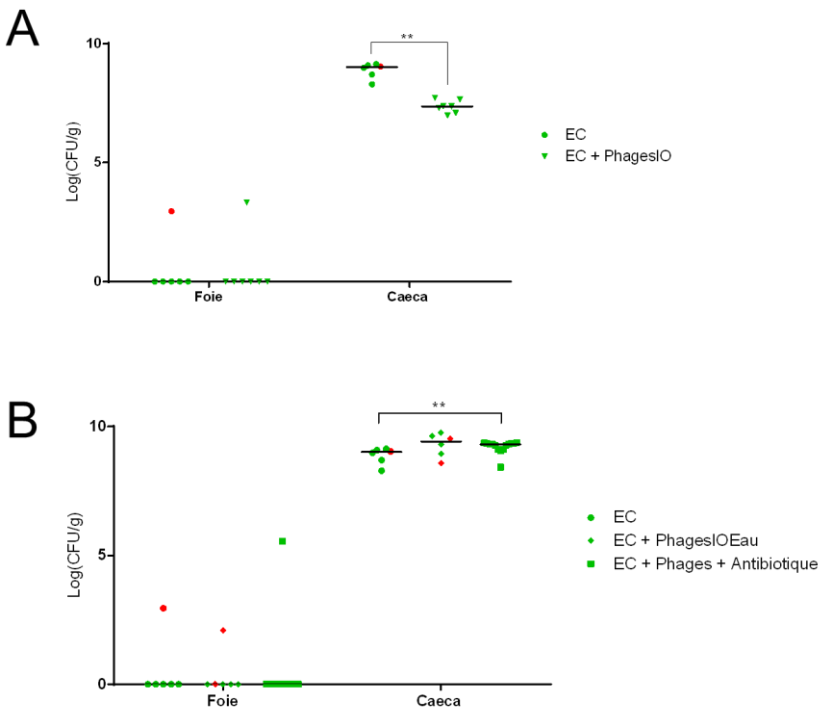


Figure 20 : Concentration bactérienne dans les organes des poussins survivants

Concentration bactérienne dans le foie et les caeca des poussins survivants des groupes (**A**) EC' et 'EC + PhagesIO' et des groupes (**B**) 'EC', 'EC + PhagesIOEau' et 'EC + Phages + Antibiotique'. Chaque symbole représente un poussin. L'absence (vert) ou la présence (rouge) de lésions macroscopiques fibrineuses associées à la colibacillose est rapportée. Les données ont été analysées à l'aide d'un test de Mann-Whitney à un niveau de signification de $p < 0,05$.

5.2.2.2.4. Le phénotype de résistance varie en fonction du traitement

La résistance aux phages a été déterminée à partir des clones réisolés des caeca des poussins survivants. Excepté un clone, toutes les bactéries réisolées des caeca des groupes 'EC + PhagesIO' et 'EC + PhagesIOEau' étaient totalement résistantes à ESCO3 (**Figure 21A-B**). Un seul clone provenant du groupe 'EC + PhagesIOEau' présentait une résistance partielle à REC.

Un unique clone du groupe 'EC + Phages + Antibiotique' était totalement résistant à ESCO3, la majorité étant partiellement résistante. Une résistance complète à ESCO58 a également été observé au sein d'un autre clone (**Figure 21C**). Un seul variant était modérément résistant aux 4 phages composant le cocktail.

A

Clone réisolé du poussin n°	REC	ESCO3	ESCO47	ESCO58
278				
280				
288				
295				
296				
281				
297				

B

Clone réisolé du poussin n°	REC	ESCO3	ESCO47	ESCO58
678				
666				
667				
669				
684				
680				

C

Clone réisolé du poussin n°	REC	ESCO3	ESCO47	ESCO58
761				
762				
770				
767				
777				
765				
771				
772				
773				
766				
779				
768				
769				
774				

Figure 21 : Résistance aux phages des clones réisolés des caeca

EOP des phages composant le cocktail sur les colonies réisolées des caeca des poussins survivants des groupes (**A**) 'EC + PhagesIO', (**B**) 'EC + PhagesIOEau' et (**C**) 'EC + Phages + Antibiotique'. L'EOP est le nombre d'UFP obtenu sur un clone réisolé divisé par le nombre d'UFP obtenu sur la souche BEN4358 de type sauvage.

5.2.2.3. Conclusion

L'analyse des données confirme les principales conclusions tirées des résultats obtenus précédemment lors de l'inoculation du cocktail de 4 phages *in ovo* en tant qu'agent préventif de la colibacillose aviaire : aucun développement de la maladie et une réduction de la charge intestinale de BEN4358. De façon surprenante, la dose inoculée, bien qu'identique à l'expérimentation décrite dans l'article n°2, a induit un fort taux de mortalité au sein des poussins, similaire à l'expérimentation pour tester le cocktail de 8 phages (cf. partie 5.1.2.1.). Par conséquent, le nombre de survivants était plus faible. Une fois de plus, les clones réisolés étaient majoritairement résistants à ESCO3. Par contre, aucun ne présentait de résistance totale à ESCO47, contrairement aux résultats de l'article n°2. Cela montre une hétérogénéité des clones dans l'apparition de la résistance aux phages.

L'application préventive et thérapeutique des phages par leur inoculation dans l'œuf puis dans l'eau de boisson n'a induit aucune amélioration, tant au niveau de la mortalité, du développement des lésions fibrineuses des séreuses ou de la charge intestinale de la souche APEC. L'échec de cet essai ne peut pas être attribué à la résistance aux phages, puisque les clones récupérés des caeca ne présentaient pas plus de résistance que ceux du groupe 'EC + Phages IO'.

Quant à la combinaison des phages et de l'antibiotique, une amélioration significative de la survie des poussins et une protection contre le développement de la maladie ont pu être observées. Toutefois, la charge intestinale de BEN4358 n'a pas été diminuée. Bien qu'il ne soit pas un médicament vétérinaire, Bactrim® est composé des mêmes principes actifs (sulfaméthoxazole et triméthoprime) que le Methoxasol® et a été administré à la même dose que ce dernier lors de la première expérimentation animale (cf. partie 5.1.). Ainsi, il est peu probable que l'antibiotique soit mis en cause. Etonnamment, le phage REC était absent des poussins survivants du groupe 'EC + Phages + Antibiotique', indiquant un effet antagoniste entre REC et l'antibiotique Bactrim®. Cela implique que seul ESCO3 était présent pour contrôler la multiplication de BEN4358 dans les caeca. La majorité des clones étant partiellement résistant à ce phage, cela pourrait aussi expliquer l'absence de réduction de la charge intestinale. Pour tirer des conclusions claires, il manque un lot traité uniquement avec l'antibiotique.

L'identification des phages chez les poussins décédés durant l'expérience indique qu'ESCO47 et ESCO58 ne sont plus détectables dès le lendemain de l'infection (à l'exception de deux poussins). Ainsi, nous pouvons conclure que seuls REC et ESCO3 agissent de concert pour contrôler l'infection par APEC. Etant donné le taux de résistance total important des clones caecaux contre ESCO3, il est possible que le phage REC soit efficace et fonctionnel dans la lutte contre BEN4358, du moins à la fin de l'expérience.

Discussion et perspectives

L'objectif de ce projet de thèse était d'évaluer le potentiel de cocktails de phages développés à partir d'une collection caractérisée, à prévenir et/ou guérir les poussins d'une semaine de la colibacillose aviaire, pathologie majeure en élevage avicole.

À partir de 44 échantillons biologiques ou environnementaux d'origines diverses, une collection de 19 phages a pu être construite. La caractérisation morphologique et moléculaire de ces phages a permis de les séparer en deux morphotypes et en neuf genres taxonomiques dont un nouveau, le genre *Nouzillyvirus*, défini par l'ICTV suite au dépôt de la séquence du génome du phage ESCO41 dans la base de données du NCBI. Une annotation manuelle des génomes a permis d'associer une partie des gènes à une fonction putative, puis à un module fonctionnel. Le spectre d'hôtes sur un panel de souches APEC appartenant aux sérogroupes majeurs circulants dans les élevages européens a été déterminé. Individuellement, les phages présentaient une activité lytique entre 0 et 43% sur les souches APEC sélectionnées. De façon plus générale, 67% des souches de la collection étaient lysées par au moins un phage. À partir de ces résultats, deux cocktails de phages ont été construits afin d'être testés *in vivo* dans leur efficacité à protéger ou traiter les poussins infectés à un jour d'âge par une souche APEC de sérogroupe O2, l'un des sérogroupes circulant majeurs. Plusieurs paramètres ont été déterminés, tels que la mortalité, la morbidité, la charge de la souche APEC inoculée dans le foie et les caeca, la distribution et l'identification des phages au sein de ces mêmes organes, et enfin la présence de clones résistants aux phages. Les phages (tout cocktail confondu) administrés dans l'eau de boisson dès l'éclosion n'ont eu aucun effet pour prévenir et guérir l'infection bactérienne. Cependant, le cocktail composé des 4 phages spécifiques à la souche BEN4358 inoculée aux poussins, administré au stade embryonnaire, a montré des résultats prometteurs. Les phages ont permis d'empêcher l'apparition de lésions fibrineuses des séreuses chez les survivants, supposant l'absence de développement de l'infection chez ces derniers. De plus, la charge intestinale de la souche APEC a été réduite d'un log par rapport au lot infecté uniquement, indiquant une possible diminution de la contamination environnementale. La résistance aux phages du cocktail était majoritairement présente au

sein des clones réisolés, mais ceux présentant une résistance au phage REC avaient une virulence significativement diminuée.

Ainsi, bien que les résultats obtenus soient prometteurs, ils ne sont pas pleinement satisfaisants, l'administration des phages n'ayant pas permis d'améliorer le taux de survie des poussins. De plus, alors que les quatre phages du cocktail étaient présents dans la majorité des poussins à l'éclosion et étaient stables *in vitro* dans des conditions aviaires, seuls deux d'entre eux (REC et ESCO3) étaient détectés dès le lendemain de l'infection. Des améliorations sont encore nécessaires afin de rendre l'application des phages efficace au même titre que les antibiotiques.

6.1. Comment obtenir un cocktail de phages efficace contre la colibacillose aviaire ?

Un certain nombre de défis sont encore persistants en phagothérapie. Parmi les plus cités, il y a le problème du choix des bactériophages à utiliser pour une infection bactérienne, l'émergence potentielle de la résistance aux phages, le risque de contribution au développement de la résistance aux antibiotiques et l'interaction avec le système immunitaire (261–263). Afin d'avoir un cocktail efficace contre une souche/espèce bactérienne donnée, ces problèmes doivent être pris en compte et résolu. Les deux derniers défis cités ne seront pas discutés dans cette section. En effet, le risque de transduction des phages pouvant conduire à la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques ou à des gènes de virulence est considéré comme une préoccupation mineure par rapport au potentiel de guérison des phages (263). Cependant, ce risque existe et il est nécessaire de caractériser génétiquement les phages afin d'exclure ceux ayant un important potentiel de transduction. De même, l'interaction des phages avec le système immunitaire n'est pas de mise ici, puisque les fonctions immunitaires adaptatives des poussins ne se développent qu'à la fin de la première semaine de vie (264). Par contre, un point important indispensable à l'efficacité du cocktail pour contrôler l'infection bactérienne, et peu cité dans les revues, est la valeur sélective (*fitness*) *in vivo* des phages, qui sera discuté ici.

6.1.1. Limite du spectre d'hôtes des bactériophages

La grande spécificité des phages est leur principal avantage par rapport aux antibiotiques, puisque cela minimise leur impact sur le microbiote. Mais c'est aussi une des principales

limites pour leur utilisation en thérapie. En phagothérapie aviaire, un des défis majeurs sera, tout comme la vaccination, de couvrir l'importante diversité des souches APEC circulantes dans les élevages. Une des solutions serait la construction de cocktails de phages, qui permettent d'obtenir un spectre d'hôtes plus large que les phages individuels. Cependant, la construction de cocktail ne doit pas uniquement se contenter d'assembler un maximum de phages à spectre d'hôtes large. Un trop grand nombre de phages peut entrainer une compétition pour l'adsorption au récepteur. Cela peut empêcher certains phages de se multiplier et de se maintenir au-dessus de la concentration minimale nécessaire pour contrôler la multiplication bactérienne (265). Il a été montré que la taille du cocktail n'était pas corrélée avec la réduction de la charge bactérienne observée lors des expérimentations (266). De plus, l'augmentation de la taille d'un cocktail de phage impliquerait une augmentation du coût de développement. Un compromis entre un spectre d'hôtes large et un faible de coût de production serait de limiter la taille des cocktails entre 2 à 10 phages (267). Dans cet esprit, des pipelines pour concevoir des cocktails de phages ont été développés, en évaluant toutes les combinaisons de phages possibles pour identifier le plus petit cocktail théorique (268,269). En effet, ces algorithmes prennent en compte les interactions phage-bactérie individuelles, qui peuvent être nombreuses à évaluer dans certains cas. Dans ce travail, l'évaluation du spectre d'hôtes de nos 19 phages sur 30 souches APEC a donné lieu à 570 interactions individuelles. Mais certaines études ayant isolé une quantité plus importante de coliphages acquièrent des données plus importantes, allant de 3200 à plus de 12000 interactions phage-hôte (162,270), d'où l'utilité de ce type de pipelines. Cependant, il manque encore à ces algorithmes la prise en compte des interactions phage-phage, qui pourraient induire des relations antagonistes, par exemple l'immunité de surinfection induite par les prophages. De plus, certains phages lytiques, lors d'une co-infection, peuvent avoir aussi des effets non-synergiques dus à la compétition pour un récepteur ou pour des ressources cellulaires limitées (222,271). Ces pipelines doivent donc encore être améliorés pour concevoir des cocktails efficaces en reflétant la complexité des réseaux phage-bactérie.

Ainsi, le choix des phages à inclure dans le cocktail est complexe à cause de leur diversité. Un cocktail composé de phages généralistes, c'est-à-dire ciblant plusieurs sérogroupes d'*E. coli*, serait optimal. Dans notre étude, trois phages (ESCO37, REC et ESCO58) présentaient une activité lytique contre des souches de 5 sérogroupes différents (O1, O2, O5, O18 et O78), mais

seuls REC et ESCO58 avaient une large activité lytique couvrant plus de 37% du panel de souches APEC. Mais bien que ces deux phages généralistes aient été inclus dans les cocktails testés, cela n'a pas suffi à protéger complètement les poussins. D'autres sessions d'isolement pourraient être réalisées pour augmenter la diversité de la collection et obtenir des phages candidats avec une plus large gamme d'hôtes. Afin d'optimiser la recherche de ces phages à large spectre, le processus d'isolement devra être modifié. En effet, il a été décrit que les enrichissements d'échantillons sur une seule souche favoriseraient l'isolement de phages à spectre d'hôtes restreint, alors qu'au contraire, l'utilisation de plusieurs souches lors de la procédure contribuerait à l'isolement de phages plus polyvalents (272). La détermination du spectre d'hôtes validera ensuite ce résultat. Il est à noter cependant qu'il n'existe pas de consensus sur le nombre de souches bactériennes nécessaires à la détermination du spectre d'hôtes d'un phage. En effet, aucune règle n'existant à ce sujet, chaque laboratoire décide du nombre de souches testées. Une enquête menée sur 52 chercheurs a montré un fort désaccord, les réponses allant de 5 à 800 souches (272). Cette divergence d'opinion a amené à un mésusage du terme « étroite » ou « large » gamme d'hôtes (273).

Afin de couvrir un plus grand nombre de souches d'une même espèce bactérienne, il est impératif de combiner des phages ciblant des récepteurs différents. En cas de développement d'un mécanisme de résistance lié au récepteur, les autres phages pourraient continuer à lyser la bactérie cible. Mais il est difficile de déterminer les récepteurs ciblés par les phages, notamment lorsque les bactéries sont elles-mêmes non-caractérisées. Une des méthodes utilisées est le séquençage de la bactérie hôte devenue résistante au phage d'intérêt suite à une culture *in vitro* ou *in vivo*, en comparant ensuite les résultats avec le génome de la bactérie sauvage. Cependant, il est possible qu'il n'y ait pas de mutations ou de délétions de gènes, ou bien que les changements engendrés ne soient pas situés sur les gènes codant les récepteurs de phages. Une analyse du polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) de 109 isolats d'*E. coli* résistants au phage vB_EcoM_P10 (*Tequatrovirus*) a identifié 66 clones sans aucune différence avec la souche sauvage de référence. Seuls 30 clones présentaient des mutations (faux-sens, non-sens, perte partielle ou totale) sur des gènes de biosynthèse de la capsule K1, du LPS ou du peptidoglycane (207). Un procédé d'identification plus fiable est la méthode à haut débit de construction de bibliothèques de mutants de transposon. Cette approche a permis d'identifier les récepteurs déjà connus des phages T2, T4, T6 et T7, ainsi que ceux d'autres

coliphages (274). Se pose tout de même la question de la nécessité de cette démarche avant de déterminer la valeur sélective et l'efficacité des phages *in vivo*. Néanmoins, cette méthode est relativement rapide et peu coûteuse, et pourra toujours fournir des informations importantes sur les gènes impliqués dans l'interaction phage-hôte.

Une approche récente permettant d'optimiser les phages est la bioingénierie, permettant de donner les traits souhaités par modification génétique. Cette méthode a obtenu des résultats prometteurs pour élargir la gamme d'hôtes d'un phage. Par exemple, deux gènes de fibres de queue du phage T2 ont été remplacés par ceux du phage IP008, ce qui a permis de combiner l'activité lytique du phage T2 avec la large gamme d'hôtes du phage IP008 (275). De même, il est également possible d'insérer des gènes étrangers à un phage pour décupler son activité lytique. Un phage T7 modifié pour exprimer l'enzyme DspB (dégradant les biofilms bactériens) a permis une dégradation des biofilms 100 fois plus efficace que le phage sauvage (276). Ces approches, basées sur le mécanisme de l'évolution des phages, permettraient de contourner les problèmes de spécificité des phages et ainsi créer des nouveaux phages efficaces et bons candidats à la phagothérapie. Dans nos travaux, REC était le meilleur phage candidat à la phagothérapie, avec le plus large spectre d'hôtes, une bonne valeur sélective *in vivo* et des propriétés intéressantes. Ce phage est issu de la recombinaison homologue entre les phages ESCO5 et ESCO37. Cela n'a été possible que grâce à la forte homologie de ces deux *Phapecoctavirus* et par l'action de gènes liés à la recombinaison homologue, mais cela démontre les avantages de cette méthode d'obtention de nouveaux phages améliorés.

6.1.2. Résistance des bactéries aux bactériophages

Les interactions constantes entre les bactéries et les phages dans la nature ont amené les bactéries à évoluer et développer des mécanismes de résistances. Certains d'entre eux sont intrinsèques aux bactéries, par exemple les systèmes CRISPR-Cas, RM ou encore Abi (cf. partie 2.2.2.). Comme décrit dans l'introduction, il existe des mécanismes liés aux phages pour contourner ces défenses bactériennes. Cependant, très peu de phages sont caractérisés dans leur résistance aux systèmes de défenses anti-phages des bactéries, ce qui pourrait éclairer certains échecs observés en phagothérapie. Une équipe a développé une souche *E. coli* K12 possédant divers plasmides, chacun porteur d'un système d'immunité bactérien différent (six systèmes RM et cinq systèmes Abi). Ils ont ainsi pu déterminer la sensibilité des 66 phages de

leur collection contre ces 11 systèmes de défense anti-phage (95). Ces constructions plasmidiques pourraient être agrémentées par d'autres systèmes de défense bactériens et permettraient une analyse approfondie des phages afin de sélectionner les plus résistants. Il a été observé une homogénéité dans les profils de sensibilité chez certaines sous-familles : par exemple les *Tevenvirinae* étaient tous sensibles au système Abi Fun/Z. Par contre, des résultats très hétérogènes ont aussi été notés au sein d'autres sous-familles et même au sein d'un même genre : seuls certains phages de la sous-famille *Studiervirinae* étaient sensibles à un système RM de type III, les autres étant complètement résistants (95). Ces différences, probablement dues à des variations génétiques, indiquent qu'il ne sera pas possible de prédire la résistance ou la sensibilité de nouveaux phages juste en se basant sur leur taxonomie.

L'acquisition de résistance est également possible suite à une exposition de la bactérie avec un ou plusieurs phages. Ce phénomène très courant pourrait être responsable d'un nombre important d'échec en phagothérapie. Une approche possible, appelée *phage steering* (pilotage de phage), est de sélectionner des phages ciblant des facteurs de virulence, comme le LPS ou la capsule, afin d'influencer l'évolution de la bactérie (277). En effet, la résistance aux phages peut entrainer un désavantage de la bactérie en diminuant sa résistance aux antibiotiques (278), son taux de croissance (207) ou sa virulence comme cela a été observée dans ces travaux ainsi que dans la littérature (279,280). Les bactéries résistantes peuvent également être plus sensibles au système immunitaire inné, aidant l'hôte à éliminer l'infection. Ainsi, cette approche de pilotage est considérée comme une approche thérapeutique, bien que des données sur les interactions phage-bactérie et les mécanismes d'évolution soient encore nécessaires (277). Dans notre étude, la résistance à REC était moins observée que la résistance vis-à-vis d'ESCO3 (14 et 32 clones sur 34, respectivement). De plus, la résistance à REC pouvait être associée à l'altération de la virulence de la bactérie. Ceci indiquerait que REC ciblerait un gène essentiel à la pathogénèse de la souche BEN4358. Des études de caractérisation du récepteur de REC sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

6.1.3. L'efficacité des phages *in vivo*

Sans passer par l'animal hôte amené à recevoir les phages, il est difficile de prédire la valeur sélective des phages *in vivo*. Cette caractéristique est pourtant essentielle, car sans stabilité ni

multiplication du phage *in vivo*, la phagothérapie est vouée à l'échec. Aucun effet n'a été rapporté suite au traitement de poulets infectés par une souche APEC O78 par 4 phages isolés d'échantillons d'eaux, s'expliquant probablement par la faible concentration des phages observée dans les organes (poumons et cœur) (248). De plus, aucun phage n'avait été détecté à 4 jours post-infection. Dans nos travaux, les phages ESCO47 et ESCO58, isolés de fèces de cheval et d'eau, respectivement, n'étaient plus détectés dès le lendemain de l'infection. Au contraire, le phage ESCO3, provenant de contenu caecal aviaire et le phage REC qui a pour origine ESCO5 isolé du même type d'échantillon, étaient encore majoritairement présents. Ainsi, les phages ayant été isolés de l'environnement visant à être traité semblent avoir une meilleure valeur sélective *in vivo*. Cet état de fait se vérifie régulièrement dans les essais publiés. Cependant, ce n'est systématiquement vrai puisque le phage R, isolé d'eaux usées domestiques, a permis une protection complète des poulets atteints de colibacillose (240). Ainsi, afin d'éviter des échecs relatifs lors des essais sur animaux, il est nécessaire de prédire le plus finement possible la valeur sélective *in vivo* des phages candidats. Les caractéristiques *in vitro* des phages ne sont pas systématiquement déterminées dans les publications. La stabilité des phages à des températures et des pH proches des conditions de l'animal ciblé, ainsi que dans des modèles améliorés tels que le liquide intestinal simulé (SIF) ou encore le liquide gastrique simulé (SGF) (281), est parfois testée. Mais ces tests ne reflètent pas toujours ce qui est observé suite au passage *in vivo* des phages. Des modèles plus poussés, incluant plusieurs paramètres simultanément, permettraient sûrement de mieux choisir les phages candidats. Par exemple, une étude a utilisé un modèle *in vitro* mimant l'intestin en termes de paramètres physiologiques (température, pH, enzymes) et avec un microbiote simulé par sept bactéries commensales pour évaluer l'efficacité d'un cocktail de 3 phages à réduire la charge en *E. coli* (282). Une étude de l'efficacité du cocktail *in vivo* serait nécessaire afin de confirmer si ce modèle est prédictif ou non.

L'efficacité des phages dans le traitement d'une infection dépend aussi également de la dynamique de l'interaction phage-bactérie, qui est propre à chaque phage pour une bactérie testée. En effet, un phage stable peut ne pas être capable de se multiplier *in vivo*. Pour déterminer cette dynamique, des modèles incluent le taux d'adsorption du phage, la période de latence (délai entre l'infection phagique et la lyse bactérienne), le *burst size* (nombre de particules de phages libérées pour chaque bactérie lysée), la croissance bactérienne et sa MOI

(283). Ces paramètres mesurables peuvent être utilisés comme indicateurs de l'efficacité *in vivo*, mais dépendent également de l'évolution et de l'état physiologique de la bactérie (201), et sont donc difficiles à extrapoler *in vivo*. Bien que des modèles prédictifs incluant tous ces facteurs soient compliqués à mettre en place, ils permettraient de cribler rapidement de nouveaux phages candidats pour la phagothérapie. Ils pourraient aussi potentiellement expliquer pourquoi ESCO47 et ESCO58 sont éliminés des poussins dès le lendemain de l'infection : si REC et ESCO3 ont des cinétiques de croissance plus rapide que ces deux phages, ESCO47 et ESCO58 n'arriveraient pas à se multiplier pour assurer leur survie *in vivo*.

6.2. Comment appliquer les phages aux oiseaux ?

Une fois le cocktail de phages développé et caractérisé, il reste le problème de la pharmacocinétique des phages *in vivo*. Le mode d'administration, la posologie et la temporalité d'application sont des facteurs affectant les effets de la phagothérapie.

6.2.1. L'administration des phages

Un grand nombre de voies d'administration a été testé en phagothérapie, que ce soit parentérale, orale, locale ou par inhalation (284). Les injections parentérales sont encore majoritairement testées dans les études expérimentales sur animaux. Elles apportent des éléments de réponse intéressants, par exemple la stabilité et l'efficacité des phages testés *in vivo*, mais sont irréalisables sur le terrain. Tout comme les vaccins, une caractéristique idéale des cocktails de phages serait qu'ils puissent être délivrés par une méthode d'administration de masse, telle que l'eau de boisson, l'alimentation, la pulvérisation par aérosol et *in ovo*.

Dans la littérature, l'administration de phages par l'eau de boisson montre des résultats prometteurs dans le contrôle de *Salmonella* en réduisant la charge intestinale des oiseaux (285,286). Mais par cette voie d'administration, aucune étude expérimentale n'a rapporté de résultats prometteurs dans le contrôle de la colibacillose aviaire, ce travail de thèse ne faisant pas exception. Une possibilité serait un manque de stabilité des phages dans l'environnement acide de l'estomac (199), qui aurait pour conséquence peu de phages viables à l'arrivée dans l'intestin. Afin de pallier à cette difficulté, plusieurs méthodes d'encapsulation des phages ont été développées. Certains matériaux utilisés lors de l'encapsulation sont sensibles à un certain pH ou à une enzyme spécifique, permettant la libération totale des phages dans l'intestin

(287). L'encapsulation d'un cocktail de trois phages dans des liposomes a permis une stabilité significativement plus importante des phages dans l'intestin des poulets de chairs par rapport au cocktail non-encapsulé (288). Un essai expérimental contre la colibacillose aviaire a aussi démontré l'efficacité de cette méthode, le traitement des poulets par le phage encapsulé ayant permis un taux de survie des poulets et une diminution de la charge intestinale significativement supérieure par rapport au phage non-encapsulé (250). Il serait ainsi intéressant de tester cette méthode de formulation sur le cocktail de 4 phages, pour ainsi essayer d'obtenir une protection par voie d'administration orale.

Dans ce travail, l'administration d'un cocktail de phage *in ovo* a montré les résultats les plus prometteurs. Cette voie d'administration n'avait encore jamais été testée en phagothérapie et nécessite des points d'améliorations. Premièrement, bien que les phages aient montré une certaine stabilité dans l'œuf, 12% des oiseaux étaient négatifs aux phages, indiquant qu'une partie des poussins risquait de ne pas bénéficier de la protection des phages à la naissance. La composition des liquides au sein de l'œuf embryonné peut avoir eu un effet néfaste sur la stabilité des phages, par exemple le pH légèrement acide (5,5) du liquide allantoïque (289). Dans la littérature, le liquide amniotique et l'embryon sont présentés comme les sites optimaux de délivrance de produits thérapeutiques (40). Afin de valider l'environnement embryonnaire comme une voie d'administration possible pour les phages, il serait important de tester leur inoculation à ces deux sites. De plus, bien que l'administration des phages au stade embryonnaire ait permis une faible protection des poussins, il a été observé que sans bactérie hôte, les phages sont naturellement éliminés de l'organisme. Sur 20 poussins ayant reçu le cocktail à ED17, seuls deux d'entre eux possédaient encore des phages à 8 jours d'âge. Ainsi, cette voie d'administration ne protégerait les oiseaux que pendant quelques jours après l'éclosion. Pour couvrir la protection des oiseaux sur une plus longue période, il sera nécessaire de coupler l'inoculation des phages *in ovo* avec une autre voie de distribution, en optimisant chaque voie d'administration.

6.2.2. La posologie des phages

Comme cela a d'abord été démontré par Barrow *et al.*, la concentration de phages inoculés a un rôle important dans le succès du traitement. Une inoculation de 10^2 UFP n'avait aucune incidence sur l'état des oiseaux, tandis que l'inoculation de 10^4 UFP permettait une protection

complète (240). Cela s'explique par le temps qu'il faut aux phages d'atteindre la concentration seuil nécessaire pour lyser un grand nombre de bactéries (265). La concentration nécessaire va varier en fonction du pathogène et des phages utilisés : tandis qu'une protection complète est atteinte chez les poulets traités par 10^4 UFP du phage R (240), seule une réduction significative de la mortalité a été observée lors du traitement par 10^8 UFP du phage SPR02 (243). Les résultats observés dans notre étude penchent pour une mauvaise posologie : le cocktail de 4 phages n'a pas permis de diminuer la mortalité mais a protégé les survivants de l'infection, indiquant que la concentration phagique était trop faible au moment de l'infection. Il est vraisemblable qu'en multipliant par 10 ou 100 la dose de phages inoculée, de meilleurs résultats auraient été obtenus.

6.2.3. La temporalité d'application

Enfin, le délai entre l'application des phages et l'infection des oiseaux est un facteur essentiel au succès de la phagothérapie. Dans la majorité des cas, le traitement est efficace lorsqu'administré peu de temps après l'infection : un cocktail de 2 phages inoculé par voie IM s'est révélé efficace pour réduire la mortalité et la morbidité lorsqu'il était administré par aérosol dans les 2 heures post-infection, mais pas après 24h ou 48h (241). Cependant, cette temporalité est impossible à atteindre sur le terrain. Le choix le plus judicieux serait d'administrer les phages avant l'infection en tant que prise en charge prophylactique. Il serait également possible de continuer leur application pendant l'infection et de combiner un traitement prophylactique et thérapeutique. Nos travaux se sont attachés à être dans des conditions les plus proches possibles que celles rencontrées sur le terrain, et ces deux approches ont été testées. Au vu des résultats, il serait intéressant d'étudier différents délais d'application pour déterminer laquelle induit la meilleure protection. Par exemple, l'inoculation des phages *in ovo* pourrait être réalisée à ED18 et ED19.

6.3. Quel est l'avenir de la phagothérapie au sein des élevages avicoles ?

6.3.1. Vers une approche prêt-à-porter ?

Mieux informés, les consommateurs sont de plus en plus préoccupés par l'utilisation d'antibiotiques au sein de l'industrie alimentaire. Ainsi, les industries et les éleveurs sont en

demande croissante de nouveaux produits thérapeutiques biologiques, non-nuisibles pour les animaux et respectueux de l'environnement. Faute de vaccins disponibles efficaces en cas de provocation hétérologue (290), les éleveurs utilisent souvent des vaccins autogènes, produits à partir de souches isolées au sein du troupeau malade. Parmi les quelques rapports de cas publiés, la majorité montrent des résultats plutôt positifs avec des taux de mortalité et de morbidité diminués suite à l'inoculation de ce type de vaccin (11,291,292). Cependant, ces approches sur-mesure ne sont pas durables dans le temps puisque généralement inefficaces contre des infections hétérologues.

La question d'une thérapie sur-mesure ou prêt-à-porter se pose également dans le cas des phages, comme discuté par Pirnay *et al.* (293). Pour une thérapie sur-mesure, le cocktail de phages devra être modélisé en fonction de la souche isolée du troupeau atteint, ce qui nécessite d'avoir une importante bibliothèque de phages (phagothèque) déjà séquencés et caractérisés, et de réaliser des phagogrammes. Cette approche est particulièrement pertinente dans le cadre d'infections chroniques ou longues, mais la majorité des infections colibacillaires sont aiguës (colisepticémie). De plus, à l'échelle industrielle, la gestion et l'utilisation d'une phagothèque sera difficile à mettre en place et la législation actuelle au sein de l'UE impliquerait une autorisation pour chaque phage administré aux animaux, une tâche longue et lourde à mettre en place. Une approche prêt-à-porter serait ainsi privilégiée par l'industrie pharmaceutique et avicole, d'où l'intérêt de cocktails composés de phages généralistes, comme décrit ci-dessus. Les phages étant omniprésents dans l'environnement, cela garantit l'isolement de phages avec des propriétés idéales pour la phagothérapie. Il n'est pas difficile d'isoler des phages spécifiques à *E. coli*, en témoigne le nombre important de coliphages présents dans les bases de données (1454). La collection de phages décrite dans ce travail est représentative de la diversité de coliphages qu'il est possible d'obtenir suite à leur isolement dans des échantillons biologiques variés. Par ailleurs, le séquençage du phage ESCO41 a soutenu la création du nouveau genre taxonomique Nouzillyvirus. Depuis, seulement 8 génomes de phages ont été rangés dans ce genre, mais aucun ne partage plus de 92% d'identité de séquence sur 78% de couverture avec le génome d'ESCO41, en faisant encore aujourd'hui un phage unique. Cela démontre que même après des décennies d'études, de nouveaux phages peuvent encore être découverts, avec potentiellement des mécanismes d'interaction phage-bactérie différents et intéressants dans le cadre d'une phagothérapie.

Même si la législation actuelle est inadaptée aux phages, elle est amenée à évoluer, ce qui à l'avenir favorisera l'autorisation de produits à base de phages sur le marché avicole.

6.3.2. Explorer le potentiel des phages pour de nouvelles approches thérapeutiques ?

Ce travail de thèse a apporté de nouvelles données sur les phages et leur potentiel en thérapie aviaire. Comme tant d'autres études, il a également mis en lumière les défis encore présents aujourd'hui, notamment les problèmes liés à la diversité des phages et à leur dynamique différente *in vitro* et *in vivo*. Au vu de l'importante diversité des phages, notre compréhension sur la totalité de leurs mécanismes d'interaction avec leur bactérie hôte, le système immunitaire de l'espèce à traiter, leur pharmacocinétique, ou encore leur pharmacodynamique ne sera pas complète avant encore des décennies de recherche. Il va donc falloir décider des paramètres essentiels à déterminer afin de valider un phage candidat à la phagothérapie et les essais de phagothérapie. Par exemple, pour des études plus rigoureuses, il serait important de convenir du processus d'isolement, du nombre de souches bactériennes à tester lors de la gamme d'hôtes, si les caractéristiques des phages (récepteurs, résistance aux systèmes anti-phages) sont obligatoires, etc. L'établissement de ces paramètres permettra une meilleure compréhension des facteurs influençant les succès et les échecs de phagothérapie.

En attendant, plusieurs laboratoires de recherches se sont tournés sur d'autres approches. L'une d'entre elles est l'utilisation des enzymes phagiques, dites « enzybiotiques ». Leur utilisation suscite un grand intérêt en raison de leur importante efficacité antimicrobienne, mais aussi par la faible émergence de résistance associée et leur facilité par rapport aux phages à pénétrer dans les tissus et diffuser dans l'organisme (294). L'enzyme portée par ESCO5 et REC, l'endo-N-acetylneuraminidase, serait intéressante à tester *in vivo* pour contrôler la colibacillose aviaire. Probablement spécifique à la capsule K1, elle permettrait d'exposer la bactérie au système immunitaire pour être éliminée des poulets, comme cela a été démontré modèle murin (232). Des médicaments à base d'Artilysins® contre *E. coli* sont déjà disponibles et en cours d'habilitation dans les domaines de l'alimentation animale (295).

En conclusion, les résultats obtenus lors de ces travaux sont prometteurs et confirment le potentiel des phages en tant qu'alternatives aux antibiotiques pour lutter contre la colibacillose aviaire. Néanmoins, de nombreux verrous nécessitent d'être levés pour des

résultats aussi efficaces que les antimicrobiens médicamenteux, notamment une caractérisation plus approfondie des phages candidats à la phagothérapie.

Bibliographie

1. Conway T, Krogfelt KA, Cohen PS. The life of commensal *Escherichia coli* in the mammalian intestine. Donnenberg MS, editor. EcoSal Plus. 2004 Feb 27;1(1):ecosalplus.8.3.1.2.

2. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics. 2006 Aug 1;118(2):511–21.

3. Schokker D, Veninga G, Vastenhouw SA, Bossers A, de Bree FM, Kaal-Lansbergen LMTE, et al. Early life microbial colonization of the gut and intestinal development differ between genetically divergent broiler lines. BMC Genomics. 2015 Dec;16(1):418.

4. Rychlik I. Composition and function of chicken gut microbiota. Animals. 2020 Jan 8;10(1):103.

5. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2010 Mar;8(3):207–17.

6. Sørum H, Sunde M. Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. Vet Res. 2001 May;32(3/4):227–41.

7. Geurtsen J, de Been M, Weerdenburg E, Zomer A, McNally A, Poolman J. Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Reviews. 2022 Nov 2;46(6):fuac031.

8. Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. J INFECT DIS. 2001 Mar;183(s1):S1–4.

9. Yamamoto S, Tsukamoto T, Terai A, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. Genetic evidence supporting the fecal-perineal-urethral hypothesis in cystitis caused by *Escherichia coli*. J Urol. 1997 Mar;157(3):1127–9.

10. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123–40.

11. Landman WJM, van Eck JHH. The efficacy of inactivated *Escherichia coli* autogenous vaccines against the *E. coli* peritonitis syndrome in layers. Avian Pathology. 2017 Nov 2;46(6):658–65.

12. Goullet P, Picard B. Comparative electrophoretic polymorphism of esterases and other enzymes in *Escherichia coli*. Microbiology. 1989 Jan 1;135(1):135–43.

13. Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, et al. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Moore RN, editor. Infect Immun. 1999 Feb;67(2):546–53.

14. Bonnet C, Diarrassouba F, Brousseau R, Masson L, Topp E, Diarra MS. Pathotype and antibiotic resistance gene distributions of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens raised on antimicrobial-supplemented diets. Appl Environ Microbiol. 2009 Nov 15;75(22):6955–62.

15. Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol. 2021 Jan;19(1):37–54.

16. Goodwin MA, Waltman WD. Transmission of *Eimeria*, viruses, and bacteria to chicks: darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. Journal of Applied Poultry Research. 1996 Mar;5(1):51–5.

17. Rochon K, Lysyk TJ, Selinger LB. Retention of *Escherichia coli* by house fly and stable fly (Diptera: Muscidae) during pupal metamorphosis and eclosion. J Med Entomol. 2005 May 1;42(3):397–403.

18. Nolan LK, Vaillancourt J, Barbieri NL, Logue CM. Colibacillosis. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL, et al., editors. Diseases of Poultry [Internet]. 1st ed. Wiley; 2020 [cited 2020 Nov 26]. p. 770–830. Available from: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781119371199.ch18

19. Guabiraba R, Schouler C. Avian colibacillosis: still many black holes. Klier A, editor. FEMS Microbiology Letters. 2015 Aug;362(15):fnv118.

20. Stordeur P, Mainil J. La colibacillose aviaire. Ann Méd Vét. 2002;146:11–8.

21. Radwan I.A., Abed A.H., Abd Allah M.M., Abd El-Latif M.A.A. Bacterial pathogens associated with cellulitis in chickens. Journal of Veterinary Medical Research. 2018 Jun 1;25(1):68–79.

22. Harry EG. The survival *Escherichia coli* in the dust of poultry houses. Vet Rec. 1964;76(17):466–9.

23. Morley AJ, Thomson DK. Swollen-head syndrome in broiler chickens. Avian Dis. 1984;28(1):238–43.

24. Kauffmann F. *Enterobacteriaceae*. Copenhagen: E Munksgaard. 1954;2nd edition.

25. Schouler C, Schaeffer B, Bree A, Mora A, Dahbi G, Biet F, et al. Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. Journal of Clinical Microbiology. 2012 May 1;50(5):1673–8.

26. Wang XM, Liao XP, Zhang WJ, Jiang HX, Sun J, Zhang MJ, et al. Prevalence of serogroups, virulence genotypes, antimicrobial resistance, and phylogenetic background of avian pathogenic *Escherichia coli* in south of China. Foodborne Pathogens and Disease. 2010 Sep;7(9):1099–106.

27. Newman DM, Barbieri NL, de Oliveira AL, Willis D, Nolan LK, Logue CM. Characterizing avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from colibacillosis cases, 2018. PeerJ. 2021 Mar 4;9:e11025.

28. Koutsianos D, Athanasiou LV, Mossialos D, Franzo G, Cecchinato M, Koutoulis KC. Investigation of serotype prevalence of *Escherichia coli* strains isolated from layer poultry in Greece and interactions with other infectious agents. Veterinary Sciences. 2022 Mar 23;9(4):152.

29. Kathayat D, Lokesh D, Ranjit S, Rajashekara G. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. Pathogens. 2021 Apr 12;10(4):467.

30. Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. J Bacteriol. 2006 Jan 15;188(2):745–58.

31. Mellata M, Ameiss K, Mo H, Curtiss R. Characterization of the contribution to virulence of three large plasmids of avian pathogenic *Escherichia coli* χ7122 (O78:K80:H9). IAI. 2010 Apr;78(4):1528–41.

32. Garénaux A, Caza M, Dozois CM. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology. 2011 Nov;153(1–2):89–98.

33. Dozois CM, Daigle F, Curtiss R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc Natl Acad Sci USA. 2003 Jan 7;100(1):247–52.

34. Hu J, Afayibo DJA, Zhang B, Zhu H, Yao L, Guo W, et al. Characteristics, pathogenic mechanism, zoonotic potential, drug resistance, and prevention of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Front Microbiol. 2022 Dec 13;13:1049391.

35. Moulin-Schouleur M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, Germon P, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. Journal of Clinical Microbiology. 2007 Oct 1;45(10):3366–76.

36. Johnson TJ, Wannemuehler Y, Johnson SJ, Stell AL, Doetkott C, Johnson JR, et al. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. Appl Environ Microbiol. 2008 Nov 15;74(22):7043–50.

37. Jakobsen L, Garneau P, Bruant G, Harel J, Olsen SS, Porsbo LJ, et al. Is *Escherichia coli* urinary tract infection a zoonosis? Proof of direct link with production animals and meat. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Jun;31(6):1121–9.

38. Tivendale KA, Logue CM, Kariyawasam S, Jordan D, Hussein A, Li G, et al. Avian-pathogenic *Escherichia coli* strains are similar to neonatal meningitis *E. coli* strains and are able to cause meningitis in the rat model of human disease. Infect Immun. 2010 Aug;78(8):3412–9.

39. Singer RS. Urinary tract infections attributed to diverse ExPEC strains in food animals: evidence and data gaps. Front Microbiol [Internet]. 2015 Feb 4 [cited 2020 Aug 17];6. Available from: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.00028/abstract

40. Peebles ED. *In ovo* applications in poultry: A review. Poultry Science. 2018 Jul;97(7):2322–38.

41. Gyimah JE, Panigrahy B. Immunogenicity of an *Escherichia coli* (serotype O1) pili vaccine in chickens. Avian Diseases. 1985 Oct;29(4):1078.

42. Rosenberger JK, Fries PA, Cloud SS. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli* III immunization. Avian Diseases. 1985 Oct;29(4):1108.

43. van den Bosch JF, Hendriks JH, Gladigau I, Willems HM, Storm PK, de Graaf FK. Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. Infect Immun. 1993 Mar;61(3):800–6.

44. Kariyawasam S, Wilkie BN, Hunter DB, Gyles CL. Systemic and mucosal antibody responses to selected cell surface antigens of avian pathogenic *Escherichia coli* in experimentally infected chickens. Avian Diseases. 2002 Jul;46(3):668–78.

45. Van Goor A, Stromberg ZR, Mellata M. A recombinant multi-antigen vaccine with broad protection potential against avian pathogenic *Escherichia coli*. Chang YF, editor. PLoS ONE. 2017 Aug 24;12(8):e0183929.

46. Cox GJM, Griffith B, Reed M, Sandstrom JD, Peterson MP, Emery D, et al. A vaccine to prevent egg layer peritonitis in chickens. Avian Diseases [Internet]. 2020 Nov 10 [cited 2023 Feb 26];65(1). Available from: https://bioone.org/journals/avian-diseases/volume-65/issue-1/aviandiseases-D-20-00093/A-Vaccine-to-Prevent-Egg-Layer-Peritonitis-in-Chickens/10.1637/aviandiseases-D-20-00093.full

47. Wang H, Liang K, Kong Q, Liu Q. Immunization with outer membrane vesicles of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 induces protective immunity in chickens. Veterinary Microbiology. 2019 Sep;236:108367.

48. Hu R, Liu H, Wang M, Li J, Lin H, Liang M, et al. An OMV-based nanovaccine confers safety and protection against pathogenic *Escherichia coli* via both humoral and predominantly Th1 immune responses in poultry. Nanomaterials. 2020 Nov 20;10(11):2293.

49. Hu R, Li J, Zhao Y, Lin H, Liang L, Wang M, et al. Exploiting bacterial outer membrane vesicles as a cross-protective vaccine candidate against avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Microb Cell Fact. 2020 Dec;19(1):119.

50. Frommer A, Freidlin PJ, Bock RR, Leitner G, Chaffer M, Heller ED. Experimental vaccination of young chickens with a live, non-pathogenic strain of *Escherichia coli*. Avian Pathology. 1994 Sep;23(3):425–33.

51. Kariyawasam S, Wilkie BN, Gyles CL. Construction, characterization, and evaluation of the vaccine potential of three genetically defined mutants of avian pathogenic *Escherichia coli*. Avian Diseases. 2004 Apr;48(2):287–99.

52. La Ragione RM, Woodward MJ, Kumar M, Rodenberg J, Fan H, Wales AD, et al. Efficacy of a live attenuated *Escherichia coli* O78:K80 vaccine in chickens and turkeys. Avian Diseases. 2013 Jun;57(2):273–9.

53. Abd El-Mawgoud AI, El-Nahass ES, Shany SAS, EL-Sawah AA, Dahshan AHM, Nasef SA, et al. Efficacy of live attenuated vaccine and commercially available lectin against avian pathogenic *E. coli* infection in broiler chickens. Veterinary Sciences. 2020 May 13;7(2):65.

54. Gregersen RH, Christensen H, Ewers C, Bisgaard M. Impact of *Escherichia coli* vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of *E. coli* in vaccinated flocks. Avian Pathology. 2010 Aug;39(4):287–95.

55. Mombarg M, Bouzoubaa K, Andrews S, Vanimisetti HB, Rodenberg J, Karaca K. Safety and efficacy of an *aroA* -deleted live vaccine against avian colibacillosis in a multicentre field trial in broilers in Morocco. Avian Pathology. 2014 May 4;43(3):276–81.

56. Sadeyen JR, Wu Z, Davies H, van Diemen PM, Milicic A, La Ragione RM, et al. Immune responses associated with homologous protection conferred by commercial vaccines for control of avian pathogenic Escherichia coli in turkeys. Vet Res. 2015 Dec;46(1):5.

57. Christensen H, Nielsen C. Safety of the live *Escherichia coli* vaccine Poulvac® *E. coli* in layer parent stock in a field trial. Veterinary Microbiology. 2020 Jan;240:108537.

58. Chrétien L, Boutant J, Lyazrhi F, Galliard N. Retrospective assessment of *Escherichia coli* vaccination in broiler turkeys under field conditions in 37 farms from Brittany (France). Avian Diseases [Internet]. 2021 Nov 18 [cited 2023 Feb 25];65(4). Available from: https://bioone.org/journals/avian-diseases/volume-65/issue-4/0005-2086-65.4.659/Retrospective-Assessment-of-Escherichia-coli-Vaccination-in-Broiler-Turkeys-Under/10.1637/0005-2086-65.4.659.full

59. Szmolka A, Nagy B. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. Front Microbiol [Internet]. 2013 [cited 2021 Jun 29];4. Available from: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00258/abstract

60. Wang S, Peng Q, Jia HM, Zeng XF, Zhu JL, Hou CL, et al. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with *Lactobacillus plantarum* B1. Poultry Science. 2017 Aug;96(8):2576–86.

61. Ding S, Wang Y, Yan W, Li A, Jiang H, Fang J. Effects of *Lactobacillus plantarum* 15-1 and fructooligosaccharides on the response of broilers to pathogenic *Escherichia coli* O78 challenge. Venkitanarayanan K, editor. PLoS ONE. 2019 Jun 13;14(6):e0212079.

62. Redweik GAJ, Stromberg ZR, Van Goor A, Mellata M. Protection against avian pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Kentucky exhibited in chickens given both probiotics and live *Salmonella* vaccine. Poultry Science. 2020 Feb;99(2):752–62.

63. Methner U, Friese A, Rösler U. Competitive exclusion: A tool to combat extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* strains in chickens. Research in Veterinary Science. 2019 Apr;123:124–8.

64. Chantziaras I, Smet A, Filippitzi ME, Damiaans B, Haesebrouck F, Boyen F, et al. The effect of a commercial competitive exclusion product on the selection of enrofloxacin resistance in commensal *E. coli* in broilers. Avian Pathology. 2018 Sep 3;47(5):443–54.

65. Dion MB, Oechslin F, Moineau S. Phage diversity, genomics and phylogeny. Nat Rev Microbiol. 2020 Mar;18(3):125–38.

66. Spencer L, Olawuni B, Singh P. Gut virome: role and distribution in health and gastrointestinal diseases. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Mar 10;12:836706.

67. Hyman P, Abedon ST. Smaller fleas: viruses of microorganisms. Scientifica. 2012;2012:1–23.

68. Cenens W, Makumi A, Mebrhatu MT, Lavigne R, Aertsen A. Phage–host interactions during pseudolysogeny: Lessons from the Pid/*dgo* interaction. Bacteriophage. 2013 Jan;3(1):e25029.

69. Ripp S, Miller RV. The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. Microbiology. 1997 Jun 1;143(6):2065–70.

70. Abedon ST. Lysis from without. Bacteriophage. 2011 Jan;1(1):46–9.

71. Bertozzi Silva J, Storms Z, Sauvageau D. Host receptors for bacteriophage adsorption. Millard A, editor. FEMS Microbiology Letters. 2016 Feb;363(4):fnw002.

72. Nobrega FL, Vlot M, de Jonge PA, Dreesens LL, Beaumont HJE, Lavigne R, et al. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages. Nat Rev Microbiol. 2018 Dec;16(12):760–73.

73. Schwarzer D, Buettner FFR, Browning C, Nazarov S, Rabsch W, Bethe A, et al. A multivalent adsorption apparatus explains the broad host range of phage phi92: a comprehensive genomic and structural analysis. Journal of Virology. 2012 Oct 1;86(19):10384–98.

74. Broeker NK, Barbirz S. Not a barrier but a key: how bacteriophages exploit host's O-antigen as an essential receptor to initiate infection. Molecular Microbiology. 2017 Aug;105(3):353–7.

75. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Mar;100(5):2141–51.

76. Miyake K, Muraki T, Hattori K, Machida Y, Watanabe M, Kawase M, et al. Screening of bacteriophages producing endo-N-acetylneuraminidase. Journal of Fermentation and Bioengineering. 1997;84(1):90–3.

77. Leiman PG, Battisti AJ, Bowman VD, Stummeyer K, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, et al. The structures of bacteriophages K1E and K1-5 explain processive degradation of polysaccharide capsules and evolution of new host specificities. Journal of Molecular Biology. 2007 Aug;371(3):836–49.

78. Petter JG, Vimr ER. Complete nucleotide sequence of the bacteriophage K1F tail gene encoding endo-N-acylneuraminidase (endo-N) and comparison to an endo-N homolog in bacteriophage PK1E. J Bacteriol. 1993 Jul;175(14):4354–63.

79. Pelkonen S, Pelkonen J, Finne J. Common cleavage pattern of polysialic acid by bacteriophage endosialidases of different properties and origins. J Virol. 1989 Oct;63(10):4409–16.

80. Tomlinson S, Taylor PW. Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide. J Virol. 1985 Aug;55(2):374–8.

81. Bull JJ, Vimr ER, Molineux IJ. A tale of tails: Sialidase is key to success in a model of phage therapy against K1-capsulated *Escherichia coli*. Virology. 2010 Mar;398(1):79–86.

82. Kwiatkowski B, Boschek B, Thiele H, Stirm S. Substrate specificity of two bacteriophage-associated endo-N-acetylneuraminidases. J Virol. 1983 Jan;45(1):367–74.

83. Nimmich W, Krallmann-Wenzel U, Müller B, Schmidt G. Isolation and characterization of bacteriophages specific for capsular antigens K3, K7, K12, and K13 of *Escherichia coli*. Zentralblatt für Bakteriologie. 1992 Jan;276(2):213–20.

84. Nimmich W, Schmidt G, Krallmann-Wenzel U. Two different *Escherichia coli* capsular polysaccharide depolymerases each associated with one of the coliphage ϕK5 and ϕK20. FEMS Microbiology Letters. 1991 Aug 1;82(2):137–41.

85. Altmann F, März L, Stirm S, Unger FM. Two additional bacteriophage-associated glycan hydrolases cleaving ketosidic bonds of 3-deoxy-D- *manno* -octulosonic acid in capsular polysaccharides of *Escherichia coli*. FEBS Letters. 1987 Aug 31;221(1):145–9.

86. Altmann F, Christian R, Czerny T, Nimmich W, Marz L. Bacteriophage-associated glycan hydrolases specific for *Escherichia coli* capsular serotype K12. Eur J Biochem. 1990 Apr;189(2):307–12.

87. Bayer ME, Thurow H, Bayer MH. Penetration of the polysaccharide capsule of *Escherichia coli* (Bi161/42) by bacteriophage K29. Virology. 1979 Apr;94(1):95–118.

88. Whitfield C, Lam M. Characterisation of coliphage K30, a bacteriophage specific for *Escherichia coli* capsular serotype K30. FEMS Microbiology Letters. 1986 Dec;37(3):351–5.

89. Reske K, Wallenfels B, Jann K. Enzymatic degradation of O-antigenic lipopolysaccharides by coliphage omega8. Eur J Biochem. 1973 Jul;36(1):167–71.

90. Park DW, Park JH. Characterization of a novel phage depolymerase specific to *Escherichia coli* O157:H7 and biofilm control on abiotic surfaces. J Microbiol. 2021 Nov;59(11):1002–9.

91. Chen Y, Li X, Wang S, Guan L, Li X, Hu D, et al. A novel tail-associated O91-specific polysaccharide depolymerase from a podophage reveals lytic efficacy of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Drake HL, editor. Appl Environ Microbiol. 2020 Apr 17;86(9):e00145-20.

92. Barbirz S, Müller JJ, Uetrecht C, Clark AJ, Heinemann U, Seckler R. Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. Molecular Microbiology. 2008 Jul;69(2):303–16.

93. Guo Z, Huang J, Yan G, Lei L, Wang S, Yu L, et al. Identification and characterization of Dpo42, a novel depolymerase derived from the *Escherichia coli* phage vB_EcoM_ECOO78. Front Microbiol. 2017 Aug 2;8:1460.

94. Zhang Z, Yu F, Zou Y, Qiu Y, Wu A, Jiang T, et al. Phage protein receptors have multiple interaction partners and high expressions. Elofsson A, editor. Bioinformatics. 2020 May 1;36(10):2975–9.

95. Maffei E, Shaidullina A, Burkolter M, Druelle V, Willi L, Estermann F, et al. Systematic exploration of *Escherichia coli* phage-host interactions with the BASEL phage collection [Internet]. Microbiology; 2021 Mar [cited 2021 Sep 14]. Available from: http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2021.03.08.434280

96. Heller K, Braun V. Polymannose O-antigens of *Escherichia coli*, the binding sites for the reversible adsorption of bacteriophage T5+ via the L-shaped tail fibers. J Virol. 1982 Jan;41(1):222–7.

97. Washizaki A, Yonesaki T, Otsuka Y. Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers. MicrobiologyOpen. 2016 Dec;5(6):1003–15.

98. Rai AK, Mitchell AM. Enterobacterial Common Antigen: synthesis and function of an enigmatic molecule. Garsin DA, editor. mBio [Internet]. 2020 Aug 25 [cited 2021 Oct 18];11(4). Available from: https://journals.asm.org/doi/10.1128/mBio.01914-20

99. Smith DL, James CE, Sergeant MJ, Yaxian Y, Saunders JR, McCarthy AJ, et al. Short-tailed Stx phages exploit the conserved YaeT protein to disseminate Shiga toxin genes among Enterobacteria. J Bacteriol. 2007 Oct 15;189(20):7223–33.

100. Hong J, Kim KP, Heu S, Lee SJ, Adhya S, Ryu S. Identification of host receptor and receptor-binding module of a newly sequenced T5-like phage EPS7. FEMS Microbiology Letters. 2008 Dec;289(2):202–9.

101. Firozi P, Zhang W, Chen L, Quiocho FA, Worley KC, Templeton NS. Identification and removal of colanic acid from plasmid DNA preparations: implications for gene therapy. Gene Ther. 2010 Dec;17(12):1484–99.

102. Gong Q, Wang X, Huang H, Sun Y, Qian X, Xue F, et al. Novel host recognition mechanism of the K1 capsule-specific phage of *Escherichia coli* : capsular polysaccharide as the first receptor and lipopolysaccharide as the secondary receptor. Pfeiffer JK, editor. J Virol. 2021 Aug 25;95(18):e00920-21.

103. Sellner B, Prakapaitė R, van Berkum M, Heinemann M, Harms A, Jenal U. A new sugar for an old phage: a c-di-GMP-dependent polysaccharide pathway sensitizes *Escherichia coli* for bacteriophage infection. Buchrieser C, editor. mBio. 2021 Dec 21;12(6):e03246-21.

104. Hantke K. Major outer membrane proteins of *E. coli* K12 serve as receptors for the phages T2 (protein Ia) and 434 (protein Ib). Molec Gen Genet. 1978 Jan;164(2):131–5.

105. Rabsch W, Ma L, Wiley G, Najar FZ, Kaserer W, Schuerch DW, et al. FepA- and TonB-dependent bacteriophage H8: receptor binding and genomic sequence. J Bacteriol. 2007 Aug;189(15):5658–74.

106. Heller KJ. Identification of the phage gene for host receptor specificity by analyzing hybrid phages of T5 and BF23. Virology. 1984 Nov;139(1):11–21.

107. Samuel ADT, Pitta TP, Ryu WS, Danese PN, Leung ECW, Berg HC. Flagellar determinants of bacterial sensitivity to χ-phage. Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Aug 17;96(17):9863–6.

108. Randall-Hazelbauer L, Schwartz M. Isolation of the bacteriophage lambda receptor from *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1973 Dec;116(3):1436–46.

109. González-García VA, Bocanegra R, Pulido-Cid M, Martín-Benito J, Cuervo A, Carrascosa JL. Characterization of the initial steps in the T7 DNA ejection process. Bacteriophage. 2015 Jul 3;5(3):e1056904.

110. McPartland J, Rothman-Denes LB. The tail sheath of bacteriophage N4 interacts with the *Escherichia coli* receptor. J Bacteriol. 2009 Jan 15;191(2):525–32.

111. Alphen L van, Havekes L, Lugtenberg B. Major outer membrane protein *d* of *Escherichia coli* K 12: Purification and *in vitro* activity of bacteriophage k3 and f-pilus mediated conjugation. FEBS Letters. 1977 Mar 15;75(1–2):285–90.

112. Yu F, Mizushima S. Roles of lipopolysaccharide and outer membrane protein OmpC of *Escherichia coli* K-12 in the receptor function for bacteriophage T4. J Bacteriol. 1982 Aug;151(2):718–22.

113. Kaufmann A, Stierhof YD, Henning U. New outer membrane-associated protease of *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol. 1994 Jan;176(2):359–67.

114. Chai TJ, Foulds J. Two bacteriophages which utilize a new *Escherichia coli* major outer membrane protein as part of their receptor. J Bacteriol. 1978 Jul;135(1):164–70.

115. German GJ, Misra R. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage. Journal of Molecular Biology. 2001 May;308(4):579–85.

116. Hantke K, Braun V. Functional interaction of the *tonA/tonB* receptor system in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1978 Jul;135(1):190–7.

117. Manning PA, Reeves P. Outer membrane proteins of *Escherichia coli* K-12: Isolation of a common receptor protein for bacteriophage T6 and colicin K. Molec Gen Genet. 1978 Jan;158(3):279–86.

118. Li P, Lin H, Mi Z, Tong Y, Wang J. vB_EcoS_IME347 a novel T1-like *Escherichia coli* bacteriophage. J Basic Microbiol. 2018 Nov;58(11):968–76.

119. Brockhurst MA, Koskella B, Zhang QG. Bacteria-phage antagonistic coevolution and the implications for phage therapy. In: Harper D, Abedon S, Burrowes B, McConville M, editors. Bacteriophages [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [cited 2023 Sep 5]. p. 1–21. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40598-8_7-1

120. Díaz-Muñoz SL, Koskella B. Bacteria–phage interactions in natural environments. In: Advances in Applied Microbiology [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2020 Aug 18]. p. 135–83. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128002599000044

121. Kronheim S, Daniel-Ivad M, Duan Z, Hwang S, Wong AI, Mantel I, et al. A chemical defence against phage infection. Nature. 2018 Dec;564(7735):283–6.

122. Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, Keren M, et al. Systematic discovery of antiphage defense systems in the microbial pangenome. Science. 2018 Mar 2;359(6379):eaar4120.

123. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol. 2010 May;8(5):317–27.

124. Morita M, Fischer CR, Mizoguchi K, Yoichi M, Oda M, Tanji Y, et al. Amino acid alterations in Gp38 of host range mutants of PP01 and evidence for their infection of an *ompC* null mutant of *Escherichia coli* O157:H7. FEMS Microbiology Letters. 2002 Nov;216(2):243–8.

125. Meyer JR, Dobias DT, Weitz JS, Barrick JE, Quick RT, Lenski RE. Repeatability and contingency in the evolution of a key innovation in phage lambda. Science. 2012 Jan 27;335(6067):428–32.

126. Petrie KL, Palmer ND, Johnson DT, Medina SJ, Yan SJ, Li V, et al. Destabilizing mutations encode nongenetic variation that drives evolutionary innovation. Science. 2018 Mar 30;359(6383):1542–5.

127. Wielgoss S, Bergmiller T, Bischofberger AM, Hall AR. Adaptation to parasites and costs of parasite resistance in mutator and nonmutator bacteria. Mol Biol Evol. 2016 Mar;33(3):770–82.

128. Seed KD, Faruque SM, Mekalanos JJ, Calderwood SB, Qadri F, Camilli A. Phase variable O antigen biosynthetic genes control expression of the major protective antigen and bacteriophage receptor in *Vibrio cholerae* O1. Satchell KJF, editor. PLoS Pathog. 2012 Sep 13;8(9):e1002917.

129. Sørensen MCH, Vitt A, Neve H, Soverini M, Ahern SJ, Klumpp J, et al. Campylobacter phages use hypermutable polyG tracts to create phenotypic diversity and evade bacterial resistance. Cell Reports. 2021 Jun;35(10):109214.

130. Manning AJ, Kuehn MJ. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. BMC Microbiol. 2011;11(1):258.

131. Lu MJ, Henning U. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. Trends in Microbiology. 1994 Apr;2(4):137–9.

132. Hofer B, Ruge M, Dreiseikelmann B. The superinfection exclusion gene (sieA) of bacteriophage P22: identification and overexpression of the gene and localization of the gene product. J Bacteriol. 1995 Jun;177(11):3080–6.

133. Oliveira PH, Touchon M, Rocha EPC. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. Nucleic Acids Research. 2014 Sep 15;42(16):10618–31.

134. Skowronek KJ, Bujnicki JM. Restriction and homing endonucleases. In: Polaina J, MacCabe AP, editors. Industrial Enzymes [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007 [cited 2023 May 8]. p. 357–77. Available from: http://link.springer.com/10.1007/1-4020-5377-0_21

135. Hampton HG, Watson BNJ, Fineran PC. The arms race between bacteria and their phage foes. Nature. 2020 Jan;577(7790):327–36.

136. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nat Rev Microbiol. 2020 Feb;18(2):67–83.

137. Deveau H, Barrangou R, Garneau JE, Labonté J, Fremaux C, Boyaval P, et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol. 2008 Feb 15;190(4):1390–400.

138. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. Nature. 2013 Jan 17;493(7432):429–32.

139. Martínez-Rubio R, Quiles-Puchalt N, Martí M, Humphrey S, Ram G, Smyth D, et al. Phage-inducible islands in the Gram-positive cocci. ISME J. 2017 Apr;11(4):1029–42.

140. Faruque SM, Asadulghani, Kamruzzaman M, Nandi RK, Ghosh AN, Nair GB, et al. RS1 element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTXΦ. Infect Immun. 2002 Jan;70(1):163–70.

141. O'Hara BJ, Barth ZK, McKitterick AC, Seed KD. A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome. Barrangou R, editor. PLoS Genet. 2017 Jun 8;13(6):e1006838.

142. Parma DH, Snyder M, Sobolevski S, Nawroz M, Brody E, Gold L. The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death. Genes Dev. 1992 Mar;6(3):497–510.

143. Lopatina A, Tal N, Sorek R. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy. Annu Rev Virol. 2020 Sep 29;7(1):371–84.

144. Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GPC. The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. Proc Natl Acad Sci USA. 2009 Jan 20;106(3):894–9.

145. Otsuka Y, Yonesaki T. Dmd of bacteriophage T4 functions as an antitoxin against *Escherichia coli* LsoA and RnlA toxins: T4 phage Dmd as an antitoxin. Molecular Microbiology. 2012 Feb;83(4):669–81.

146. Sberro H, Leavitt A, Kiro R, Koh E, Peleg Y, Qimron U, et al. Discovery of functional toxin/antitoxin systems in bacteria by shotgun cloning. Molecular Cell. 2013 Apr;50(1):136–48.

147. Roucourt B, Lavigne R. The role of interactions between phage and bacterial proteins within the infected cell: a diverse and puzzling interactome. Environmental Microbiology. 2009 Nov;11(11):2789–805.

148. Häuser R, Blasche S, Dokland T, Haggård-Ljungquist E, von Brunn A, Salas M, et al. Bacteriophage protein–protein interactions. In: Advances in Virus Research [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2023 Apr 25]. p. 219–98. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123944382000062

149. Casjens SR, Thuman-Commike PA. Evolution of mosaically related tailed bacteriophage genomes seen through the lens of phage P22 virion assembly. Virology. 2011 Mar;411(2):393–415.

150. Hatfull GF. Bacteriophage genomics. Current Opinion in Microbiology. 2008 Oct;11(5):447–53.

151. Brüssow H, Canchaya C, Hardt WD. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Sep;68(3):560–602.

152. De Paepe M, Hutinet G, Son O, Amarir-Bouhram J, Schbath S, Petit MA. Temperate phages acquire DNA from defective prophages by relaxed homologous recombination: the role of Rad52-like recombinases. Casadesús J, editor. PLoS Genet. 2014 Mar 6;10(3):e1004181.

153. Lopes A, Amarir-Bouhram J, Faure G, Petit MA, Guerois R. Detection of novel recombinases in bacteriophage genomes unveils Rad52, Rad51 and Gp2.5 remote homologs. Nucleic Acids Research. 2010 Jul;38(12):3952–62.

154. Loose M, Sáez Moreno D, Mutti M, Hitzenhammer E, Visram Z, Dippel D, et al. Natural bred ε2-phages have an improved host range and virulence against uropathogenic *Escherichia coli* over their ancestor phages. Antibiotics. 2021 Nov 1;10(11):1337.

155. Breitbart M, Rohwer F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? Trends in Microbiology. 2005 Jun;13(6):278–84.

156. Taylor VL, Fitzpatrick AD, Islam Z, Maxwell KL. The diverse impacts of phage morons on bacterial fitness and virulence. In: Advances in Virus Research [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2023 Apr 26]. p. 1–31. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352718300435

157. Turner D, Shkoporov AN, Lood C, Millard AD, Dutilh BE, Alfenas-Zerbini P, et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. Arch Virol. 2023 Feb;168(2):74.

158. Adriaenssens EM, Sullivan MB, Knezevic P, van Zyl LJ, Sarkar BL, Dutilh BE, et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. Arch Virol. 2020 May;165(5):1253–60.

159. Heller K, Braun V. Accelerated adsorption of bacteriophage T5 to *Escherichia coli* F, resulting from reversible tail fiber-lipopolysaccharide binding. J Bacteriol. 1979 Jul;139(1):32–8.

160. Niu YD, Stanford K, Kropinski AM, Ackermann HW, Johnson RP, She YM, et al. Genomic, proteomic and physiological characterization of a T5-like bacteriophage for control of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Poteete AR, editor. PLoS ONE. 2012 Apr 13;7(4):e34585.

161. Liu W, Han L, Song P, Sun H, Zhang C, Zou L, et al. Complete genome sequencing of a *Tequintavirus* bacteriophage with a broad host range against *Salmonella Abortus equi* isolates from donkeys. Front Microbiol. 2022 Aug 16;13:938616.

162. Korf IHE, Meier-Kolthoff JP, Adriaenssens EM, Kropinski AM, Nimtz M, Rohde M, et al. Still something to discover: novel insights into *Escherichia coli* phage diversity and taxonomy. Viruses. 2019 May 17;11(5):454.

163. Davison J, Brunel F. Restriction insensitivity in bacteriophage T5 I. Genetic characterization of mutants sensitive to EcoRI restriction. J Virol. 1979 Jan;29(1):11–6.

164. Davison J. Pre-early functions of bacteriophage T5 and its relatives. Bacteriophage. 2015 Oct 2;5(4):e1086500.

165. Dias C, Almeida C, Łobocka M, Oliveira H. Genome sequences of four potentially therapeutic bacteriophages infecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Dennehy JJ, editor. Microbiol Resour Announc. 2020 Sep 3;9(36):e00749-20.

166. Sørensen PE, Van Den Broeck W, Kiil K, Jasinskyte D, Moodley A, Garmyn A, et al. New insights into the biodiversity of coliphages in the intestine of poultry. Sci Rep. 2020 Dec;10(1):15220.

167. Salem M, Pajunen MI, Jun JW, Skurnik M. T4-like bacteriophages isolated from pig stools infect *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* using LPS and OmpF as receptors. Viruses. 2021 Feb 13;13(2):296.

168. Mizuno CM, Luong T, Cederstrom R, Krupovic M, Debarbieux L, Roach DR. Isolation and characterization of bacteriophages that infect *Citrobacter rodentium*, a model pathogen for intestinal diseases. Viruses. 2020 Jul 8;12(7):737.

169. Slobodníková L, Markusková B, Kajsík M, Andrezál M, Straka M, Liptáková A, et al. Characterization of anti-bacterial effect of the two new phages against uropathogenic *Escherichia coli*. Viruses. 2021 Jul 12;13(7):1348.

170. Kim SH, Adeyemi DE, Park MK. Characterization of a new and efficient polyvalent phage infecting *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Shigella sonnei*. Microorganisms. 2021 Oct 6;9(10):2105.

171. Amarillas L, Villicaña C, Lightbourn-Rojas L, González-Robles A, León-Félix J. The complete genome and comparative analysis of the phage phiC120 infecting multidrug-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* strains. Wong A, editor. G3 Genes|Genomes|Genetics. 2021 Apr 12;11(2):jkab014.

172. Olsen NS, Forero-Junco L, Kot W, Hansen LH. Exploring the remarkable diversity of culturable *Escherichia coli* phages in the Danish wastewater environment. Viruses. 2020 Sep 4;12(9):986.

173. Shahin K, Bao H, Zhu S, Soleimani-Delfan A, He T, Mansoorianfar M, et al. Bio-control of O157:H7, and colistin-resistant MCR-1-positive *Escherichia coli* using a new designed broad host range phage cocktail. LWT. 2022 Jan;154:112836.

174. Trojet SN, Caumont-Sarcos A, Perrody E, Comeau AM, Krisch HM. The gp38 adhesins of the T4 superfamily: a complex modular determinant of the phage's host specificity. Genome Biology and Evolution. 2011 Jan 1;3:674–86.

175. Thomas J, Orwenyo J, Wang LX, Black L. The odd "RB" phage identification of arabinosylation as a new epigenetic modification of DNA in T4-like phage RB69. Viruses. 2018 Jun 8;10(6):313.

176. Schwarzer D, Browning C, Stummeyer K, Oberbeck A, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, et al. Structure and biochemical characterization of bacteriophage phi92 endosialidase. Virology. 2015 Mar;477:133–43.

177. Tsonos J, Adriaenssens EM, Klumpp J, Hernalsteens JP, Lavigne R, De Greve H. Complete genome sequence of the novel *Escherichia coli* phage phAPEC8. Journal of Virology. 2012 Dec 1;86(23):13117–8.

178. Khalifeh A, Kraberger S, Dziewulska D, Stenzel T, Varsani A. Complete genome sequence of a *Phapecoctavirus* isolated from a pigeon cloacal swab sample. Roux S, editor. Microbiol Resour Announc [Internet]. 2021 Feb 4 [cited 2021 Sep 13];10(5). Available from: https://journals.asm.org/doi/10.1128/MRA.01471-20

179. Kulikov E, Golomidova A, Letarova M, Kostryukova E, Zelenin A, Prokhorov N, et al. Genomic sequencing and biological characteristics of a novel *Escherichia coli* bacteriophage 9g, a putative representative of a new *Siphoviridae* genus. Viruses. 2014 Dec 19;6(12):5077–92.

180. Thiaville JJ, Kellner SM, Yuan Y, Hutinet G, Thiaville PC, Jumpathong W, et al. Novel genomic island modifies DNA with 7-deazaguanine derivatives. Proc Natl Acad Sci USA [Internet]. 2016 Mar 15 [cited 2023 Apr 21];113(11). Available from: https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1518570113

181. Hutinet G, Kot W, Cui L, Hillebrand R, Balamkundu S, Gnanakalai S, et al. 7-Deazaguanine modifications protect phage DNA from host restriction systems. Nat Commun. 2019 Nov 29;10(1):5442.

182. Tsai R, Corrêa IR, Xu MY, Xu S yong. Restriction and modification of deoxyarchaeosine (dG+)-containing phage 9 g DNA. Sci Rep. 2017 Aug 21;7(1):8348.

183. Townsend EM, Kelly L, Gannon L, Muscatt G, Dunstan R, Michniewski S, et al. Isolation and characterization of *Klebsiella* phages for phage therapy. PHAGE. 2021 Mar 1;2(1):26–42.

184. Welkos S, Schreiber M, Baer H. Identification of *Salmonella* with the O-1 bacteriophage. Appl Microbiol. 1974 Oct;28(4):618–22.

185. Barron-Montenegro R, García R, Dueñas F, Rivera D, Opazo-Capurro A, Erickson S, et al. Comparative analysis of *Felixounavirus* genomes including two new members of the genus that infect *Salmonella* Infantis. Antibiotics. 2021 Jul 2;10(7):806.

186. Shahin K, Barazandeh M, Zhang L, Hedayatkhah A, He T, Bao H, et al. Biodiversity of new lytic bacteriophages infecting *Shigella* spp. in freshwater environment. Front Microbiol. 2021 Feb 17;12:619323.

187. Hudson HP, Lindberg AA, Stocker BAD. Lipopolysaccharide core defects in *Salmonella* Typhimurium mutants which are resistant to Felix O phage but retain smooth character. Journal of General Microbiology. 1978 Nov 1;109(1):97–112.

188. Penadés JR, Chen J, Quiles-Puchalt N, Carpena N, Novick RP. Bacteriophage-mediated spread of bacterial virulence genes. Current Opinion in Microbiology. 2015 Feb;23:171–8.

189. Shaikh N, Tarr PI. *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin-encoding bacteriophages: integrations, excisions, truncations, and evolutionary implications. J Bacteriol. 2003 Jun 15;185(12):3596–605.

190. Dedrick RM, Jacobs-Sera D, Bustamante CAG, Garlena RA, Mavrich TN, Pope WH, et al. Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. Nat Microbiol. 2017 Jan 9;2(3):16251.

191. Ansaldi M, Boulanger P, Brives C, Debarbieux L, Dufour N, Froissart R, et al. A century of research on bacteriophages. Virologie. 2018 Feb;24(1):9–22.

192. Saad AM, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Full genome sequence of a polyvalent bacteriophage infecting strains of *Shigella, Salmonella*, and *Escherichia*. Arch Virol. 2018 Nov;163(11):3207–10.

193. Lamy-Besnier Q, Brancotte B, Ménager H, Debarbieux L. Viral Host Range database, an online tool for recording, analyzing and disseminating virus–host interactions. Kelso J, editor. Bioinformatics. 2021 Sep 9;37(17):2798–801.

194. Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Kucharewicz-Krukowska A, Dabrowski M, Bisikiewicz R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 1983;31(3):267–91.

195. Gill J, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. CPB. 2010 Jan 1;11(1):2–14.

196. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. Ojcius DM, editor. PLoS ONE. 2009 Mar 20;4(3):e4944.

197. Merabishvili M, Pirnay JP, De Vos D. Guidelines to compose an ideal bacteriophage cocktail. In: Azeredo J, Sillankorva S, editors. Bacteriophage Therapy [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2018 [cited 2023 Apr 4]. p. 99–110. (Methods in Molecular Biology; vol. 1693). Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7395-8_9

198. Richter Ł, Księżarczyk K, Paszkowska K, Janczuk-Richter M, Niedziółka-Jönsson J, Gapiński J, et al. Adsorption of bacteriophages on polypropylene labware affects the reproducibility of phage research. Sci Rep. 2021 Dec;11(1):7387.

199. Dąbrowska K. Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review. Med Res Rev. 2019 Sep;39(5):2000–25.

200. Mosimann S, Desiree K, Ebner P. Efficacy of phage therapy in poultry: A systematic review and meta-analysis. Poultry Science. 2021 Sep;101472.

201. Weld RJ, Butts C, Heinemann JA. Models of phage growth and their applicability to phage therapy. Journal of Theoretical Biology. 2004 Mar;227(1):1–11.

202. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. Viruses. 2018 Jun 30;10(7):351.

203. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. Trends in Biotechnology. 2010 Dec;28(12):591–5.

204. Filippov AA, Sergueev KV, He Y, Huang XZ, Gnade BT, Mueller AJ, et al. Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis*: identification of phage receptors and attenuation for mice. Kaushal D, editor. PLoS ONE. 2011 Sep 28;6(9):e25486.

205. Burmeister AR, Turner PE. Trading-off and trading-up in the world of bacteria–phage evolution. Current Biology. 2020 Oct;30(19):R1120–4.

206. Mangalea MR, Duerkop BA. Fitness trade-offs resulting from bacteriophage resistance potentiate synergistic antibacterial strategies. Ottemann KM, editor. Infect Immun. 2020 Jun 22;88(7):e00926-19.

207. Sørensen PE, Baig S, Stegger M, Ingmer H, Garmyn A, Butaye P. Spontaneous phage resistance in avian pathogenic *Escherichia coli*. Front Microbiol. 2021 Dec 13;12:782757.

208. Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP, Wyżewski Z. Phage therapy in bacterial infections treatment: one hundred years after the discovery of bacteriophages. Curr Microbiol. 2017 Feb;74(2):277–83.

209. Dabrowska K, Switala-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. J Appl Microbiol. 2005 Jan;98(1):7–13.

210. Srivastava AS, Kaido T, Carrier E. Immunological factors that affect the *in vivo* fate of T7 phage in the mouse. Journal of Virological Methods. 2004 Jan;115(1):99–104.

211. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Mar;45(3):649–59.

212. Naghizadeh M, Karimi Torshizi MA, Rahimi S, Engberg RM, Sørensen Dalgaard T. Effect of serum anti-phage activity on colibacillosis control by repeated phage therapy in broilers. Veterinary Microbiology. 2019 Jul;234:61–71.

213. Khan Mirzaei M, Haileselassie Y, Navis M, Cooper C, Sverremark-Ekström E, Nilsson AS. Morphologically distinct *Escherichia coli* bacteriophages differ in their efficacy and ability to stimulate cytokine aelease *in vitro*. Front Microbiol [Internet]. 2016 Mar 31 [cited 2023 Mar 29];7. Available from: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.00437/abstract

214. Weber-Dabrowska B, Zimecki M, Mulczyk M, Gorski A. Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2002 Oct;34(2):135–8.

215. Roach DR, Leung CY, Henry M, Morello E, Singh D, Di Santo JP, et al. Synergy between the host immune system and bacteriophage is essential for successful phage therapy against an acute respiratory pathogen. Cell Host & Microbe. 2017 Jul;22(1):38-47.e4.

216. Cai R, Wang G, Le S, Wu M, Cheng M, Guo Z, et al. Three capsular polysaccharide synthesis-related glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaJ, are associated with virulence and phage sensitivity of *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2019 May 28;10:1189.

217. Appelmans R. Le dosage du bactériophage. Compt Rend Soc Biol. 1921;(85):1098.

218. Burrowes B, Molineux I, Fralick J. Directed *in vitro* evolution of therapeutic bacteriophages: the Appelmans protocol. Viruses. 2019 Mar 11;11(3):241.

219. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyanaga K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. Applied Microbiology and Biotechnology. 2004 Apr 1;64(2):270–4.

220. Schmerer M, Molineux IJ, Bull JJ. Synergy as a rationale for phage therapy using phage cocktails. PeerJ. 2014 Sep 25;2:e590.

221. Wright RCT, Friman VP, Smith MCM, Brockhurst MA. Functional diversity increases the efficacy of phage combinations. Microbiology [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Sep 5];167(12). Available from: https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.001110

222. Turner PE, Burch CL, Hanley KA, Chao L. Hybrid frequencies confirm limit to coinfection in the RNA bacteriophage ϕ6. J Virol. 1999 Mar;73(3):2420–4.

223. Forti F, Roach DR, Cafora M, Pasini ME, Horner DS, Fiscarelli EV, et al. Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and treats acute infections in two animal models. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2018 Jun [cited 2021 Sep 16];62(6). Available from: https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02573-17

224. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union One Health 2019 zoonoses report. EFS2 [Internet]. 2021 Feb [cited 2022 Feb 14];19(2). Available from: https://data.europa.eu/doi/10.2903/j.efsa.2021.6406

225. Żbikowska K, Michalczuk M, Dolka B. The use of bacteriophages in the poultry industry. Animals. 2020 May 18;10(5):872.

226. Ciesielska A, Pekala AM, Smigielska Z, Wojda-Stepien E, Maszewska A, Wojcik EA, et al. From a single plaque to an effective phage preparation preventing colibacillosis in poultry - the story of BAFACOL. 2022; Viruses of Microbe Congress.

227. Loeffler JM, Djurkovic S, Fischetti VA. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia. Infect Immun. 2003 Nov;71(11):6199–204.

228. Oliveira H, Thiagarajan V, Walmagh M, Sillankorva S, Lavigne R, Neves-Petersen MT, et al. A thermostable *Salmonella* phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against Gram-negative pathogens in presence of weak acids. Zeth K, editor. PLoS ONE. 2014 Oct 7;9(10):e108376.

229. Schirmeier E, Zimmermann P, Hofmann V, Biebl M, Gerstmans H, Maervoet VET, et al. Inhibitory and bactericidal effect of Artilysin® Art-175 against colistin-resistant mcr-1-positive *Escherichia coli* isolates. International Journal of Antimicrobial Agents. 2018 Mar;51(3):528–9.

230. Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. Trends in Microbiology. 2005 Jan;13(10):491–6.

231. Sharma U, Vipra A, Channabasappa S. Phage-derived lysins as potential agents for eradicating biofilms and persisters. Drug Discovery Today. 2018 Apr;23(4):848–56.

232. Mushtaq N, Redpath MB, Luzio JP, Taylor PW. Prevention and cure of systemic *Escherichia coli* K1 infection by modification of the bacterial phenotype. Antimicrob Agents Chemother. 2004 May;48(5):1503–8.

233. Waseh S, Hanifi-Moghaddam P, Coleman R, Masotti M, Ryan S, Foss M, et al. Orally administered P22 phage tailspike protein reduces *Salmonella* colonization in chickens: prospects of a novel therapy against bacterial infections. Aziz RK, editor. PLoS ONE. 2010 Nov 22;5(11):e13904.

234. McCallum KL, Laakso DH, Whitfield C. Use of a bacteriophage-encoded glycanase enzyme in the generation of lipopolysaccharide *O* side chain deficient mutants of *Escherichia coli* O9:K30 and *Klebsiella* O1:K20: role of *O* and *K* antigens in resistance to complement-mediated serum killing. Can J Microbiol. 1989 Nov 1;35(11):994–9.

235. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère MF, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. Fox D, editor. PLoS ONE. 2007 Aug 29;2(8):e799.

236. Valério N, Oliveira C, Jesus V, Branco T, Pereira C, Moreirinha C, et al. Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli*. Virus Research. 2017 Aug;240:8–17.

237. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. Poultry Science. 2004 Dec;83(12):1944–7.

238. Li X, He Y, Wang Z, Wei J, Hu T, Si J, et al. A combination therapy of phages and antibiotics: Two is better than one. Int J Biol Sci. 2021;17(13):3573–82.

239. Chan BK, Sistrom M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Rep. 2016 May 26;6(1):26717.

240. Barrow P, Lovell M, Berchieri A. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. Clin Diagn Lab Immunol. 1998 May;5(3):294–8.

241. Huff W, Huff G, Rath N, Balog J, Donoghue A. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. Poultry Science. 2003 Jul;82(7):1108–12.

242. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM. Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. Avian Diseases. 2003 Oct;47(4):1399–405.

243. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. Poultry Science. 2006 Aug;85(8):1373–7.

244. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. Immune interference of bacteriophage efficacy when treating colibacillosis in poultry. Poultry Science. 2010 May;89(5):895–900.

245. Oliveira A, Sereno R, Azeredo J. *In vivo* efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses. Veterinary Microbiology. 2010 Dec;146(3–4):303–8.

246. Lau GL, Sieo CC, Tan WS, Hair-Bejo M, Jalila A, Ho YW. Efficacy of a bacteriophage isolated from chickens as a therapeutic agent for colibacillosis in broiler chickens. Poultry Science. 2010 Dec;89(12):2589–96.

247. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Donoghue AM. Method of administration affects the ability of bacteriophage to prevent colibacillosis in 1-day-old broiler chickens. Poultry Science. 2013 Apr;92(4):930–4.

248. Tsonos J, Oosterik LH, Tuntufye HN, Klumpp J, Butaye P, De Greve H, et al. A cocktail of *in vitro* efficient phages is not a guarantee for *in vivo* therapeutic results against avian colibacillosis. Veterinary Microbiology. 2014 Jul;171(3–4):470–9.

249. El-Gohary FA, Huff WE, Huff GR, Rath NC, Zhou ZY, Donoghue AM. Environmental augmentation with bacteriophage prevents colibacillosis in broiler chickens. Poultry Science. 2014 Nov;93(11):2788–92.

250. Kaikabo AA, AbdulKarim SM, Abas F. Evaluation of the efficacy of chitosan nanoparticles loaded ΦKAZ14 bacteriophage in the biological control of colibacillosis in chickens. Poultry Science. 2017 Feb;96(2):295–302.

251. Naghizadeh M, Karimi Torshizi MA, Rahimi S, Dalgaard TS. Synergistic effect of phage therapy using a cocktail rather than a single phage in the control of severe colibacillosis in quails. Poultry Science. 2019 Feb;98(2):653–63.

252. Eid S, Tolba HMN, Hamed RI, Al-Atfeehy NM. Bacteriophage therapy as an alternative biocontrol against emerging multidrug resistant E. coli in broilers. Saudi Journal of Biological Sciences. 2022 May;29(5):3380–9.

253. Tang Z, Tang N, Wang X, Ren H, Zhang C, Zou L, et al. Characterization of a lytic *Escherichia coli* phage CE1 and its potential use in therapy against avian pathogenic *Escherichia coli* infections. Front Microbiol. 2023 Feb 16;14:1091442.

254. Oliveira A, Sillankorva S, Quinta R, Henriques A, Sereno R, Azeredo J. Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. Journal of Applied Microbiology. 2009 Jun;106(6):1919–27.

255. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Xie H, Moore PA, et al. Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). Poultry Science. 2002 Apr;81(4):437–41.

256. Huff W, Huff G, Rath N, Balog J, Donoghue A. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. Poultry Science. 2002 Oct;81(10):1486–91.

257. Kittler S, Mengden R, Korf IHE, Bierbrodt A, Wittmann J, Plötz M, et al. Impact of bacteriophage-supplemented drinking water on the *E. coli* population in the chicken gut. Pathogens. 2020 Apr 16;9(4):293.

258. Trotereau A, Schouler C. Use of a chicken embryo lethality assay to assess the efficacy of phage therapy. In: Clokie MRJ, Kropinski A, Lavigne R, editors. Bacteriophages. New York, NY: Springer New York; 2019. p. 199–205.

259. Nicolas M, Trotereau A, Culot A, Moodley A, Atterbury R, Wagemans J, et al. Isolation and characterization of a novel phage collection against avian-pathogenic *Escherichia coli*. Denes TG, editor. Microbiology Spectrum. 2023 May 4;e04296-22.

260. Petsong K, Benjakul S, Chaturongakul S, Switt A, Vongkamjan K. Lysis profiles of *Salmonella* phages on *Salmonella* isolates from various sources and efficiency of a phage cocktail against *S.* Enteritidis and *S.* Typhimurium. Microorganisms. 2019 Apr 5;7(4):100.

261. Principi N, Silvestri E, Esposito S. Advantages and limitations of bacteriophages for the treatment of bacterial infections. Front Pharmacol. 2019 May 8;10:513.

262. Lin J, Du F, Long M, Li P. Limitations of phage therapy and corresponding optimization strategies: a review. Molecules. 2022 Mar 13;27(6):1857.

263. Petrovic Fabijan A, Iredell J, Danis-Wlodarczyk K, Kebriaei R, Abedon ST. Translating phage therapy into the clinic: Recent accomplishments but continuing challenges. PLoS Biol. 2023 May 23;21(5):e3002119.

264. Barshira E, Friedman A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. Developmental & Comparative Immunology. 2006;30(10):930–41.

265. Payne RJH, Jansen VAA. Pharmacokinetic principles of bacteriophage therapy. Clinical Pharmacokinetics. 2003;42(4):315–25.

266. Molina F, Simancas A, Ramírez M, Tabla R, Roa I, Rebollo JE. A new pipeline for designing phage cocktails based on phage-bacteria infection networks. Front Microbiol. 2021 Feb 16;12:564532.

267. Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. Future Microbiology. 2013 Jun;8(6):769–83.

268. Molina F, Menor-Flores M, Fernández L, Vega-Rodríguez MA, García P. Systematic analysis of putative phage-phage interactions on minimum-sized phage cocktails. Sci Rep. 2022 Feb 14;12(1):2458.

269. Díaz-Galián MV, Vega-Rodríguez MA, Molina F. PhageCocktail: An R package to design phage cocktails from experimental phage-bacteria infection networks. Computer Methods and Programs in Biomedicine. 2022 Jun;221:106865.

270. Mathieu A, Dion M, Deng L, Tremblay D, Moncaut E, Shah SA, et al. Virulent coliphages in 1-year-old children fecal samples are fewer, but more infectious than temperate coliphages. Nat Commun. 2020 Dec;11(1):378.

271. Abedon ST. Bacteriophage secondary infection. Virol Sin. 2015 Feb;30(1):3–10.

272. Hyman P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth. Pharmaceuticals. 2019 Mar 11;12(1):35.

273. Ross A, Ward S, Hyman P. More is better: selecting for broad host range bacteriophages. Front Microbiol [Internet]. 2016 Sep 8 [cited 2023 Jun 28];7. Available from: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01352/abstract

274. Kortright KE, Chan BK, Turner PE. High-throughput discovery of phage receptors using transposon insertion sequencing of bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 2020 Aug 4;117(31):18670–9.

275. Mahichi F, Synnott AJ, Yamamichi K, Osada T, Tanji Y. Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. FEMS Microbiology Letters. 2009 Jun;295(2):211–7.

276. Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Jul 3;104(27):11197–202.

277. Gurney J, Brown SP, Kaltz O, Hochberg ME. Steering phages to combat bacterial pathogens. Trends in Microbiology. 2020 Feb;28(2):85–94.

278. Zulk JJ, Clark JR, Ottinger S, Ballard MB, Mejia ME, Mercado-Evans V, et al. Phage resistance accompanies reduced fitness of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary environment. D'Orazio SEF, editor. mSphere. 2022 Aug 31;7(4):e00345-22.

279. Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. Microbiology. 1987 May 1;133(5):1111–26.

280. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P, et al. Efficacy of bacteriophage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by a clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* strain producing CTX-M-15. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jul;56(7):3568–75.

281. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Aríñez-Soriano J, Cortés P, Maspoch D, et al. Microencapsulation with alginate/CaCO3: A strategy for improved phage therapy. Scientific Reports. 2017 Feb;7(1):41441.

282. Cieplak T, Soffer N, Sulakvelidze A, Nielsen DS. A bacteriophage cocktail targeting *Escherichia coli* reduces *E. coli* in simulated gut conditions, while preserving a non-targeted representative commensal normal microbiota. Gut Microbes. 2018 Aug 24;1–9.

283. Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Żaczek M, Łobocka M, Łusiak-Szelachowska M, Górski A. Bacteriophage procurement for therapeutic purposes. Front Microbiol [Internet]. 2016 Aug 12 [cited 2023 Jun 29];7. Available from: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01177/abstract

284. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2011 Sep 7;63(10):1253–64.

285. Clavijo V, Baquero D, Hernandez S, Farfan JC, Arias J, Arévalo A, et al. Phage cocktail SalmoFREE® reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. Poultry Science. 2019 Oct;98(10):5054–63.

286. Vaz CSL, Voss-Rech D, Alves L, Coldebella A, Brentano L, Trevisol IM. Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens. Veterinary Microbiology. 2020 Jan;240:108527.

287. Yang Y, Du H, Zou G, Song Z, Zhou Y, Li H, et al. Encapsulation and delivery of phage as a novel method for gut flora manipulation in situ: A review. Journal of Controlled Release. 2023 Jan;353:634–49.

288. Colom J, Cano-Sarabia M, Otero J, Cortés P, Maspoch D, Llagostera M. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. Pettinari MJ, editor. Appl Environ Microbiol. 2015 Jul 15;81(14):4841–9.

289. Boutilier RG, Gibson MA, Toews DP, Anderson W. Gas exchange and acid-base regulation in the blood and extraembryonic fluids of the developing chicken embryo. Respiration Physiology. 1977 Sep;31(1):81–9.

290. Ghunaim H, Abu-Madi MA, Kariyawasam S. Advances in vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli* respiratory disease: Potentials and limitations. Veterinary Microbiology. 2014 Aug;172(1–2):13–22.

291. Koutsianos D, Gantelet H, Franzo G, Lecoupeur M, Thibault E, Cecchinato M, et al. An assessment of the level of protection against colibacillosis conferred by several autogenous and/or commercial vaccination programs in conventional pullets upon experimental challenge. Veterinary Sciences. 2020 Jun 30;7(3):80.

292. Lozica L, Morteza Gholi CS, Kela A, Lošić I, Horvatek Tomić D, Gottstein Ž. Autogenous *Escherichia coli* vaccine application as an innovative antimicrobial therapy in poultry farming — a case report. Vaccines. 2022 Sep 19;10(9):1567.

293. Pirnay JP, De Vos D, Verbeken G, Merabishvili M, Chanishvili N, Vaneechoutte M, et al. The phage therapy paradigm: prêt-à-porter or sur-mesure? Pharm Res. 2011 Apr;28(4):934–7.

294. Maciejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application? Appl Microbiol Biotechnol. 2018 Mar;102(6):2563–81.

295. Lysando. Available from: www.lysando.com

Annexes

1. Communications dans des congrès

M. Nicolas, P. Menanteau, M. Girault, A. Faurie, T. Chaumeil, M. Riou, C. Schouler. Evaluation of a phage cocktail to prevent and control avian colibacillosis. Sixième symposium du réseau français PHAGE, Roscoff (France). Communication orale, 11 octobre 2021.

M. Nicolas, P. Menanteau, M. Girault, A. Faurie, T. Chaumeil, M. Riou, C. Schouler. Evaluation of a phage cocktail to prevent avian colibacillosis. Septième symposium du réseau français PHAGE, Paris (France). Poster, 12 octobre 2022.

M. Nicolas, P. Menanteau, M. Girault, A. Faurie, T. Chaumeil, M. Riou, C. Schouler. Evaluation of a phage cocktail to prevent avian colibacillosis. Viruses of Microbes conference, 2022, Guimarães (Portugal). Poster, 20 juillet 2022.

M. Nicolas. Evaluation of phage cocktails to prevent and control avian colibacillosis. PhD Day 2021, INRAE UMR 1282 ISP, Nouzilly (France). Communication orale, 17 septembre 2021.

M. Nicolas. Biocontrol of avian colibacillosis by bacteriophages. PhD Day 2020, INRAE UMR 1282 ISP, Nouzilly (France). Communication orale, 11 septembre 2020.

2. Communications auprès du public

Participation à la fête de la science 2020 : https://www.youtube.com/watch?v=8Hk5OnJCNl4&t=32s

Intervention en visioconférence dans des classes de 4ème et 3ème afin d'initier les élèves aux phages et aux métiers de la recherche.

3. Formations suivies

Expérimentation animale niveau concepteur (50h) : formation destinée aux personnes concevant et réalisant des procédures expérimentales sur porcs/oiseaux. Ecole nationale Oniris, juin 2021.

MOOC Rédiger et publier un article scientifique (20h) : cours en ligne destiné aux doctorants, décrivant les règles d'écritures et les étapes de publications. Novembre 2020.

MOOC Vaccinologie (18h) : cours en ligne sur les bases de la vaccinologie actuelle et les perspectives. Juin 2020.

Anglais (15h) : apprentissage niveau intermédiaire. Mars 2020.

Trouver l'information pertinente en sciences et techniques (6h) : formation sur les logiciels et les sites de bibliographie. Février 2020.

Marianne NICOLAS

Biocontrôle de la colibacillose aviaire par les bactériophages

Résumé

La colibacillose aviaire, principale maladie bactérienne des volailles et responsables d'importantes pertes économiques au sein de l'industrie avicole, est causée par certaines souches d'*Escherichia coli* nommées APEC pour avian pathogenic *E. coli*. Le traitement de cette pathologie repose essentiellement sur l'antibiothérapie, favorisant l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques. Par ailleurs, les vaccins disponibles sont peu efficaces pour protéger les troupeaux contre l'importante diversité génétique des souches circulantes. Ainsi, l'utilisation des bactériophages (phages) comme alternative médicamenteuse apparaît comme prometteuse. Ce travail propose d'évaluer le potentiel des phages en tant qu'agents de biocontrôle des APEC. La caractérisation morphologique et génétique d'une collection de 19 phages a permis d'observer leur distribution au sein de 9 genres taxonomiques, dont un nouveau créé à partir de l'un d'entre eux, le genre *Nouzillyvirus*. La collection de phages était active envers 67% d'un panel de souches APEC représentatives de leur diversité. L'efficacité des phages pour prévenir ou traiter la colibacillose chez les poussins d'une semaine a été évaluée en testant différentes combinaisons (cocktails) de phages et différents modes d'administration. L'impact des phages sur le développement de la pathologie, la charge intestinale de la souche APEC inoculée, la biodistribution des phages et le développement de résistance aux phages ont été déterminés. Un cocktail composé de 4 phages de 4 genres différents, inoculé au stade embryonnaire, présentent les résultats les plus encourageants. Bien que n'ayant pas réduit la mortalité des jeunes oiseaux, les phages ont permis d'empêcher l'apparition de l'infection chez les survivants et de réduire d'un log la charge intestinale de la souche APEC. Etonnamment, seuls deux des quatre phages étaient détectés dans les organes des poussins survivants. Des clones réisolés à partir des caeca ont développé une résistance aux phages, mais, de façon intéressante, certains d'entre eux présentaient une altération dans leur virulence. Ainsi, ce travail rapporte de nouvelles données sur la phagothérapie dans le biocontrôle de la colibacillose aviaire. Bien que prometteuse, l'application des phages nécessite encore des améliorations pour être totalement efficace.

Mots clés : Colibacillose, *Escherichia coli*, bactériophages, phagothérapie, *Gallus gallus*

Abstract

Avian colibacillosis, the main bacterial disease in poultry and responsible for major economic losses in the poultry industry, is caused by some specific strains of *Escherichia coli* named APEC for avian pathogenic *E. coli*. The treatment of this disease relies mainly on antibiotic therapy, leading to the emergence of multidrug-resistant strains. Furthermore, the available vaccines are not very effective to protect the flocks against the high genetic diversity of circulating strains. Thus, the use of bacteriophages (phages) as a drug alternative appears promising. The aim of this study was to evaluate the potential of phages as biocontrol agents of APEC. Morphological and genetic characterization of a collection of 19 phages revealed their distribution within 9 taxonomic genera, including a new one created from one of them, the genus *Nouzillyvirus*. The phage collection was active against 67% of a panel of APEC strains representative of their diversity. The efficacy of phages in preventing or treating colibacillosis in one-week-old chicks was assessed by testing different combinations (cocktails) of phages and different administration routes. The impact of phages on the development of the pathology, the intestinal load of the inoculated APEC strain, the biodistribution of phages and the development of phage resistance were determined. A cocktail of 4 phages from 4 different genera, inoculated at the embryonic stage, showed the most promising results. Although the phages administration did not reduce mortality of the young birds, they prevented the onset of infection in surviving chicks and reduced the intestinal load of the APEC strain by one log. Surprisingly, only two out of the four phages were detected in the organs of the surviving chicks. Clones re-isolated from the caeca have developed phage resistance, but interestingly, some of them showed an alteration in their virulence. Indeed, this work reports new data on phage therapy for the biocontrol of avian colibacillosis. Although promising, the application of phages still requires improvement to be fully effective.

Keywords: Colibacillosis, *Escherichia coli*, bacteriophages, phage therapy, *Gallus gallus*