



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**



**FACULTE DES SCIENCES  
PHARMACEUTIQUES ET  
BIOLOGIQUES DE LILLE**

**THESE  
POUR LE DIPLOME D'ETAT  
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 15 mars 2012  
Par M. MOAFO DJIABENG Christian**

---

***Titre :***

**TRAITEMENTS DES INFECTIONS PAR LES PHAGES**

---

**Membres du jury :**

**Président : Dr Christel NEUT**  
Maitre de conférences,  
Faculté de Pharmacie Lille II.

**Assesseur(s): Dr Anne GOFFARD**  
Maitre de conférences,  
Faculté de pharmacie Lille II

**Membre(s) extérieur(s) : TAKENNE Serge**  
Docteur en Pharmacie,  
Pharmacie des Trois Ponts à ROUBAIX.



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

## ***Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises  
dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

---



**Université Lille 2**  
**Droit et Santé**

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques  
et Biologiques de Lille**

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



**Université Lille 2 – Droit et Santé**

Président :

Professeur Christian SERGHERAERT

Vice- présidents :

Madame Stéphanie DAMAREY

Professeur Marie-Hélène FOSSE-GOMEZ

Professeur Régis MATRAN

Professeur Salem KACET

Professeur Paul FRIMAT

Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE

Professeur Patrick PELAYO

Madame Claire DAVAL

Madame Irène LAUTIER

Monsieur Larbi AIT-HENNANI

Monsieur Rémy PAMART

Secrétaire général :

Monsieur Pierre-Marie ROBERT

**Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques**

Doyen :

Professeur Luc DUBREUIL

Vice-Doyen, 1<sup>er</sup> assesseur :

Professeur Damien CUNY

Assesseurs :

Mme Nadine ROGER

Professeur Philippe CHAVATTE

Chef des services administratifs :

Monsieur André GENY

**Liste des Professeurs des Universités :**

| Civ. | NOM                | Prénom          | Laboratoire                         |
|------|--------------------|-----------------|-------------------------------------|
| M.   | ALIOUAT            | El Moukhtar     | Parasitologie                       |
| Mme  | AZAROUAL           | Nathalie        | Physique                            |
| M.   | BAILLEUL           | François        | Pharmacognosie                      |
| M.   | BERTHELOT          | Pascal          | Chimie Thérapeutique 1              |
| M.   | CAZIN              | Jean-Louis      | Pharmacologie – Pharmacie clinique  |
| M.   | CHAVATTE           | Philippe        | Chimie Thérapeutique                |
| M.   | COURTECUISE        | Régis           | Sciences végétales et fongiques     |
| M.   | CUNY               | Damien          | Sciences végétales et fongiques     |
| Mlle | DELBAERE           | Stéphanie       | Physique                            |
| M.   | DEPREZ             | Benoît          | Chimie Générale                     |
| Mme  | DEPREZ             | Rebecca         | Chimie Générale                     |
| M.   | DUPONT             | Frédéric        | Sciences végétales et fongiques     |
| M.   | DURIEZ             | Patrick         | Physiologie                         |
| M.   | GARÇON             | Guillaume       | Toxicologie                         |
| Mlle | GAYOT              | Anne            | Pharmacotechnie Industrielle        |
| M.   | GESQUIERE          | Jean-Claude     | Chimie Organique                    |
| M.   | GOOSSENS           | Jean François   | Chimie Analytique                   |
| Mme  | GRAS               | Hélène          | Chimie Thérapeutique 3              |
| M.   | LEMDANI            | Mohamed         | Biomathématiques                    |
| Mme  | LESTAVEL           | Sophie          | Biologie Cellulaire                 |
| M.   | LUC                | Gerald          | Physiologie                         |
| Mme  | MELNYK             | Patricia        | Chimie Générale                     |
| Mme  | MUHR – TAILLEUX    | Anne            | Biochimie                           |
| Mme  | PAUMELLE-LESTRELIN | Réjane          | Biologie Cellulaire                 |
| Mme  | PERROY – MAILLOLS  | Anne Catherine  | Droit et déontologie pharmaceutique |
| Mlle | ROMOND             | Marie Bénédicte | Bactériologie                       |
| Mme  | SAHPAZ             | Sevser          | Pharmacognosie                      |
| M.   | SIEPMANN           | Juergen         | Pharmacotechnie Industrielle        |
| M.   | STAELS             | Bart            | Biologie Cellulaire                 |
| M    | TARTAR             | André           | Chimie Organique                    |
| M.   | VACCHER            | Claude          | Chimie Analytique                   |
| M.   | VION               | Daniel          | Droit et déontologie pharmaceutique |

**Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers**

| Civ. | NOM        | Prénom  | Laboratoire                          |
|------|------------|---------|--------------------------------------|
| M.   | BROUSSEAU  | Thierry | Biochimie                            |
| M    | BRUNET     | Claude  | Pharmacologie                        |
| Mme  | CAPRON     | Monique | Immunologie                          |
| M.   | DINE       | Thierry | Pharmacie clinique                   |
| M.   | DUBREUIL   | Luc     | Bactériologie et Virologie Cliniques |
| M.   | DUTHILLEUL | Patrick | Hématologie                          |
| M.   | GAMOT      | André   | Chimie Analytique                    |
| M.   | GRESSIER   | Bernard | Pharmacologie                        |
| M.   | LHERMITTE  | Michel  | Toxicologie                          |
| M.   | LUYCKX     | Michel  | Pharmacie clinique                   |
| M.   | ODOU       | Pascal  | Pharmacie Galénique                  |

|    |         |         |                          |
|----|---------|---------|--------------------------|
| M. | DEPREUX | Patrick | Chimie Organique (ICPAL) |
|----|---------|---------|--------------------------|

M. BONTE Jean-Paul Chimie Analytique et (ICPAL)

**Liste des Maitres de Conférences**

| Civ.  | NOM           | Prénom           | Laboratoire                     |
|-------|---------------|------------------|---------------------------------|
| Mme   | AGOURIDAS     | Laurence         | Chimie Générale                 |
| Mme   | ALIOUAT       | Cécile Marie     | Parasitologie                   |
| Mme   | AUMERCIER     | Pierrette        | Biochimie                       |
| Mme   | BANTUBUNGI    | Kadiombo         | Biologie cellulaire             |
| Mme   | BARTHELEMY    | Christine        | Pharmacie Galénique             |
| M.    | BEGHYN        | Terence          | Chimie Thérapeutique 3          |
| Mme   | BEHRA         | Josette          | Bactériologie                   |
| M.    | BERTHET       | Jérôme           | Physique                        |
| M.    | BERTIN        | Benjamin         | Immunologie                     |
| M.    | BLANCHEMAIN   | Nicolas          | Pharmacotechnie industrielle    |
| M.    | BOCHU         | Christophe       | Physique                        |
| M.    | BOUTILLON     | Christophe       | Chimie Organique                |
| M.    | BRIAND        | Olivier          | Biochimie                       |
| Mme   | CACHERA       | Claude           | Biochimie                       |
| M.    | CARATO        | Pascal           | Chimie Thérapeutique 2          |
| M.    | CARNOY        | Christophe       | Immunologie                     |
| Mme   | CARON         | Sandrine         | Biologie cellulaire             |
| Mlle  | CHABÉ         | Magali           | Parasitologie                   |
| Mlle  | CHARTON       | Julie            | Chimie Organique                |
| M     | CHEVALIER     | Dany             | Toxicologie                     |
| M.    | COCHELARD     | Dominique        | Biomathématiques                |
| Mlle  | DANEL         | Cécile           | Chimie Analytique               |
| Mme   | DEMANCHE      | Christine        | Parasitologie                   |
| Mlle  | DEMARQUILLY   | Catherine        | Biomathématiques                |
| Melle | DUMONT        | Julie            | Biologie cellulaire             |
| M.    | FARCE         | Amaury           | Chimie Thérapeutique 2          |
| Mlle  | FLAMENT       | Marie-Pierre     | Pharmacotechnie Industrielle    |
| Mlle  | FLIPO         | Marion           | Chimie Organique                |
| Mme   | FOULON        | Catherine        | Chimie Analytique               |
| Melle | GARAT         | Anne             | Toxicologie                     |
| M.    | GELEZ         | Philippe         | Biomathématiques                |
| M.    | GERVOIS       | Philippe         | Biochimie                       |
| Mme   | GOFFARD       | Anne             | Virologie                       |
| Mme   | GRAVE         | Béatrice         | Toxicologie                     |
| Mme   | GROSS         | Barbara          | Biochimie                       |
| Mme   | HANNOTHIAUX   | Marie-Hélène     | Toxicologie                     |
| Mme   | HELLEBOID     | Audrey           | Physiologie                     |
| M.    | HENNEBELLE    | Thierry          | Pharmacognosie                  |
| M.    | HERMANN       | Emmanuel         | Immunologie                     |
| M.    | KAMBIA        | Kpakpaga Nicolas | Pharmacologie                   |
| M.    | KARROUT       | Youness          | Pharmacotechnie Industrielle    |
| Mlle  | LALLOYER      | Fanny            | Biochimie                       |
| M.    | LEBEGUE       | Nicolas          | Chimie thérapeutique 1          |
| Mme   | LIPKA         | Emmanuelle       | Chimie Analytique               |
| Mme   | LORIN-LECOEUR | Marie            | Chimie Analytique               |
| Mme   | MARTIN        | Françoise        | Physiologie                     |
| M.    | MOREAU        | Pierre Arthur    | Sciences végétales et fongiques |
| Melle | MUSCHERT      | Susanne          | Pharmacotechnie industrielle    |

|       |             |           |                                     |
|-------|-------------|-----------|-------------------------------------|
| Mme   | NEUT        | Christel  | Bactériologie                       |
| Mme   | PINÇON      | Claire    | Biomathématiques                    |
| M.    | PIVA        | Frank     | Pharmacie Galénique                 |
| Mme   | POMMERY     | Nicole    | Toxicologie                         |
| M.    | RAVAUX      | Pierre    | Biomathématiques                    |
| Melle | RIVIERE     | Céline    | Pharmacognosie                      |
| Mme   | ROGER       | Nadine    | Immunologie                         |
| M.    | ROUMY       | Vincent   | Pharmacognosie                      |
| M.    | SERGHERAERT | Eric      | Droit et déontologie pharmaceutique |
| Mme   | SIEPMANN    | Florence  | Pharmacotechnie Industrielle        |
| Mlle  | SINGER      | Elisabeth | Bactériologie                       |
| M.    | TAGZIRT     | Madjid    | Hématologie                         |
| Mme   | THUILLIER   | Pascale   | Hématologie                         |
| Mme   | VANHOUTTE   | Geneviève | Biochimie                           |
| Mme   | VITSE       | Annie     | Parasitologie                       |
| M.    | WILLAND     | Nicolas   | Chimie organique                    |
| M.    | YOUS        | Saïd      | Chimie Thérapeutique 1              |

|     |          |            |                              |
|-----|----------|------------|------------------------------|
| M.  | FURMAN   | Christophe | Pharmacobiochimie (ICPAL)    |
| Mme | GOOSSENS | Laurence   | Chimie Organique (ICPAL)     |
| M.  | MILLET   | Régis      | Chimie Thérapeutique (ICPAL) |

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

| Civ. | NOM      | Prénom          | Laboratoire        |
|------|----------|-----------------|--------------------|
| Mme  | ALLORGE  | Delphine        | Toxicologie        |
| Mme  | BALDUYCK | Malika          | Biochimie          |
| M.   | DECAUDIN | Bertrand        | Pharmacie Clinique |
| Mme  | ODOU     | Marie Françoise | Bactériologie      |

### Professeurs Agrégés

| Civ. | NOM        | Prénom  | Laboratoire                         |
|------|------------|---------|-------------------------------------|
| Mme  | MAYES      | Martine | Anglais                             |
| M.   | MORGENROTH | Thomas  | Droit et déontologie pharmaceutique |

### Professeurs Certifiés

| Civ. | NOM      | Prénom    | Laboratoire |
|------|----------|-----------|-------------|
| M.   | HUGES    | Dominique | Anglais     |
| Mlle | FAUQUANT | Soline    | Anglais     |
| M.   | OSTYN    | Gaël      | Anglais     |

### Professeurs Associé - mi-temps

| Civ. | NOM    | Prénom | Laboratoire                         |
|------|--------|--------|-------------------------------------|
| M.   | ABADIE | Eric   | Droit et déontologie pharmaceutique |

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

| Civ. | NOM | Prénom | Laboratoire |
|------|-----|--------|-------------|
|------|-----|--------|-------------|

|     |          |           |                                         |
|-----|----------|-----------|-----------------------------------------|
| Mme | BERTOUX  | Elisabeth | Pharmacie Clinique - Biomathématiques   |
| M.  | CREN     | Yves      | Information Médicale - Biomathématiques |
| M.  | FIEVET   | Pierre    | Information Médicale                    |
| M.  | FRIMAT   | Bruno     | Pharmacie Clinique                      |
| M.  | MASCAUT  | Daniel    | Pharmacie Clinique                      |
| M.  | WATRELOS | Michel    | Droit et déontologie pharmaceutique     |
| M.  | ZANETTI  | Sébastien | Biomathématiques - Pharmacie virtuelle  |

**AHU**

| Civ. | NOM    | Prénom  | Laboratoire         |
|------|--------|---------|---------------------|
| M.   | LANNOY | Damien  | Pharmacie Galénique |
| M.   | SIMON  | Nicolas | Pharmacie Galénique |

# SOMMAIRE

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| DEDICACES .....                                     | 8  |
| REMERCIEMENTS .....                                 | 8  |
| HISTORIQUE.....                                     | 9  |
| INTRODUCTION .....                                  | 10 |
| A. GENERALITES SUR LES PHAGES .....                 | 11 |
| I. COMPOSITION ET STRUCTURE .....                   | 11 |
| II. LES ETAPES DE L'INFECTION.....                  | 13 |
| III. CYCLE DE MULTIPLICATION DES PHAGES .....       | 14 |
| B. ESSAIS DE TRAITEMENT PAR LES BACTERIOPHAGES..... | 19 |
| I. INFECTIONS DU TUBE DUGESTIF .....                | 19 |
| II. INFECTIONS ORL.....                             | 43 |
| SYNTHESE .....                                      | 88 |
| CONCLUSION.....                                     | 90 |
| BIBLIOGRAPHIE .....                                 | 91 |

## **DEDICACES**

*Je dédie cet évènement marquant de ma vie à la mémoire de ma sœur disparue trop tôt. J'espère que du monde qui est sien maintenant elle apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un frère qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant l'avoir en sa sainte miséricorde !*

*J'ai aussi une pensée particulière pour tous les miens qui sont partis très tôt; je citerai mes grands-parents, ma tante (Djiabeng), mon oncle (Martin), maman marguerite, papa Sonkwa. Qu'ils reposent en paix,*

*Cette thèse représente l'aboutissement du soutien et des encouragements que mes parents (MOAFO et YOTTA) ont prodigués tout au long de ma scolarité.*

## **REMERCIEMENTS**

J'exprime mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, le professeur NEUT Christel pour l'aide compétente qu'elle m'a apportée pour sa patience et son encouragement à finir un travail commencé il y'a longtemps. Son œil critique m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections.

Je remercie ma famille Guillaume, Blaise, Prince, Marlyse, Oscar, Edmond, Clarisse, Cédric, Christelle et tous mes neveux pour l'amour qu'ils portent à quelqu'un qui travaille souvent tard le soir.

J'exprime aussi ma gratitude à l'équipe de la pharmacie Montebello, la pharmacie des Trois ponts qui pendant mes années d'études ont été à mes côtés. Je tiens plus particulièrement à remercier Mr Régis BARDYN.

L'aboutissement de cette thèse a aussi été encouragé par de nombreuses discussions avec des amis et collègues de disciplines variées. Je ne citerai pas de noms ici, pour ne pas en oublier certains.

D'autres personnes m'ont encouragé à finir ce travail par des gestes d'amitié dont je suis reconnaissant. A titre d'exemple, je citerai Mlle KAMDEM Yolande, M. LONTOUO Thierry, TAKENNE Olivier, AHADJI Thierry ou encore Achille COUBEL qui a parié quelques bouteilles de champagne sur ma réussite.

Je ne manquerai pas non plus de dire un grand merci aux membres du jury qui ont accepté sans réserve aucune d'évaluer cette thèse à sa juste valeur et de me faire part de leurs remarques sûrement pertinentes qui avec un peu de recul contribueront sans nul doute au perfectionnement du présent travail

Enfin une pensée pour mon fils et sa tendre mère Diane.

## ***HISTORIQUE***

Au début du XXème siècle, il y avait peu de médicaments capables de combattre les infections bactériennes qui faisaient alors de très nombreuses victimes. C'est pourquoi on peut comprendre que la phagothérapie ait connu un retentissement mondial avant la découverte des antibiotiques(1). Son histoire s'étend essentiellement sur deux décennies entre les deux Grandes Guerres mondiales. Félix d'Hérèle,

convaincu que le phénomène bactériolytique qu'il observait *in vitro* était provoqué par un virus de bactérie, pressentit son rôle dans la guérison des maladies bactériennes. Il en fit la démonstration chez l'animal et l'homme en 1919(2). Mais bien que ce traitement eût un rapide retentissement mondial, de vives controverses se développèrent. La nature virale et l'efficacité réelle furent combattues. Dans les années 40, le doute sur la valeur réelle de la phagothérapie était répandu. La pénicilline découverte, l'exploration d'éventuelles extensions ou améliorations de la phagothérapie n'était plus d'actualité. Le rapide développement de l'antibiothérapie pendant les décennies qui suivirent laissait penser que toutes les infections bactériennes pourraient être maîtrisées. La phagothérapie connu un déclin puis fut pratiquement abandonnée dans les pays occidentaux.

Les résistances acquises des bactéries aux antibiotiques décrites peu après l'introduction de la pénicilline, se sont rapidement répandues. Chaque nouveau produit a été suivi de la mise en évidence d'un mécanisme d'inactivation de celui-ci. Il n'existe pratiquement plus d'antibiotique sans qu'un ou plusieurs mécanismes soient capables de le mettre en échec(3). De plus, aujourd'hui, pour diverses raisons, le développement de nouvelles molécules est quasi inexistant à tel point que certains n'hésitent pas à évoquer la fin d'une période et annoncent une ère post-antibiotique.

## ***INTRODUCTION***

Les bactériophages sont des parasites intracellulaires obligatoires qui se multiplient à l'intérieur des bactéries en faisant usage de tout ou d'une partie de la machinerie de biosynthèse de l'hôte (par exemple des virus qui infectent les bactéries.). Il y a beaucoup de similitudes entre bactériophages et virus de cellules animales. Ainsi, les bactériophages peuvent être considérés comme des systèmes modèles pour les virus de cellules animales. En outre, une connaissance du cycle de vie du bactériophage est nécessaire pour comprendre les mécanismes par lesquels les

gènes bactériens peuvent être transférés d'une bactérie à une autre. À une époque, on pensait que l'utilisation des bactériophages pourrait être un moyen efficace pour traiter les infections bactériennes, mais il est vite devenu évident que les phages sont rapidement éliminés de l'organisme et donc, ont été d'une valeur clinique minime. Toutefois, les bactériophages sont utilisés dans les laboratoires de diagnostic pour l'identification des bactéries pathogènes (lysotypie). Bien qu'elle ne soit pas utilisée dans les laboratoires cliniques de routine, elle est utilisée dans les laboratoires de référence à des fins épidémiologiques. Récemment, un nouvel intérêt s'est développé dans l'utilisation possible des bactériophages pour le traitement des infections bactériennes et de prophylaxie.

## **A. GENERALITES SUR LES PHAGES**

### **I. COMPOSITION ET STRUCTURE**

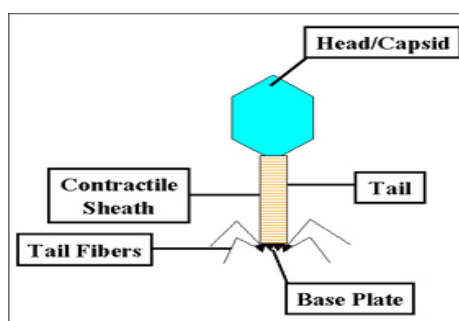
#### **1. COMPOSITION**

Bien que les bactériophages différents puissent contenir différents matériaux et qu'ils contiennent tous des acides nucléiques et des protéines. Selon le phage, l'acide nucléique peut être de l'ADN ou l'ARN mais pas les deux et il peut exister sous

diverses formes. Les acides nucléiques des phages contiennent souvent des bases inhabituelles ou modifiées. Ces bases modifiées permettent de protéger les acides nucléiques des nucléases qui les dégradent durant l'infection phagique. La taille de l'acide nucléique varie selon le phage. Le nombre et la quantité de chaque types de protéines dans la particule de phage va varier en fonction du phage. Les phages plus simples ont de nombreuses copies d'un seul ou de deux protéines différentes alors que les phages plus complexes peuvent avoir beaucoup de copies de protéines différentes.

## 2. STRUCTURE

Les bactériophages sont de tailles et de formes différentes. Les caractéristiques structurelles de base de bactériophages sont illustrés dans la *Figure 1*, qui représente le phage appelé T4.



**Figure 1:** Structure du bactériophage T4(30).

Le T4 est parmi les plus grands phages, il mesure environ 200 nm de long et 80 à 200 nm de large. Les autres phages sont plus petits et leurs tailles varient entre 24 et 200 nm de longueur. Tous les phages contiennent une tête qui peut varier en taille et en forme. Certains sont icosaédriques et d'autres filamenteux. La tête ou capsidie contient de nombreuses copies d'une ou de plusieurs protéines différentes. A l'intérieure de cette tête se trouve les acides nucléiques. La majorité des phages contiennent une queue (pas tous). C'est un tube creux à travers lequel les acides nucléiques passent lors de l'infection. La taille de la queue peut varier d'un phage à l'autre. Dans les phages T4 qui sont plus complexes, la queue est entourée par une gaine contractile qui se contracte lors de l'infection. A la base du phage T4, on a une

plaque avec des fibres de queue qui sont impliquées dans la liaison du phage avec les cellules bactériennes.

## **II. LES ETAPES DE L'INFECTION**

### **1. L'ADSORPTION**

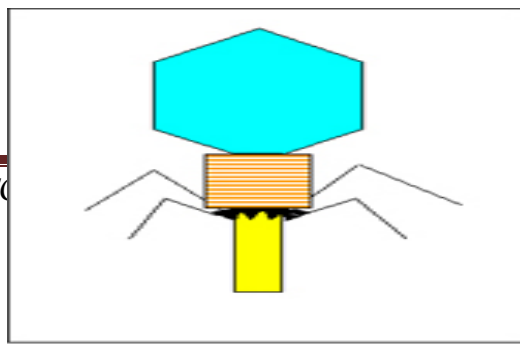
La première étape dans le processus d'infection est l'adsorption du phage à la cellule bactérienne. Cette étape est médiée par les fibres de queue ou d'une structure analogue (pour les phages qui manquent de fibres de queue). Les fibres de queue se lient à des récepteurs spécifiques sur la cellule bactérienne et la spécificité d'hôte du phage (c'est à dire les bactéries qu'il est capable d'infecter) est généralement déterminée par le type de fibres de queue. La nature du récepteur bactérien varie pour différentes bactéries. Les exemples incluent les protéines sur la surface externe de la bactérie, le LPS et des lipoprotéines. Ces récepteurs sont sur les bactéries à d'autres fins et les phages ont évolué pour utiliser ces récepteurs pour l'infection.

### **2. FIXATION IRREVERSIBLE**

L'attachement du phage à la bactérie via les fibres de queue est faible et réversible. La liaison irréversible du phage à une bactérie est médiée par une ou plusieurs des composants de la plaque de base. Les phages manquant de plaques de base ont d'autres façons de devenir étroitement liée à la cellule bactérienne.

### **3. CONTAGION**

La liaison irréversible du phage aux bactéries résulte de la contraction de la gaine



(pour ceux qui ont une gaine) et la fibre queue creuse est poussé à travers l'enveloppe bactérienne (*figure 2*). Les phages qui n'ont pas de gaines contractiles utilisent d'autres mécanismes pour envoyer les particules de phage à travers l'enveloppe bactérienne. Ils ont des enzymes qui digèrent les composants de l'enveloppe bactérienne.

**Figure 2** : Contraction de de la gaine du bactériophage T4(30).

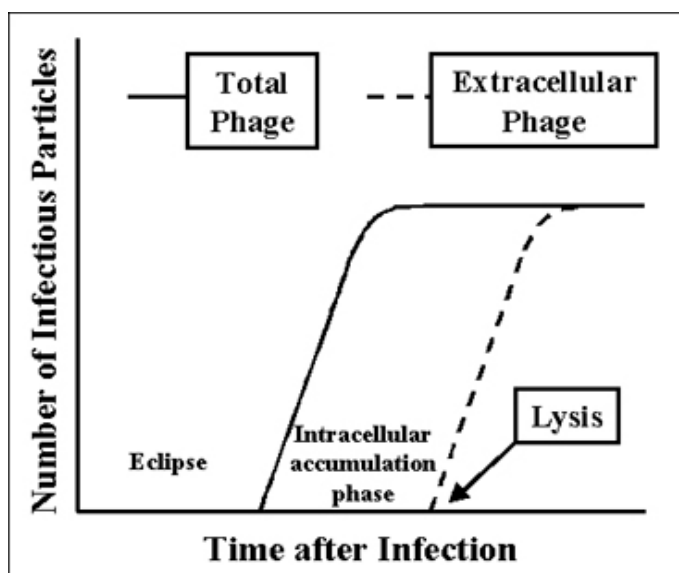
#### **4. INJECTION DE L'ACIDE NUCLEIQUE**

Lorsque le phage a réussi à traverser l'enveloppe bactérienne, l'acide nucléique passe à travers la queue creuse et pénètre dans la cellule bactérienne. Habituellement, seul l'acide nucléique pénètre dans la cellule bactérienne. Le reste du phage reste à l'extérieur de la bactérie. Il y a quelques exceptions à cette règle. Ceci est différent chez de cellules animales dans lesquelles la particule virale entre habituellement dans la cellule. Cette différence est sûrement due à l'incapacité de la cellule à engloutir le phage.

### **III. CYCLE DE MULTIPLICATION DES PHAGES**

#### **1. LES PHAGES VIRULENTS OU LYTHIQUES**

Les Phages lytiques ou virulents sont des phages qui ne peuvent se multiplier que sur les bactéries et les tuent par lyse. Le cycle de vie d'un phage lytique est illustré dans la *Figure 3*.



**Figure 3:** Cycle de vie d'un phage lytique.(30)

### **1.1. PERIODE D'ECLIPSE**

Pendant la phase de l'éclipse, les particules du phage infectieux peuvent se trouver à l'intérieur ou l'extérieur de la cellule bactérienne. L'acide nucléique du phage prend le contrôle de biosynthèse de l'ARN-m et des protéines. Au début l'ARN-m code pour des protéines précoces qui sont nécessaires à la synthèse de l'ADN des phages et de destruction de l'ADN de la cellule hôte. Les protéines tardives sont les protéines structurales qui composent le phage et sont nécessaires à la lyse de la cellule bactérienne.

### **1.2. PHASE D'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE**

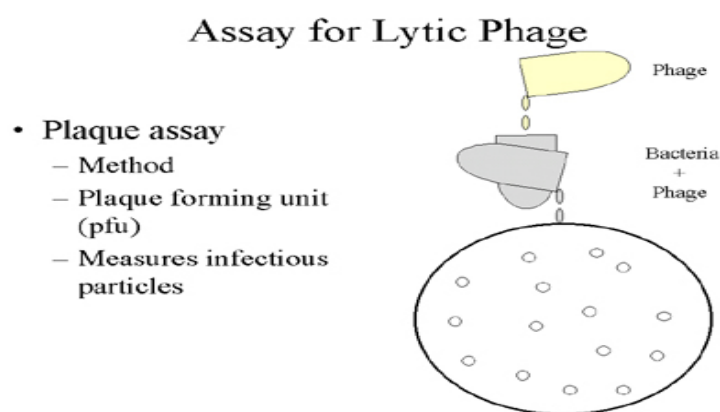
Dans cette phase, l'acide nucléique et les protéines de structure qui ont été synthétisés sont assemblés et s'accumulent dans la cellule avec les particules du phage.

### **1.3. LYSE**

Après un moment les bactéries commencent à lyser. (Ceci est dû à l'accumulation des

protéines de structure et des acides nucléiques). On a une libération d'un nombre très élevé de particules d'acides nucléiques dans le milieu intracellulaire.

Les phages lytiques sont énumérés par un dosage de la plaque. Une plaque est une zone claire qui résulte de la lyse des bactéries (*figure 4*). Chaque plaque se forme à partir d'un phage infectieux unique. La particule infectieuse qui donne lieu à une plaque est appelé un PFU (unité de formation des plaques).



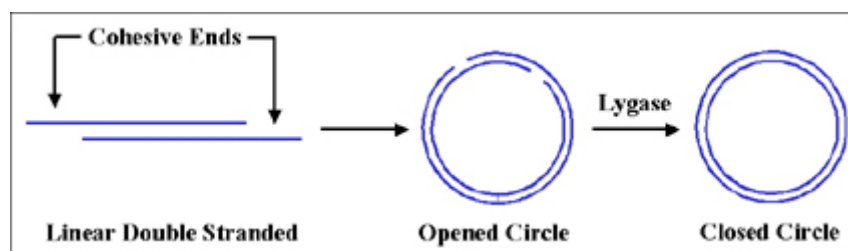
**Figure 4:** *Essai pour les phages lytiques (30)*

## **2. LES PHAGES LYSOGENES OU TEMPEREES**

Les Phages lysogènes ou tempérés sont des phages qui peuvent soit se multiplier à travers un cycle lytique, soit entrer dans un état quiescent dans la cellule. Dans cet état de repos la plupart des gènes du phage ne sont pas transcrits. L'ADN des phages dans cet état réprimé est appelé prophage parce qu'il n'est pas un phage, mais il a le potentiel pour produire des phages. Dans la plupart des cas, l'ADN du phage s'intègre réellement dans le chromosome de l'hôte et est répliqué avec le chromosome de l'hôte et transmis aux cellules filles. La cellule hébergeant un prophage n'est pas affectée par sa présence et l'état lysogène peut persister indéfiniment. La cellule hébergeant un prophage est appelé un lysogène.(4). Le phage Lambda est un prototype.

## 2.1. CIRCULATION DU PHAGE LAMBDA

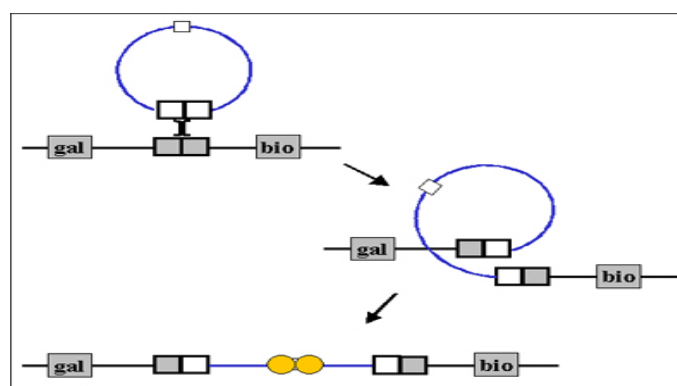
L'ADN du phage Lambda est une molécule à double brins linéaires avec de petites régions simples bloquées à l'extrémité 5'. Ces extrémités simple brin sont complémentaires (extrémités cohésives) afin qu'ils puissent produire une molécule circulaire. Dans la cellule, les extrémités libres du cercle peut être ligaturé pour former un cercle fermé de façon covalente comme illustré dans la *figure 5*.



**Figure 5:** Circulation du chromosome phagiques, extrémités cohésives. (30)

## 2.2. PHASE DE RECOMBINAISON SPECIFIQUE

Une recombinaison catalysée par une enzyme se produit entre un site particulier sur l'ADN des phages circulaires et un site particulier sur le chromosome hôte. Le résultat est l'intégration de l'ADN du phage dans le chromosome hôte, comme illustré dans la *figure 6*.



**Figure 6:** *Recombinaison spécifique du site(30).*

### **2.3. REPRESSION DU GENOME DES PHAGES**

Une protéine appelé répresseur se lie à un site particulier sur l'ADN des phages, appelé l'opérateur, et couple la transcription des gènes des phages sauf le gène répresseur. Le résultat est un génome du phage stable réprimé qui est intégré dans le chromosome hôte. Chaque phage tempéré ne réprime que son propre ADN et non pas celui d'un autre phage de sorte que la répression est très spécifique (immunité à une surinfection avec le phage même).

### **2.4. MECANISMES D'INDUCTION DE LA FIN DE LA LYSOGENIE**

Chaque fois qu'une bactérie lysogène est exposée à des conditions défavorables, l'état lysogène peut être résilié. Ce processus est appelé induction. Les Conditions qui favorisent la fin de l'état lysogène incluent: le dessèchement, l'exposition aux rayonnements UV ou ionisants, l'exposition aux produits chimiques mutagènes, et ces conditions défavorables conduisent à la production de protéases qui détruisent le répresseur.

## **3. CYCLES LYTHIQUES OU LYSOGENIQUES**

La capacité du phage lambda d'entrer dans le cycle lytique ou lysogénique quand il entre dans une cellule est déterminée par la concentration du répresseur et une autre protéine de phage appelé CRO. La protéine CRO inhibe la synthèse du répresseur et empêche ainsi la création de la lysogénie. Les conditions qui favorisent la production de CRO mèneront au cycle lytique, tandis que ceux qui favorisent la production du répresseur favoriseront la lysogénie. (4)

## **B. ESSAIS DE TRAITEMENT PAR LES BACTERIOPHAGES**

### **I. INFECTIONS DU TUBE DUGESTIF**

#### **1. ESCHERICHIA COLI**

##### **1.1. GENERALITES**

*E.coli* est un bacille gram négatif radio résistant de la famille des Enterobacteriaceae C'est un hôte commun de la microflore commensale intestinale de l'Homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). Son entrée dans le tractus digestif s'effectue durant les premières heures ou journées qui suivent l'accouchement. *E.coli* constitue alors tout au long de la vie l'espèce bactérienne dominante de la flore aérobie intestinale. Il est sans doute l'organisme vivant le plus étudié à ce jour. L'ancienneté de sa découverte et sa culture facile (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37°C dans un milieu riche) en font un outil d'étude de choix. Les connaissances sur les mécanismes physiopathologies des infections à *E.coli* ont mis en lumière la très grande diversité des facteurs de virulence de cette espèce. Certaines souches sont virulentes et sont capables de déclencher spécifiquement chez l'homme des infections spontanées du tube digestif, certaines souches par ailleurs appartiennent à la flore commensale et peuvent être responsables d'infections opportunistes variées surtout chez les sujets aux défenses immunitaires affaiblies. Les diarrhées infectieuses sont causées par des souches virulentes qui sont absorbées par voie buccale avec de l'eau et des aliments contaminés. Ces bactéries colonisent la muqueuse digestive et entraînent la diarrhée selon plusieurs mécanismes. Certaines souches spécialisées d'*E.coli* sont associées à des pathologies très diverses tant chez l'être humain, que chez l'animal (diarrhées, gastro-entérites, infections urinaires,

méningites, septicémies). Les techniques modernes de biochimie, de génétique, de biologie moléculaire et de microbiologie cellulaire ont permis d'identifier et d'analyser les mécanismes impliqués dans l'interaction des *E.coli* pathogènes avec leur hôte. Malgré la diversité des affections provoquées par les souches d'*E.coli* pathogènes, toutes ces souches utilisent une stratégie classique d'infection, commune à de nombreux autres agents pathogènes. Comme la plupart des pathogènes des muqueuses, les souches d'*E.coli* responsables de diarrhées et d'infections extra-intestinales utilisent une stratégie d'infection dont les points clés sont les suivants: colonisation des muqueuses et éventuellement invasion des cellules, multiplication, évation des défenses de l'hôte et dommages à l'hôte.(5)

Pour survivre et se multiplier dans le tractus intestinal, les bacilles doivent surmonter les premières lignes de défense de l'organisme hôte, à savoir le péristaltisme et l'effet de barrière de la microflore commensale. L'effet de barrière est surmonté par les *E.coli* pathogènes grâce à des mécanismes qui sont connus de façon générales: la compétition pour les sources de carbone, de fer, d'énergie sous des conditions anaérobies, la production de bactériocines, ainsi qu'un fort taux de croissance. L'étape de colonisation implique aussi la capacité à adhérer à la surface de la muqueuse intestinale. Virtuellement toutes les souches d'entérobactéries pathogènes ou non possèdent des systèmes d'adhésion et il est bien établi que ce pouvoir d'adhésion est la caractéristique la plus conservée chez les *E.coli* pathogènes. Les structures bactériennes responsables de l'adhésion aux cellules épithéliales sont des adhésines (fimbriaires ou afimbriaires). Exposées à la surface des bactéries, ces adhésines interagissent avec des récepteurs de la membrane des cellules cibles. C'est ainsi que des souches d'*E.coli* pathogènes sont capables de coloniser des biotopes qui ne sont normalement pas ou peu colonisés par les *E.coli* commensales. La multiplication est essentielle dans le processus de pathogénicité et on conçoit en effet qu'une multiplication rapide est un avantage pour la colonisation, ainsi que pour causer des dommages avant que le système immunitaire n'entre en action. Une multiplication lente, voire son arrêt, peut aussi constituer un avantage dans la

persistance des pathogènes qui causent des maladies chroniques. (5)

## **1.2. LES DIFFERENTS PATHOVARS**

### **❖ E.COLI ENTEROTOXIGENIQUE (ETEC)**

Les ETEC sont une cause majeure de diarrhées aqueuses aiguës avec déshydratation chez les enfants de bas âge (moins de 3 ans) dans les pays en voie de développement et sont aussi responsables de la «diarrhée des voyageurs». Ils sont également une cause fréquente de diarrhées néonatales souvent fatales chez les animaux d'élevage (veau, mouton, porcelet). Ils colonisent essentiellement la partie proximale de l'intestin grêle, grâce à leurs facteurs de colonisation (adhésines). Ils n'induisent pas d'altérations histologiques marquées de la muqueuse. Le pouvoir pathogène s'explique principalement par la sécrétion des toxines thermostables et thermolabiles. Cette toxine, après endocytose, est activée par l'adénylate cyclase, il s'en suit une augmentation de la concentration de l'AMPc, et la phosphorylation des transporteurs membranaires, Cette action se traduit par une sécrétion d'ions chlorure et une inhibition de l'absorption de chlorure de sodium par les cellules intestinales, ce qui provoque une diffusion osmotique d'eau vers la lumière intestinal. En se fixant sur leurs récepteurs présents à la surface des cellules intestinales (une guanylate cyclase), elles induisent des concentrations accrues en GMPc, ce qui entraîne une activation des transporteurs membranaires, une altération de l'homéostasie intestinale, et une diarrhée osmotique. Ainsi, c'est l'action des toxines qui explique le tableau clinique de l'infection (diarrhée aqueuse peu fébrile, nausées et crampes abdominales). (6)

### **❖ E.COLI DES GASTRO-ENTERITES INFANTILES (EPEC)**

Ils sont capables de causer un syndrome latéritique grave avec toxicose et déshydratation chez les jeunes enfants. On admet généralement que ces colibacilles

ne sont pathogènes qu'en dessous de l'âge de 2 ans mais c'est surtout chez les nouveau-nés et plus particulièrement chez les prématurés que ces germes se manifestent de la façon la plus sévère. L'allaitement maternel confère une certaine protection contre ces infections. Dans les collectivités de nourrissons (maternités, services pédiatriques), la maladie prend généralement une allure épidémique, il s'agit dans ces cas de souches à la fois virulentes et multi résistantes réalisant le tableau d'une véritable infection nosocomiale. (6)

### ❖ E.COLI ENTEROINVASIVES (EIEC)

Les EIEC sont responsables des syndromes dysentériques caractérisés par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse qui évolue rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Ils ont des caractères biochimiques, antigéniques, génétiques et fonctionnels très proches de ceux des *shigella*, et mettent en œuvre un mécanisme de pathogénicité similaire. Elles envahissent la muqueuse intestinale au niveau du côlon, s'y multiplient, provoquent la mort cellulaire et déclenchent une intense réaction inflammatoire. En ce qui concerne *Shigella*, le processus d'invasion peut être résumé ainsi: lors du contact avec les cellules épithéliales, les bactéries sécrètent des invasines, qui interagissent avec la surface cellulaire et provoquent un réarrangement localisé du cytosquelette aboutissant à la pénétration de la bactérie dans la cellule. Une fois en position intracellulaire, la membrane de la vacuole est rapidement lysée grâce à une hémolysine de contact, libérant les bactéries dans le cytoplasme où elles peuvent se multiplier. Puis, les bactéries induisent la polymérisation de l'actine cellulaire à un de leur pôle pour se disséminer de cellule en cellule. Le processus d'invasion mis en jeu par les EIEC reste à être élucidé, mais les données actuelles indiquent qu'il est probablement identique à celui de *Shigella*. Les EIEC et les *Shigella* élaborent également une ou plusieurs entérotoxines qui seraient impliquées dans la diarrhée aqueuse qui précède la dysenterie. (6)

❖ **E.COLI ENTEROHEMORRAGIQUES (EHEC)**

Les EHEC sont responsables de colites hémorragiques. Le principal réservoir de ces bactéries est le tube digestif des bovins. La contamination humaine se fait par l'intermédiaire d'aliments, principalement la viande de bœuf hachée et le lait cru. Le sérotype O157 H7 est le plus fréquent. Ils produisent une vérotoxine (ou Shiga-toxine) qui peut entraîner un syndrome hémolytique et urémique (SHU). Les épidémies à EHEC se sont déclarées suite à l'ingestion de viande contaminée et insuffisamment cuite (hamburger). La vérotoxine est à l'origine de la destruction des cellules intestinales. Les symptômes peuvent aller de la diarrhée simple à une diarrhée sanglante et abondante. Les manifestations sont plus graves chez les enfants de moins de 8 ans et chez les personnes de plus de 65 ans. Le syndrome hémolytique et urémique (SHU) se manifeste entre autres par une anémie hémolytique, une thrombopénie et une insuffisance rénale aiguë.

❖ **E.COLI ENTEROAGGREGATIVES (EAggEC)**

Au début des années 1980, il a été constaté que la plupart des souches classées dans les EPEC adhèrent sur des cellules de lignée. Par la suite, trois modes distincts d'adhésion aux cellules ont été décrits: l'adhésion «localisée», l'adhésion «diffuse», et l'adhésion «agrégative», ce qui a permis de différencier un nouveau groupe d'*E.coli*, les EAggEC. Ils sont actuellement définis comme des souches qui ne sécrètent pas d'entérotoxines et qui adhèrent aux cellules en formant des images comme des amas de briques. Il est probable que cette définition inclut des souches non pathogènes. L'hétérogénéité de ce groupe a d'ailleurs été confirmée par des études épidémiologiques et des infections expérimentales d'adultes volontaires. Néanmoins, ils sont de plus en plus reconnus comme étant responsables de retards de croissance et de diarrhées persistantes dans les pays en voie de développement ainsi que dans les pays industrialisés. Des fimbrines responsables de l'adhésion agrégative ont été décrites, mais ils sont présents dans une minorité d'isolats d'EAggEC.(6) Ceci suggère que la colonisation du tractus digestif serait due à un ou plusieurs fimbrines,

comme dans le cas des ETEC, Ils s'adhèrent à la muqueuse intestinale. Environ 40% des souches EAggEC produisent une entérotoxine qui présente environ 50% d'homologie avec la toxine des ETEC. La contribution de cette toxine au pouvoir pathogène n'a pas encore établie.

#### ❖ **E.COLI A ADHERENCE DIFFUSE**

Ces souches tout d'abord classées avec les *Escherichia coli* entéro-pathogènes forment maintenant un groupe à part du fait de leur mode d'adhésion particulier qui n'implique pas d'agrégats microbiens. Deux marqueurs caractérisent ces souches : l'antigène fibrillaire de surface F1845 et la protéine AIDA-1(adhesin involved in diffuse adherence)

On a aussi des *E.coli* adhérant et diffuse mais leurs particularités restent à déterminer, néanmoins on sait qu'ils sont impliqués dans certaines pathologies comme la maladie de crhon. (C'est une pathologie inflammatoire qui affecte la partie supérieure de l'intestin grêle).

### **1.3. ESSAI DE TRAITEMENT D'EHEC ET EPEC PAR LES PHAGES**

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été cultivées dans un bouillon cœur-cerveille à 37°C. *E. coli* O157: H7 a été utiliser pour l'isolement des phages, les échantillons de selles ont été collectée dans 10 fermes. L'effet des bactériophages ou du traitement par antibiotique en termes de libération de toxine a été déterminé. *E.coli* O157:H7 a été cultivé à 37°C à une densité optique à 0.8(8). La culture a été utilisée pour inoculer 3ml de bouillon de culture préchauffe avec soit des antibiotiques (5µg/l de ciprofloxacine ou 10µg/l de norfloxacine) ou des phages. Après une nuit d'incubation à 37°C la densité optique a été mesure. Les surnageant ont été filtrés et on a mesuré la quantité de Shiga-toxine et leur absorbance a 450nm. (7)

L'analyse des échantillons a montré deux plages de lyse distinctes avec des différences de diamètre: 4mm (MVBS) et 2mm (MVSS). La courbe de croissance indique que les MVSS affichent une période d'éclipse de 14 min et une période de latence de 21min. Les MVBS affichent une période d'éclipse de 18min et une latence de 27 min. Leurs tailles ont été de 120 UFP/cellule pour les MVSS et de 155 UFP /cellule pour les MVBS.

L'ADN des phages MVSS a résisté à un large éventail d'enzymes de restriction contrairement à ceux des phages MVBS qui sont tous digérés par ces enzymes de restriction. Ainsi la différence de taille des plaques observées et de la digestion des ADN génomique justifie les phages comme deux bactériophages distincts.

Dans l'étude on a testé l'efficacité de ces deux bactériophages (MVSS et MVBS) sur 250 isolats de sérotype O157 et 15 isolats de sérotype non-O157 isolées à partir des flores intestinales humaines et animales. En outre ces phages ont été testés sur 72 isolats de la collection ECOR qui est une compilation d'isolats considéré comme largement représentatif de la diversité génétique de l'espèce *E.coli*. (7)

Dans l'ensemble, les deux phages affichent une gamme d'hôte très similaire et ont été capable de lyser 94% de pathogènes d'*E.coli* (EHEC et EPEC), 5.8% résistant à MVSS et MVBS (*figure 7*). Dans l'ensemble, 57% des souches EHEC étaient résistantes à au moins un des antibiotiques. Des 50 isolats O157 humains testés, 27 (54%) ont été résistant à au moins 1 des 14 antibiotiques testés et 5 (10%) ont été multi-résistants. Des 15 isolats non-O157 isolées, 10 (66%) étaient résistant à au moins un antibiotique et 3 ont été multi résistants.

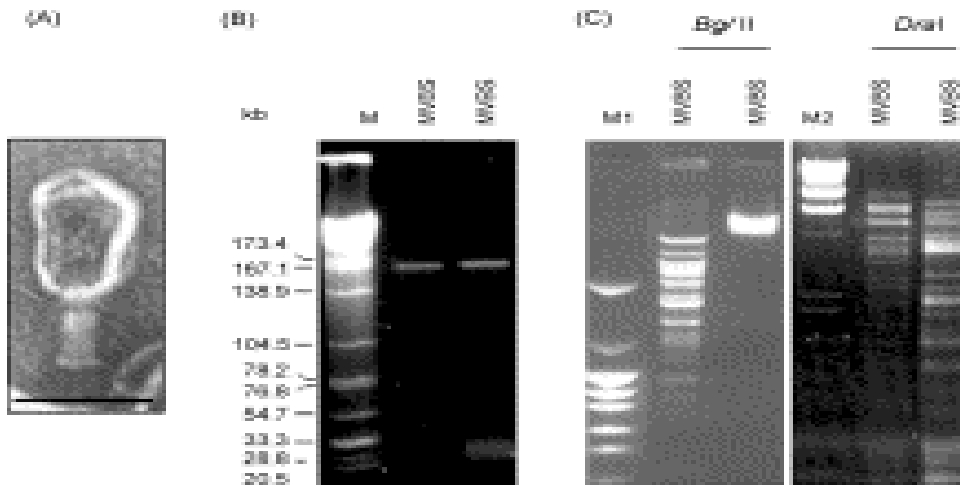
Dans les 250 isolats O:157 animales, 114 (57%) ont montrées une résistance aux antibiotiques et 40 (20%) ont été multi résistants.

La résistance des antibiotiques a été plus marquée chez l'isolat EPEC. L'ensemble des 45 souches testée était résistant a moins un antibiotique. En outre 44 des 45 isolats (97.8%) ont été multi résistants et 1 était résistant à deux antibiotiques. Parmi les isolats EPEC il y a eu 3 qui ont été résistant à 8 antibiotiques et 1 à neuf

antibiotiques. Ainsi aucune différence en pourcentage de la résistance aux antibiotiques entre les EHEC d'origine animal et humaine a été trouvée (114/200; 57%), alors que la prévalence de la résistance aux antibiotiques est significativement élevée chez les isolats EHEC de lapin (100%). La croissance d'*E.coli* O157:H7 ATCC 35150 a été complètement inhibée avec les phages (MVSS et MVBS) ou les antibiotiques (ciprofloxacine et norfloxacine), présentant une densité optique de 0,05 après une nuit d'incubation alors que la densité optique était de 2,8 pour les souches non exposées au agent microbiens. Pour ce qui est de la production de la toxine Shiga, les surnageants de culture traités par antibiotique ont montré une grande absorbance (2.9 ou 2.5) ce qui représente une forte concentration en Shiga toxine. La ciprofloxacine a été plus efficace sur la toxine Shiga par rapport à la norfloxacine comme le montre les valeurs de l'absorbance. Le niveau de la Shiga-toxine n'a pas été affecté par aucun des deux bactériophages (*figure 8*).

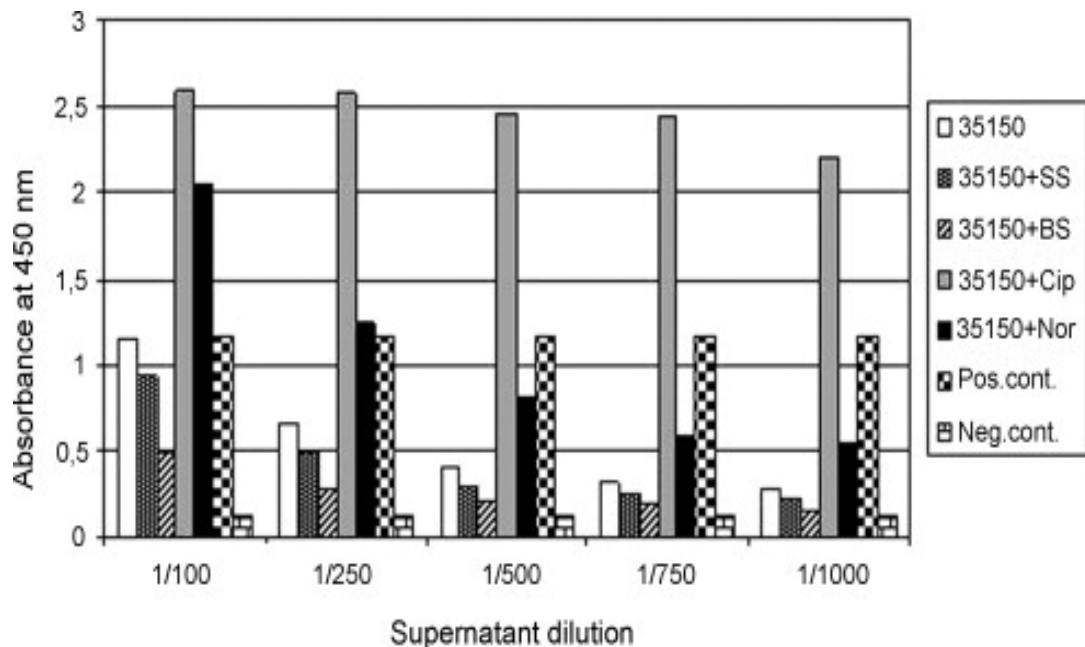
L'augmentation de la résistance aux antibiotiques est à l'origine des échecs thérapeutiques. Un traitement antibiotique reste très controversé dans le cas des infections à *E.coli* O157:H7, car les antibiotiques peuvent causer des perturbations sur la paroi bactérienne et altérer la réplication de l'ADN favorisant l'augmentation de la libération des endotoxines. Les résultats montrent que l'ajout de la ciprofloxacine et ou de la norfloxacine à une culture de *E.coli* ATCC 35150 peut entraîner une augmentation de la production de toxine Shiga. Ces phénomènes ne sont pas observés après traitement par les deux bactériophages. (7)

En conclusion, les bactériophages ont un réel potentiel pour limiter l'utilisation d'antibiotiques dans la lutte contre les *E.coli* pathogènes, ils n'ont pas des effets collatéraux et ont moins d'impact sur l'environnement. Évidemment, l'analyse complète de la séquence des gènes sera une exigence minimale pour une utilisation pratique.



**Figure 7:** Caractérisation des bactériophages MVBS et MVSS(7).

A- au microscope électronique : on a une morphologie semblable à celle des phages T4,  
 B- par électrophorèse : on a des phages de 167ko (taille)  
 C- modèle de digestion des bactériophages par les enzymes de restriction.



**Figure 8:** Enzyme immunoassay for Shiga toxins I and II in culture supernatants of *Escherichia coli* ATCC 35150 only (35150), *E. coli* infected with MVSS (35150 + SS), *E. coli* with MVBS (35150 + BS) and ciprofloxacin-treated (35150 + Cip) or norfloxacin-treated (35150 + Nor) (7)

## 2. LES SALMONELLES

## **2.1. GENERALITES**

Le genre *Salmonella* comporte trois espèces : *S.enterica*, *S.bongori* et *S.subterranea*. L'espèce principale est *S.enterica* qui comprend elle-même six sous-espèces, elle-même divisée en plusieurs sérotypes : *dublin*, *enteritidis*, *infantis*, *paratyphi*, *typhi*, *typhi murium*, *virchow*. Les salmonelloses entraînent deux principaux types d'infections : d'une part, la fièvre typhoïde et les fièvres paratyphoïdes. La fièvre typhoïde est due à *S.enteritica* sérotype *typhi* (ou bacille d'Eberth). Les fièvres paratyphoïdes sont dues à *S. paratyphi A* et à certaines souches de *S. paratyphi B*. La fièvre typhoïde est devenue rare dans les pays industrialisés du fait des progrès d'hygiène et de l'amélioration des conditions d'approvisionnement en eau potable. Dans les pays en voie de développement (PED), l'incidence est élevée et est liée aux mauvaises conditions d'hygiène et aux risques de transmission fécale. C'est une maladie de l'enfant d'âge scolaire (5 à 15 ans), peu fréquente chez le très jeune enfant, y compris en zone de très forte endémie. L'incidence est de 21 000 000 cas, avec 200 000 décès par an, dont 90% des décès en Asie(5).

Les salmonelloses non typhiques sont responsables d'infections sporadiques ou épidémiques, le plus souvent en raison de la contamination des aliments. Ce sont les bactéries le plus souvent en cause dans les toxi-infections d'origine alimentaire. Elles entraînent des gastroentérites, des formes invasives étant observées chez les malades à risques, en particulier les malades immunodéprimés.

Les salmonelles font partie de la famille des entérobactéries, bacilles à Gram négatif. Les souches multi résistantes de salmonelles, y compris au traitement de première ligne (les fluoroquinolones) émergent un peu partout dans le monde, ce qui pose le problème de leur prise en charge.

La physiopathologie est différente selon l'infection, pour la fièvre typhoïde, après l'ingestion, les bacilles typhiques adhèrent sur les entérocytes et les follicules lymphoïdes (cellules M des plaques de Peyer) sont activés et phagocytés par les macrophages dans lesquels ils se multiplient et rejoignent les ganglions

mésentériques. Quelques bacilles gagnent la circulation sanguine, la plupart sont détruits dans les ganglions lymphatiques. Leur lyse libère une endotoxine qui va imprégner les terminaisons nerveuses du système neurovégétatif abdominal, créant des lésions intestinales qui sont envahies ensuite par les salmonelles. L'endotoxine diffuse dans tout l'organisme et se fixe sur les centres nerveux diencéphaliques et sur d'autres organes.

Concernant les salmonelles non typhiques, les germes sont invasifs et se multiplient dans la lamina propria et entraînent une diarrhée par production d'une entérotoxine, comme dans le choléra. Elles ne donnent pas habituellement de bactériémie prolongée, car elles sont rapidement captées par les phagocytes et tuées, sauf pour *S.typhi murium* et *S.enteritidis* qui donnent des infections systémiques chez les sujets à risques (nouveaux nés, enfants drépanocytaires, immunodéprimés).

## **2.2. ESSAI DE TRAITEMENT SUR LES PHAGES**

L'étude a été évaluée sur trois groupes tel que décrit dans le *tableau 1*. Les groupes se composaient de 25 échantillons prélevés sur des poulets avec un poids moyen compris entre 300 et 350 grammes. Ces échantillons ont été recueillis lors de l'abattage d'un groupe négatif à *Salmonella*. Les échantillons ont été contaminés expérimentalement par immersion dans une suspension de tampon phosphate salin contenant 10 UFC/ml de SE PT4 (souches de salmonelles). Les échantillons ont été transférés dans des sacs plastiques stériles, scellés et conservés à 5°C. Ensuite cinq échantillons par groupe ont été pris au hasard à chaque trois jour et chiffrés en nombre de bactériophages et de salmonelles. (9)

| Groupes | Echantillons | Traitements                    |
|---------|--------------|--------------------------------|
| 1       | 25           | Non-contaminés et non-traités  |
| 2       | 25           | Contaminés par les salmonelles |

|   |    |                                                                                                |
|---|----|------------------------------------------------------------------------------------------------|
|   |    | et traités par les phages                                                                      |
| 3 | 25 | Contaminés et traités un jour après par un mélange de 3 bactériophages CNPSA1, CNPS3 et CNPSA4 |

**Tableau 1:** traitements utilisés pour évaluer l'effet des bactériophages sur la réduction de *Salmonella* dans les échantillons poulets.

La souche de salmonelle (SE PT4) a été isolée à l'origine à partir d'un cas d'intoxication alimentaire chez l'homme. Une colonie de SE PT4 a été inoculée dans 10 ml de bouillon nutritif et incubée une nuit à 37 °C sous agitation. La culture a été congelée à -80 °C et une aliquote a été utilisé pour le dénombrement des cellules viables. Après, la culture d'origine a été diluée avec une solution saline tamponnée stérile (1L) pour produire une suspension contenant 10 UFC/ml qui a servi à contaminer les échantillons. Les bactériophages CNPSA1, CNPSA3 et CNPSA4 ont été isolés à partir des fèces de poulet. Comme la résistance aux bactériophages peut émerger pendant la croissance bactérienne, un ensemble de trois virus différents a été utilisé. Les Plages de lyse ont été comptées après 24 heures d'incubation à 37°C. Le nombre de *Salmonella* viables et de particules de bactériophages ont été évalués dans cinq échantillons prélevés sur chaque groupe à intervalle de trois jours.

Le dénombrement des salmonelles a été réalisé uniquement sur des échantillons provenant du groupe 2 et 3 car le groupe 1 n'a pas été contaminé. Le total des UFC variait de  $0.66 \pm 0.05 \times 10^8$  UFC à  $4.840 \pm 4.461 \times 10^8$  UFC par échantillon dans le premier et le dernier prélèvement du groupe 2 (groupe contaminés). Dans le groupe 3 contaminé par le SE PT4 et traité par les bactériophages, les réductions étaient de  $0.29 \pm 0.8 \times 10^8$  UFC et  $3.920 \pm 738.51 \times 10^8$  UFC par échantillon pendant le premier et le dernier jour. Il y a eu une tendance à la hausse dans les groupes d'échantillons prélevés à chaque 3 jour. Ces concentrations d'UFC sont élevées et peuvent s'expliquer par le fait que de la dose utilisée pour contaminer les échantillons était

élevée et aussi parce que les conditions expérimentales empêchent une concurrence entre les *Salmonella* et les autres organismes. Toutefois, la baisse des grandeurs d'UFC total a été observée dans le groupe traité par les bactériophages (*groupe 3*) à tous les jours d'échantillonnage, à l'exception des 12 et 15 jours post-traitement (*tableau 2 et figure 9*). Les échantillons non traités ont été comparés et les valeurs P étaient très significatives aux jours 3, 6 et 9, indiquant une plus grande efficacité des bactériophages dans la réduction des salmonelles dans un délai de 9 jours (*tableau2*).

La diminution de *Salmonella* dans les échantillons du groupe 2 a été de moindre ampleur à 12 jours post-inoculation par rapport aux échantillons du groupe 3. Ce résultat a été probablement provoqué par une variation technique. Par conséquent, on suppose que les bactériophages auraient effectivement eu un effet pendant plus de 9 jours. Il est également possible que la contamination par *Salmonella* était inférieure ou que les effets des bactériophages étaient plus élevés dans les échantillons choisis au hasard sur 12 jours. La courbe présentée dans la *figure 9* indique que les données du groupe 2 au jour 12 devraient logiquement se situer entre  $4.000$  et  $8.000 \times 10^8$  UFC.

La réduction du nombre de salmonelles après traitement a été d'environ 4,49 fois supérieure le jour 9 après le traitement (*tableau 2*). Une telle réduction est suffisante pour démontrer un effet de lien à cause, mais des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de parvenir à la réduction des salmonelles sur plusieurs ordres de grandeur. Sur la base des résultats de la présente étude, il semble raisonnable de supposer que des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre comment les bactériophages peuvent être utilisés plus efficacement pour réduire les salmonelles.

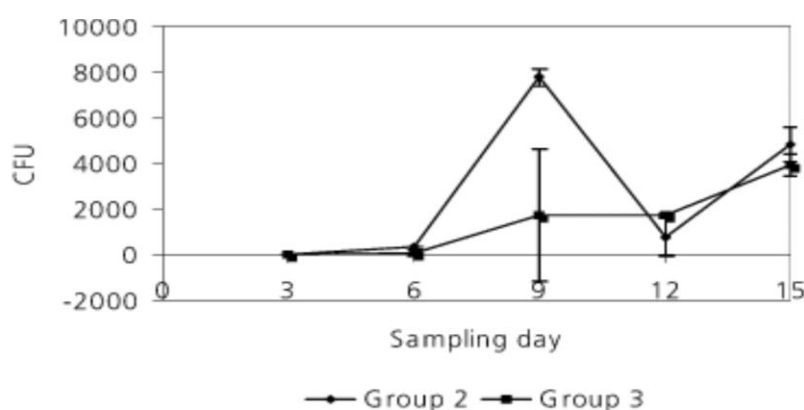
En conclusion, un panel de bactériophages peut réduire le dénombrement des SE PT4 dans les échantillons contaminés expérimentalement. Nous avons démontré que les salmonelles ont été réduites dans les jours 3, 6 et 9 de post-traitement comparativement à leurs homologues non-traités.

| Jours après traitement | Group 2 <sup>x</sup> | Groupe 3       | P value <sup>xx</sup> | Réduction <sup>xxx</sup> |
|------------------------|----------------------|----------------|-----------------------|--------------------------|
| 3                      | 0.66 ± 0.05          | 0.29 ± 0.08    | 0.0334                | 2.27                     |
| 6                      | 340.2 ± 124.16       | 74.6 ± 20.37   | 0.0026                | 4.56                     |
| 9                      | 7.734 ± 2.875        | 1.720 ± 360.85 | 0.0195                | 4.49                     |
| 12                     | 772 ± 5152           | 1.714 ± 813.74 | 0.269                 | -0.45                    |
| 15                     | 4.840 461.09         | 3.920 ± 738.51 | 0.552                 | 0.97                     |

**Tableau 2** moyenne et écart-type des colonies formées par les échantillons des groupes contaminés et non traités (groupe 2) ou contaminés et traités avec les bactériophages (groupe 3).

<sup>x</sup> Les échantillons non contaminés et non traités (groupe 1) ont été négatifs tout au long de l'expérience

<sup>xxx</sup> La différence dans les valeurs moyennes entre les groupes 3 (contaminés, traités) et le groupe 2 (contaminé, non traité).



**Figure 1** - Mean ± standard deviation of total colony forming units (CFU x 10<sup>8</sup>) of SE PT4 recovered from cuts contaminated with *Salmonella* (Group 2) or contaminated and treated with bacteriophage (Group 3). Differences between means were statistically significant on days 3, 6 and 9.

**Figure 9 :** Moyenne et écart-type des colonies formées récupéré à partir des échantillons contaminés par des salmonelles ou contaminé et traité avec les bactériophages. Les différences entre les moyennes étaient significatives aux jours 3, 6 et 9.

| Nombres de jour après le traitement | Nombre total par échantillons |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| 3                                   | 15 × 10 <sup>5</sup>          |

|    |                    |
|----|--------------------|
| 6  | $5.8 \times 10^5$  |
| 9  | $25.4 \times 10^5$ |
| 15 | $13 \times 10^5$   |

**Tableau 3: moyenne du nombre de bactériophages récupérer après la contamination suivie d'un traitement par les bactériophages (groupe 3).**

### 3. CAMPYLOBACTER

#### 3.1. GENERALITES

Le genre *Campylobacter* comprend une douzaine d'espèces parmi lesquelles trois sont impliquées en pathologie humaine *C.jejuni*, *C.coli*, et *C.fetus*. Ce sont des bactéries à gram négatif, incurvées ou spiralées ou en formes de S. Elles sont mobiles avec un flagelle unique et polaire. Leurs cultures nécessitent des milieux spéciaux et sélectifs mais surtout une atmosphère micro-aérophile, c'est à dire dans laquelle la tension partielle de l'oxygène est réduite et très inférieure à celle du CO<sub>2</sub>. Certains *Campylobacter* commensaux de la cavité buccale sont considérés comme des anaérobies stricts et ne supportent que des tensions d'oxygène inférieures à 1%. Ce sont des commensaux du tube digestif des animaux (des oiseaux pour *C.jejuni*, des porcins pour *C.coli* et des bovins pour *C.fetus*). Leurs survies dans le milieu extérieur sont limitées en raison de leurs sensibilités à l'oxygène de l'air(5).

*C.jejuni* et *C.coli* sont très souvent responsables de diarrhées, chez l'enfant il s'agit d'une diarrhée aqueuse parfois muqueuse ou sanglante. Chez le nouveau-né ou le nourrisson de moins de six mois, une rectorragie constitue parfois le seul symptôme apparent. Chez l'adulte ils sont la cause de manifestations intestinales inflammatoires avec également des diarrhées. Parfois l'infection se traduit par un syndrome pseudo-appendiculaire. Les complications sont rares (arthrites, érythèmes, urticaires et surtout syndrome de Guillain barré). *C.fetus* peut passer dans le sang et donner lieu à des bactériémies. A l'instar d'autres bactéries comme le vibron cholérique ou les *E.coli* entérotoxigènes, *C.jejuni* peut provoquer des diarrhées motrices, certaines souches produiraient une entérotoxine thermolabile, fonctionnellement et immunologiquement apparentée à la toxine cholérique. Pourtant un mécanisme invasif peut également être provoqué dans les infections à *C.jejuni* d'une part un syndrome pseudo-dysentérique est assez souvent observé cliniquement, et une

atteinte inflammatoire recto-colique avec présence de nombreux polynucléaires a pu être mise en évidence. Grâce à son affinité pour le mucus intestinal (chimiotactisme pour le fructose et la sérine), *C.jejuni* coloniserait les cryptes coliques, par ailleurs certaines souches semblent produire une cytotoxine active sur les cellules(6).

### **3.2. LES DIFFERENTES SOUCHES**

#### **❖ LES INFECTIONS A C.JEJUNI**

La grande majorité des infections humaines à *Campylobacter* sont dues à *C.jejuni*. L'incubation varie de 1 à 7 jours, probablement en fonction de la dose infectante ingérée. Une phase prodromique fébrile avec malaise et douleurs abdominales peu être observée. La diarrhée peut être isolée ou s'intégrer dans un tableau spécifique fait de crampes abdominales, de nausées avec fièvre modérée. La grande majorité des infections à *C.jejuni* cèdent spontanément en quelques jours. Les résultats de plusieurs études suggèrent que l'isolement de *C.jejuni* dans les selles est particulièrement fréquent au cours de certaines affections: Arthrites réactionnelles et syndrome de Guillain-barré. (6)

#### **❖ LES INFECTIONS A C.FETUS**

Ces infections sont très rares et s'observent sur un terrain fragilisé (cirrhose éthylique, diabète, cancer, corticothérapie) ou lors de la grossesse. *C.fetus* est donc considéré comme un véritable pathogène opportuniste. Il est responsable tout comme *C.jejuni* de diarrhées mais aussi d'infections systémiques avec hémocultures positives. Chez l'adulte, il s'agit d'une infection généralisée. Le tableau est alors limité à une fièvre avec des frissons et sueurs. Le pronostic est souvent favorable. Les cas d'infections survenant lors de la grossesse peuvent provoquer une mort fœtale ou une maladie néo-natale dominée par l'atteinte du système nerveux central. Malgré l'antibiothérapie, le pronostic de ces méningo-encéphalites néo-natales est médiocre.

En revanche, la mère sort indemne de cet épisode infectieux généralement peu sévère pour elle.

### **3.3. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES**

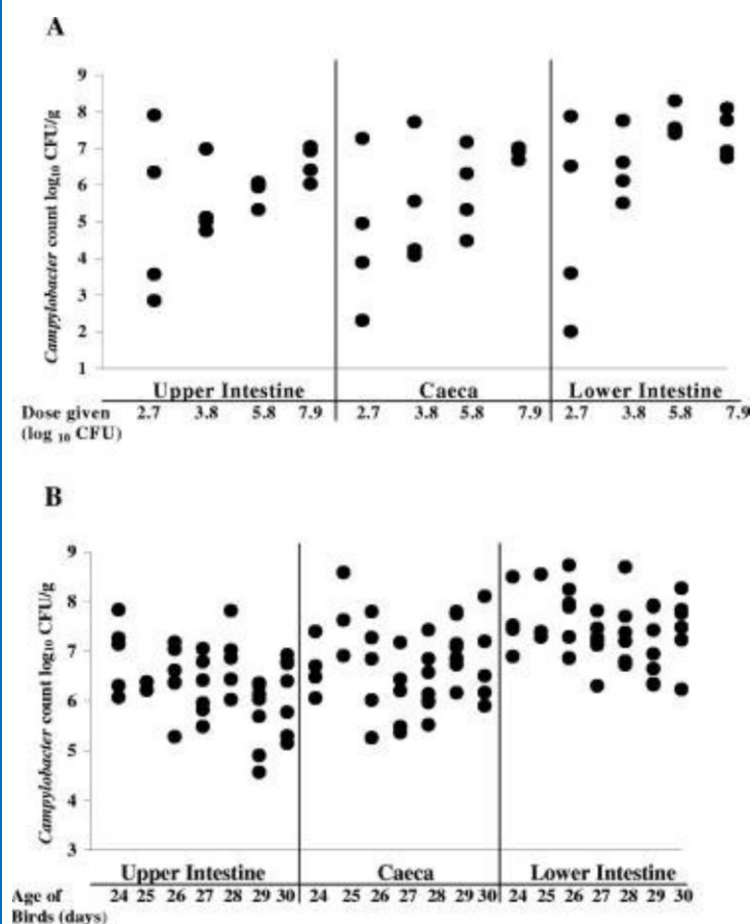
Les souches de *Campylobacter* ont été isolées et identifiées à partir d'excréments de poulets. Ces poulets expérimentaux ont été logés individuellement dans un environnement contrôlé dans des conditions strictes de biosécurité. Afin de s'assurer qu'ils sont restés libres de toute infection naturelle, les fèces et des écouvillons cloacaux ont été prélevés chaque jour et testés pour la contamination par *Campylobacter* par ensemencement direct sur gélose et pour les salmonelles par enrichissement dans un bouillon. Les échantillons ont été contaminés par deux souches de *C.jejuni* (HPC5 et GIIC8), et tués 48h après. Afin de s'assurer qu'aucun contaminant de *Campylobacter* n'avait infecté les poulets dans l'installation de confinement, une électrophorèse a été réalisée sur l'ADN et comparée aux profils connus de souches d'essai(11). Le profil lytique des bactériophages a été ensuite déterminé. Le dénombrement des bactériophages CP8 et CP34 a été réalisé en faisant des dilutions en série de suspension filtrée du cæcum et du contenu intestinal supérieur et inférieur. Les poulets de 18 à 20 jours d'âge ont été infectés par *C.Jejuni* (HPC5 ou GIIC8) par gavage oral. Un groupe de contrôle non contaminé a été maintenu. Les bactériophages CP34 ou CP8 ont été administrés à 25 jours après contamination. Les doses de bactériophages de  $\log_{10}$  5, 7 et 9 UFC ont été administrées. Les poulets ont été sacrifiés à des intervalles de temps de 24 h et le nombre de *Campylobacter* et des deux bactériophages dans le contenu caecal et des deux parties de l'intestin a été dénombré. Le foie, le pancréas, le cœur et les reins ont également été disséqués afin de déterminer si le *Campylobacter* et / ou les bactériophages pourraient être récupérés à partir de ces tissus.

Afin d'établir la fréquence de la résistance aux bactériophages après l'intervention, les colonies sur les plaques d'isolation de chaque poulet traité par les bactériophages ont

été sélectionnées et testées pour la résistance au bactériophage. La fréquence de résistance *in vitro* des phages a également été déterminée à partir de colonies de *Campylobacter* recueillies après 24 h d'expérience.

On a cherché à créer un modèle de colonisation par *Campylobacter* des poulets qui pourrait être utilisé spécifiquement pour évaluer l'efficacité de la thérapie par les phages. Deux isolats de *C.jejuni* (HPC5 et GIIC8) qui ont été sensibles à l'infection sur un large éventail de bactériophages y compris les CP8 et CP34 qui ont été sélectionnés pour les essais de colonisation. Le taux et le niveau de colonisation ont été déterminés sur 20 à 22 poussins d'un jour âge. L'effet de la dose sur le niveau de colonisation de *C.jejuni* HPC5 ( $\log_{10}$  2.7, 3.8, 5.8 et 7.9 UFC) à 48 h est présenté dans la *Figure 10A*.

La *figure 10* montre le niveau de colonisation des poulets après inoculation de *C.jejuni* sur une période de 7 jours. *C.jejuni* HPC5 a pu être détecté dans toutes les parties de l'intestin dans les 24 h. La colonisation maximum a été atteinte dans les 48 h, et ce niveau de colonisation a été maintenu plus de 9 jours (sur les poulets de 22 à 30 jours d'âge). La Moyenne des souches viables et écarts-types de *C.Jejuni* HPC5 dans l'intestin supérieur, inférieure et du caecum ont été de  $\log_{10}$   $6.3 \pm 0.8$ ,  $6.7 \pm 0.8$  et  $7.4 \pm 0.7$  UFC / g de contenu luminal respectivement. De même, les réponses du temps et de la dose ont été obtenus en utilisant *C.Jejuni* GIIC8, où la moyenne des souches viables dans l'intestin supérieur, inférieur et du caecum étaient  $\log_{10}$   $8.0 \pm 0.5$ , et  $7,8 \pm 0,4$  UFC / g de contenu luminal respectivement. Ces résultats indiquent que *C.jejuni* (HPC5 et GIIC8) ont tous deux été capables de coloniser les échantillons dans les gammes de ceux rapportés pour les poulets naturellement infectés, et de maintenir les niveaux de colonisation sur une période de temps convenable. Les données recueillies à partir des essais de colonisation ont ensuite été utilisées pour concevoir les expériences de traitement par les bactériophages(10).

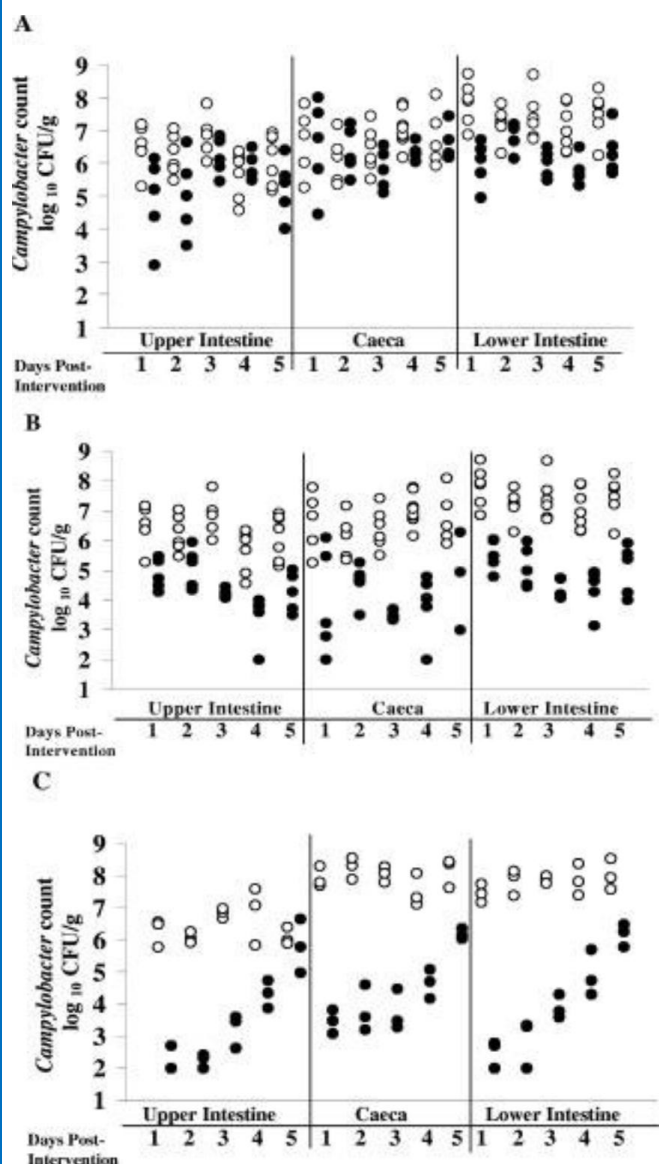


**Figure 10: colonisation des poulets avec *C. jejuni* HPC5(10)**

A- la colonisation dose-dépendante des poulets de 21 jours d'âge avec *C. Jejuni* HPC5 (les doses administrées étaient log<sub>10</sub> 2.7, 3.8, 5.8 et de 7,9 UFC). La colonisation a été évaluée 48 h après pour chaque site intestinale.

B- La colonisation des poulets avec *C. Jejuni* HPC5 sur une période de 7 jours. La dose log<sub>10</sub> 8 UFC a été administrée à 20 jours d'âge.

Des expériences préliminaires ont été effectuées afin d'évaluer si l'utilisation du carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>) comme un antiacide a été appropriées pour protéger les bactériophages d'une exposition à faible pH lors du passage dans le pro-ventricule et le gésier. Les bactériophages ont donc été administrés aux échantillons colonisés par *C. jejuni* (HPC5 et GIIC8). *C. jejuni* HPC5 a été utilisé pour coloniser les poulets de 20 jours d'âge et trois doses de bactériophage CP8 (log<sub>10</sub> 5, 7 et 9 UFP) ont été administrées séparément en présence d'antiacide aux poulets 5 jours après la colonisation. Les nombres de *Campylobacter* et de bactériophages dans le contenu intestinal supérieure, inférieure et du caecum ont été déterminés et comparés aux niveaux de colonisation dans le groupe contrôle recevant l'antiacide seul.



**Figure11: Comparaison de l'efficacité de CP8 et de CP34 contre *C.jejuni*(10)**

Les poulets colonisés par *C. Jejuni* HPC5 ou GIIC8 ont été traités avec une dose de  $\log_{10} 7$  UFP de phage CP8 ou CP34.

○ contrôle de *Campylobacter* dans le contenu intestinal

• *Campylobacter* compter après traitement par les phages ( $\log_{10}$  CFU / g)

(A) traitement des poulets colonisés par *C.jejuni* HPC5 par le phage CP8

(B) traitement des poulets colonisés par *C.jejuni* HPC5 par le phage CP34.

(C) traitement des poulets colonisés par *C.jejuni* GIIC8 par le phage CP8.

Les bactériophages CP8 ont persistés 5 jours après le contact avec *C.jejuni* HPC5. Ces observations indiquent que les bactériophages peuvent être maintenus avec leur cible dans l'intestin des poulets. Les titres bactériophagiques récupérés à partir du contenu intestinal colonisé par *C.jejuni* ont été de l'ordre de  $\log_{10}$  3,2 à 6,5 UFC/ g de

matières fécales. Ces résultats sont compatibles avec la distribution des titres bactériophagiques détectés dans le contenu caecal des poulets naturellement colonisés (variant entre  $\log_{10}$  3 UFC et 6,9 UFC/ g de matières fécales).

Le Traitement de *C.jejuni* HPC5 avec le phage CP34 à des doses de  $\log_{10}$  5, 7 et 9 UFC a entraîné une chute significative du nombre de *Campylobacter*. La figure 11b montre l'effet de l'administration d'une dose de  $\log_{10}$  7 UFC sur les différents sites de colonisation. Des baisses significatives dans le niveau de colonisation du caecum ont été enregistrées pour les  $\log_{10}$  5 et 7 UFC après 24 h. La plus forte dose de bactériophages ( $\log_{10}$  9 UFC) n'a pas entraîné de diminution significatives des niveaux de colonisations dans le caecum pendant les premiers jours de l'expérience. Mais une diminution a été observée le quatrième jour (résultats non présentés). La dose la plus efficace était celle de  $\log_{10}$  7 UFC.

Globalement, le bactériophage CP34 a été plus efficace dans la réduction de *C.jejuni* sur tous les sites intestinaux par rapport à CP8. Après le premier jour du traitement de CP8, le nombre de *Campylobacter* a chuté dans la partie supérieure et inférieure de l'intestin, mais ce nombre dans le caecum n'était pas significativement différent de celui des poulets de contrôle.

Une seule dose de bactériophage CP8 a été administrée aux poulets infectés par *C.jejuni* GIIC8 (figure 11c). Une baisse importante du nombre moyen de *Campylobacter* ( $\log_{10}$  5,6 UFC/g) dans les matières fécales a été observée dans les 24h après administration des bactériophages. Cependant il est évident que le nombre de *C.jejuni* a commencé à baisser à partir de 72h après l'administration du bactériophage. Après 5 jours de traitement, les valeurs dans le caecum et de la partie inférieure de l'intestin ont présenté des différences importantes de  $\log_{10}$  2,1 et 1,8 UFC/g respectivement, mais les valeurs de la partie supérieure de l'intestin n'ont montré aucune différence significative avec les valeurs obtenues par le groupe de contrôle. Il est évident que le bactériophage CP8 est beaucoup plus efficace dans sa capacité à tuer les *C.jejuni* GIIC8 que les *C.jejuni* HPC5 dans l'intestin des poulets.

Avant d'adopter une thérapie par bactériophage comme un moyen de contrôler les

*Campylobacter* dans les poulets, il est important de comprendre la dynamique de l'infection chez les oiseaux. Il était important de démontrer que le *C.jejuni* sélectionnés pour l'étude pourrait établir et maintenir la colonisation, de telle sorte que tout changement dans la colonisation pourrait être attribué à l'introduction du bactériophage. Les traitements expérimentaux par les bactériophages des poulets colonisés par *C.jejuni* aboutissent à des titres de phages persistant au cours de l'essai qui implique qu'ils ont été administrés aux sites intestinaux colonisés par *C.jejuni* et ont été capables de se reproduire dans l'environnement des voies intestinales des poulets.

Les bactériophages ont été testés chez les poulets, la capacité du bactériophage CP34 à se reproduire au contact de *C.jejuni* HPC5 chez les poulets a entraîné des réductions importantes du nombre de *Campylobacter* au niveau caecal avec des doses de  $\log_{10}$  5 et  $\log_{10}$  7 UFP, mais  $\log_{10}$  9 UFP a été moins efficace. Les phages ont été inefficaces dans le caecum des poulets traités à  $\log_{10}$  9 UFC. Ceci s'expliquerait par le fait que la première rencontre des bactériophages avec *C.jejuni* peut entraîner une métabolisation du phage au niveau de la partie supérieure de l'intestin et pourrait influencer sur la suite du traitement. L'adhésion des bactériophages à des cellules hôtes bactériennes entraînant la mort cellulaire sans répllication des bactériophages peu aussi expliquer cette inactivité(12).

En général, les bactériophages CP 8 ont été moins efficaces que le CP34 sur *C.jejuni* HPC5. La récupération du bactériophage CP8 après 5 jours de traitement indique clairement qu'il est capable de se répliquer sur *C.jejuni* HPC5 mais pas de réduire la quantité présent dans les voies intestinales. La capacité du bactériophage CP34 à tuer *C.jejuni* HPC5 chez les poulets est supérieure et est contraire aux observations *in vitro* (qui sont favorable à CP8). Cependant, en dépit de l'incapacité de CP8 à affecter *C.jejuni* HPC5 chez les poulets, le traitement des poulets colonisés par *C.jejuni* GIIC8 avec le bactériophage a donné une diminution du nombre de *Campylobacter* dans le caecum. Les plus fortes réductions du nombre de *Campylobacter* dans le caecum ont été observées à 24 h et 48 h après le traitement par le phage. Le phage

CP8 a clairement la capacité de fonctionner comme un agent thérapeutique chez les poulets. Il a survécu à l'ingestion, et a été en contact avec les mécanismes de défenses entériques, mais était encore en mesure de se répliquer dans le tractus intestinal. Il est possible qu'une sous-population de bactéries puisse devenir résistante au bactériophage CP8, mais actuellement il n'y a aucune preuve pour cela en observant les bactéries récupérées après le traitement.

Le tractus intestinal des poulets est un environnement complexe où les différences physiques (le flux constant de digestion), physiologiques (les niveaux d'oxygène) et biochimiques (les enzymes protéolytiques) ont une influence sur les bactéries colonisantes. De plus, la cinétique de l'adsorption du bactériophage dans l'intestin peut être très différente en raison de la viscosité de la couche de mucus. Il est évident que l'information acquise dans la traduction directe des bactéries et des phages homogènes dans un environnement de laboratoire (*in vitro*) ne va pas être une mesure fiable de l'efficacité du phage pour tuer les bactéries hôtes.(13)

Dans cette étude, nous avons choisi d'utiliser un phage unique dans chaque expérience pour fournir des données comparatives entre les phages. Cependant, dans la production commerciale, il pourrait être nécessaire d'administrer un cocktail de phages.

Ces données représentent les premières étapes vers une compréhension des processus cinétique et les caractéristiques des phages de *Campylobacter* qui sont nécessaires si on utilise cette thérapie comme une mesure de contrôle biologique durable et la réduction de *Campylobacter* provenant de sources de volaille d'élevage.

## II. INFECTIONS ORL

### 1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE

#### 1.1. GENERALITES

*Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) est l'une des espèces connues du genre *Klebsiella*. Elle est l'une des plus fréquentes étudiées à travers le monde. C'est une bactérie encapsulée (présence d'une couche de polysaccharides à l'extérieur de la paroi cellulaire), anaérobie facultative, ce qui signifie qu'elle a la caractéristique de devenir à la fois aérobie (survivre en présence d'oxygène) et anaérobie (survivre en l'absence d'oxygène). Elle se trouve naturellement dans le sol, l'eau et les légumes. Certaines souches de *K.pneumoniae* sont diazotrophes et ont une capacité à fixer l'azote atmosphérique sous une forme plus utilisable pour les plantes. Chez l'homme, elle peut être trouvée au niveau la peau, du pharynx et du tube digestif. Elle est la cause de pneumonie chez l'homme, d'infections urinaires et de la sphère abdominales. Il affecte habituellement les personnes ayant un système immunitaire faible, comme les patients hospitalisés, les patients diabétiques et les personnes souffrant de pathologies pulmonaires chroniques(5).

Il est difficile pour *K.pneumoniae* d'infecter les poumons des personnes en bonne santé. Cependant, elle provoque une pneumonie mortelle chez les personnes qui ont été hospitalisées, généralement après deux jours d'hospitalisation et est donc connue sous le nom de pneumonies nosocomiales. Elle provoque une maladie à déclenchement rapide qui peut entraîner la destruction des poumons. Le symptôme le plus fréquent de ce type de pneumonie est la toux avec sécrétion de crachats. Le patient peut également souffrir de frissons, douleurs thoraciques, une forte fièvre, un essoufflement et des symptômes pseudo-grippaux. Dans les cas graves, elle peut

causer la destruction du poumon et la formation d'abcès du poumon (poches de pus), ce pus peut également être présent dans les tissus entourant le poumon appelés empyème, qui peuvent conduire à la formation de tissus cicatriciels. Le taux de mortalité de cette pneumonie est supérieur à celui de la pneumonie ordinaire en raison de la présence de maladies sous-jacentes chez les personnes touchées.

La virulence des klebsielles est liée à la présence d'une capsule polysidique qui confère aux bactéries une résistance à la phagocytose par les polynucléaires et les macrophages. Les infections broncho-pulmonaires induites par les bactéries sont dues à une contamination des poumons par voie aérienne ou sanguine chez des malades souvent immunodéprimés(6). Atteignant les alvéoles par aérosols, les bactéries se multiplient d'abord dans un exsudat pratiquement acellulaire. La pullulation bactérienne aboutit souvent à la nécrose des parois alvéolaires au cours d'un processus d'abcédation. La contamination par voie sanguine se voit lors des septicémies à point de départ muqueux et cutané. Les bactéries envahissent le parenchyme pulmonaire en franchissant les capillaires pulmonaires alvéolaires. Les infections urinaires sont toujours pratiquement la conséquence d'actes exploratoires ou chirurgicaux.

## **1.2. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES**

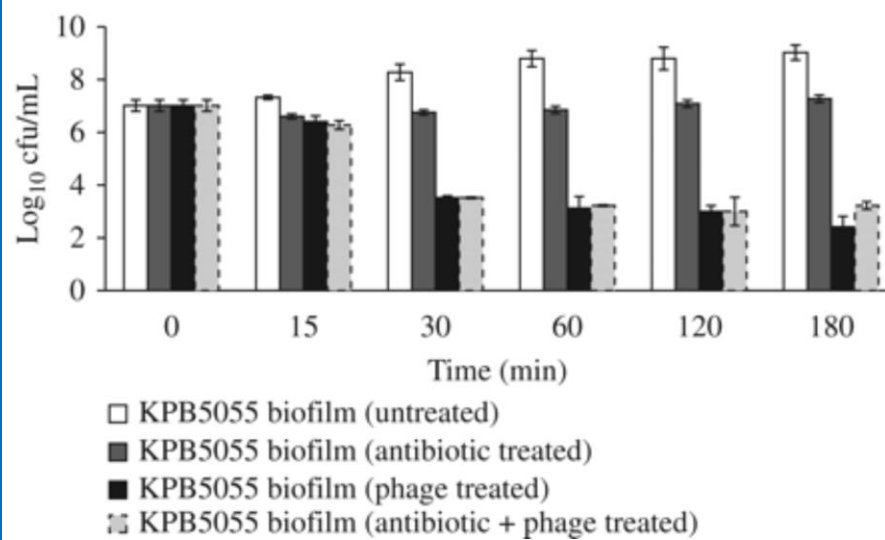
L'efficacité *in vitro* des bactériophages lytiques comme agents thérapeutiques contre les biofilms de *K.pneumoniae* seuls ou en association avec la ciprofloxacine a été étudiée. Le potentiel pathogène des souches résistantes formées au cours du traitement a aussi été évalué. L'efficacité et la fréquence de formation des souches résistantes ont été estimées après les traitements respectifs. Des cultures pures de *K.pneumoniae* (KPBk5055, KPARV et KPØRV) ont été utilisées pour l'étude. Les bactéries ont été cultivées en bouillon nutritif et des tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés avec de la caséine de soja.(15) Les dilutions ont été faites dans du PBS stérile. Le dosage des biofilms a été fait et ils ont été soumis à une

multiplicité d'infections, d'antibiotiques et de bactériophage (traitement seul ou en combinaison). Le biofilm traité a été récupéré et la charge bactérienne du biofilm a été déterminée. Le Changement d'UFC a été calculé par la méthode de réduction logarithmique. Les résultats en valeurs positives indiquent une diminution du nombre d'UFC / ml.

Le titre de la préparation a été estimé par une méthode de superposition et a été exprimé en PFU/ml. Les klebsielles KPØRV ont été isolées à partir des biofilms de bactériophages traités. Les bactéries capables de croître après le traitement par les bactériophages ont été isolées et retraitées par les bactériophages dans leur état planctonique. Une seule colonie de bactéries a été choisie au hasard après incubation. Cette souche bactérienne a été désignée KPØRV. Les caractéristiques des souches résistantes (KPØRV et KPARV) ont aussi été évaluées. La ciprofloxacine a été utilisée à une concentration comprise entre 0,078 et 1,024 mg / L. Les biofilms ont été traités avec des antibiotiques (10 mg/L) et / ou des bactériophages à 37 ° C. A des intervalles de temps appropriés, la charge bactérienne des biofilms traités a été estimée. De même, la susceptibilité des biofilms formés par la souche bactériophage résistante (KPØRV) à l'antibiotique a été analysée(16). Le taux de mutation dans la culture bactérienne planctonique a été déterminé et la culture bactérienne exposées à la ciprofloxacine et / ou des bactériophages a été répartie en plages. Les biofilms intacts ont été exposés aux bactériophages et aux antibiotiques (10mg/L), seuls ou en combinaison. Après un traitement de 3 h, le biofilm a été récupéré et exposer sur des plages sans antibiotiques et contenant des antibiotiques (10 mg / L) à moyen terme. Le nombre de colonies a été dénombré après 48 h d'incubation à 37 °C. La fréquence de la mutation a été calculée. La capacité de *K.pneumoniae* B5055 et de ses souches à résister à la phagocytose a été évaluée.

Les CMI de la ciprofloxacine pour KPB5055, KPARV et KPØRV sont de 0.625, 0.160 et 0.156 mg / L respectivement. Une réduction significative de 1,76 du nombre de bactérie dans le biofilm a été observée après un traitement antibiotique (*Figure12*). Le traitement avec des bactériophages a entraîné une diminution de plus de  $\log_{10} 4$  (*P*

= 0.001) sur une période de 3 h. Lors d'un traitement combiné, une diminution significative du nombre de bactéries  $\log_{10}$  ( $P = 0,0008$ ) par rapport à un biofilm non traité a été observée. Il y eu une différence significative entre les chiffres des bactéries traitées aux antibiotiques et de ceux après traitement combiné ( $p = 0.006$ ), mais la différence après traitement combiné avec les bactériophages n'a pas été significative ( $P = 0.895$ ).



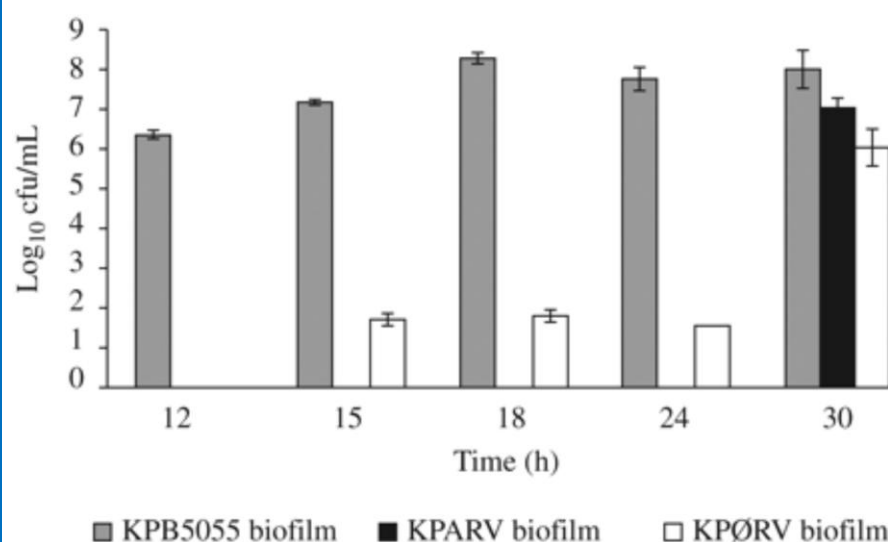
**Figure 12: Traitement du biofilm de *K. Pneumoniae* B5055 à la ciprofloxacine et aux bactériophages, seule ou en combinaison. (14)**

Les données sont présentées comme une moyenne  $\pm$  SD. Chaque expérience a été réalisée en double exemplaire à trois reprises à des jours différents.

La production de souches résistantes après 3 h de traitement combiné était significativement inférieure ( $P < 0,0001$ ) à celle avec le traitement antibiotique et de bactériophage seul. De même pour les biofilms, la réduction de l'émergence de souches résistantes après une association a été hautement significative ( $p < 0,00001$ ). On pourrait en conclure que le bactériophage et le traitement combiné ont été tout aussi efficaces dans l'éradication du biofilm (Figure 12). Le traitement combiné a été plus efficace pour inhiber la formation des souches résistantes.

Un morphotype (KPARV) résistant à la ciprofloxacine, aux concentrations utilisées pour l'éradication du biofilm, a été isolé après des repiquages répétés avec des antibiotiques. Toutefois, le morphotype bactériophage résistant (KPØRV) obtenue

après traitement du biofilm par le bactériophage était stable et a montré une sensibilité accrue à la ciprofloxacine avec une CMI diminuée de 0.156 mg / L. Les biofilms bactériens des trois isolats, KPB5055, KPARV et KPØRV, ont été cultivés pendant des périodes de temps variables. Dans les premières 12 heures, KPB5055 a formé un biofilm ayant une numération bactérienne de  $0.13 \pm 6.63$ . KPARV n'a produit aucun biofilm jusqu'à 24 heures, après quoi il a produit un biofilm avec un nombre très faible de bactéries ( $P = 0,002$ ). La production de biofilm KPØRV a été observée entre 12 et 15 h, et le nombre de bactéries est resté très faible ( $P = 0,001$ ) par rapport à KPB5055 (Figure 13).

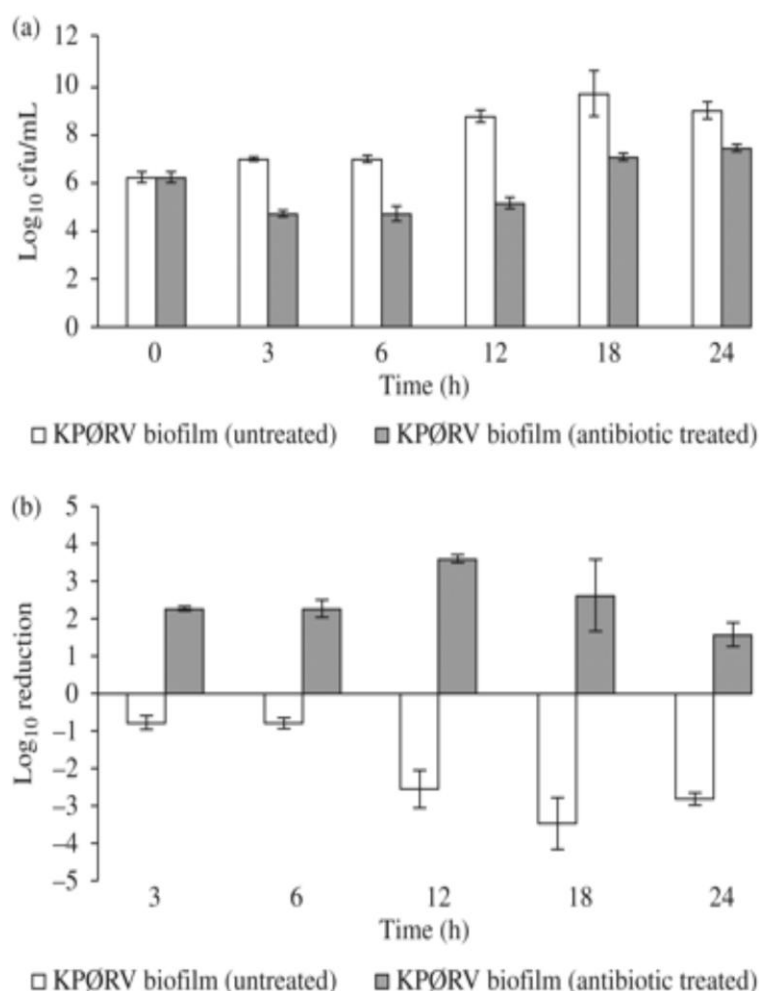


**Figure 13: Potentiel de formation de biofilm de *K.Pneumoniae* B5055 et des souches résistantes: KPARV et KPØRV. (14)**

Le biofilm a été cultivé sur des plaques de titration et estimé par le nombre de cellules viables. Les données sont présentées comme une moyenne  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Le biofilm de KPØRV a été soumis à un traitement antibiotique. Après 12 h de traitement, une diminution significative ( $P = 0,019$ ) de  $\log_{10} 3.6$  de la numération bactérienne, en comparaison avec le biofilm non traité a été observée (Figure 14b). Après un traitement prolongé de 24 h, une réduction moindre de la charge bactérienne du biofilm a été observée ( $P = 0,020$ ). (Figure 14a). Toutefois, la charge bactérienne du biofilm KPØRV non traité a commencé à diminuer après 24 h (Figure

14a) et est arrivé peu à peu à de faibles niveaux de manière significative par rapport aux biofilms traités de KPB5055 (données non présentées).

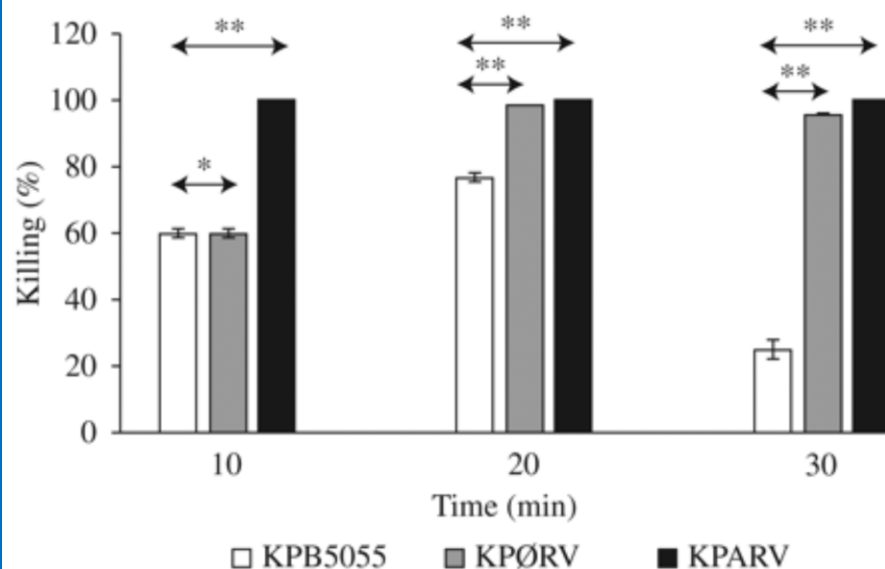


**Figure 14 : Une partie des biofilms a été soumise à un traitement antibiotique. (14)**

Pour les biofilms non traités il y a eu une augmentation progressive de la charge bactérienne jusqu'à 18 h après, ensuite cette charge a diminué progressivement (a). Mais dans les biofilms traités aux antibiotiques une réduction de la numération bactérienne a été observée après 12h de traitement antibiotique(b) (une valeur positive du log indique une diminution du nombre de bactéries, alors qu'une valeur négative indique une augmentation du nombre de bactéries). Les données sont présentées comme une moyenne  $\pm$ SD (n=3).

Dans les 10 min de l'interaction de KPB5055 avec des macrophages de souris, Une destruction des bactéries d'environ 60% a été observée dans les 10 premières minutes et le taux de destruction a augmenté de 76% en 20 min (Figure 15). Dans le cas de

KPØRV, le taux d'absorption des bactéries a été un peu plus élevé (52%) que celle observée pour KPB5055, mais le taux de destruction est resté de 60%. Ce taux est passé à 98% 30 min après. Dans le cas des souches KPARV, les taux d'absorption et de destruction des bactéries ont été très élevés à 99,69% et 99,99% respectivement (figure 5).



**Figure 15: Mort des trois isolats bactériens après incubation avec les macrophages péritonéaux de souris. (12)**

Dans cette étude, l'exposition des biofilms de *K.pneumoniae* à la ciprofloxacine a provoqué à fréquence élevée une production de souches résistante, malgré une baisse significative dans la numération bactérienne(17). Cette apparition de souches résistantes ne se limite pas au traitement antibiotique, mais aussi avec le traitement avec des bactériophages. La fréquence avec laquelle les souches bactériophage-résistants ont été produites a été élevée, bien inférieure à la fréquence pour la production de souches résistantes aux antibiotiques. Ainsi, comme suggéré précédemment, les traitements ont été appliqués en combinaison. Après un traitement combiné, la production de souches résistantes a été moindre par rapport aux traitements individuels. Cette observation est d'un intérêt particulier, car elle approuve la thèse selon laquelle la combinaison d'un bactériophage et d'un antibiotique est plus efficace. Les souches bactériophage-résistantes produites au

cours du traitement ont été éliminées par l'antibiotique, alors que les variantes résistantes aux antibiotiques ont été sensibles au bactériophage. Ceci est en accord avec une observation dans laquelle l'utilisation d'un bactériophage conçu, en association avec un antibiotique provoque une diminution de la fréquence de production de souches résistantes.

Comme démontré précédemment, le caractère de la résistance aux antibiotiques n'est pas permanent. La résistance permanente est apparue seulement après une exposition répétée à l'antibiotique. La résistance des souches KPARV aux antibiotiques a été accrue, non seulement à la ciprofloxacine, mais aussi à d'autres antibiotiques. Par conséquent, le traitement des infections associées aux biofilms en utilisant seulement un antibiotique comme la ciprofloxacine, n'est pas conseillé car il sélectionne des souches résistantes. Dans le cas de la souche bactériophage-résistant (KPØRV), la résistance a été permanente même après une exposition répétée. La souche bactériophage-résistant(KPØRV) a montré une sensibilité accrue à tous les antibiotiques testés.

Les souches KPARV et KPØRV ont produit beaucoup moins de biofilm que la souche mère. La raison de cette anomalie pourrait être la présence de petites quantités de SCP associés à la cellule, ce qui dans le cas de *K.pneumoniae*, agit comme un liant qui aide l'organisme à former des biofilms. Lorsque les variantes résistantes ont été soumises à la phagocytose, un taux plus élevé de mort a été observé par rapport à la souche mère. La phagocytose accrue et la mort pourrait être attribuée à la perte de la capsule de la bactérie. L'enzyme sécrétée par le bactériophage (dépolymérase) est connu pour dégrader la capsule de la bactérie, ce qui la rend sensible à l'attaque phagocytaire, ce qui peut empêcher la formation des souches résistantes au cours du traitement combiné, *in vivo*. Cela souligne l'importance de choisir des bactériophages à des fins thérapeutiques avec le plus grand soin. Seuls les bactériophages lytiques dont l'innocuité et l'efficacité ont été démontrées devraient être sélectionnés. La présence de l'enzyme dépolymérase des bactériophages serait un atout

supplémentaire. L'enzyme peut faciliter la propagation du bactériophage et l'aération du biofilm, ce qui augmente l'efficacité du traitement combiné tout en diminuant l'émergence des souches résistantes.

Comme le montre cette étude, les souches résistantes produites après les traitements respectifs peuvent ne pas être en mesure de produire des biofilms efficaces, mais leur présence dans la structure des biofilms peut aider les organismes à survivre à la présence d'antibiotiques(18). L'administration des bactériophages combinés avec des antibiotiques comme traitement complémentaire est fortement recommandée(19). En outre, il a été démontré que même conçus, les bactériophages pourraient être utilisés pour cibler les gènes bactériens, ce qui rend l'organisme sensible aux antibiotiques classiques.

En conclusion, l'efficacité de la ciprofloxacine en combinaison avec des bactériophages est démontrée non seulement par l'élimination importante du biofilm, mais aussi par la prévention de la formation des souches résistantes. Néanmoins, des études, y compris dans l'évaluation *in vivo* de la pathogénie des souches résistantes sont nécessaires pour examiner la question.

## **2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.**

### **2.1. GENERALITES.**

*Pseudomonas aeruginosa* est un petit bacille mobile grâce à son flagelle que l'on retrouve partout dans la nature, dans l'eau, le sol, les plantes, les animaux et l'homme. *P.aeruginosa* produit un pigment (colorant) bleu gris : la pyocyanine, d'où il tire son nom de bacille pyocyanique (nom usuel de la bactérie en France). Ce bacille est facilement mis en évidence en laboratoire, il est non sporulé et est de forme droite ou légèrement incurvée. Elle préfère les milieux humides et on la trouve quelquefois au niveau de la peau, de l'appareil respiratoire supérieur, de l'oreille externe et du tube digestif chez l'individu sain. Ce sont essentiellement les individus qui ont été traités

par antibiotiques, qui sont affaiblis sur le plan immunitaire ou qui ont été hospitalisés qui développent le plus facilement le bacille. Les infections à *P.aeruginosa* sont le plus souvent des infections d'origine nosocomiale. Ce terme concerne tout ce qui est relatif aux hôpitaux. (5)

Pour que *P.aeruginosa* devienne pathogène, l'organisme doit présenter une rupture de la barrière de protection, autrement dit une plaie au niveau de la peau ou des muqueuses (couche de cellules de protection et de recouvrement des organes creux en contact avec l'air, comme la bouche entre autres). Cette rupture de la barrière de protection est secondaire à un traumatisme (coupure, égratignure, abrasion), une brûlure, une intervention chirurgicale, une intubation endotrachéale (pénétration d'un tube directement dans la trachée), un cathéter urinaire. Les toxicomanes sont particulièrement sensibles à ces bactéries.

Le plus souvent, *P. aeruginosa* se fixe par l'intermédiaire d'une colonisation sur la peau, superficiellement mais aussi sur une muqueuse. On assiste ensuite à une invasion bactérienne qui, au départ, est localisée puis qui a tendance à envahir les tissus sous-jacents et enfin à gagner la circulation sanguine où ces bactéries sont responsables de septicémies et quelquefois de décès (6). Mais l'infection ne se généralise pas obligatoirement, et quelquefois reste localisée ou se diffuse directement aux structures voisines. *P.aeruginosa* fabrique d'autre part une endotoxine (pouvant participer à la septicémie).

## **2.2. INFECTIONS A PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

### **❖ VOIES AERIENNES SUPERIEURES**

Elle touche essentiellement les poumons chez le patient immunodéprimé. On note l'apparition d'une pneumonie primaire survenant chez les patients ayant déjà une maladie pulmonaire chronique, au cours d'une insuffisance de fonctionnement de la pompe cardiaque, d'un sida, chez les personnes hospitalisées dans une structure de réanimation, celles qui sont soumises à une ventilation artificielle, les malades traités pour un cancer du sang (surtout après avoir reçu des médicaments affaiblissants les globules blancs). *P.aeruginosa* survient également chez les patients présentant une mucoviscidose(5). Les symptômes sont les suivants: hyperthermie, sueur, dyspnée (difficulté respiratoire) sévère, cyanose (coloration en bleu-violet des tissus, notamment de la peau) traduisant le déficit d'apport en oxygène au niveau de ces tissus, toux avec ramenant des glaires, angoisse, confusion.

### ❖ SEPTICEMIES

Ce germe est fréquemment responsable de septicémies mortelles surtout chez les patients immunodéprimés. Ce sont les infections urinaires, des poumons, du système digestif, de la peau qui sont à l'origine des septicémies. Les symptômes sont les suivants: hyperthermie, polypnée (fréquence de respiration anormalement élevée), tachycardie, atteinte importante de l'état général, désorientation, Confusion Obnubilation (quelquefois), ecthyma gangrenosum(5).

Ces lésions sont spécifiques d'une infection par cette bactérie qui se caractérise par une atteinte de la peau apparaissant chez certains patients septicémiques. Les lésions débutent par une vésicule de petite taille, de nature hémorragique, autour de laquelle s'organise une zone érythémateuse (rose ou rouge). L'évolution de ce fait vers une nécrose (destruction du tissu au centre) et une ulcération (apparition d'une plaie après creusement de la lésion). L'ecthyma gangrenosum apparaît en petit nombre au niveau des fesses, du périnée (zone où se trouvent les organes génitaux externes et l'anus), des extrémités du creux axillaire (à la jonction des bras et du thorax : l'aisselle) et moins souvent dans d'autres endroits. Les muqueuses qui peuvent être atteintes par cette pathologie sont celles de la bouche avec les gencives.

### ❖ ENDOCARDITES

Ce sont essentiellement les toxicomanes pratiquant des injections intraveineuses de stupéfiants qui souffrent d'inflammation et d'infections des valves cardiaques. *P.aeruginosa* semble provenir de l'eau utilisée pour effectuer ces injections. Or, ce germe possède un tropisme pour les cellules recouvrant l'intérieur du cœur (endocardite). Ce sont essentiellement les valves tricuspides (entre l'oreillette droite et le ventricule droit) qui sont atteintes. Néanmoins, les autres valves (mitrale, aortique, pulmonaire) sont également concernées par cette pathologie mais moins fréquemment(5). L'évolution de l'endocardite à *P.aeruginosa* s'accompagne le plus souvent d'une embolie pulmonaire septique (obstruction des vaisseaux sanguins du poumon par des caillots sanguins d'origine infectieuse) accompagnée d'une atteinte du cervelet, d'abcès du cerveau, d'infarctus splénique (diminution de la circulation sanguine à l'origine d'une destruction des tissus composant la rate). Les symptômes sont : hyperthermie, présence d'un souffle (bruit que fait le sang en passant par ses valves qui ont perdu leur étanchéité), toux expliquant l'infection pulmonaire et l'embolie et douleurs du thorax dues à l'atteinte des plèvres (membranes recouvrant et protégeant les poumons).

### ❖ INFECTIONS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Ce sont généralement des traumatismes directs au niveau de la face: une intervention chirurgicale (plus particulièrement neurochirurgicale), une exploration à l'aide d'un instrument souillé (ponction lombaire, rachianesthésie), une infection des voies urinaires, des poumons, de l'endocarde, une maladie sous-jacente (cancer de la tête, du cou) qui entraînent un envahissement du sang par les bactéries pathogènes. Ces pathologies surviennent chez les patients dans un état de faiblesse avancée et immunodéprimé.

### ❖ INFECTIONS AURICULAIRES

Ce type d'infection est relativement fréquent et touche spécifiquement le conduit auditif externe, essentiellement chez les sujets qui sont en contact fréquent avec l'eau (« oreilles des piscines ») (5). *P.aeruginosa* adore les milieux humides et de ce fait il se multiplie plus rapidement dans cet environnement. Cette bactérie est également à l'origine d'otite externe maligne apparaissant le plus souvent chez les personnes âgées et diabétiques. Elle a également été rapportée de façon occasionnelle chez des jeunes enfants présentant d'autres pathologies.

### ❖ INFECTIONS OCCULAIRES

*P.aeruginosa* est responsable de kératite (inflammation de la cornée), d'ulcères de la cornée et d'infection du globe oculaire. Généralement, on retrouve un léger traumatisme de la cornée à l'origine d'une rupture de la membrane de protection de celle-ci, ce qui permet la pénétration des germes qui envahissent les tissus sous-jacents et provoquent l'infection et les ulcères. Ces ulcères sont également retrouvés à la suite du port de lentilles, essentiellement de lentilles souples. Néanmoins, les patients qui ont eu un séjour en soins intensifs et qui ont une irradiation oculaire ou une trachéotomie, sont susceptibles de présenter une infection oculaire à *P.aeruginosa*.

### ❖ INFECTIONS OSSEUSES ARTICULAIRES

Ce sont essentiellement les vertèbres qui sont touchées, faisant suite à une infection des voies urinaires ou à une intervention chirurgicale sur l'appareil urogénital. Les toxicomanies par voie intraveineuse peuvent également entraîner ce type d'infection. Les vertèbres intéressées par cette pathologie sont essentiellement les vertèbres lombaires et le sacrum. Chez l'individu jeune, ce sont les vertèbres cervicales et les vertèbres sacrées qui sont affectées.

### ❖ INFECTIONS DES VOIES URINAIRES

*P.aeruginosa* est fréquemment responsable d'infections urinaires. Celles-ci ayant comme facteurs de risque une affection de la prostate, présence d'un calcul, d'une affection sanguine qui se propage, présence d'une sonde urinaire, d'une obstruction quelconque des voies urinaires, d'une intervention chirurgicale et de malformations anatomiques du tractus urinaire chez les patients paraplégiques (paralysie des deux membres supérieurs ou inférieurs) (5).

### ❖ INFECTIONS DE LA PEAU ET DES TISSUS MOUX

Les pyodermites sont des lésions dues à *P.aeruginosa* qui commencent généralement par une vésicule et donnent lieu à des hémorragies et à une nécrose. Ce germe peut occasionnellement entraîner une gangrène des extrémités, du périnée, du visage et de la partie supérieure du pharynx. Cette variété de lésions survient après un traumatisme, une abrasion de la peau (égratignure), une brûlure, une plaie, une escarre chez une personne constamment alitée. *P.aeruginosa* se complaît dans les milieux humides, c'est pour cette raison que les macérations du périnée faisant suite au port de couches chez le bébé ou l'enfant plus grand entraînent la survenue de pyodermites. Cette pathologie survient également chez les individus présentant une diminution du nombre de leurs globules blancs (leucopénie). Une des caractéristiques de la pyodermite à *P.aeruginosa* est la présence d'un écoulement de coloration bleue tirant sur le gris associée à une odeur fruitée caractéristique.

## 2.3. ESSAI DE TRAITEMENT AVEC LES PHAGES

Les souches de *P.aeruginosa* utilisées dans cette étude sont dénommées (lumi PKA) nous avons utilisé 10 souches de colonisation primaire et 10 souches de colonisation chronique de *P. aeruginosa*. Le bactériophage P1-PAK a été isolé à partir des eaux usées. Pour les expériences sur les animaux.(21)

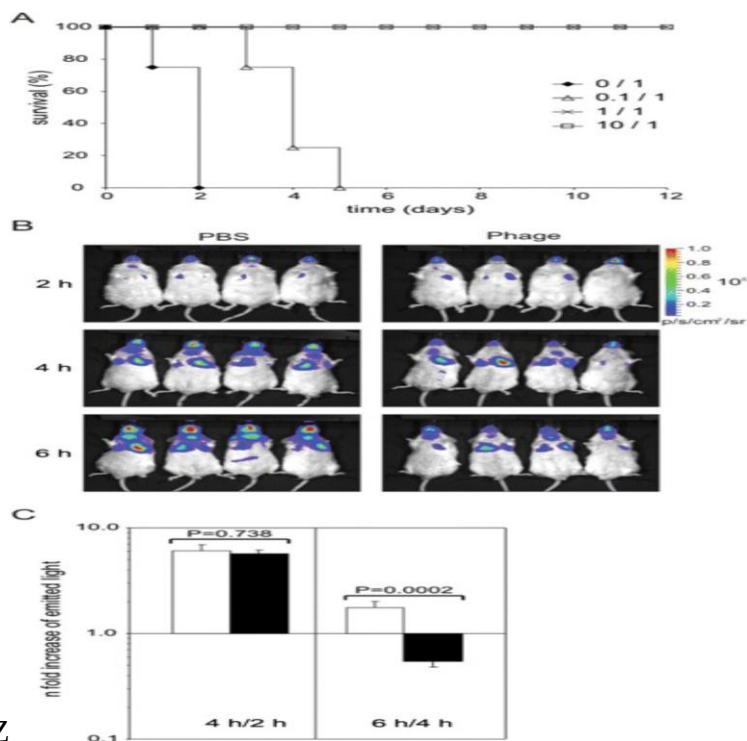
Les souris ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale (IP) d'un mélange de kétamine-xylidine avant d'être infectés. La dose infectieuse est de  $1 \times 10^7$  bactéries luminescentes. Dans les expériences curatives, l'instillation de la bioluminescence

bactérienne a été enregistrée après administration par voies intranasale de 30 ml de bactériophages alors que les souris étaient encore endormies. Dans les expériences préventives, 24 h avant l'infection des animaux par voie intranasale ils ont reçu 30  $\mu$ L de bactériophages sous une légère anesthésie par inhalation d'isofluorane. L'émission de photons de la bactérie luminescente dans les poumons des souris infectées a été quantifiée en utilisant un système d'imagerie. Après l'infection, les souris ont été anesthésiées par inhalation à isofluorane et la luminescence des bactéries a été enregistrée au moyen d'une caméra à couplage de charge dispositif. Une image numérique en fausses couleurs émettant des photons a été générée, et les photons ont été comptés dans une zone définie correspondant à la surface de la poitrine et englobant la région du poumon entier. Toutes les données ont été normalisées en soustrayant le niveau de fond moyen obtenu à partir d'animaux non infectés. L'émission de photons a été exprimé en photons/s /cm<sup>2</sup> /stéradian. Les images montrées pour chaque expérience ont été directement prises à partir d'un logiciel dans le quelle l'échelle des couleurs est identique pour chaque image. Les lavages broncho-alvéolaires (LBA, 4 lavages de 0,5 ml chacune) ont été effectués après l'infection. Une partie du liquide obtenu après le lavage a été centrifugé puis les concentrations de cytokine murine ont été déterminées. Une autre partie du liquide a été centrifugé et les surnageant ont été dilués et étalés sur des plaques recouvertes de la souche PAK pour déterminer le nombre des bactériophages libres.

L'analyse statistique des valeurs P a été faite avec le test t-non apparié. Les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  erreur-type de la moyenne.

On a isolé à partir des eaux usées d'un bactériophage spécifique à la souche PAK de *P.aeruginosa* que nous avons nommée PAK-P1. Pour déterminer l'effet du bactériophage P1-PAK sur l'infection dans un modèle animal d'infection du poumon en direct, les souris ont été infectées par la souche PAK bioluminescentes, puis traitées avec des bactériophages. Les bactéries et les bactériophages ont été administrés au moyen d'instillation intranasale. Une expérience a été conçue pour déterminer le nombre de bactériophage nécessaires pour bien guérir des souris

infectées (figure 1a ). Bien que les souris non traitées par les phages sont mortes dans les 48 h après l'inoculation avec PAK (la plupart d'entre eux étaient encore vivants après 24 h), les souris traitées avec des bactériophages dans un rapport phage à la bactérie de 1/10 sont mortes dans les 5 jours après l'inoculation avec PAK. Les souris traitées avec des rapports de bactériophages à bactérie supérieur (1/1 et 10/1) ont survécus jusqu'à la fin de l'expérience (12h). En 2 expériences indépendantes, 100% des animaux traités avec la dose 10/1 ont survécu, alors que 100% et 80% des animaux traités avec la dose 01/1 ont survécu, ce qui a conduit à choisir le bactériophage ratio de 10/1 pour l'expérience.



**Figure 16** : Effet du traitement de l'infection chez la souris par le bactériophage.

A courbe de survie des animaux infectés et traités par des bactériophages à des taux indiqués. (22)

La quantité de bactéries nécessaires pour provoquer une infection pulmonaire mortelle par voie intranasal a été fixée à  $1 \times 10^7$  bactéries, parce qu'on a constaté que 100% des souris ont survécu à une dose de  $5 \times 10^7$  bactéries pour un maximum de 4 jours et une dose de  $1,5 \times 10^7$  bactéries a été mortelle pour 100% des souris dans les 24h.

### **B exemple de courbes de survie des souris infectées et traitées par des bactériophages à un ratio de 10:1**

L'exemple des courbes d'images en temps de souris infectées par *P.aeruginosa* bioluminescent et traitées avec du PBS (à gauche) ou traitées avec le bactériophage P1-PAK à une bactérie à ratio de 10:1 bactériophage (à droite).

### **C quantification de la lumière émise**

Étant donné que le ratio entre le temps de 2 points (à gauche 4 h / 2 h à droite 6 h / 4 h), la quantité de lumière émise par la région de la poitrine des souris infectées ( $n=12$ ) à partir de 2 expériences indépendantes) traitées avec du PBS (barres blanches) ou traitées avec le bactériophage P1-PAK à une bactérie à phage ratio de 10:01 (barres noires) a été quantifiée. Les barres indiquent la moyenne, et les barres d'erreur indiquent l'erreur standard.  $p/s/cm^2/sr$ , photons/s/cm<sup>2</sup>/stéradian.

Un bactériophage actif a été nécessaire pour soigner les souris. Ces souris traitées avec une solution de bactériophage P1-PKA tué 2 h après l'infection sont mortes à la même vitesse que les souris non traitées (données non présentées). Afin de déterminer si le traitement bactériophage P1-PAK est inoffensif pour les animaux, une dose 10 fois plus élevée a été administrée par voie intranasale à un groupe de souris ( $n= 8$ ), et leur comportement a été suivi pendant 10 jours. Ces souris n'ont pas montré un comportement erratique, leur fourrure est restée régulière et elles n'ont pas pris de poids, ce qui suggère que l'administration du bactériophage n'a eu aucun effet négatif sur eux.

La vitesse à laquelle le bactériophage P1-PAK a été en mesure d'éliminer les bactéries *in vivo* a été estimée par la quantification de la lumière émise par les bactéries bioluminescences de souris vivantes pendant les premières heures de l'infection (figure 16B). Les échantillons ont d'abord été inoculés avec la souche PAK puis avec le bactériophage P1-PAK 2 h plus tard. Entre 2 et 4 h après l'infection bactérienne, la

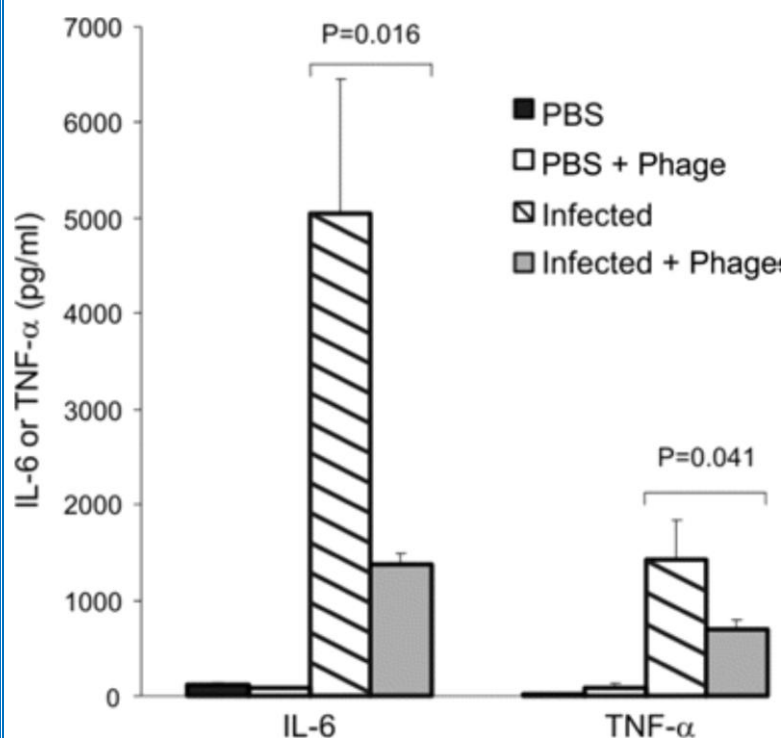
quantité de lumière émise par les souris traitées et la quantité de lumière émise par celles non traitées n'ont montré aucune différence statistiquement significative, ce qui démontre que l'évolution initiale de l'infection était similaire dans les deux groupes pendant les 4 premières heures (*figure16C*). Toutefois, 6h après (soit 4 h après le bactériophage a été administré), la quantité de lumière émise par les souris traitées a été significativement réduite par rapport à la quantité de lumière émise par les souris non traitées, suggérant l'élimination des bactéries par des bactériophages. 24 h après le début de l'infection, les souris traitées par les phages ont montré des points faibles de lumière, alors que les souris non traitées par les phages étaient mortes ou très lumineuses (données non présentées). Ceci suggère que la quantité de bactéries est fortement diminuée chez les souris traitées par phage.

On a ensuite mesuré la charge bactérienne et le nombre de bactériophage après 24 h d'infection. Comme prévu, aucun des bactériophages n'a été détecté dans le groupe de souris non traitées par les phages, et le nombre moyen de bactéries a été de  $1.6 \times 10^8$  bactéries /ml ( $n = 2$ ). En revanche, seulement  $1.5 \times 10^2$  bactéries /ml, et  $2 \times 10^7$  bactériophages / ml, a été retrouvé dans le groupe de souris traitées par les phages ( $n=4$ ). En comparaison, le bactériophage P1-PAK a été détecté à une concentration de  $3,1 \times 10^6$  bactériophages / souris traitées ( $n=4$ ) dans le groupe non infecté. Ce qui confirme que les bactériophages se multiplient dans les poumons des souris infectées et non infectées.

Dans les expériences ci-dessus, les bactériophages ont été instillés 2h après l'inoculation avec la bactérie, mais à ce point, le temps peut ne pas correspondre à un état infectieux. Pour avoir plus de certitude sur l'infection, on a mesuré le niveau de lactate déshydrogénase (une enzyme libérée lorsque l'intégrité de la cellule est endommagée) présents dans le groupe 6h après l'infection. Par rapport aux témoins (PBS des souris traitées avec bactériophages seulement), les niveaux de lactate déshydrogénase chez les souris non traitées et les souris traités étaient de 3,7 fois et 3,1 fois plus élevée respectivement, montrant clairement qu'à ce point dans le temps,

l'atteinte des poumons a été équivalente dans les 2 groupes de souris infectées (données non présentées).

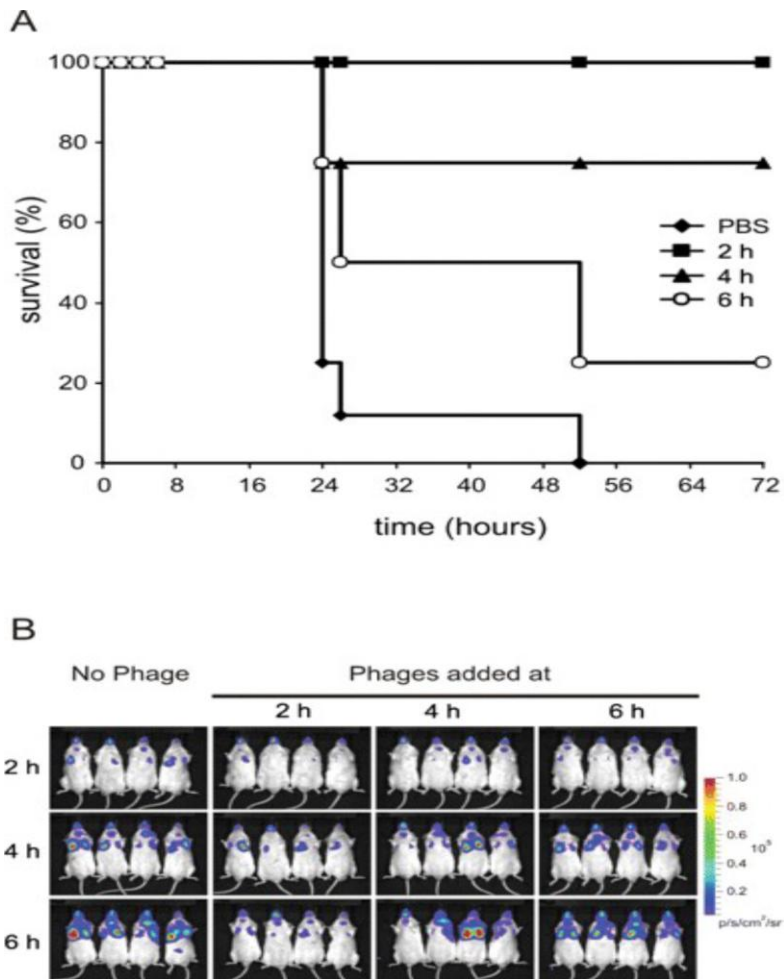
On a supposé que si les bactériophages sont capables de tuer les bactéries *in vivo*, ce qui conduit à une réduction du nombre de ces bactéries dans les poumons, la réponse inflammatoire (la première ligne de défense de l'hôte contre les agents pathogènes envahisseurs) devrait être inférieure. À 24 h après l'infection au niveau de 2 marqueurs de l'inflammation le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine (IL-6), connue pour être induite par une provocation bactérienne ont été évalués dans le groupe de souris non traitées et le groupe de souris traitée par les phages (*figure 17*). IL-6 et TNF- $\alpha$  ont augmenté chez les souris infectées (à la fois ceux qui ont été traitées avec les bactériophages et ceux non traitées) comparativement aux témoins non infectés, ce qui confirme que l'infection avait commencé dans les deux groupes. Toutefois, ces niveaux ont été statistiquement et significativement réduits dans le groupe traité en comparaison avec le groupe non traité, ce qui confirme que la réduction du nombre de bactéries par traitement de bactériophage atténue la réponse inflammatoire de l'hôte. A 48 h après l'infection, les niveaux d'IL-6 et TNF- $\alpha$  sont retournés aux valeurs de base dans le groupe traité (données non présentées). Il convient également de noter que les niveaux d'IL-6 et TNF- $\alpha$  ont été aussi faible chez les souris non infectées et traitées comme les niveaux chez les animaux qui ont reçu une solution de PBS, ce qui montre que les bactériophages seuls ne semblent pas stimuler une réponse inflammatoire (*figure 17*).



**Figure 17 : Réduction de l'inflammation après traitement par les bactériophages.**  
(22)

Les niveaux de cytokines ont été mesurés dans lavages broncho-alvéolaires de souris ( $n = 4$ ) 24 h après l'instillation de solution saline tamponnée au-phosphate (PBS) (barres noires), et bactériophage P1-PAK (barres blanches). les bactéries avec du PBS 2 h plus tard (en barres hachuré) ou des bactéries avec les bactériophages 2h après (barres grises). Les barres indiquent la moyenne, et les barres d'erreur indiquent l'erreur standard.

On a ensuite déterminé le délai maximum possible de traitement pour maintenir un taux de survie des souris de 100% par l'administration du traitement à 2, 4, ou 6 h après l'infection. Bien que 100% des souris ont survécu dans le groupe traité avec les phages 2 h après l'infection, à 24 h seulement 75% des souris étaient encore en vie dans les groupes traités 4 ou 6 h après l'infection. À 72 h, la survie était proche pour le groupe de 2h (100% des souris) et 4 h du groupe (75% des souris), mais avait chuté à 25% pour le groupe de 6h (figure 18A). Ces résultats pourraient être prévus sur l'examen des images bioluminescentes à des temps précoces (figure 18B). Ces expériences ont montré que le traitement bactériophage devait être administré 2 heures après l'infection pour atteindre 100% de survie chez les souris infectées.



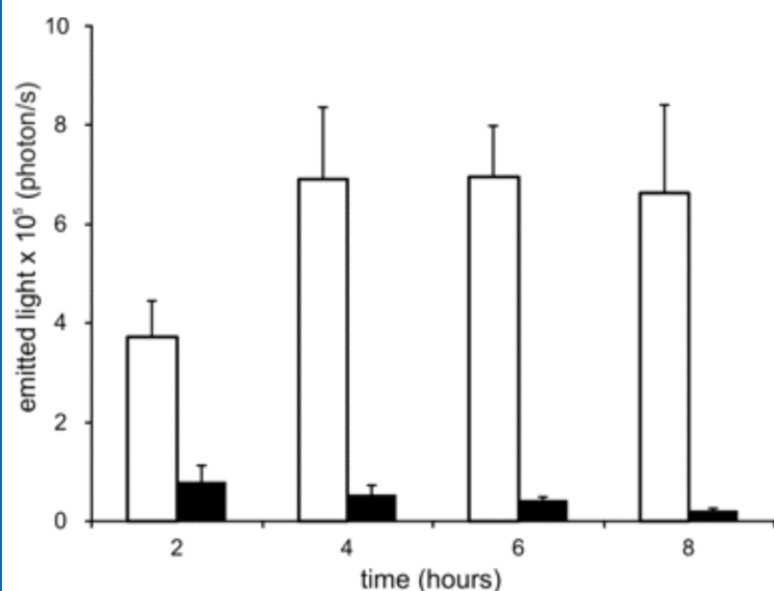
**Figure 18**

A- Images en temps de traitement des bactériophages. Les courbes de survie des souris infectées et traitées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS)(diamants) ou avec le bactériophage P1-PAK à un ratio de phage-bactérie de 10:1 à 2 h(carrés), à 4h(triangles) ou à 6h(cercles) après l'infection.(22)

B- Images correspondant aux points dans le temps au début de l'expérience présentée dans la partie A  $p/s/cm^2/sr$ , photons/s/  $cm^2$ /stéradian.

On n'a pas observé de développement de l'infection chez les souris traitées par les phages parce que les bactériophages administrés chez les souris non infectées ont persisté dans des quantités raisonnables dans les poumons pendant au moins 24 h, on a vérifié si le prétraitement par les bactériophages pouvait prévenir une infection ultérieure. Deux groupes de souris, 1 groupe traité par voie intranasale avec  $1 \times 10^8$  de bactériophages PAK et 1autre traité par même voie avec un tampon ont été infectés

24 h après avec  $1 \times 10^7$  bactéries. Après 2 h, la quantité de lumière émise à partir des souris dans le groupe pré traité a été environ 5 fois inférieure à celle émise par les souris dans le groupe non pré traité (*figure 19*). La Surveillance a confirmé que la charge bactérienne a diminué chez les souris prétraitées et augmenté chez les souris non prétraitées (*figure 19*). Enfin, 100% des souris prétraitées ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience (16 h), alors que 100% des souris non traitées sont mortes dans les 2 h.



***Figure 19. Efficacité du prétraitement par les bactériophages 24 h avant l'infection.(22)***

Il est représenté au cours du temps de la lumière émise (en photons / s) de la région de la poitrine des souris prétraitées avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (barres blanches) ou avec bactériophage P1-PAK (barres noires) 24 h avant l'infection par *P.aeruginosa* ( $n = 4$  pour chaque groupe). Les barres indiquent la moyenne, et les barres d'erreur indiquent l'erreur standard.

Les expériences démontrent que la technologie non invasive par bioluminescence est remarquablement utile pour évaluer l'efficacité du traitement des bactériophages et surtout pour l'étude cinétique de l'infection à différents moments sans tuer les souris. Par exemple, au cours du temps de l'expérience, afin de déterminer le moment optimal pour administrer les bactériophages après le début de l'infection, la

bioluminescence a aidé à comprendre pourquoi l'inoculation précoce des bactériophages (2 h après l'infection) a été si importante dans le traitement de l'infection. C'est au cours de ce stade précoce de l'infection (tel que confirmé par les niveaux de lactate déshydrogénase) que la multiplication des bactéries est la plus rapide. Dans ces conditions, la sensibilité des bactéries aux bactériophages est également à son plus haut. L'infection est réduite à une réduction de la réponse inflammatoire chez l'hôte comme le montrent les niveaux d'IL-6 et TNF- $\alpha$ . L'efficacité rapide des bactériophages en tuant les bactéries à l'intérieur des poumons suggère qu'il n'existe pas de facteur cellulaire spécifique (par exemple, protéases) assez active pour éviter d'infecter les bactéries. Par conséquent, il est possible qu'un bactériophage efficace *in vitro* puisse être aussi efficace *in vivo*. Cette hypothèse doit encore être prouvée, et si elle a été confirmée pour les poumons, elle ne serait pas nécessairement applicable à d'autres organes.

Le choix d'utiliser une voie naturelle pour l'infection et le traitement a permis de démontrer que les infections des voies respiratoires supérieure et inférieure peuvent être traitées avec des bactériophages. Plus intéressant, on a démontré que les bactériophages peuvent activement prévenir la survenue d'une infection et fournir une protection à 100% lorsqu'il est administré 24 heures avant. Les résultats ont montré que les bactériophages ne sont pas rapidement éliminés dans les poumons. Un tel effet n'a pas été anticipé, car il est généralement indiqué que les bactériophages sont rapidement éliminés de l'organisme. Cette observation suggère qu'un traitement préventif pourrait encore être efficace si les bactériophages sont administrés 48 ou 72 h avant le début de l'infection ou si le nombre de bactériophages est réduit lorsqu'il est administré 24 h avant l'infection. Ces possibilités permettent d'élargir les applications des bactériophages pour prévenir les infections. Sur la base du faible niveau de cytokines induite par les de bactériophages, on peut considérer que l'effet préventif est seulement due aux bactériophages plutôt que due à une réaction inflammatoire. Cependant, on ne peut pas exclure la possibilité que les

bactériophages pourraient induire l'activité phagocytaire des cellules comme les macrophages vers les bactéries.

Pris ensemble, ces résultats indiquent clairement la possibilité d'utiliser des bactériophages pour la prévention des infections pulmonaires bactériennes. Par exemple, une possibilité est le prétraitement des populations à risque de ces infections (patients immunodéprimés ou des patients atteints de fibrose kystique) pour diminuer la probabilité d'infection dans les lieux où les patients sont plus susceptibles d'être infectés par des bactéries (par exemple les centres de soins ou les hôpitaux). Ceci est particulièrement pertinent dans les situations où une souche épidémique est identifiée et pour lesquelles un traitement préventif avec des bactériophages spécifiques pourraient être utilisé pour limiter sa propagation. Ces souches épidémiques ont été rapportées précédemment pour *P. aeruginosa* dans les centres de traitement de la fibrose kystique.

En conclusion, ce travail prend en charge l'utilisation potentielle des bactériophages pour lutter contre les agents pathogènes responsables d'infections pulmonaires et de développer une application pour prévenir ces infections. Avec l'utilisation de bactéries bioluminescentes, il est désormais possible de comparer plusieurs bactériophages (en utilisant un petit nombre d'animaux) afin d'établir un classement des souches pour les thérapies basées sur leur réelle efficacité *in vivo* au lieu de leur performance *in vitro*.

### **3. LES STAPHYLOCOQUES**

#### **3.1. GENERALITES**

Les staphylocoques sont des cocci à gram positif très répandus dans la nature (sol, eau, air) et responsables d'un grand nombre de pathologie chez l'homme. Ces bactéries survivent et prolifèrent du fait de leur particulière résistance aux conditions

hostiles de l'environnement telles que la chaleur, la sécheresse ou la salinité de l'eau. Ainsi près de 50% des sujets normaux sont porteurs de différents espèces de staphylocoques (nez, gorge, peau). Actuellement, on distingue 44 espèces, et L'espèce *S.aureus* (plus communément appelé staphylocoque doré) se distingue généralement des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulase négative (SCN) par la présence d'une coagulase(5).

Il est important de distinguer *S.aureus* des SCN. *S.aureus* a un potentiel de pathogénique très important et est responsable aussi bien d'infections communautaires que nosocomiales. Par opposition, les SCN sont en règle générale des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales.

### **3.2. LES DIFFERENTES SOUCHES**

#### **❖ STAPHYLOCOQUE AUREUS**

Il est responsable d'infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que de syndromes liés à l'action de toxines.

##### **▪ INFECTIONS SUPPURATIVES SUPERFICIELLES ET PROFONDES**

Les infections à *S.aureus* les plus fréquentes sont des infections cutanéomuqueuses telles que les folliculites, l'impétigo, les furoncles, l'anthrax, le panaris, les cellulites ou les sinusites et les otites. Il s'agit le plus souvent d'auto-infestations. *S.aureus* peut être responsable de septicémies, d'endocardites, de pneumopathies, d'ostéomyélites, d'arthrites, de méningites ou d'infections urinaires. La gravité des septicémies à *S.aureus* tient tant au risque de survenue de choc staphylococcique qu'à la localisation de métastases septiques. Une des complications des septicémies à *S.aureus* est la survenue d'endocardite infectieuse.

##### **▪ LES SYNDROMES CUTANES STAPHYLOCOCCIQUES**

Le syndrome de la peau ébouillantée chez les jeunes enfants (Staphylococcal Scalded

Skin Syndrome) est provoqué par la diffusion d'exfoliatines. Ce syndrome est appelé syndrome de Ritter chez les nouveau-nés. Le foyer initial peut être ORL, conjonctival ou cutané. Ce syndrome se rencontre dans la grande majorité chez le jeune enfant mais peut aussi se rencontrer chez l'adulte immunodéprimé et les patients atteints d'insuffisance rénale. Le syndrome d'exfoliation généralisée se caractérise par une érythrodermie douloureuse, rapidement suivie d'un décollement bulleux généralisé régressant en quelques jours. L'évolution est bénigne et est favorisée par un traitement antibiotique mais ne doit pas faire oublier le risque d'évolution mortelle estimé à environ 4% en cas de retard de traitement antibiotique(5).

#### ▪ LES INTOXICATIONS ALIMENTAIRES

Elles sont provoquées par l'ingestion d'entérotoxine. Ces toxines thermostables sont produites par les souches de *S.aureus* contaminant les aliments. Les aliments le plus souvent incriminés sont les produits laitiers et la viande. L'intoxication est caractérisée par une incubation courte (1 à 6 heures après ingestion), des crampes abdominales douloureuses, des diarrhées, des vomissements et l'absence de fièvre. L'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement mais la survenue de choc toxique staphylococcique est possible lors d'une intoxication massive. En fonction des études, les intoxications alimentaires à *S.aureus* représenteraient 15 à 30% des intoxications alimentaires.

En dehors de ces pathologies, les toxines antigéniques staphylococciques pourraient être impliquées dans l'étiologie du syndrome de Kawasaki, la mort subite du nourrisson et semblent au moins représenter un facteur aggravant de l'eczéma atopique.

#### ❖ LES STAPHYLOCOQUES A COAGULASES NEGATIVE

La majorité des staphylocoques à coagulase négative sont des bactéries opportunistes essentiellement responsables d'infections nosocomiales. Trois facteurs favorisent ces

infections : l'immunodépression, la présence de cathéters veineux ou de matériaux prothétiques, la multi résistance des SCN aux antibiotiques. *S.epidermidis* est l'espèce la plus fréquemment isolée en milieu hospitalier. Il peut provoquer des infections chez les sujets porteurs de matériel étranger (cathéter intravasculaire, prothèse ostéo-articulaire, boîtier de stimulation cardiaque, valve de dérivation du liquide céphalo-rachidien). La production d'exopolysaccharides augmente sa capacité d'adhésion aux biomatériaux et va empêcher la pénétration des antibiotiques, rendant leur éradication difficile. *S.epidermidis* est aussi responsable de septicémies notamment dans les services d'oncologie et de néonatalogie, de péritonites chez les patients en dialyse péritonéale, d'endocardites surtout chez les sujets porteurs de prothèse valvulaire cardiaque, d'infections sur valve de dérivation du liquide céphalo-rachidien. *S.haemolyticus* est la seconde espèce responsable d'infections humaines, en particulier de suppurations, d'infections urinaires et de septicémies. Au sein des SCN, deux espèces sont responsables d'infections communautaires : *S.saprophyticus* par ses capacités à adhérer à l'épithélium vésical provoque des cystites chez les jeunes femmes et *S.lugdunensis* est responsable d'infections cutanées et d'endocardites infectieuses.

Pour qu'une bactérie colonise un tissu(6), il faut au préalable qu'elle y adhère. Cette étape est déterminante dans le développement ultérieur de l'infection. *S.aureus* colonise la peau et les muqueuses en adhérant aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire. La colonisation est favorisée par toute effraction de la barrière cutanéomuqueuse. Plusieurs constituants staphylococciques interviennent dans ce phénomène. *S.aureus* possède un grand nombre de protéines exposées à la surface de la bactérie et qui ont la capacité de se fixer sur des molécules de l'hôte. Ce sont des adhésines et elles reconnaissent les molécules de la matrice extracellulaire. Cette matrice extracellulaire est composée de molécules de collagène, d'élastine, de protéoglycane et de glycoprotéines interagissant entre elles et avec les cellules environnantes. 90% des souches cliniques de *S.aureus* produisent une capsule composée d'exopolysaccharides. La coagulase se lie à la prothrombine et forme un

complexe appelé staphylothrombine(6). Le complexe staphylothrombinique entraîne la polymérisation du fibrinogène en fibrine et la formation d'un caillot protégeant ainsi la bactérie de la phagocytose. *S.aureus* produit plusieurs toxines (hémolysine a b d et les toxines synergohmynenotropes) ayant pour cible les membranes cellulaires. Ces toxines se fixent à des cellules cibles et provoquent la formation de canaux membranaires laissant passer les ions. L'hémolysine-alpha a pour cible la cellule endothéliale, les monocytes et les thrombocytes. La destruction des cellules endothéliales favorise la dissémination des bactéries et les métastases septiques à distance. L'hémolysine bêta et l'hémolysine delta créent des lésions cellulaires. L'hémolysine bêta est une sphingomyélinase qui altère les membranes riches en lipides et l'hémolysine delta possède des propriétés détergentes. Les autres enzymes produites par *S.aureus* capables de dégrader le tissu conjonctif comme les protéases, l'élastase et la hyaluronidase, favorisent l'extension du foyer infecté.

### **3.3. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES**

Dans cette étude, on a utilisé une population de bactériophages lytiques P-27/HP polyvalente isolé à partir de l'eau d'égout et efficace contre un large éventail de maladies humaines associées au staphylocoques. Le bactériophage P-27/HP a montré une forte efficacité lytique pour éliminer *S.aureus* 27/HP en dessous du seuil significatif de rates de souris infectées expérimentalement. Les Souches de *S.aureus* ont été isolées à partir des échantillons cliniques humains (provenant de l'acné, du sang, du liquide céphalo-rachidien, de l'oreille, des yeux, du nez, de la gorge, et des plaies) recueillies dans les hôpitaux(24). Les Isolats de *S.aureus* ont été testés pour leur sensibilité à 12 antibiotiques couramment utilisés (30 mg d'amikacine, 10 mg d'ampicilline, 30 mg de céphalexine, 30mg de chloramphénicol, 5 mg de ciprofloxacine, 10 mg de gentamicine, 10 mg à la méticilline, 10 U de pénicilline G, 5 mg rifampicine, 30 mg roxithromycine, 30 mg de tétracycline et 30 mg de vancomycine). Les tests de sécurité du bactériophage P-27/HP ont été menés chez la

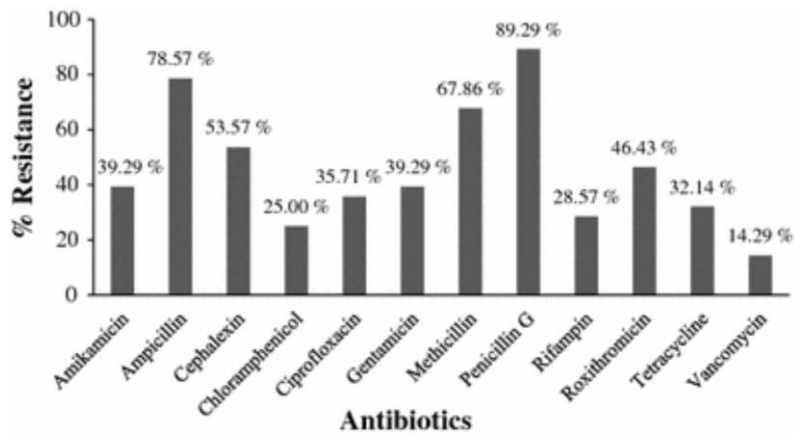
souris. Quatre groupes distincts de cinq souris chacun ont été injecté avec le bactériophage P-27/HP ( $10^8$  UFP / souris) par voie intramusculaire, sous-cutanée, intraveineuse et intra-péritonéale et ont été maintenus sous surveillance constante dans des conditions idéales pendant 20 jours.

Ensuite 500 ml de la culture de *S.aureus* 27/HP a été inoculé avec le bactériophage P-27/HP et incubées à 37°C. Une lyse complète s'est produite. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation et un surnageant clair a été filtré pour obtenir un stock de bactériophages homogènes. La stérilité du stock de bactériophages a été vérifiée sur la plaque de gélose et le titre de bactériophage a été déterminé par dosage de plaque en utilisant la méthode de superposition soft-agar.

L'efficacité *in vivo* des bactériophages P-27/HP contre la *S.aureus* 27/HP a été évaluée chez des souris adultes pesant de 18 à 20 g. Ils ont été subdivisés en trois groupes (G1-G3) de cinq souris chacun, marqué avec un contrôle négatif pour le G1, un contrôle positif pour G2 et un traitement du G3 par le bactériophage P-27/HP.

Les souris G1 ont été injectés avec 0,2 ml de solution stérile, alors que les souris de G2 et G3 ont été injectés avec 0,2 ml de la culture de *S.aureus* 27/HP. 24 h après l'infection, chaque souris du G3 a été inoculés en sous-cutanée avec 0,1 ml de bactériophages P-27/HP ( $10^8$  UFP / ml). Les souris ont été tuées trois jours après le traitement. L'abdomen des souris a été désinfecté avec de l'alcool à 70% et la rate a été prélevée de façon aseptique

Le test de sensibilité aux antibiotiques a révélé la nature de *S.aureus*. La plupart d'entre eux (89,29%) sont résistants à la pénicilline G. Un peu plus de 14,29% le sont contre la vancomycine. 67,86% des isolats sont résistant à la méticilline. *S.aureus* 27/HP (bactérie hôte utilisé pour l'évaluation d'efficacité *in vivo* des phages lytiques P-27/HP) était résistant à tous les antibiotiques sauf un (la vancomycine) (Figure20).(25)



**Figure20:** Profil de résistance aux antibiotiques de *S.aureus* chez l'homme. (23)

Les souris qui ont reçu une solution stérile (G1, témoin négatif) étaient saines et ont eu un comportement normal pendant les 4 jours d'expérience. Bien au contraire, dans le groupe de souris de contrôle positif (G2) une souris est morte le jour 1 et deux souris sont mortes le jour 3. Les deux autres souris présentaient des symptômes chroniques de la bactériémie. La moyenne ( $\log_{10}$ ) de *S.aureus* 27/HP comptée dans les rates de ces deux souris a été de  $\log_{10} 4,44 \pm 0,2$ . *S.aureus* 27/HP a infectées les souris qui ont reçu la thérapie par les bactériophages. Les souris du groupe (G3) ont montrées une amélioration des symptômes cliniques après 48 h de traitement. La moyenne  $\log_{10}$  UFC de *S.aureus* 27/HP dans la rate de ces souris a été mesuré à  $2,21 \pm 0,31$  avec une réduction significative ( $P < 0,0001$ ) de plus de  $\log_{10} 6,0$  UFC. (Tableau3).

| Les groupes de traitements.    | Infection <i>S.aureus</i> 27/HP (log <sub>10</sub> UFC/souris.) | Traitement par les phages (log <sub>10</sub> UFP/souris). | moyenne (n=5) de <i>S.aureus</i> 27/HP compter sur les souris après 3 jours de traitements (log <sub>10</sub> UFC/ souris $\pm$ sd |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| G1 (témoin négatif)            | Aucune infection                                                | Pas de phages                                             | Non détecte                                                                                                                        |
| G2 (contrôle positif)          | 8,7                                                             | Pas de phages                                             | +4,44 $\pm$ 0,2                                                                                                                    |
| G3 (traitement par les phages) | 8,7                                                             | 7                                                         | 2,31 $\pm$ 0,14                                                                                                                    |
|                                |                                                                 |                                                           | 2,29 $\pm$ 0,18                                                                                                                    |
|                                |                                                                 |                                                           | 2,21 $\pm$ 0,31                                                                                                                    |

**Tableau 3: Efficacité in vivo des bactériophages lytiques P-27/HP contre *S.aureus* 27/HP chez les souris expérimentales(23)**

L'abondance élevée (70% du total des tests) de souches de *S.aureus* dans les échantillons cliniques humains indique son importance comme pathogène. De plus, on note une inefficacité des antibiotiques les plus couramment utilisés (l'amikamicine, l'ampicilline, la céphalexine, le chloramphénicol, la ciprofloxacine, la gentamicine, la méticilline, la pénicilline G, la rifampicine, la roxithromycine, les tétracyclines et à la vancomycine). Le manque d'efficacité des antibiotiques nécessite la recherche de nouveaux agents antibactériens pour contrôler ce pathogène. Le spectre d'hôtes très large du bactériophage P-27/HP suggère sa nature polyvalente et signifie son importance à être utilisé comme agent anti-staphylococcique universelle. L'énorme baisse de log<sub>10</sub> 0,5 de la quantité de *S.aureus* 27/HP dans les 3 heures après le traitement par le bactériophage P-27/HP montre son haut impact lytique sur cette souche. Cette constatation implique que l'administration de ce bactériophage à dose thérapeutique plus faible serait suffisante et efficace pour contrôler les infections à *S.aureus*(26). Les tests de sécurité menés sur des souris suggèrent que l'inoculation d'une dose de bactériophage P-27/HP (10<sup>8</sup> UFP / souris) est 10 fois moins plus forte

que la dose thérapeutique ( $10^7$  UFP / souris) qui peut être utilisé pour des essais cliniques chez l'homme. L'évaluation de l'efficacité *in vivo* des bactériophages lytiques P-27/HP chez la souris révèle son intérêt thérapeutique pour soulager les symptômes cliniques induits par le *S.aureus* 27/HP. La réduction du nombre de *S.aureus* 27/HP dans la rate et 100% de survie des souris traitées prône une haute efficacité lytique de ce bactériophage.

En conclusion, la nature polyvalente et l'effet lytique du bactériophage P-27/HP sur *S.aureus in vivo* montre son efficacité antibactérienne et donc peut être utilisé comme thérapie pour contrôler les infections à staphylocoque chez l'homme.

## **4. LES STREPTOCOQUES**

### **4.1. GENERALITES**

La famille des *streptococcacea* comprend sept genres. Parmi lesquelles *Streptococcus* et *Enterococcus* regroupant la plus part des espèces responsables d'infections humaine. Les caractéristiques communes à toutes ces espèces sont : cocci gram positif, non sporulés, immobiles, dépourvus de catalases et d'oxydases, ne réduisant pas les nitrates et résistants aux aminosides. Leurs classifications se fonde sur plusieurs critères; leurs pouvoirs hémolytiques, leurs équipements antigéniques et leurs caractères biochimiques(5).

### **4.2. LES DIFFERENTES SOUCHES**

#### **❖ LES STREPTOCOQUES DU GROUPE A**

Les streptocoques du groupe A se comportent en culture comme des aérobies-anaérobies facultatifs. Ils tolèrent l'oxygène, mais l'eau oxygénée qui apparaît lors du métabolisme respiratoire leur est nuisible car contrairement aux staphylocoques, ils sont dépourvus de catalase. Sur gélose au sang, les colonies sont petites et entourées

d'une zone d'hémolyse franche et complète (c'est une  $\beta$ -hémolyse). En milieu liquide, la culture prend dans le bouillon l'aspect de "mie de pain". La température optimale de croissance se situe entre 35° et 37°C. Les streptocoques hémolytiques du groupe A sont la principale cause d'infections à streptocoques chez l'homme mais on peut en trouver dans la gorge des sujets bien portants. Les streptococcies aiguës peuvent être bénignes ou sévères mais sont susceptibles d'occasionner des affections non suppuratives redoutables à pathogénie auto-immune regroupées sous l'appellation de syndromes post-streptococciques.

Les streptocoques A sont sensibles à la pénicilline qui est l'antibiotique de choix pour le traitement et la prophylaxie des infections à streptocoques A. En cas d'allergie à la pénicilline, on a recours aux macrolides. Comme tous les streptocoques, les streptocoques A résistent aux aminosides (mais cette résistance peut être levée par association avec les pénicillines). Environ 20% des souches isolées sont résistantes aux cyclines. Les autres antibiotiques sont actifs mais leur emploi n'est guère utile(6).

#### ❖ **LES STREPTOCOQUES BETA HEMOLYTIQUES C, G** **ou L**

Les streptocoques des groupes C, G, et L sont d'origine humaine ou animale, ils se comportent comme des commensaux mais sont parfois responsables d'infections aiguës de la peau, de la gorge, des voies respiratoires, d'endocardites ou d'infections néonatales. Ces infections sont rares mais assez sévères car elles s'accompagnent souvent de bactériémies et de suppurations métastatiques profondes. La seule complication à redouter est la glomérulonéphrite. Ils forment, sur gélose au sang, de petites colonies entourées d'une zone de  $\beta$ -hémolyse et leur culture contrairement à celle des streptocoques A, n'est pas inhibée par la bacitracine. Ils sont sensibles à la plupart des antibiotiques, aux pénicillines en particulier(6).

#### ❖ **LES STREPTOCOQUES DU GROUPE B**

Les streptocoques du groupe B ou streptococcus agalactiae sont responsables de mammite chez les bovidés. Chez l'homme, ce sont des commensaux des voies

génitales et de l'intestin, éventuellement responsables d'infections néonatales très sévères (septicémies, méningites). Ils sont responsables d'infections graves du nouveau-né qui donnent lieu à des tableaux cliniques variables. La forme précoce survient dans les 5 premiers jours de vie et souvent dès la naissance et se manifeste par un syndrome infectieux généralisé, toujours sévère et parfois mortel(5). L'autre forme, tardive, atteint les nouveau-nés d'1 semaine à 3 mois de vie qui font alors une méningite avec ou sans septicémie. Chez la femme en période du post partum, les streptocoques B sont responsables de bactériémies avec endométrite ou suppuration de la plaie de césarienne. Chez les sujets immunodéprimés ou atteints d'affections fragilisantes, ils sont responsables d'infections opportunistes (pneumopathies, arthrites, méningites, cellulites, endocardites). Ils sont moins sensibles aux pénicillines que les streptocoques A. Des souches résistantes aux cyclines sont fréquemment isolées. Les autres antibiotiques (chloramphénicol, macrolides, cotrimoxazole) sont généralement actifs. Le traitement recommandé des infections néonatales est une association pénicilline-aminoside (gentamicine). En cas d'atteinte méningée, on remplace la pénicilline par l'ampicilline. Il faut s'assurer que la souche n'oppose pas une possible mais rare résistance "de haut niveau" aux aminosides en testant des disques fortement chargés en antibiotiques(6).

### **❖ LES STREPTOCOQUES DU GROUPE D**

Ce groupe est caractérisé par la présence de l'antigène D, antigène qui est également présent chez les entérocoques mais des études génétiques ont conduit à séparer le genre *Enterococcus* des streptocoques. Dans le groupe D des streptocoques, il reste *S.bovis*, *S.equinus* et *S.alactolyticus*, qui sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. *S.bovis* est l'espèce la plus fréquemment isolée chez l'homme, elle est responsable d'infections localisées, de septicémies et d'endocardites. Les streptocoques du groupe D sont plus sensibles que les entérocoques aux antibiotiques mais, des résistances acquises pouvant être observées, un antibiogramme est nécessaire pour les détecter. Les infections bénignes répondent

bien aux bêtalactamines mais les infections sévères nécessitent une association bêtalactamines et aminosides.

### ❖ **LES STREPTOCOQUES ORAUX**

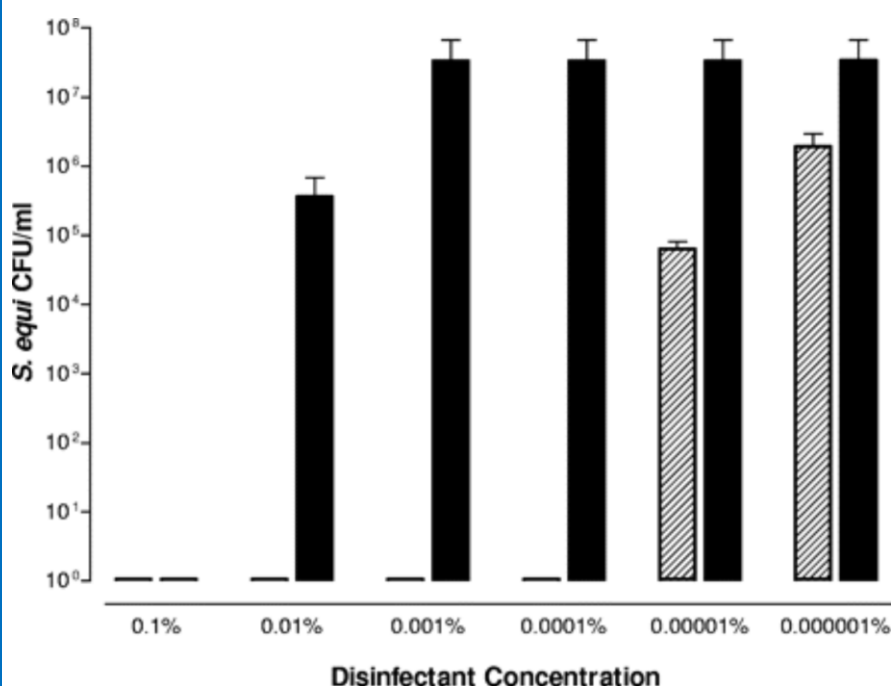
Alpha, non ou rarement bêta hémolytiques, souvent non groupables, ils font partie de la flore bucco pharyngée normale et certains sont responsables de la formation de la plaque dentaire mais aussi d'endocardites malignes, de pneumopathies ou de suppurations diverses. On les signale eux aussi comme agents étiologiques d'infections nosocomiales. Les espèces d'importance médicale sont *streptococcus mitis*, *sanguis*, *milleri*, *salivarius*, *mutans*, *gordonii* et *oralis*. Ils sont généralement sensibles aux pénicillines mais un antibiogramme comprenant la détection d'un haut niveau de résistance aux aminosides est nécessaire. Les règles de traitement sont les mêmes que celles des entérocoques(6).

Ici on va traiter le cas de *S.equi* qui est l'agent causal de l'infection purulente "équine étranglée". Cette maladie est transmise par excrétion de bactéries vivantes par les sécrétions nasales, ou par contact avec des surfaces contaminées par les bactéries. Les désinfectants sont efficaces contre *S.equi*, mais sont souvent inactivés par des facteurs environnementaux.

## **4.3. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES**

Les souches bactériennes ont été cultivées à 37°C et conservées à -80°C. *S.equi* a été au préalable traité par du sulfates de streptomycine afin de pouvoir tester sa résistance spontanée. La spécificité de PlyC a été testée pour son activité lytique, sur un panel de pathogène gram positif. Un microgramme de PlyC a été suffisante pour induire une baisse de 0,5 unité en moins de deux minutes pour toutes les souches de référence du groupe Streptocoque C (*S.equi* et *S.dysgalactiae*). En revanche, PlyC n'a pas produit de lyse lorsqu'il était testé sur un panel de non groupe streptocoque C, de staphylocoques et d'entérocoques. Cette spécificité au streptocoque du groupe C est

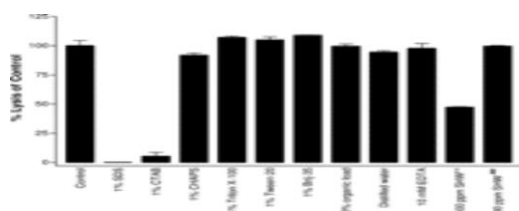
due à un domaine de haute affinité de liaison (liaison covalente à la paroi cellulaire) au sein de l'enzyme pour un glucide. Un dosage sur des plaques a été utilisé pour comparer l'efficacité du Virkon-S (qui est un agent désinfectant largement utilisé pour prévenir les maladies du bétail) et de PlyC sur des souches de *S. equi*. Les deux produits ont été testés (Figure 20). Le Virkon-S à des concentrations fortes a été en mesure de stériliser la culture streptococcique dans les 30 min. Cependant, à des concentrations faibles le désinfectant a rapidement perdu son efficacité. En revanche, PlyC a fortement stérilisé la solution sans perte d'activité avec une diminution de la concentration. Ainsi PlyC était 1000 fois plus efficace que le Virkon-S(28).



**Figure 20.** L'efficacité de désinfection des PlyC par rapport au Virkon-S. PlyC (barres hachurées) et le Virkon-S (barres pleines) a été testée à des concentrations finales comprises entre 1 mg/ml (0,1%) et 10 ng / ml (0,000001%), en présence de 1 x10<sup>8</sup> UFC de *S. equi* pendant 30 min à 25 ° C. les résidus d'UFC ont été énumérés sur gélose au sang contenant 200 µg / ml de streptomycine pour évaluer l'efficacité du désinfectant. Les barres d'erreur indiquent les écarts types de triplicatas. (27)

L'effet additif des détergents PlyC a été testé en combinaison avec des additifs ou dans des conditions difficiles qui pourraient se produire en milieu agricoles. PlyC a été mélangé avec une solution de *S. equi* en présence de différents détergents. Les

détergents anioniques(SDS) et cationiques(CTAB) ont inactivé le PlyC, cependant l'enzyme a conservé son activité complète en présence des détergents zwitterioniques (CHAPS) et non ioniques (Triton X-100, Tween-20 et Brij-35).



**Figure 22: L'activité des PlyC en présence d'additifs /contaminants. (27)**

Les PlyC (0,2 pg) a été testée dans le dosage de lyse spectrophotométrique contre *S. equi* en présence de détergent à 1% (SDS anioniques, CTAB cationiques, CHAPS zwitterioniques, Triton X-100, Tween-20 et Brij 35 tous les actifs non ioniques). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type.

Les enzymes telles que les protéases, les lipases et les amylases ont une longue histoire d'usage industriel comme additifs détergents pour décomposer respectivement les protéines, les lipides et les glucides. Cependant, dans ces deux approches, la destruction est médiée par la génération d'entités classiques chimiques désinfectantes, plutôt que par l'action directe des enzymes. Le désinfectant idéal doit avoir les caractéristiques suivantes: biocide contre tous les pathogènes, non toxique pour le bétail ou les êtres humains, écologique et biodégradable, économique et facile à utiliser, non corrosif ou non destructif des surfaces stables, susceptibles d'être utilisés en combinaison avec des détergents, et non affectés par les matières organiques ou par l'eau dure. De toute évidence, le désinfectant idéal n'existe pas. Cependant, alors que PlyC ne possède pas d'activité biocide à large spectre commun à la plupart des désinfectants, il a néanmoins la plupart de ces attributs. Le Mécanisme d'action de PlyC est enzymatique. Comme une protéine, PlyC est biodégradable et non corrosif. En raison de la forte liaison de l'enzyme pour la surface streptococcique, PlyC lie *S.equi* et commence à le tuer en quelques secondes à une dose efficace de 1µg / ml, ce qui est de plusieurs ordres de grandeur plus faible que les désinfectants chimiques (figure 20 et 21). PlyC et les désinfectants sont également sensible à une dilution ou être emporté lorsqu'il est appliqué dans l'environnement, une fois PlyC

entre en contact avec la surface bactérienne, elle reste étroitement liée et n'est pas inactivée par un nouveau lavage ou par dilution comme le sont les désinfectants traditionnels. La liaison à haute affinité de la lysine pour la surface de la bactérie, est une caractéristique de cette classe d'enzyme. En outre, Bien que les lysines PlyC et d'autres ne remplaceront jamais le besoin de désinfectants à large spectre, ils peuvent néanmoins se compléter aux désinfectants dans les conditions où le contrôle d'un agent pathogène particulier est souhaité.

Conjointement avec des désinfectants, les détergents servent à disperser, à enlever la saleté et les matières organiques sur des surfaces, permettant ainsi d'atteindre les désinfectants embarqués. Toutefois, les désinfectants chimiques ont souvent une activité réduite (aldéhydes) ou inactivé (biguanides, les hypochlorites, et composés d'ammonium quaternaire) par les détergents. Les détergents anioniques (par SDS) ont une charge négative et ne sont pas idéales pour le nettoyage à cause de trop de mousse. Les détergents cationiques (CTAB), sont chargés positivement, mais sont rarement utilisés comme agents de nettoyage. De même, les détergents zwitterioniques (CHAPS), qui ont des charges positives et négatives, ne sont pas couramment dans les produits de nettoyage. Les détergents non ioniques, tels que Triton X-100, Tween-20 et Brij -35, sont des émulsifiants et ont un bon pouvoir de pénétration et de dispersion (diminution de la tension de surface). De manière significative, PlyC a une pleine activité bactériolytique en présence de ces détergents (non ioniques) en dépit d'être inactivé par les détergents anioniques et cationiques.

On a présenté ici la possibilité d'utiliser PlyC comme désinfectant à spectre étroit contre *S.equi*.

Les essais en grandeur sur les fermes où équine étrangle est endémique ainsi que les études de formulation et de stabilité en combinaison avec les désinfectants classiques seront nécessaires pour valider le développement des PlyC. Bien que le test actuel fût limité à *S. equi*, il convient de noter qu'il y a un certain nombre d'autres streptocoques du groupe C d'importance vétérinaire qui sont également sensibles aux PlyC.

*S.dysgalactiae* a été identifié comme agent pathogène de la mammite bovine chez les vaches laitières ainsi que de la polyarthrite chez les chèvres, et *S.equi subsp zooepidemicus* est un agent pathogène pour les porcs, les vaches et les chevaux. Au-delà de PlyC, il y a aussi un certain nombre d'autres milieux où une utilisation sûre, respectueuse pourrait réduire considérablement la transmission des maladies. Par exemple, les désinfectants ciblant *S.aureus* résistant à la méticilline peut être pratique dans les suites chirurgicales, les maisons de soins infirmiers, ou des gymnases. Ceux contre la bactérie *Listeria monocytogenes* auraient des applications dans le traitement des installations alimentaires, de la réduction de charges bactériennes de Pyrogènes et *S.pneumoniae* dans les établissements de soins ou des zones d'habitations denses. La poursuite du développement de ces lysines pour l'environnement comme désinfectant à spectre étroit pourraient fournir des alternatives importantes pour limiter l'acquisition et la propagation des agents pathogènes importants.

## **5. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE**

### **5.1. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES**

Les bactériophages lytiques ont été proposés pour la réduction du nombre de *S.pneumoniae* au niveau nasopharyngé. Le Cpl-1 est une enzyme lytique du phage qui a montré sa capacité à tuer *in vitro* tous les pathovars de *S.pneumoniae* testés. Avec son domaine de liaison à la choline, il affiche une spécificité envers le *S.pneumoniae* et peut agir en synergie avec la pénicilline et / ou la gentamicine *in vitro*.

Les études réalisées ont été faites sur des jeunes rats âgés de 10 jours. Les rats ont été infectés 11 jours après leurs naissances par voie intracisternale (IC) avec une injection de 10µl d'une solution de  $\log_{10} 5.7 \pm 0.3$  UFC/ ml d'isolats de *S.pneumoniae* sensibles à la pénicilline. Pour produire le Cpl-1, une enzyme (muramidase) exprimée par *Escherichia coli* DH5 (pJML6) a été purifiée en utilisant la technique de

Chromatographie sur colonne DEAE et suspendue dans un tampon phosphate.

Le traitement était comme suit : Dix-huit heures après l'infection, le liquide céphalorachidien (LCR) a été récolté par ponction et cultivé quantitativement afin de diagnostiquer la méningite. Immédiatement après, le Cpl-1 a été injecté par voie intracisternale à 20 rats (600 U dans 30 µl, 20 mg/kg de poids corporel) et intrapéritonéale à 24 rats (6000 U dans 300 µl, 200 mg / kg de poids corporel). Les rats infectés (n =12) et non traités ont été injectés par voie IC avec 30 µl de solution stérile. Les rats ont été tués après 30 min (n =8 pour IC et n= 4 pour IP), 1 h (n =7 pour IC et n =5 pour IP), 2 h (n =4 pour IC et n =5 pour IP), 3 h (n =4 pour IC et n= 5 pour IP), et 4 h (n= 7 pour IC et n =5 pour IP ), et des échantillons du LCR et du plasma ont été prélevés pour la détermination des titres bactériens. Par la suite, la concentration du Cpl-1 a été déterminée dans les échantillons.

L'activité lytique du Cpl-1 contre le pneumocoque isolé a été testée *in vitro* par incubation de 1107 UFC de *S.pneumoniae* avec 30 U de Cpl-1 à température ambiante dans un volume total de 300µl. A 30s et à 10min après le début de l'incubation, 10µl a été prise et immédiatement dilué dans une solution saline. La quantité du Cpl-1 dans le LCR à différents moments après l'injection a été évaluée.

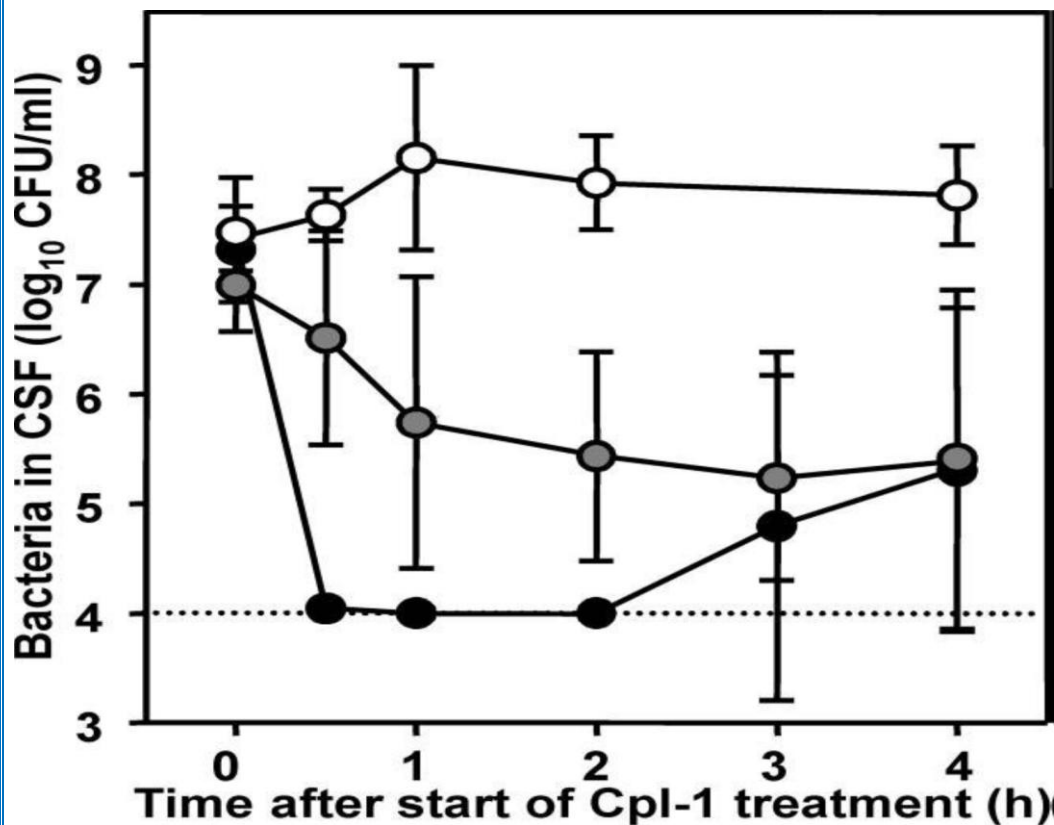
L'incubation de 1 107 UFC de *S.pneumoniae* avec 30 U de Cpl-1 pendant 30 s et 10 min a respectivement diminué les titres bactériens au-dessous de la limite de détection (1 103 UFC / ml) pour les deux temps testés.

Le Cpl-1 a ensuite été évalué en tant que thérapie expérimentale. Après une seule injection de 600 U par voie IC (600 µg) de Cpl-1, le titre bactérien a rapidement diminué au cours des 4 premières heures, alors que le traitement avec le tampon n'a eu aucun effet (*figure 23*). De 30min à 2h, les titres bactériens dans le LCR des rats traités avec Cpl-1 ont été égaux ou inférieurs à la limite de détection. Peu après, les pneumocoques ont commencés à se multiplier dans le LCR (*figure 23*). La quantité de Cpl-1 dans chaque échantillon a été calculée par balayage densitométrique (*figure 24C*). Le Cpl-1 a été systématiquement détectés dans le LCR au cours des 2 premières heures après l'injection par voie IC dans 2 expériences indépendantes,

(figure 24C). Le temps de demi-vie du Cpl-1 dans le LCR a été estimé à 16 min (figure 24A), ainsi, la repousse des bactéries 4 h après administration de Cpl-1 était due au temps de demi-vie du Cpl-1 dans le LCR.

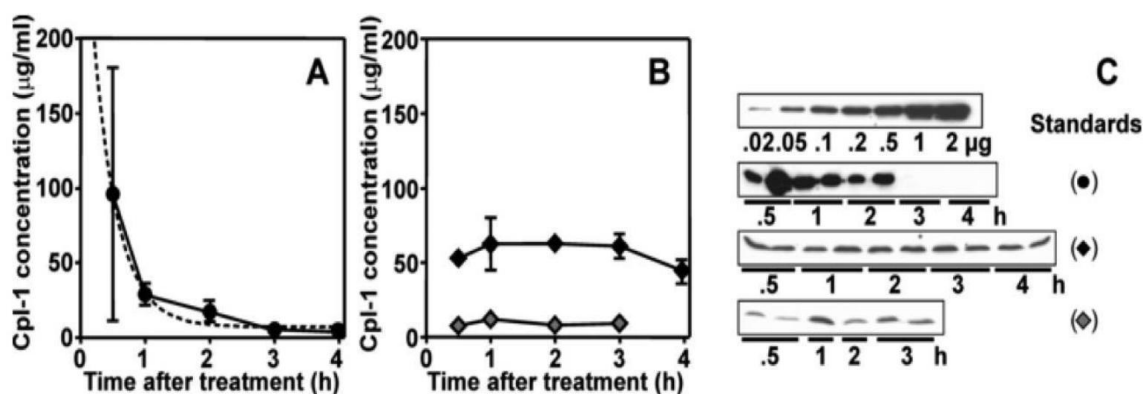
Dans une seconde approche, le Cpl-1 a été administré par injection IP. L'analyse des échantillons de plasma à différents moments après l'infection a démontré que le Cpl-1 a été libéré en continu dans la circulation sanguine pendant les 4 premières heures après l'injection, et les concentrations sont restées stables entre 50 et 60 µg/ml (figure 24B et 24C). Parallèlement, les titres bactériens correspondants dans le sang étaient inférieurs à la limite de détection ( $10^3$  UFC / ml). Surtout, une réduction marquée du titre des bactéries dans le LCR a été observée après injection par voie IP du Cpl-1 (figure 23, cercles gris). Après 2 h, les titres ont diminué d'une moyenne de  $\log_{10} 6.99 \pm 0.11$  à  $\log_{10} 5.23 \pm 0.6$  UFC / ml, soit une baisse de 98%. Cet effet antibactérien a été détectable dans le LCR plus de 4 heures après l'initiation du traitement IP (figure 23 cercles gris).

La réduction des titres bactériens dans le LCR est liée à la présence du Cpl-1 dans le même compartiment. Contrairement aux concentrations dans le LCR après injection par voie IP, le Cpl-1 a montré une présence prolongée jusqu'à 3 h après l'injection de 200 mg / kg, variant de 7 à 12 g / ml de LCR (figure 24B et 24C).



**Figure 23: Effet du Cpl-1 par voie intracisternale (IC) et intrapéritonéale (IP) dans le liquide céphalo-rachidien (LCR).(31)**

Les titres bactériens n'ont pas été touchés par l'application d'une solution saline IC (cercles blancs). L'injection du CPL-1 en IC (cercles noirs) a entraîné une rapide (moins de 30 min) diminution du titre bactérien de 3 ordres de grandeur. L'injection du Cpl-1(cercles gris) a conduit à la diminution des pneumocoques dans le LCR de 2 ordres de grandeur jusqu'à 3 h après l'administration. La limite de détection pour la détermination des titres bactériens du LCR a été 1104 UFC / ml de CSF non dilué (ligne pointillée).



**Figure 24: Evaluation du Cpl-1 dans le liquide céphalorachidien (LCR) et le plasma. (31)**

A- Diminution de la concentration du Cpl-1 dans le LCR après administration par voie intracisternale (IC) (cercles noirs). La demi-vie a été établie à 16 min en ajustant une courbe de décroissance exponentielle (ligne pointillée).

B- La concentration du Cpl-1 dans le sérum (diamants noirs) et LCR (diamants gris) après administration par voie intrapéritonéale (IP).

Les concentrations de Cpl-1 sont restées stables pour la période testée.

C- Anti-Cpl-1 utilisés pour effectuer la détermination densitométrique des concentrations du Cpl-1 indiquées dans les tableaux A et B.

On a démontré la capacité du Cpl-1 à tuer rapidement les *S.pneumoniae* injectés par voie IC ou IP chez les rats. Un seul circuit d'injection de Cpl-1 a donné une diminution du nombre de bactéries dans le LCR en dessous de la limite de détection dès 30 minutes après l'injection. Cet effet a été observé jusqu'à 3 heures après l'administration. L'effet antibactérien du Cpl-1 est temporairement défini par son temps de demi-vie dans le LCR qui est de 16 minutes. L'augmentation de la biodisponibilité du Cpl-1 dans le LCR par de multiples injections par voie IC a été tentée, mais ces injections répétitives se sont avérées être trop nuisibles pour les rats (données non présentées). Le Cpl-1 a été étudié précédemment pour *in vivo*. Des souris ont été infectées par le *S.pneumoniae* et le Cpl-1 a été injecté par voie intraveineuse (IV). Dans les deux modèles, le Cpl-1 a été capable de réduire rapidement le nombre de *S.pneumoniae* dans le sang. Par ailleurs, la demi-vie du Cpl-1 dans le plasma était estimée à 20 min, une valeur similaire à ce qu'on a observé dans le LCR des rats infectés.

Dans cette étude, on observe une recroissance bactérienne dans le LCR après 4 h. ceci peut être dû à une invasion transitoire des cellules épithéliales ou endothéliales par *S.pneumoniae* et donc sont hors de la portée du Cpl-1. En plus Il est possible qu'une dose unique du Cpl-1 ne suffise pas à atteindre tous les pneumocoques dans le LCR et que des doses supplémentaires peuvent être nécessaires pour une éradication complète. L'administration du Cpl-1 par voie IP a abouti à une libération systémique prolongée. Le nombre de Cpl-1 dans le LCR était en corrélation avec la concentration en protéine totale du LCR (données non représenté), ce qui suggère que des changements dans la barrière hémato-encéphalique peuvent avoir facilité la diffusion du Cpl-1 dans le sang. L'administration du Cpl-1 par voie IP a été suffisante pour diminuer les titres bactériens du LCR de 98% sur les 4 premières heures. On suppose que la libération prolongée du Cpl-1 dans la cavité péritonéale a été biologiquement activée et associée à une diminution de l'action de la barrière hémato-encéphalique pendant la méningite, ce qui explique la présence prolongée de Cpl-1 dans le LCR.

Les données présentées dans cette étude permettent d'identifier le Cpl-1 comme une solution prometteuse à la thérapie antibactérienne pour plusieurs raisons. La présence de Cpl-1 est biologiquement active dans le LCR après administration par voie IP. Ce constat ouvre de nouvelles portes pour les enquêtes futures sur l'utilisation de Cpl-1 dans le traitement des infections invasives à pneumocoques. Il a été démontré que le Cpl-1 peut agir en synergie avec d'autres enzymes lytiques (Paypal), et (plus récemment) avec pénicilline ou la gentamicine. D'un intérêt particulier, le Cpl-1 et la pénicilline ont montrés une synergie d'action *in vitro* contre une souche très résistante à la pénicilline. En ce qui concerne la résistance émergente, un traitement combiné du Cpl-1 avec une antibiothérapie conventionnelle pourrait donc être bénéfique.

Compte tenu de l'émergence considérable des souches résistantes aux antibiotiques, la thérapie par les bactériophages pourrait représenter une alternative pour la

prophylaxie (par exemple, par réduction sélective ou de l'éradication de transport), et le traitement des infections dues à *S.pneumoniae*.

## **SYNTHESE**

Les bactériophages lytiques sont des ennemis naturels des bactéries. Ils représentent en quelque sorte une forme de lutte biologique, est-ce que cette arme biologique pourrait telle être efficace chez l'homme? Cette question fait l'objet d'un débat autour de leurs utilisations en médecine. Afin d'alimenter ce débat au niveau scientifique, on peut aujourd'hui affirmer que les bactériophages, qui sont capables de lyser les bactéries *in vitro* ne sont pas tous capables de lyser *in vivo*, poussant les chercheurs à identifier les phages les plus virulents. Ici se pose un premier obstacle: comment identifier les phages les plus virulents *in vivo*? La plupart des chercheurs se base sur le spectre d'activité des phages; plus ce spectre est large, plus les chances sont que ce phage soit efficace *in vivo*, sans que cela ait été clairement démontré. D'autres tests utilisent un nombre limité de phage et poursuivent leurs études avec les meilleurs d'entre eux. Il serait certainement très utile de mettre au point une méthode permettant de discriminer rapidement les phages moins virulents pour ne retenir que les meilleurs. Malgré cela les expériences restent globalement très positives.

Faut-il craindre que les phages isolés de l'environnement possèdent des effets néfastes pour l'homme? La réponse est probablement négative. D'une part seuls les phages lytiques devraient être utilisés et d'autre part, le coût du séquençage du génome d'un phage est aujourd'hui très faible que l'on pourrait très prochainement séquencer le génome entier des phages pour lesquels on trouverait des homologues de séquences avec les gènes codant des protéines potentiellement néfastes.

Les différents articles cités ici font appel à différents modèles animaux, ils ne sont pas encore suffisamment nombreux mais il est toutefois possible de distinguer deux situations: les modèles d'infections par voies IV des bactéries nécessitant une application rapide des bactériophages et les modèles d'infection et de colonisation par voie plus ou moins naturelle. Si d'une part les infections par voie IV ont l'avantage de démontrer que les bactériophages sont efficaces *in vivo*, il se révèle

assez limitant pour d'autres études. En revanche, les modèles d'infections et de colonisation présentent l'avantage de permettre des études sur des temps plus longs, mais ils ne se soldent toujours pas par l'éradication des bactéries. Rien ne remplacera les antibiotiques tant qu'ils s'avèrent efficaces, ce qui est encore le cas au quotidien dans la grande majorité des cas. En revanche, pour les situations de résistance et à la lumière des résultats expérimentaux, l'utilisation des bactériophages peut être envisagée.

## **CONCLUSION**

D'après les conclusions de ces études, pouvons-nous considérer la thérapie par les bactériophages comme un traitement antimicrobien pour les maladies où la résistance bactérienne aux antibiotiques est rencontrée ? En effet, on a pu voir tout au long des expériences les résultats encourageant de leurs utilisations. Au problème croissant des souches bactériennes multi- résistantes aux antibiotiques, la phagothérapie peut représenter une alternative thérapeutique possible. La thérapie par les phages peut être une piste de recherche prometteuse, car celles si possèdent des avantages que n'ont pas les antibiotiques (spectre d'hôte moins large que les antibiotiques limitant leur action lytique et donc la destruction de la flore normale du patient et capacités d'infecter très vite la cellule). La mise en œuvre de la phagothérapie reste complexe et l'utilisation des phages en complément des antibiotiques dans le cas d'infections nosocomiales est actuellement privilégiée en France, même si c'est une piste de recherche qu'il convient encore d'explorer. La prudence reste de mise, car de nombreuses questions demeurent en suspens demandant à être examinées afin d'apporter des réponses avant l'application thérapeutique des bactériophages dans le cas des infections microbiennes. Nous devons donc concentrer nos efforts dans ce domaine en mettant en avant la recherche au niveau des bactériophages, avec le soutien des grandes industries pharmaceutiques.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. **Debarbieux L.** La phagothérapie expérimentale à l'aube du XXI siècle, Médecine et Maladies Infectieuses, 2008, 38, 421- 425
2. **Dublanchet A., Patey O.** Histoire de la phagothérapie. Feuill. Biol. 2012, 53, 59-65
3. **Dublanchet A.** Des virus pour combattre les infections. La phagothérapie au secours des antibiotiques Lausanne (Suisse): Editions Favre SA, 2009.
4. **Euzéby J.P.** Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse : Bactériologie Générale, Bactériologie Médicale. <http://www.bacteriologie.net/generale/sommaire.html>
5. **Denis F., Cécile P., Martin C., Bingen E., Quentin R.** Bactériologie Médicale : techniques usuelles, Edition Masson, Paris, 2007, 254-60
6. **Freney J., Renaud F., Leclerc R. et Riegel P.** Précis de bactériologie clinique, 2ème éd., Editions ESKA, Paris, 2007, 1764 pages.
7. **Viscardi M., Perugen A., Auriemma C.** Isolation and characterisation of two novel coliphages with high potentiel to control antibiotic-resistant pathogenic *Escherichia coli* (EPEC,EHEC), International journal of antimicrobial agents , 2008, 31, 152-157
8. **Florentin L., Viera N. D. & Barioni Jr. B.** Use of lytic bacteriophages to reduce *Salmonella Enteritidis* in experimentally contaminated chicken cuts. Brazilian J. Poult. Sci. 2005, 7, 255-260.

9. **Atterbury R. J., El-Shibiny A.** Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 4511- 4518.
10. **Kudva I. T., Jelasic S., Tarr P. I.** Biocontrol of *Escherichia coli* 0157 with 0157- specific bacteriophage, *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 3767-3777.
11. **Carillo C., Atterbury R. J., El-Shibiny A., Connerton P. L.** Bacteriophage to reduce a *Campylobacter jejuni* colonization in broiler Chickens , *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71, 6554 - 6563.
12. **Rudi K., Hoidal K., Katl T.** Direct real-time PCR quantification of *Campylobacter jejuni* in chicken fecal and cecal samples by integrated cell concentration and DNA purification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 790-797.
13. **Theor J., Butts C., and Heinemann A.** Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *Journal of Theoretical Biology.* 2004, 227, 1-11.
14. **Verma V., Harjai K., Chhibber S.** Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 64, 1212 - 1218.
15. **Andrews J.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001, 48, 5–16.
16. **Mah T. F., O 'Toole G. A.** Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001, 9, 34-39.
17. **Chhibber S., Yadav.** Contribution of capsular and lipopolysaccharide antigens to the pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* respiratory tract infection. *Folia microbiologica* .2003, 48, 699-702

18. **Inal J. M.** Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. Arch. Immunol. Ther Exp (Warsz). 2003, 51, 237-244.
19. **Wright A., Hawkins C. H., Anggård E. E., Harper D. R.** A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. Clin Otolaryngol. 2009, 34, 349-357.
20. **Ming D., Opperman D., Schweizer H. P.** High-throughput, homogeneous, bioluminescent assay for *Pseudomonas aeruginosa* gyrase inhibitors and other DNA-damaging agents. Journal of Biomolecular Screening. 2007, 12, 855-864.

## TABLE DES MATIERES

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| DEDICACES .....                                              | 8  |
| REMERCIEMENTS.....                                           | 8  |
| HISTORIQUE.....                                              | 9  |
| INTRODUCTION .....                                           | 10 |
| A. GENERALITES SUR LES PHAGES .....                          | 11 |
| I. COMPOSITION ET STRUCTURE .....                            | 11 |
| 1. COMPOSITION .....                                         | 11 |
| 2. STRUCTURE .....                                           | 12 |
| II. LES ETAPES DE L'INFECTION .....                          | 13 |
| 1. L'ADSORPTION .....                                        | 13 |
| 2. FIXATION IRREVERSIBLE .....                               | 13 |
| 3. CONTAGION .....                                           | 13 |
| 4. INJECTION DE L'ACIDE NUCLEIQUE.....                       | 14 |
| III. CYCLE DE MULTIPLICATION DES PHAGES .....                | 14 |
| 1. LES PHAGES VIRULENTS OU LYTHIQUES .....                   | 14 |
| 1.1. PERIODE D'ECLIPSE .....                                 | 15 |
| 1.2. PHASE D'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE .....              | 15 |
| 1.3. LYSE.....                                               | 15 |
| 2. LES PHAGES LYSOGENES OU TEMPEREES .....                   | 16 |
| 2.1. CIRCULATION DU PHAGE LAMBDA .....                       | 17 |
| 2.2. PHASE DE RECOMBINAISON SPECIFIQUE .....                 | 17 |
| 2.3. REPRESSION DU GENOME DES PHAGES .....                   | 18 |
| 2.4. MECANISMES D'INDUCTION DE LA FIN DE LA LYSOGENIE .....  | 18 |
| 3. CYCLES LYTHIQUES OU LYSOGENIQUES .....                    | 18 |
| B. ESSAIS DE TRAITEMENT PAR LES BACTERIOPHAGES.....          | 19 |
| I. INFECTIONS DU TUBE DUGESTIF .....                         | 19 |
| 1. ESCHERICHIA COLI .....                                    | 19 |
| 1.1. GENERALITES .....                                       | 19 |
| 1.2. LES DIFFERENTS PATHOVARS.....                           | 21 |
| 1.3. ESSAI DE TRAITEMENT D'EHEC ET EPEC PAR LES PHAGES ..... | 24 |
| 2. LES SALMONELLES.....                                      | 27 |
| 2.1. GENERALITES .....                                       | 28 |
| 2.2. ESSAI DE TRAITEMENT SUR LES PHAGES .....                | 29 |

|                                               |    |
|-----------------------------------------------|----|
| 3. CAMPYLOBACTER .....                        | 34 |
| 3.1. GENERALITES .....                        | 34 |
| 3.2. LES DIFFERENTES SOUCHES .....            | 35 |
| 3.3. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES ..... | 36 |
| II. INFECTIONS ORL .....                      | 43 |
| 1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE .....                | 43 |
| 1.1. GENERALITES .....                        | 43 |
| 1.2. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES ..... | 44 |
| 2. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....                | 51 |
| 2.1. GENERALITES. ....                        | 51 |
| 2.2. INFECTIONS A PSEUDOMONAS AERUGINOSA..... | 52 |
| 2.3. ESSAI DE TRAITEMENT AVEC LES PHAGES..... | 56 |
| 3. LES STAPHYLOCOQUES .....                   | 66 |
| 3.1. GENERALITES .....                        | 66 |
| 3.2. LES DIFFERENTES SOUCHES.....             | 67 |
| 3.3. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES ..... | 70 |
| 4. LES STREPTOCOQUES .....                    | 74 |
| 4.1. GENERALITES .....                        | 74 |
| 4.2. LES DIFFERENTES SOUCHES.....             | 74 |
| 4.3. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES ..... | 77 |
| 5. STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE .....             | 81 |
| 5.1. ESSAI DE TRAITEMENT PAR LES PHAGES ..... | 81 |
| SYNTHESE .....                                | 88 |
| CONCLUSION.....                               | 90 |
| BIBLIOGRAPHIE .....                           | 91 |

Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(Tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2011/2012

**Nom : MOAFO DJIABENG**  
**Prénom : CHRISTIAN**

**Titre du mémoire / thèse : TRAITEMENTS DES INFECTIONS PAR LES PHAGES**

**Mots-clés : bactériophages, phagothérapie, antibiotique, thérapeutiques expérimentales, infections, résistances,**

---

**Résumé : La phagothérapie est l'utilisation des bactériophages (ou phages) lytiques pour le traitement de certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. Ce traitement a été largement utilisé dans le monde avant la découverte des antibiotiques. Avec l'apparition des bactéries résistantes à presque tous les antibiotiques, certaines infections notamment les infections nosocomiales ont parfois des conséquences dramatiques. La lutte contre ces infections à l'aide de la phagothérapie est proposée comme une éventuelle solution alternative. Ce travail se propose de faire le point des dernières connaissances sur les bactériophages dans une perspective thérapeutique ainsi que certaines thérapies expérimentales potentiellement applicable à l'homme.**

**Membres du jury :**

**Président : Dr NEUT Christel, Maitre de conférences, Faculté de Pharmacie Lille II**

**Assesseur(s) : Dr GOFFART Anne, Maitre de conférences, Faculté de Pharmacie Lille II**

