

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

**Soutenu publiquement le 25 Avril 2019
Par Mme Morgane AVEZ**

**Intérêt de la phagothérapie, dans le
traitement et la prévention des maladies du
tube digestif**

Membres du jury :

Président, conseiller de thèse : (Neut, Christel, Maitre de Conférences des Universités émérite, Lille)

Assesseur : (Standaert, Annie, Maitre de Conférences des Universités, Lille)

Membre extérieur : (Minart, Valérie, Docteur en pharmacie d'officine, Isbergues)



Faculté de Pharmacie
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 de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Damien CUNY
Vice-présidente Formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président Recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président Relations Internationales :	François-Olivier SEYS
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-Doyen et Assesseur à la Recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux Relations Internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur à la Vie de la Faculté et aux Relations avec le Monde Professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la Pédagogie :	Benjamin BERTIN
Assesseur à la Scolarité :	Christophe BOCHU
Responsable des Services :	Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHÉRAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Lab. de Médicaments et Molécules

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Lab. de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOIT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Lab. de Médicaments et Molécules
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Lab. de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

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

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Hai Pascal	Lab. Médicaments et Molécules
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie

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

Remerciements

Pour commencer, je souhaite remercier ma présidente et conseillère de thèse, Mme Neut Christel, pour sa grande disponibilité et son accompagnement tout au long de la rédaction de cette thèse de docteur en pharmacie.

Je joins à ces remerciements les personnes de son équipe du laboratoire de Bactériologie de Lille, pour leur accueil chaleureux tout au long de l'écriture de cette thèse.

Je remercie également Mme Standaert et Mme Minart d'avoir accepté de former mon jury, pour un jour aussi spécial que la soutenance de la thèse.

Je remercie aussi mes amies Camille, Justine et Typhaine pour le long chemin parcouru ensemble durant ses années d'étude à la faculté de pharmacie de Lille.

Et je remercie enfin ma famille et mon fiancé, pour le soutien et les encouragements apportés tout au long de ces années études.

Abréviations

ACHIM = Microflore Intestinale Humaine Cultivée en Anaérobiose

AIEC = Adherent Invasive *Escherichia coli*

ANSM = Agence Nationale de Sécurité du Médicament

Anti-TNF = Anti-Tumor Necrosis Factor

ASCA = Anti *Saccharomyces cerevisiae* Antibodies

ATU = Autorisation Temporaire d'Utilisation

BIM = Mutants Insensibles aux Bactériophages

CDC = Centre de contrôle et de prévention des maladies

CFU = Unité Formant Colonie

DAI = Disease Activity Index

DEC = *Escherichia coli* diarrhéiques

DSS = Dextran Sodique Sulfate

EAEC = *Escherichia coli* Entéro-aggrégant

EHEC/STEC = *Escherichia coli* Entérohémorragique

EIEC = *Escherichia coli* Entéro-invasive

EPEC = *Escherichia coli* Entéropathogène

ESKAPE = *Enterococcus faecium* - *Staphylococcus aureus* - *Klebsiella pneumoniae* - *Acinetobacter baumannii* - *Pseudomonas aeruginosa* - *Enterobacter spp*

ETEC = *Escherichia coli* Entérotoxigène

ICD = Infection à *Clostridium difficile*

MC = Maladie de Crohn

MOI = Multiplicité d'infection = Rapport du nombre de bactéries ou phages sur une cellule ou sur une bactérie

MICI = Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

ND = Non Détectable

pANCA = Anticorps périnucléaires anticytoplasmes des polynucléaires neutrophiles

PBS = Tampon Phosphate Salin

PFU = Unité de Formation de Phage

RCH = Rectocolite Hémorragique

WBC = White Blood Cells

5-ASA = Acide 5 Aminosalicylique

Table des matières

INTRODUCTION :	10
CHAPITRE 1 : CONTEXTE	11
1. DE LA DECOUVERTE DE LA PENICILLINE A L'EXPLOSION DES RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES.....	11
2. DIFFERENTS MECANISMES DE RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES.....	12
3. UN BESOIN URGENT DE NOUVELLE THERAPEUTIQUE	13
4. D'UN POINT DE VUE ECONOMIQUE :	14
CHAPITRE 2 : LES BACTERIOPHAGES	14
1. DEFINITIONS	14
2. HISTORIQUE	15
3. SOURCE - ISOLEMENT.....	15
4. CLASSIFICATION PAR MODE D'ACTION.....	16
5. MODE D'ACTION	16
1. <i>Les phages virulents</i>	16
2. <i>Les phages tempérés</i>	16
6. UNE ALTERNATIVE THERAPEUTIQUE : LES BACTERIOPHAGES.....	17
7. AVANTAGES/INCONVENIENTS	18
CHAPITRE 3 : TRAITEMENTS DES MALADIES DIGESTIVES PAR LES PHAGES	19
1. INTRODUCTION.....	19
2. PATHOGENES SPECIFIQUES DU TRACTUS DIGESTIF :	20
1. <i>Escherichia coli</i> :	20
2. <i>Salmonella</i>	28
3. <i>Clostridium difficile</i>	35
4. <i>Campylobacter</i>	41
5. <i>Shigella</i>	42
3. LES MICI :	43
CHAPITRE 4 : TRAITEMENTS DES ALIMENTS PAR LES PHAGES	51
1. INTRODUCTION :	51
2. EPIDEMIOLOGIE :	52
3. CONTEXTE :	52
4. ÉTUDE DE L'UTILISATION DES BACTERIOPHAGES SUR LES ALIMENTS.....	53
1. <i>E. coli</i>	53
2. <i>Salmonella</i>	57
3. <i>Campylobacter</i>	60
5. DES ENTREPRISES QUI COMMERCIALISENT DES PHAGES	62
1. <i>Intralytix, USA</i>	62
2. <i>Pherecydes Pharma, France</i>	63
3. <i>Micreos Phage Guard, Belgique</i>	63
4. <i>Autres</i>	64
CONCLUSION	65
TABLE DES ILLUSTRATIONS	66
BIBLIOGRAPHIE :	70

Introduction :

Les bactériophages, virus qui attaquent des bactéries, ont été découverts il y a environ un siècle et ont depuis été utilisés à des fins thérapeutiques, notamment dans les pays de l'ex-Union soviétique. Leur utilisation dans les pays occidentaux a été abandonnée après la découverte et l'utilisation généralisée d'un médicament considéré comme miracle : la pénicilline. Malheureusement, nous nous trouvons dans une ère où la résistance aux antibiotiques devient un fardeau pour la santé publique. La recherche et le développement de nouveaux médicaments antibactériens n'est pas avantageuse pour les industries pharmaceutiques, par conséquent l'augmentation des résistances et le non intérêt économique pour ce problème entraîne un besoin urgent de trouver des alternatives qui pourraient lutter contre ces pathogènes (1).

Les bactériophages du fait de leur spécificité et de leur sécurité semblent une alternative intéressante. En effet nous verrons que les phages peuvent être efficaces sur des pathogènes bien précis, notamment les pathogènes responsables de troubles intestinaux tels que les diarrhées. D'autres espoirs semblent possibles avec les phages notamment sur une maladie chronique qui ne possède pas de traitement curatif à ce jour : la maladie de Crohn.

La maladie de Crohn fait partie des MICI, maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Cette pathologie présente une prévalence plus importante dans les pays industrialisés notamment en Europe du Nord et aux États-Unis mais aussi elle est plus souvent diagnostiquée chez les jeunes adultes entre 20 et 30 ans. Son origine est multifactorielle, il y a des facteurs environnementaux mais aussi des facteurs génétiques. L'utilisation des phages dans cette pathologie sera peut-être bientôt possible grâce à la découverte d'une cible spécifique.

Dans un premier temps, nous verrons le contexte qui a conduit à la recherche et à l'émergence de nouvelles alternatives telles que les phages, dans un second temps nous verrons les bactériophages, dans un troisième, le traitement des maladies digestives par les phages et enfin le traitement des aliments par les phages.

Chapitre 1 : Contexte

1. De la découverte de la pénicilline à l'explosion des résistances aux antibiotiques

La découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 fut l'une des plus grandes avancées de la médecine moderne. Ce « médicament miracle » fut découvert par accident, lors du retour de vacances de Mr Fleming, il remarqua qu'une de ses boîtes de Petri contenant des staphylocoques avait été affectée par un contaminant fongique : *Penicillium notatum*. Il appellera la molécule antibactérienne la pénicilline (2).

Malheureusement les premiers signes de résistance aux antibiotiques sont apparus peu après la découverte de la pénicilline vers 1940, où il a été rapporté par Abraham et Chain qu'une souche d'*Escherichia coli* était capable d'inactiver la pénicilline par la production d'une pénicillinase. Au cours des années, la proportion d'infections dues à des bactéries résistantes à la pénicilline a augmenté. Exemple : A la fin des années 1960, plus de 80% des souches de *Staphylococcus aureus* étaient résistantes à la pénicilline (2).

Le développement accru des résistances aux antibiotiques est lié à l'introduction de nouvelles générations de pénicillines. En effet, depuis la découverte de la pénicilline, plus de 150 antibiotiques ont été découverts et, pour la majorité des antibiotiques disponibles, une résistance est apparue (2).

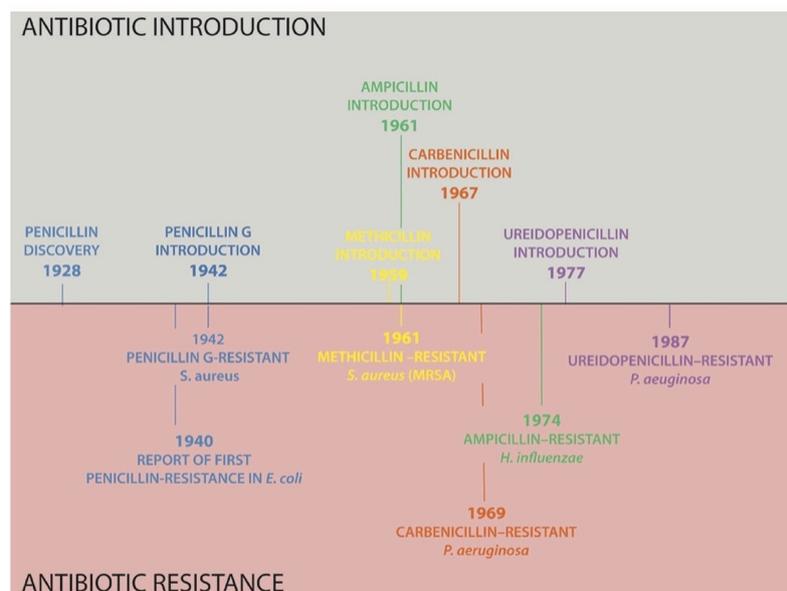


Figure 1: Apparition des résistances aux antibiotiques au cours du temps (2).

L'augmentation récente de souches multi-résistantes est en corrélation avec une morbidité et une mortalité accrue. Globalement, l'inefficacité des traitements antibiotiques contre les infections à « superbactéries » a entraîné la persistance et la propagation d'espèces multi-résistantes à travers le monde. Ceci représente une menace mondiale grave pour la santé publique (2).

Cette situation est due à une « ère d'abus » des antibiotiques, qui ont été utilisés de manière inappropriée et cela a été exacerbé par sa facilité d'accès et sa large utilisation dans le domaine de l'agriculture (2).

Depuis quelques temps, l'Organisation Mondiale de la Santé alerte sur le danger de cette ère post-antibiotique due à l'augmentation croissante de la résistance aux antibiotiques. Elle nous dit que de simples infections pourraient redevenir mortelles. On estime qu'aux États-Unis il y a au moins 23 000 décès par an résultant d'une infection à bactérie résistante. En Europe on remarque aussi la croissance des résistances aux antibiotiques ce qui entraîne des multi-résistances aux médicaments et donc limite les options thérapeutiques (1).

2. Différents mécanismes de résistances aux antibiotiques

Pour neutraliser l'action des agents antimicrobiens, les bactéries ont développé différents mécanismes de défense. Voici les 4 principaux mécanismes de résistances (3) :

- Inactivation enzymatique de l'antibiotique
- Modification de la cible de l'antibiotique
- Utilisation de pompes à efflux
- Diminution de la perméabilité

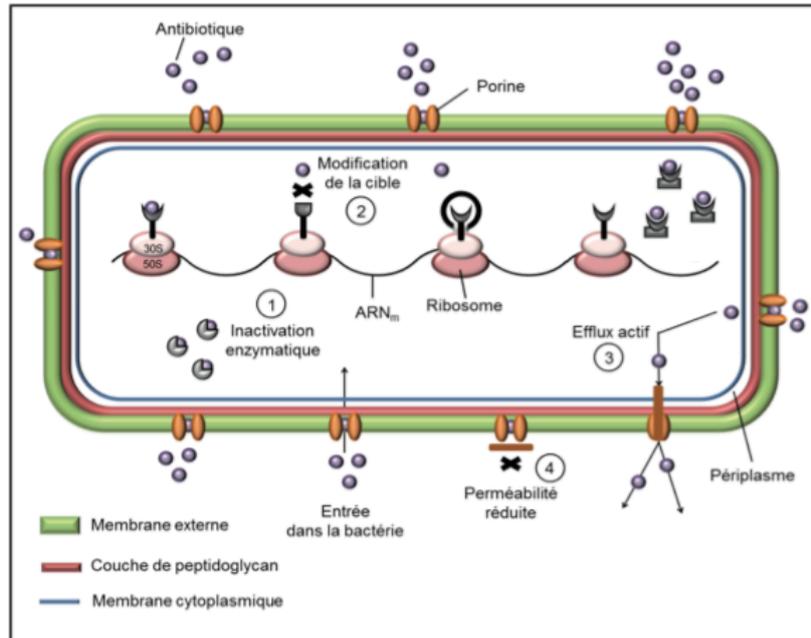


Figure 2 : Schéma des principaux mécanismes de résistances (4).

En plus de ces mécanismes, il peut exister d'autres phénomènes diminuant l'action des antibiotiques : le biofilm. Le biofilm est une barrière physique, défini comme des amas d'agrégats de cellules bactériennes attachées à une surface et enrobées d'une matrice polymérique (5). Les antibiotiques ont peu d'action sur les bactéries sous forme d'un biofilm car sous cette forme la multiplication bactérienne est très ralentie. Mais la plupart des antibiotiques agissent sur la phase de multiplication d'où l'intérêt de trouver des agents antibactériens utilisant un autre mode d'action.

3. Un besoin urgent de nouvelles thérapeutiques

En 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé a publié une liste de bactéries pour lesquelles il est urgent de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques. Il s'agit d'un groupe d'agents pathogènes regroupés sous l'acronyme ESKAPE (1) :

- *Enterococcus faecium*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Acinetobacter baumannii*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterobacter spp*

Pour pallier à ce besoin thérapeutique il est important d'avoir la possibilité de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques aux antibiotiques. En effet actuellement plusieurs pistes sont explorées telles que des molécules antibiotiques de 3^{ème} génération associées à un inhibiteur de bêta-lactamases ou encore des pistes de protection du microbiote intestinal (car un traitement antibiotique augmente le portage fécal par des bactéries résistantes) ou bien des thérapies anti-virulence (6). Une autre thérapie efficace peut-être éventuellement obtenue par les bactériophages (1).

4. D'un point de vue économique :

Il faut savoir que les entreprises pharmaceutiques sont de moins en moins centrées sur le développement et la production de nouveaux agents antibactériens, car c'est un marché qui n'est pas très rentable, par rapport à d'autres. A terme, ce désintérêt des entreprises pourrait nous conduire à des impasses thérapeutiques (1).

Chapitre 2 : les Bactériophages

1. Définitions

Les bactériophages ou appelés plus communément les phages sont des virus qui infectent les bactéries (1).

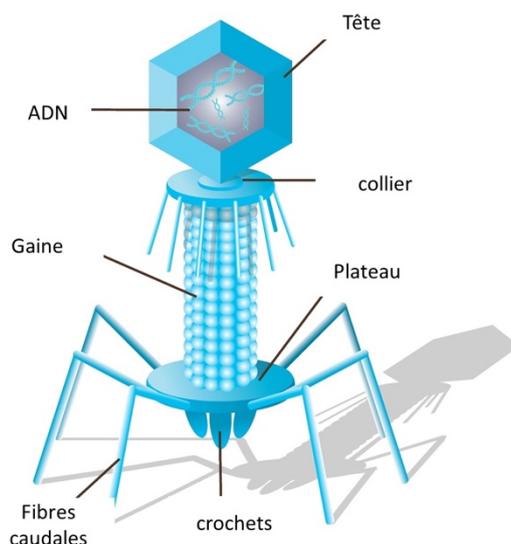


Figure 3 : Schéma d'un bactériophage (7).

L'utilisation d'un cocktail de phages est fréquente, il s'agit d'une association de plusieurs phages utilisée de manière à traiter une pathologie définie (ciblant plusieurs bactéries ou ciblant une bactérie en évitant l'apparition de résistances) (1).

2. Historique

Les phages furent découverts en 1915, par un médecin britannique Frederick Twort. En effet il fut le premier à décrire l'existence d'un « virus microscopique » capable de nuire aux bactéries. Cette découverte est due au hasard. Lors de ses travaux sur des préparations vaccinales, Mr Twort a remarqué des tâches vitreuses et transparentes dans des colonies, qui étaient des colonies de bactéries mortes. A cette époque, Mr Twort a émis l'hypothèse d'un virus microscopique mais il fut incapable de confirmer son hypothèse.

Deux ans plus tard, en 1917, un microbiologiste franco-canadien : Felix Herelle, fut convaincu que la cause d'apparition de bactéries mortes était la présence d'un « virus invisible ». Mr Herelle a nommé ce virus : bactériophage.

Après cette découverte, l'idée que les phages puissent servir un jour comme traitement de maladies bactériennes fut retenue avec enthousiasme. Malheureusement son utilisation s'estompera avec la découverte des antibiotiques (1).

3. Source - Isolement

Les phages sont les organismes les plus abondants de la planète. Ils sont présents dans tous les environnements où leurs hôtes bactériens existent.

Pour des fins thérapeutiques, ils peuvent être isolés d'une source environnementale dans laquelle le pathogène cible est susceptible d'être contenu. La source de phages la plus riche se trouve au niveau des eaux usées, si ces eaux usées proviennent du milieu hospitalier cela est un plus dans l'utilisation des phages comme traitement des maladies présentes à l'hôpital.

Afin d'isoler ces phages le moyen le plus direct est de filtrer un échantillon de l'environnement afin d'en éliminer les micro-organismes et de le placer en culture sur une culture bactérienne hôte choisie en fonction de la pathologie à traiter (1).

4. Classification par mode d'action

Il existe 2 classes de phages :

- Les phages virulents
- Les phages tempérés

Leur différence dépend de leur cycle de vie (1).

5. Mode d'action

Les phages infectent leurs hôtes bactériens de manière spécifique. C'est à dire qu'un phage agit sur une espèce bactérienne (1).

1. Les phages virulents

Leur mode d'action réside en un cycle lytique. Le phage s'attache à son hôte bactérien, il y injecte son génome, se reproduit en saisissant la machinerie moléculaire de l'hôte et finalement lyse la cellule hôte tout en libérant sa progéniture. Le plus souvent les phages lytiques utilisent deux types de protéines pour détruire leur hôte :

- Les holines : utilisées pour la perforation de la membrane cytoplasmique et bactérienne
- Les lysines : utilisées pour la destruction de la paroi cellulaire bactérienne

Ces phages sont la meilleure option à des fins de traitement par des bactériophages (1).

2. Les phages tempérés

Leur mode d'action réside en un cycle lysogène. Le phage infecte son hôte mais reste en dormance sous forme de prophage. Il se réplique avec son hôte et pourra entrer occasionnellement en cycle lytique suite à un déclencheur (1).

Bacteriophage life cycles

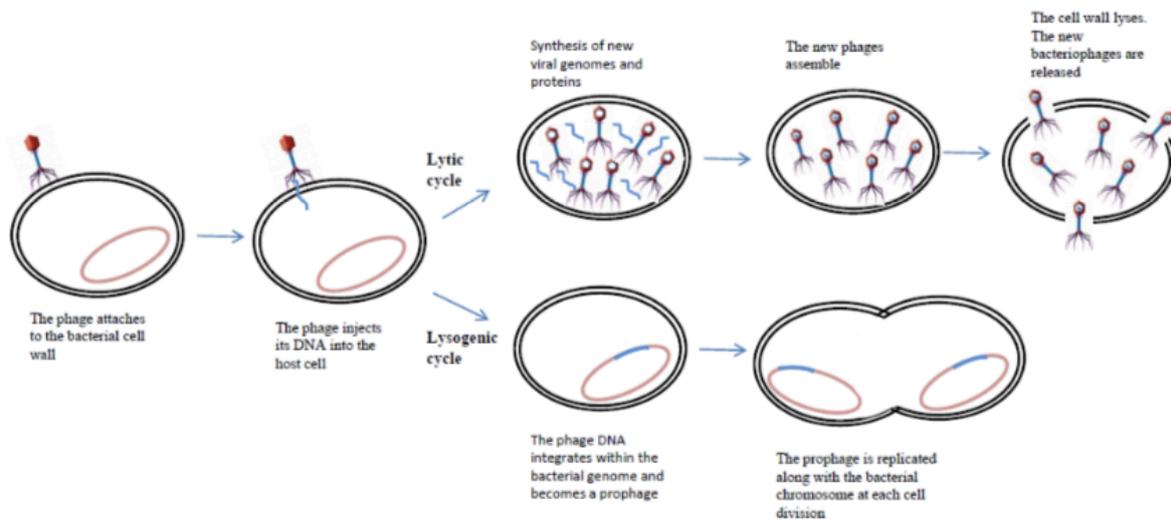


Figure 4: Cycle de vie des bactériophages (1).

Pour utiliser les bactériophages en tant que thérapeutique il faut utiliser les phages lytiques qui permettent une destruction rapide de leur hôte, contrairement aux phages tempérés qui eux peuvent entrer dans un état latent au sein de la bactérie hôte et même entraîner des phénomènes de résistances (8).

6. Une alternative thérapeutique : les bactériophages

Aujourd'hui toutes nos maladies infectieuses ne sont pas bien contrôlées par les médicaments actuels dû à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques. C'est pourquoi il y a un regain d'intérêt pour les bactériophages qui semblent être un moyen prometteur de contrer ce problème (8). Mais cette thérapie, suscite cependant beaucoup d'interrogations quant au choix du bactériophage, son isolement, sa préparation, sa purification, son stockage ou encore sa pharmacovigilance qui doivent être approfondies. Mais malgré les obstacles, les bactériophages possèdent des propriétés qui font d'eux une alternative adaptée aux traitements d'infection bactérienne définie. En plus des phages naturels, il existe des endolysines dérivés des phages ou des bactériophages fabriqués qui peuvent être utilisés comme traitement efficace (1).

L'intérêt essentiel des phages réside dans son mode d'action totalement différent des antibiotiques, ce qui leur permet de ne pas être affectés par le phénomène de résistance aux antibiotiques. En effet le mode d'action parallèle des phages par rapport

aux antibiotiques lui permet de contrer les résistances antimicrobiennes les plus courantes mais aussi de contrer les bactéries sous forme de biofilms (8).

Afin de maximiser les chances de succès de cette thérapeutique il faut impérativement que la sélection des cibles de la maladie repose sur des bonnes connaissances de la maladie à traiter, de la bactérie infectante ainsi que de la nature et des interactions des bactériophages à utiliser. Ces succès sur des cibles initiales permettront de créer une confiance pour continuer à travailler sur les phages dans des applications de plus en plus complexes (8).

7. Avantages/Inconvénients

Afin d'être une alternative appropriée aux antibiotiques il a été montré que les phages possèdent de nombreux avantages.

Ces avantages sont :

- La sécurité/ L'innocuité : du fait de leur nature abondante dans l'environnement
- La cible : c'est la membrane bactérienne par conséquent il n'y a pas d'interaction avec les cellules de l'hôte infecté
- La spécificité : qui permet une inertie face aux autres cellules et aux autres bactéries (pas de perturbation du microbiote)
- L'efficacité
- Une utilisation par voie intraveineuse sans danger
- Effet bénéfique sur la réduction du stress oxydatif

Toutes thérapeutiques ont des effets indésirables et donc ses inconvénients.

Ces inconvénients sont :

- Possible réaction immunologique (mais aucune réaction anaphylactique reportée) par création d'anticorps anti-phages
- Ils peuvent libérer des produits nocifs comme des endotoxines
- La spécificité : qui engendre utilisation de cocktail de phage pour lutter contre une seule espèce bactérienne. En effet un phage étant très spécifique d'une bactérie donnée et pour éviter les résistances il est nécessaire de traiter avec un cocktail de phages plutôt qu'un seul phage.

- L'utilisation dans une infection polymicrobienne est mal adaptée. Cela est une différence fondamentale entre les phages et les antibiotiques à large spectre.
- Pour leur utilisation il faut que la ou les bactérie(s) responsable(s) soient identifiées contrairement aux antibiotiques à large spectre.

Ces inconvénients peuvent être palliés en étudiant les phages lytiques lors d'essais, de manière à trouver des méthodes de purification par exemple, ou encore de voir que l'impact sur le système immunitaire peut être contrôlé. Les phages ne fonctionnent pas comme les antibiotiques, afin de les utiliser comme traitement il faudra récolter un maximum d'informations sur eux et utiliser des cocktails de phages (1,8).

Les phages suscitent un intérêt pour le traitement des troubles digestifs provoqués par des entéropathogènes tels qu'*Escherichia coli* ou *Salmonella* mais leur utilisation ne s'arrête pas là, en effet nous verrons les applications possibles d'un tel traitement sur une maladie chronique ou encore sur des aliments contaminés, au travers des deux chapitres suivants.

Chapitre 3 : Traitements des maladies digestives par les phages

1. Introduction

Le chemin pour trouver de nouveaux médicaments ou nouvelles alternatives thérapeutiques est long et fastidieux. Ainsi pour arriver à une thérapeutique utilisable par les patients, plusieurs étapes se succèdent (9) :

- Le développement des médicaments avec :
 - La recherche et le développement
 - Les essais précliniques
 - Les essais cliniques
- L'autorisation de mise sur le marché et la fixation du prix et taux de remboursement
- La vie réelle du médicament

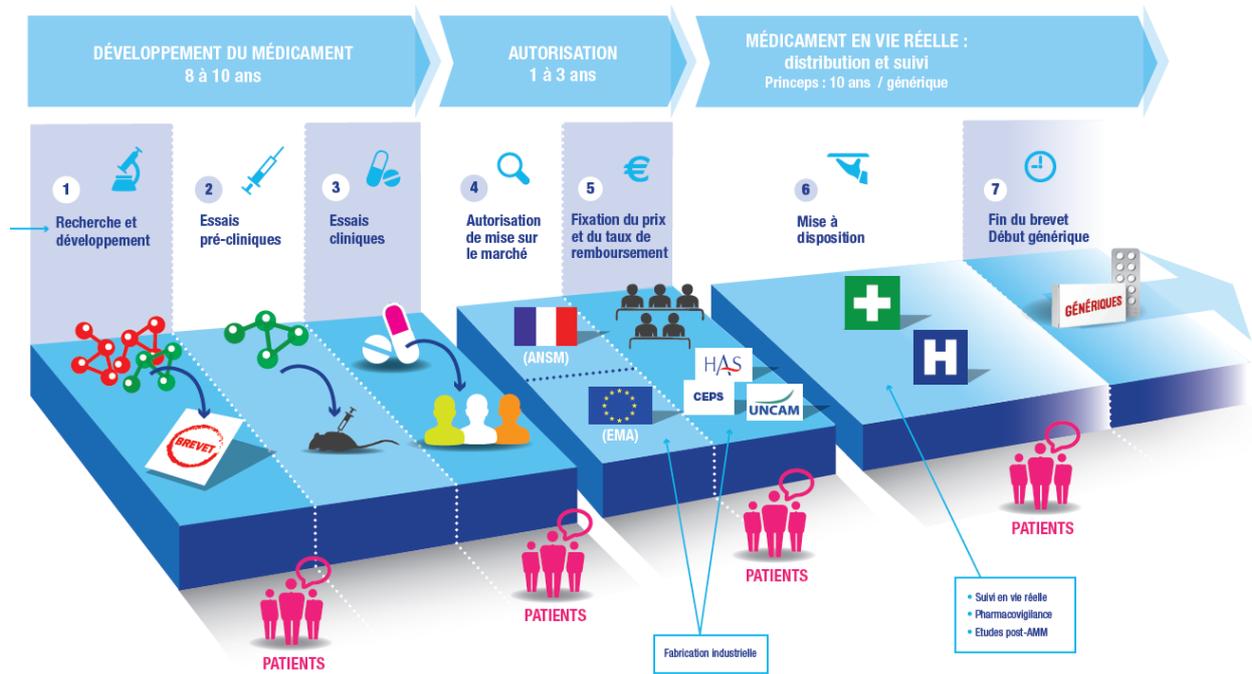


Figure 5 : Cycle de vie du médicament (9).

Ici nous verrons donc diverses études précliniques menées avec les phages. En effet afin d'arriver à un médicament utilisable par l'homme nous utilisons en phase préclinique des modèles animaux expérimentaux comme la souris, le rat mais aussi des modèles in vitro. Les phages pourront aussi être utiles sur les animaux, ou sur les aliments.

2. Pathogènes spécifiques du tractus digestif :

1. *Escherichia coli* :

Les *Escherichia coli* sont des bactéries à Gram négatif, appartenant à la famille des entérobactéries. Ce sont des bacilles anaérobies facultatifs. La plupart des souches d'*Escherichia coli* vivent sans danger dans le côlon et causent rarement des maladies digestives chez les individus en bonne santé, mais un certain nombre de souches ayant acquis des caractères de pathogénicité peuvent provoquer des maladies intestinales aussi bien chez les individus en bonne santé que chez les personnes immunodéprimées (10).

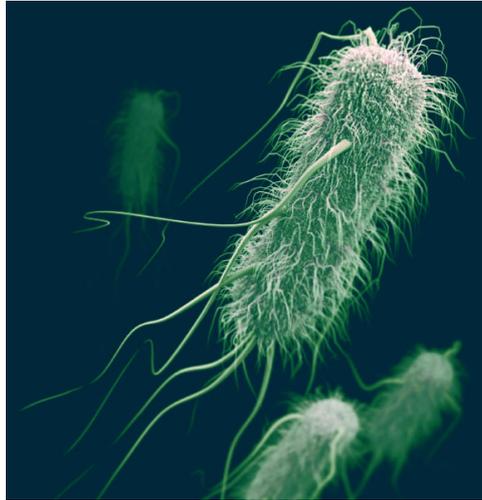


Figure 6 : Illustration d'*Escherichia coli* (11).

Les souches d'*Escherichia coli* responsables de diarrhée ont évolué en acquérant, par transfert de gènes, un ensemble particulier de caractéristiques. Selon le groupe de déterminants de virulence acquis, des combinaisons spécifiques ont été formées pour déterminer des pathotypes actuellement connus d'*Escherichia coli*, qui sont collectivement appelés *Escherichia coli* Diarrhéiques (DEC). Les pathotypes de DEC sont (10) :

- *Escherichia coli* Entéropathogène (EPEC),
- *Escherichia coli* Entérohémorragique (EHEC / STEC),
 - Avec ici un sérotype important : O157 : H7
- *Escherichia coli* Entéro-agrégant (EAEC),
- *Escherichia coli* Entérotoxigène (ETEC),
- *Escherichia coli* Entéro-invasive (EIEC).
 - Qui peuvent prendre en compte les *Escherichia coli* Adhérent et Invasif (AIEC)

Ces espèces *Escherichia coli* pathogènes pour l'homme, causent des problèmes. Par exemple, *E. coli* O157:H7 peut être la cause de diarrhée aiguë, de colite hémorragique et de syndrome hémolytique et urémique. Les *E. coli* entérohémorragique (STEC) et les *E. coli* entéropathogène (EPEC) sont aussi particulièrement préoccupants, car ils provoquent des infections pouvant être fatales chez les populations sensibles (12).

En ce qui concerne les *E. coli*, lors d'une étude, trois phages ont été isolés et nous allons donc voir leur efficacité en association ou non à un antibiotique. Pour cela nous avons isolé et caractérisé des phages de l'intestin humain contre *E. coli* à partir

d'échantillons fécaux humains et étudié leurs propriétés antibactériennes seules ou en cocktail, avec ou sans antibiotiques (12).

Trente échantillons de selles congelées, 20 provenant de patients de la communauté et 10 de patients d'établissements de soins de longue durée, ont été utilisés pour isoler les phages. La souche DPC6051 est l'hôte utilisé pour isoler les trois phages : ϕ APCEc01, APCEc02 et APCEc03, elle est donc utilisée dans tous les tests présentés dans cette étude (12).

A l'aide des trois phages et de leur souche hôte DPC6051, 3 tests sont réalisés (12) :

- Un test de provocation bactérienne
- Un test d'activité des phages contre les biofilms d'*E. coli*
- Une combinaison de phages et antibiotique

Ce qui est intéressant avec les trois phages isolés c'est que le phage ϕ APCEc03 a la gamme d'hôtes la plus large et cible neuf des seize souches de *E. coli* testées, y compris une souche de *E. coli* O157: H7. Le phage ϕ APCEc02 cible cinq souches de *E. coli*, y compris une souche de *E. coli* O157: H7, lui aussi et ϕ APCEc01 cible trois souches de *E. coli* et une souche de *Shigella sonnei* (12).

Test de provocation bactérienne :

L'effet de ϕ APCEc01, APCEc02 et APCEc03, seul ou en cocktail, sur la croissance de la souche DPC6051 a été testé à différentes MOI (Multiplicité d'infection) après 24 h de contact entre la souche et les phages (12).

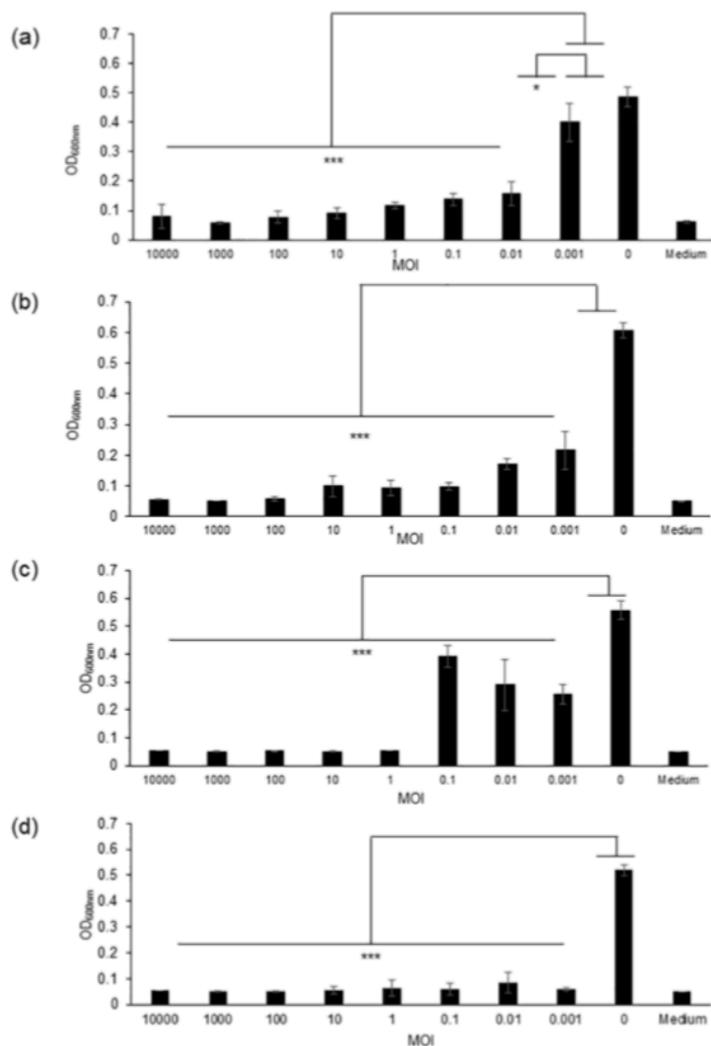


Figure 7 : Graphes représentant la densité optique après mise en contact durant 24h de la souche de *E. coli* avec les phages. On note (a) le phage ϕ APCEc01, (b) le phage ϕ APCEc02, (c) le phage ϕ APCEc03 et (d) le cocktail des trois phages, avec *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ (12).

Les trois phages ont inhibé de manière significative ou réduit la croissance de la souche de *E. coli* à toutes les MOI testées (Figure a, b et c) (12).

Un cocktail à trois phages a également inhibé la croissance de la souche *E. coli* à toutes les MOI testées (figure d) (12).

En conclusion, ces résultats prouvent l'efficacité des phages seuls ou en cocktail pour réduire la croissance d'*E. coli*.

Test d'activité des phages contre les biofilms d'*E. coli* :

E. coli est capable de former et de survivre dans des biofilms, ce qui constitue un grave problème de contrôle et de prévention des maladies (12).

L'action des phages seuls et en cocktail sur un biofilm formé par la souche DPC6051 d'*E. coli* a été évaluée dans un système modèle après 24 h et 48 h de contact avec le phage (12).

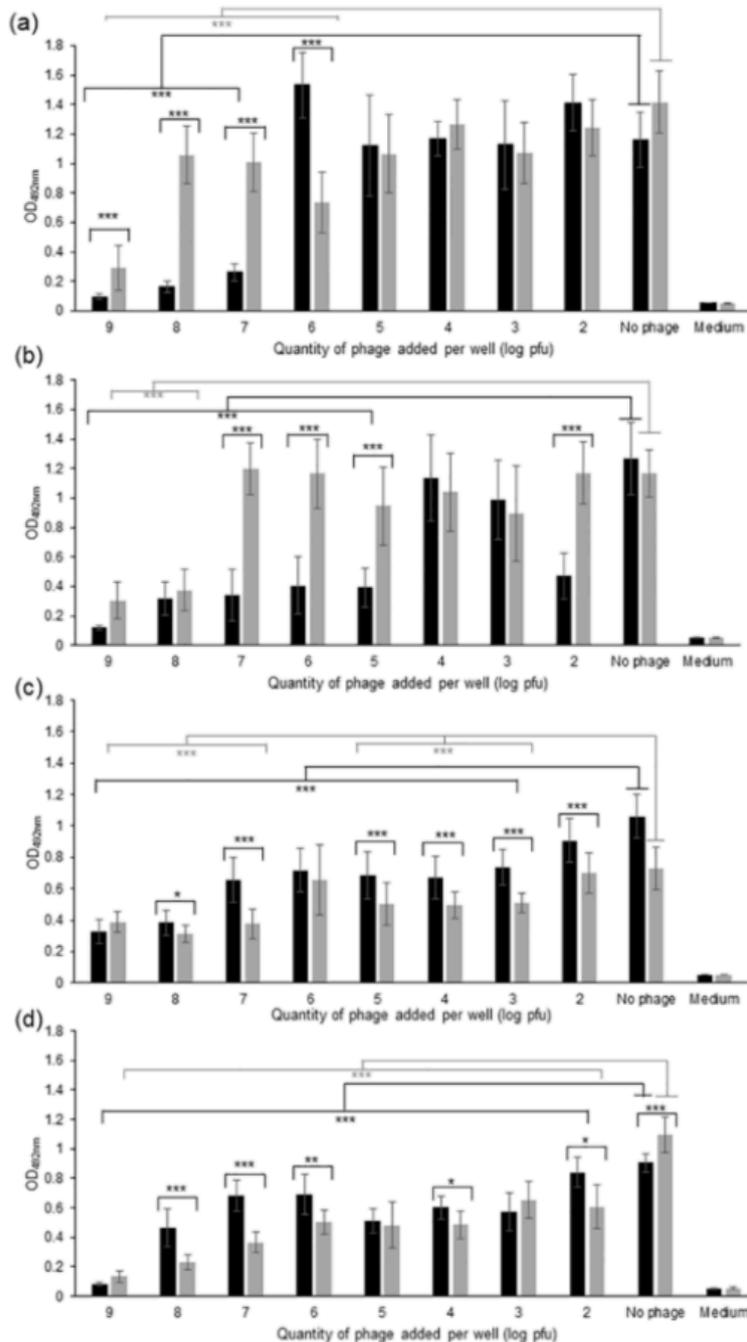


Figure 8 : Graphes représentant la densité optique après mise en contact durant 24h (barre noire) et 48h (barre grise) de la souche de *E. coli* avec les phages. On note (a) le phage ϕ APCEc01, (b) le phage ϕ APCEc02, (c) le phage ϕ APCEc03 et (d) le cocktail des trois phages, avec $***p < 0.001$; $**p < 0.01$; $*p < 0.05$ (12).

Les mêmes tendances à 24 h et à 48 h ont été observées lorsque le biofilm était en contact avec ϕ APCEc02 (figure b) (12).

L'activité métabolique du biofilm a diminué de manière significative après 24 heures de contact avec ϕ APCEc03 et est restée identique ou a même continué à diminuer après 48 heures supplémentaires (figure c) (12).

L'activité du biofilm a été considérablement réduite d'au moins 4 fois après 24 h de contact avec le phage ϕ APCEc01 à des doses supérieures à 10^7 unités de formation de phages (PFU) / puits (figure a). À des doses plus faibles, l'activité du biofilm n'a pas été réduite (12).

Après 48 heures de contact avec ϕ APCEc01, l'activité métabolique du biofilm a augmenté de manière significative à toutes les doses de phage (figure a). Cela indique l'émergence possible de mutants insensibles aux bactériophages (BIM) dans le biofilm Ou l'impossibilité des phages de rentrer en contact avec les bactéries (12).

Le cocktail de phages à des doses supérieures à 10^3 PFU / puits à significativement réduit l'activité métabolique du biofilm d'au moins 1,2 fois et a pratiquement éliminé toute activité à 10^9 PFU / puits (figure d) (12).

Sur la base de ces résultats, le cocktail de phages représente un agent de biocontrôle approprié pour la réduction et le contrôle des biofilms de *E. coli*, ce qui n'est pas le cas lors de l'utilisation d'un seul phage qui peut favoriser l'émergence de mutants.

Combinaison de phage et d'antibiotique :

Une culture en croissance de la souche DPC6051 d'*E. coli* a été incubée pendant 24 h à 37°C en présence d'une combinaison de ciprofloxacine et des phages : ϕ APCEc01, APCEc02 et APCEc03, seul ou en cocktail (12).

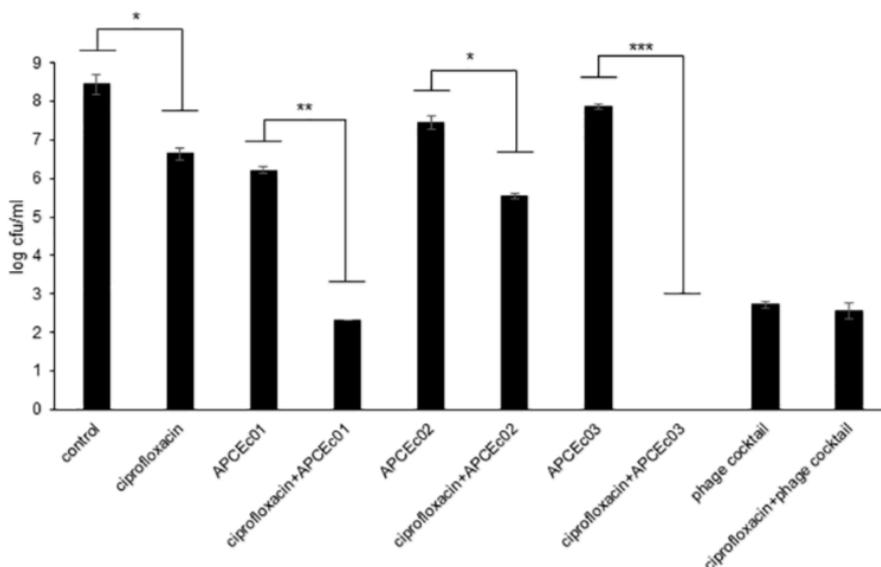


Figure 9 : Effet de la combinaison des phages avec un antibiotique après 24h d'incubation. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (12).

- La combinaison des antibiotiques et du phage APCEc01 a diminué le nombre de cellules vivantes de 3,9 log CFU/ml par rapport à APCEc01 utilisé seul et de 4,3 log CFU/ml par rapport à l'antibiotique utilisé seul.
- La combinaison des antibiotiques et du phage APCEc02 a diminué le nombre de cellules vivantes de 1,9 log CFU/ml par rapport à APCEc02 utilisé seul et de 1,1 log CFU/ml par rapport à l'antibiotique utilisé seul.
- Dans le cas de ϕ APCEc03, les cellules vivantes n'ont pas pu être détectées avec la combinaison d'antibiotique et de phage, ce qui indique l'inhibition

complète de l'émergence de cellules bactériennes résistantes aux antibiotiques et aux phages (12).

Nous pouvons donc dire que, l'association de phage et d'antibiotique améliore l'élimination des bactéries *E. coli* DPC6051.

En conclusion, des 3 tests, les trois nouveaux phages d'*E. coli* semblent prometteurs en tant qu'agents antimicrobiens, en particulier lorsqu'ils sont utilisés dans un cocktail pour empêcher la croissance d'*E.coli* et la formation de biofilm. Leur association avec un antibiotique est positive pour aider à la lutte contre *E.coli*.

Après des tests in vitro, voyons une étude sur la colibacillose causée par un *Escherichia coli* chez le lapin. La colibacillose chez le lapin est causée par un *E.coli* entéropathogène (EPEC), qui entraîne une diarrhée ou une infection systémique, cette pathologie est problématique dans les élevages. Chez le lapin a été isolée une souche EPEC atypique ZR1 causant la maladie mais aussi un bactériophage spécifique ZRP1 (13).

Cette étude se déroule en 2 étapes :

1^{ère} étape : 60 lapins blancs de Nouvelle-Zélande d'un poids corporel moyen d'environ 1 kg ont été répartis en deux groupes en fonction de leur poids corporel et de leur nombre de globules blancs (13) :

- Le groupe témoin C qui comprend quinze lapins et qui ne sont pas infectés par *E.coli*.
- Le groupe B qui comprend quarante-cinq lapins qui ont reçu un inoculum de *E.coli* ZR1 par voie orale.

2^{ème} étape : Les quarante-cinq lapins du groupe B, ont été également repartis en 3 groupes en fonction de leur poids et de leur nombre de globules, trois jours après l'infection (13) :

- Le groupe témoin négatif N
- Le groupe sous phage P
- Le groupe sous antibiothérapie A

Les lapins du groupe C et N ont reçu 1ml de PBS, ceux du groupe P 1ml de bactériophage ZRP1 (1×10^{11} PFU/ml) et ceux du groupe A 1ml de lactate de

ciprofloxacine (20mg/ml). Trois jours après les traitements, tous les lapins ont été pesés, saignés pour des échantillons de sang et euthanasiés pour la collecte du contenu caecal (13).

Au niveau des résultats de l'étape 1, une légère réduction du poids corporel a été observée dans le groupe infecté. Mais une augmentation significative des leucocytes sanguins (WBC = White Blood Cells), en particulier des neutrophiles, est survenue après infection dans le groupe B par rapport au groupe témoin ($p < 0,05$). La concentration en endotoxines chez les lapins infectés a doublé après l'infection ($p < 0,05$) (13).

	Group C	Group B
Initial body weight (kg)	0.972 ± 0.239	0.975 ± 0.192
Body weight after infection (kg)	1.111 ± 0.236	1.054 ± 0.185
Body weight gain 1 (kg)	0.139 ± 0.016 ^a	0.079 ± 0.084 ^b
Initial WBC count (10 ³ /μL)	4.3 ± 1.4	4.3 ± 1.2
WBC count after infection (10 ³ /μL)	4.4 ± 1.6 ^a	6.5 ± 2.0 ^b
Initial W-LCR (%)	12.2 ± 2.8	11.8 ± 3.4
W-LCR after infection (%)	9.3 ± 2.6 ^a	16.4 ± 7.8 ^b
Initial Serum LPS (EU/ml)	0.21 ± 0.05	0.22 ± 0.06
Serum LPS after infection (EU/ml)	0.26 ± 0.09 ^a	0.50 ± 0.09 ^b

Means with no common superscript letter differ significantly ($P < 0.05$).

Figure 10 : Résultats après infection à E.coli ZR1 chez le lapin. Groupe C : lapins témoins non infectés par E.coli et groupe B : lapins ayant reçu E.coli ZR1 (13).

Pour l'étape 2, après les traitements, les lapins ayant reçu des antibiotiques avaient le gain de poids le plus élevé de tous les groupes ($p < 0,05$). Les lapins inoculés par voie orale avec le bactériophage ZRP1 ont gagné 10 g de plus que ceux sans traitement, mais la différence n'était pas statistiquement significative. Le nombre de WBC a continué d'augmenter, sauf dans le groupe A. On observe aucune différence significative dans le nombre de globules blancs entre les groupes A et C (13).

	Group C	Group P	Group N	Group A
Body weight after infection (kg)	1.111 ± 0.236	1.054 ± 0.194	1.051 ± 0.193	1.055 ± 0.192
Body weight after treatment (kg)	1.232 ± 0.250	1.178 ± 0.187	1.164 ± 0.188	1.219 ± 0.200
Body weight gain 2 (kg)	0.121 ± 0.051 ^b	0.124 ± 0.034 ^b	0.114 ± 0.017 ^b	0.164 ± 0.034 ^a
WBC count after infection (10 ³ /μL)	4.4 ± 1.6 ^a	6.7 ± 1.3 ^b	6.5 ± 1.9 ^b	6.5 ± 2.6 ^b
WBC count after treatment (10 ³ /μL)	5.4 ± 1.3 ^a	7.7 ± 1.1 ^b	9.0 ± 2.9 ^b	6.1 ± 1.3 ^{a,b}
W-LCR after infection (%)	9.3 ± 2.6 ^a	16.9 ± 9.3 ^b	16.7 ± 8.0 ^b	15.7 ± 7.4 ^b
W-LCR after treatment (%)	9.0 ± 2.3 ^a	11.2 ± 2.6 ^{a,b}	13.0 ± 4.4 ^b	9.4 ± 2.5 ^a
Serum LPS after infection (EU/ml)	0.26 ± 0.09 ^a	0.50 ± 0.07 ^b	0.47 ± 0.08 ^b	0.51 ± 0.11 ^b
Serum LPS after treatment (EU/ml)	0.25 ± 0.06 ^a	0.35 ± 0.09 ^{a,b}	0.43 ± 0.09 ^b	0.30 ± 0.09 ^a

Means with no common superscript letter differ significantly ($P < 0.05$).

Figure 11 : Résultats après les différents traitements sur le lapin. Groupe C : lapins témoins non infectés par E.coli ZR1, groupe P : lapins ayant reçu E.coli ZR1 et traités par phage, groupe N : lapins témoins négatifs ayant reçu E.coli ZR1, groupe A : lapins ayant reçu E.coli ZR1 et traités par antibiothérapie (13).

En conclusion, les lapins infectés par voie orale avec *E. coli* ZR1 peuvent être guéris par un traitement à un seul phage : ZRP1. Cependant, comparant à ce stade le traitement par les phages et les antibiotiques on ne peut pas savoir si le traitement par les phages est plus efficace. Cela mériterait une étude plus longue et plus approfondie (13).

2. *Salmonella*

Salmonella est un pathogène responsable de mortalité et de morbidité dans le monde entier, mais de manière plus fréquente dans les pays en voie de développement. Ce sont des bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif en forme de bâtonnets flagellés (14).



Figure 12 : Illustration de *Salmonella* (15).

99% des souches de salmonelles qui causent des infections chez l'homme appartiennent à l'espèce *Salmonella enterica*. Celle-ci est subdivisée en six sous-espèces d'au moins 2500 sérotypes qui se distinguent par des variations d'antigène O (somatiques) et H (flagellaires) (14).

Les trois maladies les plus importantes causées par cette bactérie sont :

- **La Salmonellose non invasive non typhoïde :**

Cette salmonellose est une gastro-entérite aigue, elle est transmise par voie orale à travers l'eau ou des aliments contaminés. On estime à 1,3 milliards le nombre de gastro-entérite dû à *Salmonella* avec environ 3 millions de décès par an dans le

monde. Elle fait partie des agents pathogènes d'origine alimentaire, elle est le plus souvent associée à la consommation de fruits et légumes frais.

Cette infection survient après l'ingestion de plus de 50 000 bactéries dans la nourriture ou l'eau, sa symptomatique survient généralement 6 à 72h après ingestion. Les symptômes de cette maladie sont : douleurs abdominales, diarrhées avec ou sans sang, nausées et vomissements. En générale cette gastro-entérite se résorbe naturellement en 5 à 7 jours sans traitement particulier. En cas de perte de liquide trop importante une réhydratation peut être nécessaire (14).

- **La Salmonellose invasive non typhoïde :**

Les 2 sérotypes principaux responsables de cette pathologie sont : *S.Typhimurium* et *S.Enteritidis*. Elles sont surtout présentes en Afrique subsaharienne et provoquent une maladie invasive chez l'homme. Elle se présente comme une maladie systémique fébrile ou la diarrhée est souvent absente. Son diagnostic est compliqué sans tests microbiologiques car souvent il existe un chevauchement clinique avec d'autres pathologies (maladies bactériennes, parasitaires, des voies respiratoires ou encore du VIH). Même avec un traitement, le taux de mortalité est compris entre 22 et 47% chez les adultes et enfants africains (14).

- **La fièvre typhoïde :**

Cette fièvre est causée par une infection à *S.typhi*, elle est responsable de 21 millions de nouveaux cas chaque année et entraîne environ 200 000 morts. Cette maladie est plus fréquente dans les pays en voie de développement (Afrique subsaharienne et Asie). La différence de cette maladie par rapport aux salmonelloses invasives ou non est la présence au niveau de l'espèce *S.typhi* d'un facteur de virulence qui permet à la bactérie de survivre dans un environnement acide comme celui de l'estomac. Ce pathogène est exclusivement humain. En raison de la nature systémique de cette infection, elle est traitée par des antibiotiques (14).

Pour *Salmonella* nous regarderons une étude sur des poussins infectés par *Salmonella* Enteritidis et *Salmonella* Typhimurium dans un type de pathologie du premier type.

On a cherché les types de salmonelles qui infectaient 100 poulets malades d'Égypte. Sur chaque oiseau ont été collectés des échantillons de foie, rate et caecum pour l'isolement des bactéries. Les bactéries qui ont été isolées de la chair malade des poulets sont : salmonelles sérotypes Typhimurium et Enteritidis. Pour constituer un traitement par des bactériophages adaptés, il a été récupéré des échantillons d'eaux usées collectées près des élevages de poulets et les salmonelles récoltées sur les poulets malades ont été utilisées pour la préparation des bactériophages (16).

L'étude a porté sur 120 poussins âgés du jour divisés en 4 groupes de 30 poussins.

Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Contrôle négatif, non inoculation des bactériophages ou salmonelles	Administration de bactériophage de S. Typhimurium par voie orale aux jours 1,2,3,6,8,10,13 et 15 Infecté par voie orale à partir du 2 ^{ème} jour avec une dose unique de S. Typhimurium	Administration de bactériophage de S. Enteritidis par voie orale aux jours 1,2,3,6,8,10,13 et 15 Infecté par voie orale à partir du 2 ^{ème} jour avec une dose unique de S. Enteritidis	Contrôle positif pour les 2 types de salmonelles : Groupe A : 15 poussins ont reçu S. Typhimurium au 2 ^{ème} jour Groupe B : 15 poussins ont reçu S. Enteritidis au 2 ^{ème} jour

Figure 13 : Tableau sur le design de l'étude, représentant les poussins répartis en quatre groupes.

Les poussins ont ensuite été euthanasiés par tranches de 5 poussins dans chaque groupe aux jours 5, 7, 9, 11, 14 et 17. Durant l'étude et lors du constat post-mortem les poussins du groupe 1 (témoin négatif), n'ont présenté aucun signe clinique. Tandis que les poussins du groupe 4 (témoin positif) ont subi une dépression, une perte d'appétit, une incapacité à se tenir debout ou encore des diarrhées. Lors du constat post-mortem on a observé une congestion des organes internes, des hémorragies dans le foie ou encore une distension de l'intestin avec diarrhée. Dans ce groupe 4 des mortalités sont apparues après 3 jours.

En ce qui concerne les groupes 2 et 3 qui ont reçu le traitement aux bactériophages, il y a eu une dépression et une diarrhée après 2 jours d'infection, mais ces signes ont

graduellement disparu au fil des jours. Le traitement par les bactériophages a commencé à réduire la colonisation de *S. Typhimurium* et de *S. Enteritidis* dans le caecum à partir de 4 doses successives.

Tous ces résultats cliniques mais aussi bactériologiques sur les échantillons prélevés et analysés concourt à supposer que le traitement par bactériophage est efficace dans le traitement des salmonelloses (16).

Au niveau des histogrammes :

- Le groupe 1 représente le contrôle négatif = sans salmonelle, sans phage,
- Le groupe 2 : avec salmonelle Typhimurium, avec phage,
- Le groupe 3 : avec salmonelle Enteritidis, avec phage,
- Le groupe 4 représente le contrôle positif = avec salmonelle (*S.Typhimurium* ou *S.Enteritidis*), sans phage,
- ND = Non détectable

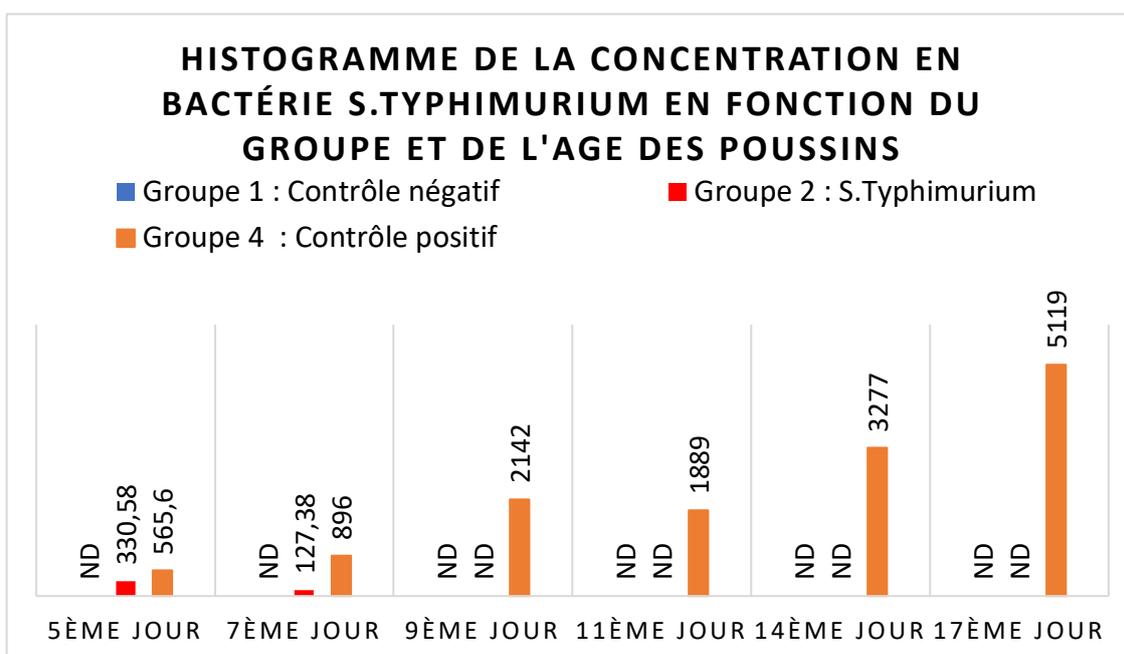


Figure 14 : Résultats de la concentration de *S.Typhimurium* en fonction du groupe et l'âge des poussins.

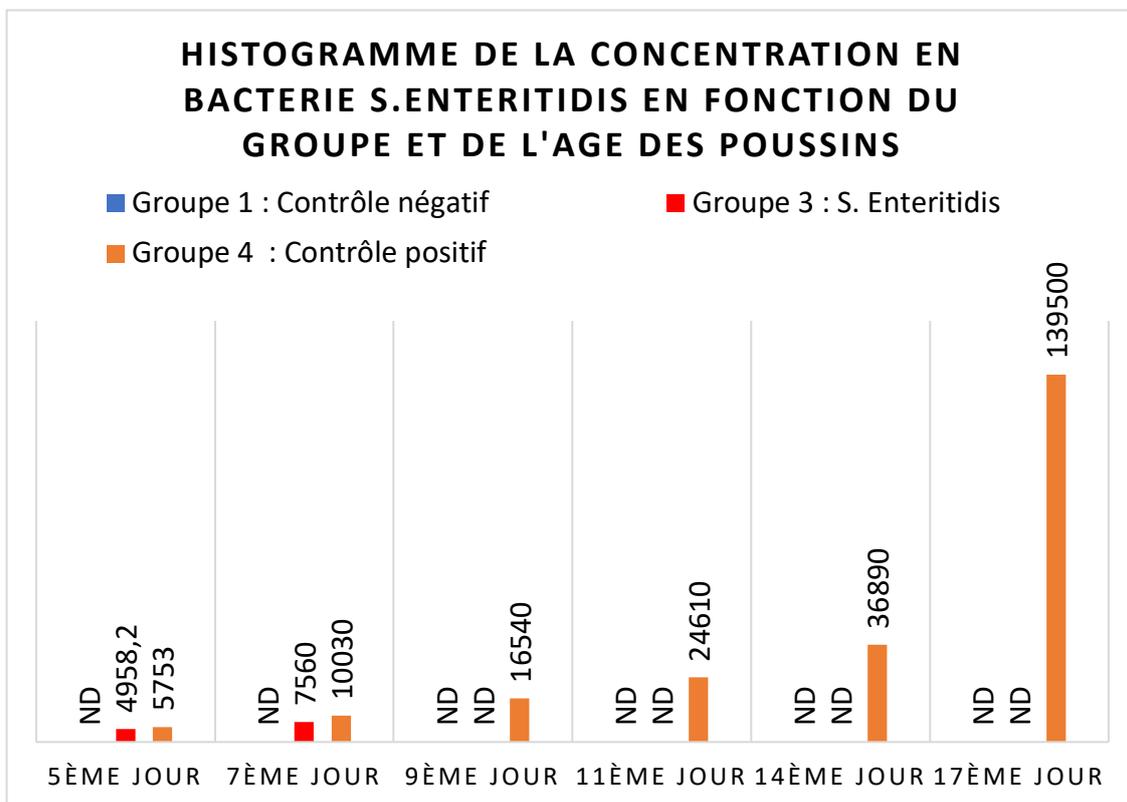


Figure 15: Résultat de la concentration de S. Enteritidis en fonction du groupe et de l'âge des poussins.

On observe que dès le 9^{ème} jour les poussins euthanasiés ayant reçu un traitement adapté en fonction de la bactérie pathogène, par bactériophages n'ont plus de bactéries détectables, tandis que les poussins non traités (contrôle positif), ont une augmentation croissante des bactéries pathogènes.

Après une étude in vivo chez le poussin regardons une étude in vitro sur une microflore intestinale humaine cultivée en anaérobiose (système ACHIM), de *Salmonella* Enteritidis comme modèle d'organisme pathogène et un traitement par des phages spécifiques de Salmonelle ou l'Azithromycine.

A savoir que l'ACHIM est un modèle qui permet de mimer le microbiote intestinal humain, il contient donc la majeure partie de la communauté du microbiote intestinal provenant d'un donneur adulte et en bonne santé (17).

Dans un premier temps, cette étude nous montre que l'ACHIM qui représente un microbiote intestinal équilibré est un facteur protecteur de l'infection à *Salmonella* enteritidis. En effet sans traitement un microbiote intestinal bien régulé est capable de conduire à une diminution d'une infection à *Salmonella* (17).

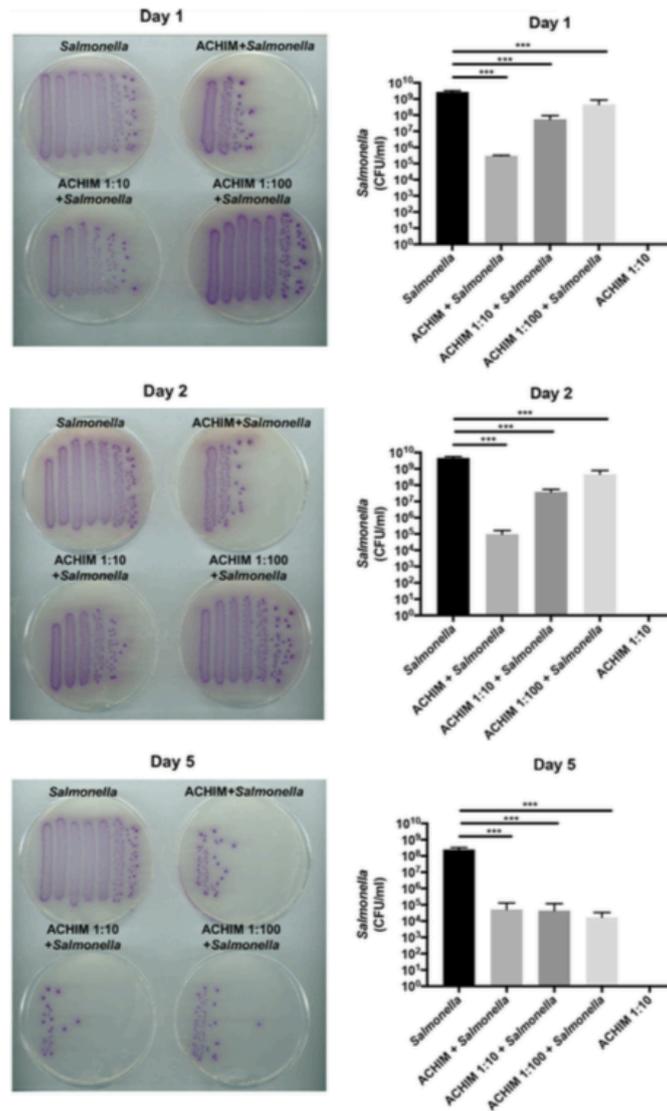


Figure 16 : Résultat de l'effet de l'ACHIM sur une infection à *Salmonella*. *** : $p < 0,001$ (17).

Dans un deuxième temps que les traitements par les phages mais aussi par les antibiotiques tels que l'azithromycine éliminent *Salmonella* dans ACHIM. Avec ces deux traitements en moins d'un jour on observe une réduction forte de *Salmonella*. L'effet des deux traitements dure 7 jours et entraîne une diminution significative de *Salmonella* par rapport au témoin ACHIM. (17)

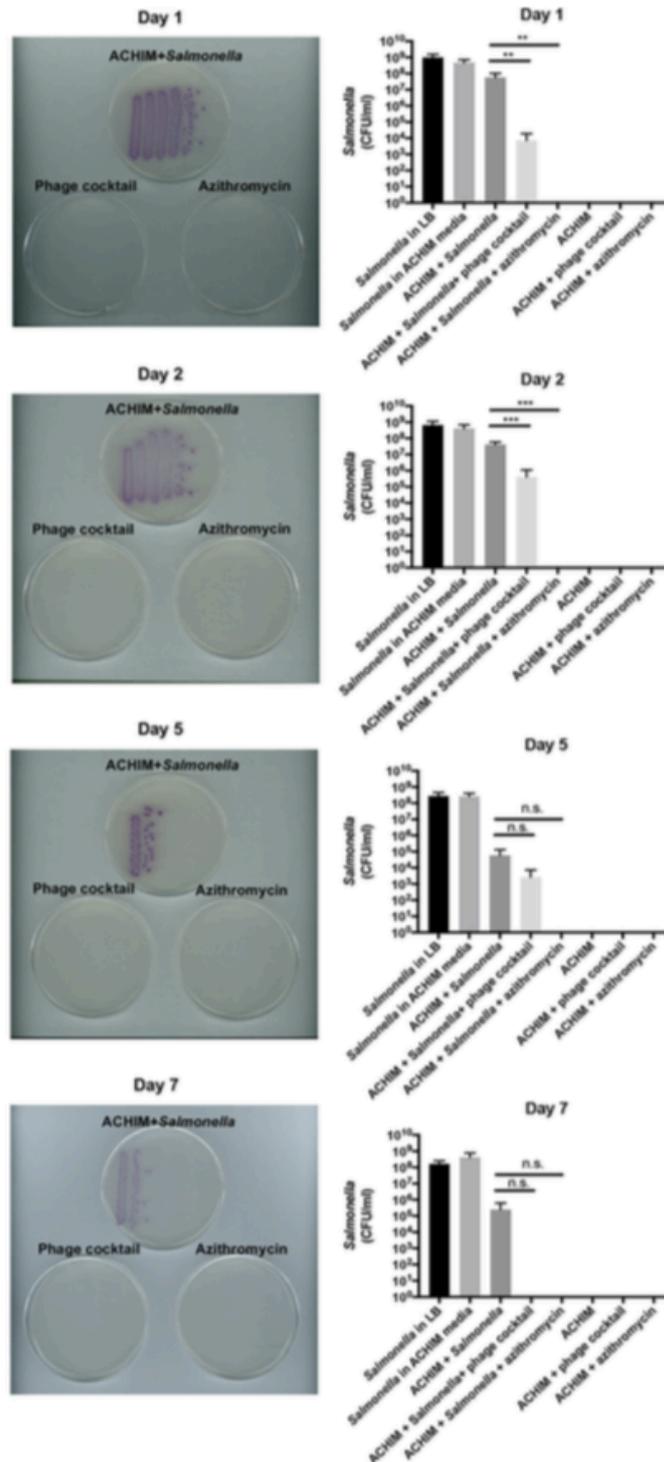


Figure 17 : Résultats des effets du traitement par les phages ou du traitement par l'Azithromycine sur le pathogène Salmonella. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et ns : non significatif (17).

Cette étude nous permet de comparer les deux traitements (17) :

Traitements par les phages	Traitement par l'azithromycine
<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la croissance de <i>Salmonella</i>• Spécificité élevée• Moins d'effets indésirables• Non perturbation de l'ACHIM	<ul style="list-style-type: none">• Diminution de la croissance de <i>Salmonella</i>• Moins spécifique• Plus d'effet indésirable• Perturbation de l'ACHIM dès la première dose

Figure 18 : Comparaison du traitement par les phages par rapport au traitement antibiotique représenté par l'azithromycine (17).

L'équilibre du microbiote intestinal a un rôle primordial dans la lutte contre les infections bactériennes. Et le traitement par les phages est une bonne alternative à un traitement par les antibiotiques et possède de nombreux avantages tels que le maintien de l'équilibre du microbiote intestinal.

3. *Clostridium difficile*

Ce pathogène est un bacille anaérobie à Gram positif sporulant, qui produit des toxines. Il est transmis à l'homme par voie oro-fécale. *Clostridium difficile* est devenu un agent pathogène entérique majeur répandu dans le monde entier. Aux États-Unis, il s'agit de la bactérie nosocomiale la plus fréquemment signalée. En effet *Clostridium difficile* est étroitement lié à un déséquilibre de la flore intestinale qui est souvent causé par les traitements antibiotiques eux-mêmes, qui détruisent les bactéries pathogènes mais aussi les bactéries commensales de la flore. Il agit en colonisant le gros intestin et en libérant 2 exotoxines protéiques (TcdA et TcdB), ces toxines provoquent des colites et des diarrhées. Cette infection est transmise par les spores qui sont résistantes à la chaleur, aux acides et aux antibiotiques (18).

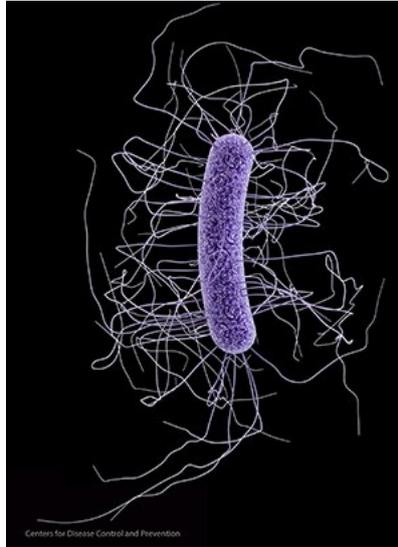


Figure 19 : Illustration de Clostridium difficile (19)

Ici nous allons voir des combinaisons de bactériophages qui réduisent la croissance in vitro et la prolifération in vivo de *Clostridium difficile*.

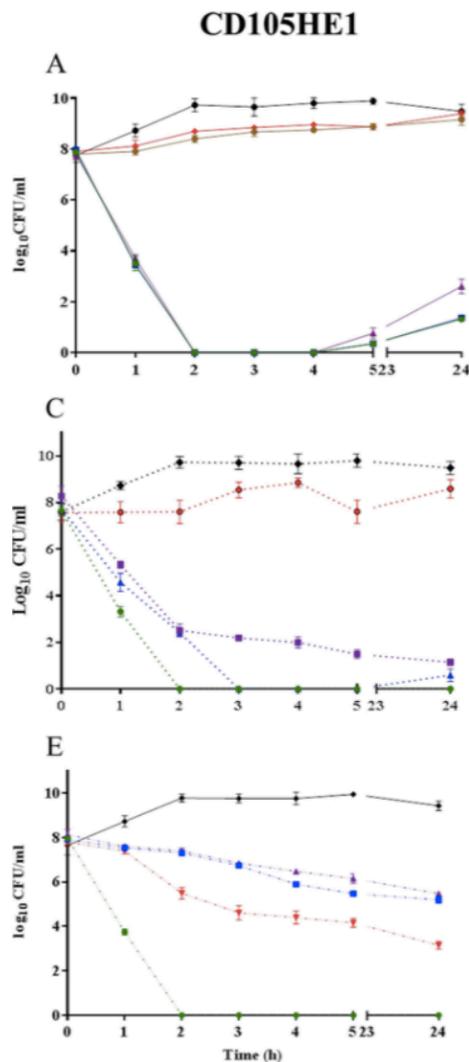
Le traitement par bactériophage offre une spécificité de la cible mais peu d'études se sont concentrées sur son utilisation dans le traitement de l'ICD (Infection à *Clostridium difficile*). Cela est principalement dû au manque de phages strictement virulents qui ciblent ce pathogène. Bien qu'il soit largement admis que les phages tempérés ne conviennent pas à des fins thérapeutiques, l'analyse de sept phages de *C. difficile* a confirmé que cet impact pourrait être réduit par l'application de plusieurs types de phages. Dans cette étude nous avons analysé sept phages sur 80 souches majeurs et endémiques de *Clostridium difficile* (20).

Pour l'étude in vitro seulement cinq des sept phages étudiés seront conservés, car seulement cinq des sept phages se propagent sur CD105HE1 qui est la souche hôte sélectionnée (20).

Nous allons donc comparer les capacités de cinq phages à lyser des cultures bactériennes in vitro sur une période de 24h. Les phages étudiés sont : phiCDHM1, phiCDHM2, phiCDHM3, phiCDHM5 et phiCDHM6. Ils ont été propagés sur la même souche bactérienne hôte CD105HE1, afin de prouver la spécificité des phages sur leur hôte. Leurs activités ont aussi été mesurées sur un isolat clinique le CD105LC2 de *C.difficile* car cette souche est présente en milieu clinique (20).

Sur CD105HE1 :

- Graphique A = CD105HE1 traitement monophagique
- Graphique C = CD105HE1 traité avec une combinaison de 2 phages
- Graphique E = CD105HE1 traité avec une combinaison de trois ou quatre phages



Élimination de la culture bactérienne par deux phages phiCDHM1 et phiCDHM2, mais après 24h une reculture bactérienne s'est produite (figure A).

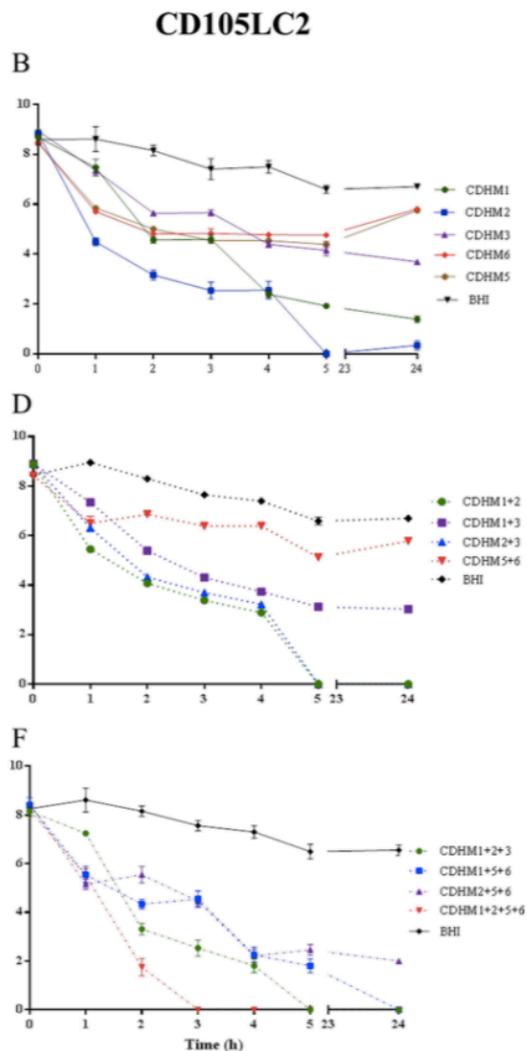
La lyse la plus efficace pour un couple de phage est observée avec phiCDHM1 et phiCDHM2, qui ont complètement lysé CD105HE1 deux heures après l'infection, sans reprise après 24 heures (figure C).

La meilleure combinaison de phages pour la lyse de CD105HE1 est phiCDHM1-phiCDHM2-phiCDHM3, qui élimine toutes les bactéries viables 2 h après l'infection (figure E). La combinaison à trois phages est meilleure que la combinaison à quatre (20).

Figure 20 : Nombre de cellules de *C. difficile* viables après traitement par des phages *in vitro*, sur des cellules bactériennes CD105HE1. Graphique A : en vert CDHM1, en bleu CDHM2, en violet CDHM3, en rouge CDHM6, en marron CDHM5 et noir pour le témoin. Graphique C : en vert CDHM 1 + 2, en violet CDHM 1 + 3, en bleu CDHM 2 + 3, en rouge CDHM 5 + 6 et noir pour le témoin. Graphique E : en vert CDHM 1 + 2 + 3, en bleu CDHM 1 + 5 + 6, en violet CDHM 2 + 5 + 6, en rouge CDHM 1 + 2 + 5 + 6 (20).

Sur CD105LC2 :

- Graphique B = CD105LC2 traitement monophagique
- Graphique D = CD105LC2 traité avec une combinaison de 2 phages
- Graphique F = CD105LC2 traité avec une combinaison de trois ou quatre phages



La lyse des bactéries par les phages a mis plus de temps dans l'isolat clinique CD105LC2 que dans la souche CD105HE1 (figure B).

Le même couple de phages qui a complètement lysé CD105HE1 a aussi lysé notre isolat clinique CD105 LC2 (figure D).

La combinaison efficace de trois phages pour CD105LC2 est également phiCDHM1-phiCDHM2-phiCDHM3. Mais ici l'association la plus efficace est une combinaison de quatre phages phiCDHM1-phiCDHM2-phiCDHM4-phiCDHM6, qui a éliminé la culture bactérienne au bout de 3 h sans nouvelle repousse (figure F) (20).

Figure 21 : Nombre de cellules de *C.difficile* viables après traitement par les phages *in vitro*, sur des cellules bactériennes CD105LC2. Graphique B : en vert CDHM1, en bleu CDHM2, en violet CDHM3, en rouge CDHM6, en marron CDHM5 et noir pour le témoin. Graphique D : en vert CDHM 1 + 2, en violet CDHM 1 + 3, en bleu CDHM 2 + 3, en rouge CDHM 5 + 6 et noir pour le témoin. Graphique F : en vert CDHM 1 + 2 + 3, en bleu CDHM 1 + 5 + 6, en violet CDHM 2 + 5 + 6, en rouge CDHM 1 + 2 + 5 + 6 (20).

Notre modèle animal d'une infection à *Clostridium difficile* se fait sur le hamster doré de Syrie (20). Notre modèle animal va être utilisé au cours de deux études.

Étude 1 : Chaque hamster a reçu 30mg de phosphate de clindamycine par kg de poids corporel par voie oro-gastrique en une dose unique administrée 5 jours avant l'épreuve. Avant la provocation de la maladie par administration de spores de *Clostridium difficile*, les hamsters ont reçu un traitement de phages (sous forme unique ou en cocktail). Les doses de phages ont été administrées toutes les 8 heures jusqu'à la fin prévue au bout de 36 heures. Au bout de 36 heures les animaux ont été euthanasiés et l'impact du traitement par les phages a été quantifié par l'énumération de la charge bactérienne dans le caecum et le colon (20).

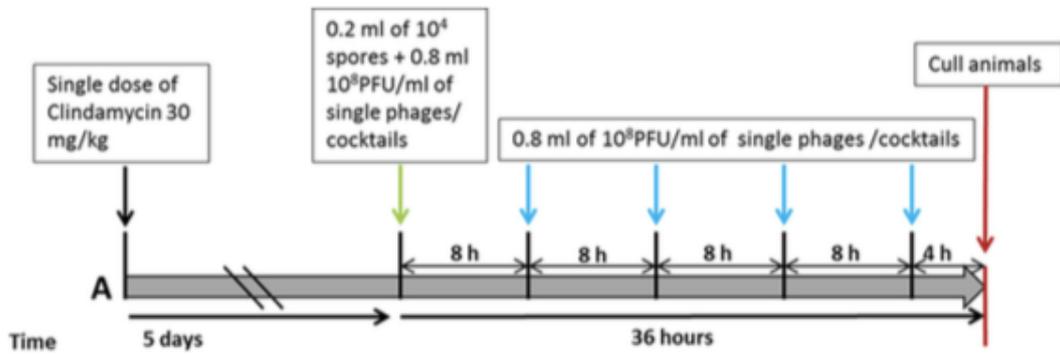


Figure 22 : Protocole d'étude d'un traitement par les phages sur le hamster (20).

Étude 2 : Dans cette étude, deux groupes de six animaux chacun ont été traités et infectés comme pour l'étude 1, sauf que pour cette expérience le traitement dure toute la durée de vie du hamster. Les animaux sont surveillés par observation et télémétrie durant toute leur vie (20).

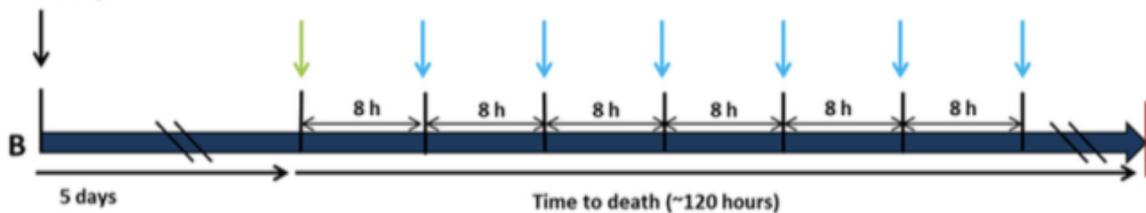


Figure 23 : Protocole d'étude d'un traitement par les phages sur le hamster (20).

En ce qui concerne l'étude 1, les résultats proviennent d'un nombre minimum de 4 animaux pour chaque traitement. Les diagrammes ci-dessous nous montrent la colonisation des *Clostridium difficile* (figure 12 de A à D) et les niveaux relatifs de spores de *Clostridium difficile* (figure 12 E et F). Chaque graphique est représentatif d'un organe de hamster disséqué.

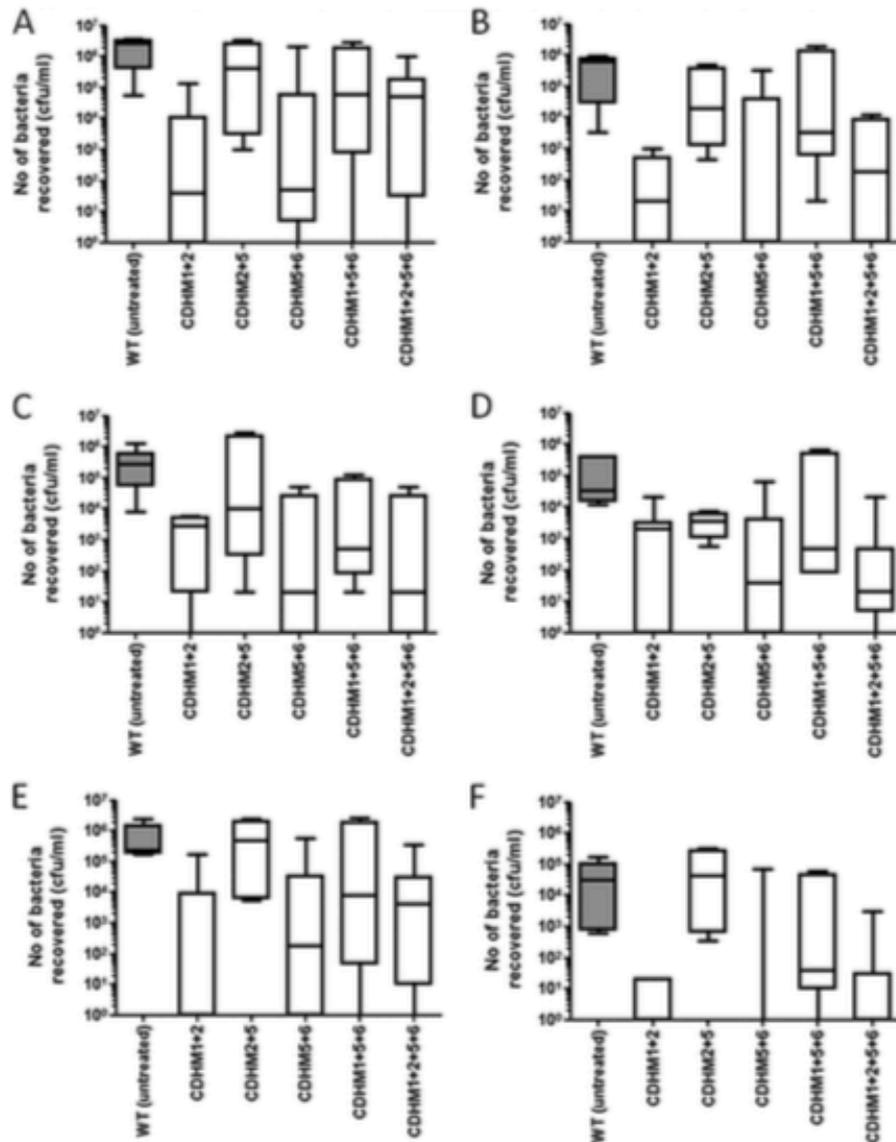


Figure 24 : Niveaux de colonisation des animaux traités pour l'étude 1. Graphe A : Colonisation dans le contenu caecal. Graphe B : Colonisation dans le colon. Graphe C : Colonisation dans le caecum. Graphe D : Bactéries associées au colon. Graphe E : Nombre de spores dans le caecum et graphe F : Nombre de spores dans la lumière du colon (20).

Chez les animaux traités par les phages, le nombre de CFU (Unité Formant Colonie) de *C. difficile* retrouvé était significativement plus bas dans les tissus que sans traitement. Un traitement par les phages a donc une influence positive sur la diminution d'une infection à *C. difficile*. Ces données nous montrent aussi que les combinaisons thérapeutiques les plus efficaces sont phiCDHM1-phiCDHM2 et phiCDHM5-phiCDHM6 (20).

Pour l'étude 2 on compare deux groupes de six animaux. Un groupe traité par les phages et un groupe non traité.

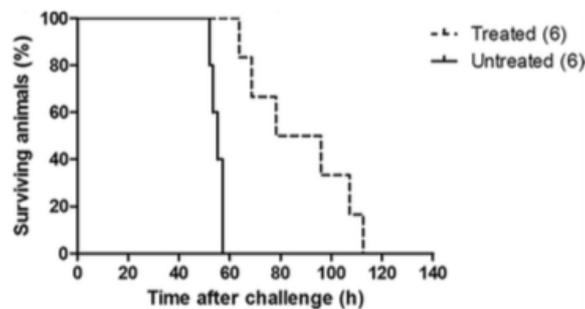


Figure 25 : Impact du traitement par les phages sur la survie des animaux (20).

Ici nous pouvons voir que pour des animaux ayant subi une infection à *C. difficile* la survie des animaux est augmentée s'ils ont eu un traitement à base de phages (20).

Même contre une infection à *Clostridium difficile*, on peut trouver des cocktails de phages qui ont un impact sur la diminution de la colonisation de cette bactérie mais aussi sur la survie.

4. *Campylobacter*

Les *Campylobacter* sont des bactéries à Gram négatif. Leur morphologie en forme de bâtonnet décrit une spirale, ces bactéries peuvent posséder des flagelles. Cette espèce ne produit pas de spores (21).



Figure 26 : Illustration de *Campylobacter* (22).

Depuis 10 ans, la prévalence de la campylobactériose est en augmentation dans les pays en voie de développement mais aussi dans les pays développés. Les facteurs de risque proviennent de la consommation de produits d'origine animale et d'eau ou de contact avec les animaux. En effet la volaille est un important réservoir et une source de la transmission de la campylobactériose à l'Homme. Chez l'être humain, les espèces de *Campylobacter* sont associées à divers troubles intestinaux (dû aux

déséquilibres de la flore digestive). Elle est aussi responsable d'autres manifestations extra gastro-intestinales (21).

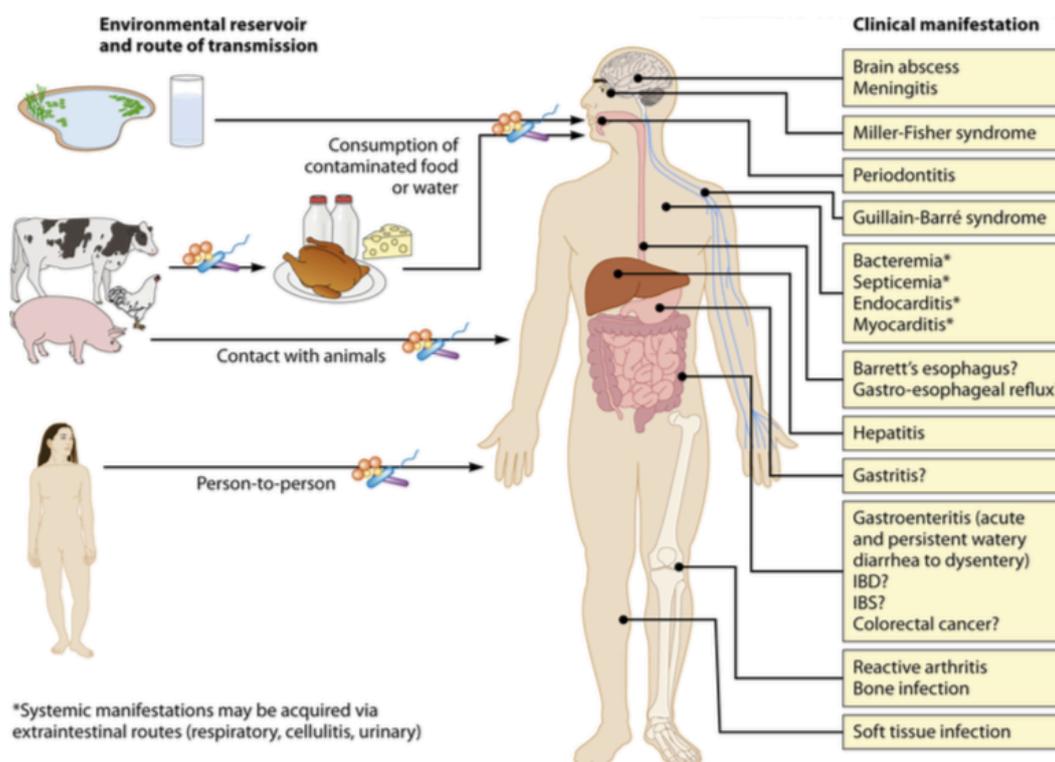


Figure 27 : Réservoir, voie d'administration et manifestations cliniques de *Campylobacter* (21).

L'infection à *Campylobacter jejuni* est une maladie infectieuse répandue, qui est une des causes majeures de la gastro-entérite dans le monde, ce pathogène peut aussi conduire à des affections auto-immunes telle que le syndrome de Guillain-Barré ou encore le syndrome de Miller Fisher (21).

Les études actuelles sur *Campylobacter* portent plus sur leur utilisation dans l'alimentation qu'à la recherche d'un traitement chez l'homme (voir Chapitre 4, partie 4 petit 3).

5. *Shigella*

Shigella est une entérobactérie à Gram négatif. Elle est responsable de la shigellose. Les espèces les plus courantes sont *Shigella flexneri*, causant la forme endémique de la maladie, *Shigella dysenteriae* responsable des épidémies brutales, ou encore *Shigella sonnei*, qui est prévalente dans les pays émergents et industrialisés. Le processus pathologique est très rapide. Les shigelles envahissent les cellules épithéliales intestinales puis le tissu constituant la muqueuse recto-colique. Ce

processus aboutit à une intense inflammation avec une sévère destruction tissulaire (23).



Figure 28 : Illustration de Shigella (24).

Lors d'une étude cherchant à isoler des bactériophages lytiques pour *Salmonella* Enteritidis, il a été trouvé un phage : SS3e, capable de lyser non seulement *Salmonella* Enteritidis mais aussi d'autres agents pathogènes à Gram négatif comme *Escherichia coli* mais aussi *Shigella sonnei* (25).

Dans une autre étude, visant à développer une méthode pour isoler les grands phages (environ 200 kpb), il a été observé que ceux-ci avaient des gammes d'hôtes plus étendues par exemple un phage : *Escherichia* phage E1wE11 E9 est efficace contre *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis mais aussi sur des shigelles : *S.sonnei*, *S.flexneri*, et *S.boydii* (26).

Actuellement il existe une préparation de phage ShigaShield™ composée de cinq bactériophages lytiques qui ciblent spécifiquement les espèces pathogènes de *Shigella* présentes dans les eaux et les aliments contaminés (27).

3. Les MICI :

Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) (28).

Ces MICI se caractérisent par **l'inflammation d'une partie de la paroi du tube digestif** (28).

Le tableau 29, regroupe les manifestations cliniques des deux entités :

Maladie de Crohn	Rectocolite hémorragique
<p>Symptômes plus variés :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diarrhée chronique • Douleurs abdominales • Amaigrissement • Altération de l'état général • Présence de lésions ano périméales 	<p>Symptôme majeur : Rectorragies (présence de sang dans les selles)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diarrhée glairo-sanglante • Ténésme • Épreintes • Douleurs abdominales • Perte de poids

Figure 29 : tableau présentant les manifestations cliniques de la MC et de la RCH.

Ces 2 pathologies évoluent par poussées.

En terme de topographie lésionnelle :

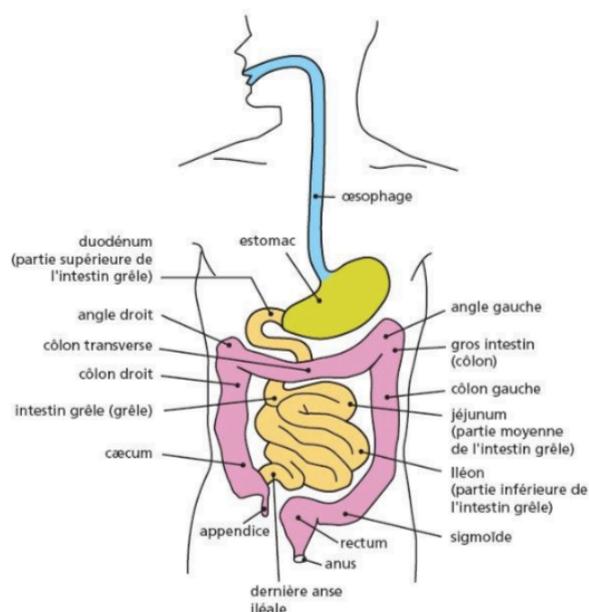


Figure 30 : Anatomie touchée lors de la MC (28).

La MC, touche l'ensemble du tube digestif de la bouche à l'anus, mais les 2 parties les plus touchées sont : l'intestin grêle (surtout l'iléon) et le colon. Les lésions provoquées par la MC sont discontinues avec des intervalles de paroi saine (28).

Discontinue
Intervalles de paroi saine

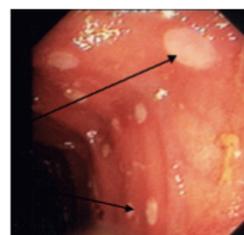


Figure 31 : Lésions provoquées par la MC (28).

Tandis que pour la RC, cela ne concerne que le colon. Les lésions provoquées par la RC sont diffuses et continues sans intervalle de paroi saine (28).



Figure 32 : Lésions provoquées par la RCH vs paroi saine (28).

En terme d'épidémiologie : Les MICI sont des maladies des pays industrialisés, qui touchent majoritairement les jeunes adultes (28).

En terme de diagnostic : Le diagnostic d'une MICI n'est pas aisé du premier coup, il se base sur un faisceau d'arguments et avec différents résultats qui peuvent être obtenus par l'anamnèse, des examens biologiques et microbiologiques (syndrome inflammatoire), des examens d'imagerie médicale (coloscopie majoritairement), ou encore des examens sérologiques (dosage des anticorps ASCA et des pANCA) (28).

En termes de traitement : A ce jour il n'existe pas de traitements curatifs des MICI. Mais leur but est d'améliorer la qualité de vie du patient en contrôlant les symptômes. En général ce sont des traitements qui ciblent la réaction inflammatoire intestinale en diminuant l'action du système immunitaire (28).

Le tableau 33, représente le panel des traitements existants :

Traitements	Indications, exemples de médicaments
Les dérivés aminosalicylés (5-ASA)	Traitement de première intention pour la RCH, intérêt limité pour la MC. <i>Ex : Sulfasalazine, Mésalazine</i>
Les corticoïdes	Traitement de base des poussées des MICI. <i>Ex : Prednisone, Prednisolone, Budésonide</i>
Les immunosuppresseurs	Utilisés de plus en plus. <i>Ex : Azathioprine, 6 Mercaptopurine, Methotrexate, Ciclosporine</i>
Les biothérapies	Les anti-TNF (<i>Infliximab, adalimumab, Golimumab, Certolizumab</i>) + Autres anticorps.
La chirurgie	RCH : Une colectomie totale permet la guérison totale MC : Une résection des segments les plus lésés ne permet pas la guérison totale

Figure 33 : Tableau des traitements existants pour les MICI (28).

Ces pathologies multifactorielles résultent d'une interaction complexe entre facteurs environnementaux (tabac, appendicectomie, flore intestinale) et génétiques (28).

La flore intestinale joue un rôle important dans l'inflammation caractéristique des MICI, pour exemple on trouve chez environ 40% des patients atteints de MC des *E. coli* adhérents et invasifs : les **AIEC**. (29)

Au niveau de la MC, nous avons donc mis en évidence une cible bactérienne spécifique : les AIEC, ce qui nous permet d'agir via les phages sur cette cible et d'espérer une amélioration de la pathologie (par contre pour la RCH qui est aussi une MICI, nous n'avons actuellement pas de cible spécifique).

Les AIEC sont anormalement prédominants sur la muqueuse iléale des patients atteints de la maladie de Crohn et comme l'efficacité des antibiotiques est en chute, en raison de l'augmentation des multirésistances aux bactéries, il est judicieux de s'orienter vers des alternatives thérapeutiques (30).

Pour la MC, le potentiel des bactériophages sur les AIEC de la muqueuse intestinale a été testé via plusieurs expériences qui ont été combinées afin de quantifier la capacité des bactériophages à cibler la souche AIEC LF82. Pour ces expériences des souris exprimant le récepteur humain CEACAM6 (récepteur plus présent chez les patients atteint de MC) ont été utilisées. Pour les différents tests la souche AIEC LF82 a été génétiquement modifiée de telle sorte qu'elle devienne résistante à la streptomycine et à la kanamycine, elle est nommée : LF82SK. Trois bactériophages issus des eaux usées et efficaces contre LF82 et LF82SK ont été sélectionnés : LF82-P2, LF82-P6 et LF82-P8 (30).

Expérience 1 : Réplication ex vivo de bactériophages individuels dans des échantillons intestinaux colonisés

Les souris BALB / cYJ, ont reçu du sulfate de streptomycine via l'eau de boisson trois jours avant l'administration de LF82SK, de manière à perturber leurs flores bactériennes pour permettre l'implantation de la souche LF82SK. Avant l'administration de la souche LF82SK, les fèces ont été recueillies, leur analyse n'a pas permis de mettre en évidence une colonisation préalable. Trois jours après le gavage avec la souche, les souris ont été euthanasiées et des coupes intestinales ont

été recueillies. Ces coupes ont été homogénéisées et il leur a été rajouté les bactériophages. Après incubation les bactériophages ont pu être comptés (30).

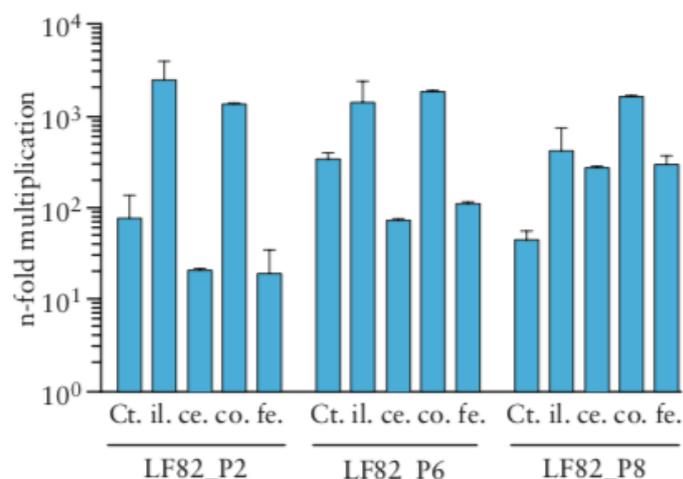


Figure 34: Histogramme du nombre de bactériophages dans les sections intestinales. Le contrôle (Ct.), Iléal (il.), Caecal (ce.), Colique (co.) et les sections intestinales fécales (fe.) (30).

Les trois bactériophages se répliquent ex vivo dans toutes les sections intestinales à taux plus important que dans le contrôle (30).

Expérience 2 : Traitement par bactériophage chez la souris CEABAC10

Dix souris transgéniques CEABAC10 (présentant le récepteur de la bactérie au niveau intestinal) ont reçu du DSS (Dextran Sodique Sulfate) (afin de provoquer une inflammation intestinale) dans l'eau de boisson, trois jours avant l'administration de la souche. Puis 24h après avoir reçu une dose unique de Streptomycine, elles ont reçu soit du PBS (témoin) soit le cocktail des trois bactériophages. Au cours de l'expérience des selles fraîches ont été prélevées pour évaluer le degré de colonisation de la souche LF82. Un ou quatre jours après l'administration des phages, les souris ont été euthanasiées afin d'évaluer le nombre de bactérie associées aux tissus du colon ou de l'iléon et déterminer les taux de bactériophages (30).

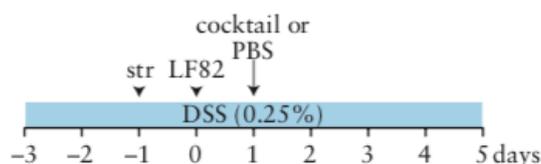


Figure 35 : Design de l'étude (30).

Vingt-quatre heures après le traitement, la concentration de la souche LF82 dans les fèces avait considérablement diminué, dans le groupe recevant des bactériophages.

Et il est resté significativement inférieur à celui du groupe témoin 4 jours après traitement, sans administration de bactériophages supplémentaires (figure B) (30).

Nous avons aussi observé que le nombre de bactériophages dans les fèces du groupe des bactériophages diminuait en fonction de la concentration de la souche LF82, tandis que dans le groupe des souris non colonisées, il était tombé en dessous du seuil de détection en 24 h (figure C) (30).

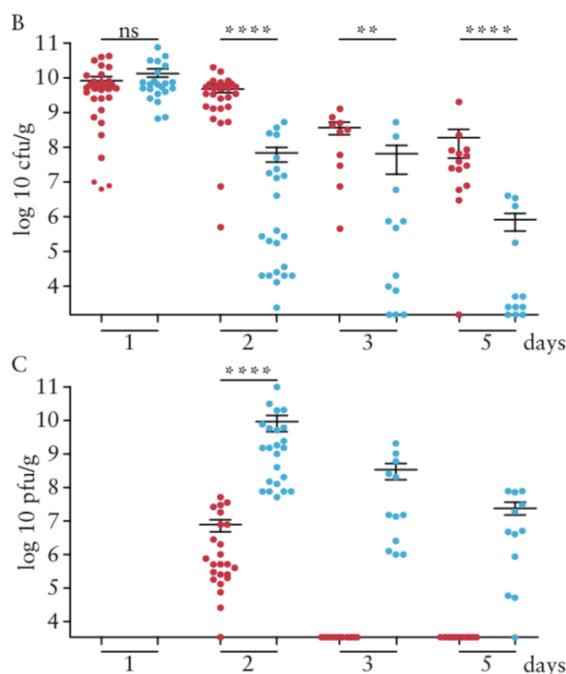


Figure 36 : Diagramme présentant les niveaux de la souche AIEC LF82 récupérés dans les matières fécales. En rouge les souris recevant du PBS (témoin), et en bleu les souris recevant le cocktail de phage. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ et ns : non significatif (30).

Nous avons également analysé les bactéries *E. coli* adhérentes des coupes intestinales iléales et coliques des groupes bactériophages et témoins :

- Vingt-quatre heures après le traitement, les taux de la souche adhérente LF82 étaient significativement plus faibles dans toutes les sections intestinales du groupe des bactériophages par rapport à celles du groupe témoin.
- Quatre jours après le traitement, les différences entre les deux groupes restaient significatives, sauf pour les coupes iléales.

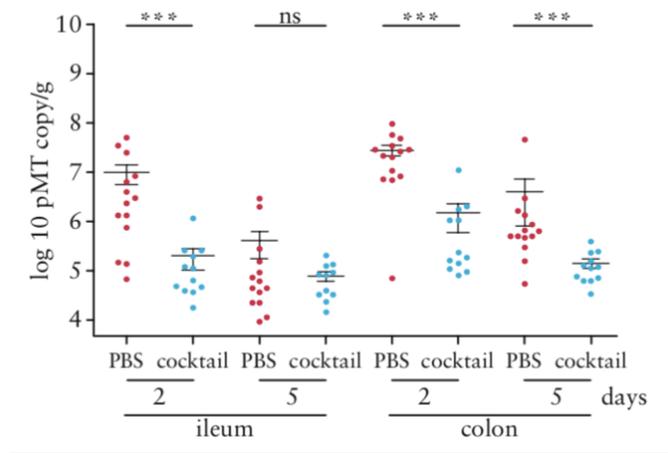


Figure 37 : Diagramme présentant les niveaux de la souche AIEC récupérés sur les coupes intestinales. En rouge les souris ayant reçu le PBS et en bleu, les souris ayant reçu le cocktail de phages. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ et ns : non significatif (30).

En conclusion, les bactériophages réduisent la colonisation de l'intestin de la souche AIEC LF82 chez des souris transgéniques exprimant la glycoprotéine CEACAM6 humaine. Et cela est vrai dans les matières fécales mais aussi sur les coupes intestinales (30).

Expérience 3 : Traitement par bactériophage de la colite induite par le DSS chez les souris de type sauvage

Les animaux BALB / cYJ ont été traités de la même manière que les souris transgénique CEABAC10 avec gavage par la souche LF82SK. Après l'introduction de la souche LF82SK, le DSS a été ajouté à l'eau de boisson afin de provoquer des légers symptômes de colite. Des fèces ont été collecté à des moments indiqués afin d'évaluer les niveaux de LF82SK et des bactériophages. Les souris ont été euthanasiées 25 jours après administration de la souche, afin d'évaluer LF82SK et les bactériophages dans les organes (30).

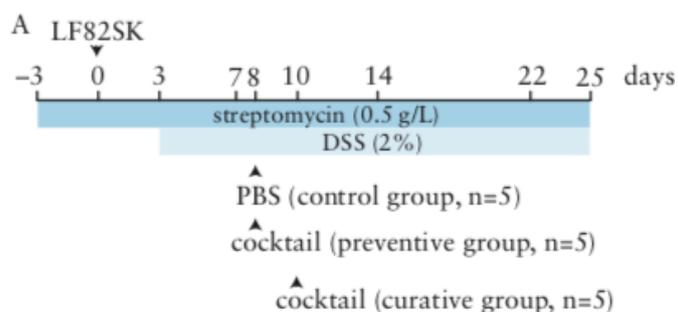


Figure 38 : Design de l'étude (30).

Trois groupes de souris colonisées avec la souche LF82SK ont reçu trois traitements indépendants (30) :

- Un groupe témoin qui reçoit du PBS au 8^{ème} jour
- Un groupe recevant le traitement en préventif (8^{ème} jour)
- Un groupe recevant le traitement curatif (10^{ème} jour)

Dans le groupe recevant le traitement préventif, le score DAI (Disease Activity Index) du dixième jour est inférieur à celui des deux autres groupes. Il a ensuite rediminué un peu et est resté à ce niveau sur les 15 prochains jours (figure B) (30).

Dans le groupe recevant le traitement curatif le dixième jour, la DAI a diminué 4 jours après le traitement mais dans une moindre mesure puis il reste faible pendant les 11 jours suivants (figure B) (30).

Les niveaux fécaux moyens de la souche LF82SK du jour 7 au jour 25 sont restés stables dans le groupe témoin, mais ont diminué dans les groupes préventif et curatif. De plus, ces résultats ont été confirmés par quantification moléculaire des coupes iléales et coliques recueillies au jour 25 (figure C, D). Par conséquent, une seule application de bactériophage a permis de réduire les symptômes de colite et de favoriser la décolonisation à long terme des AIEC (30).

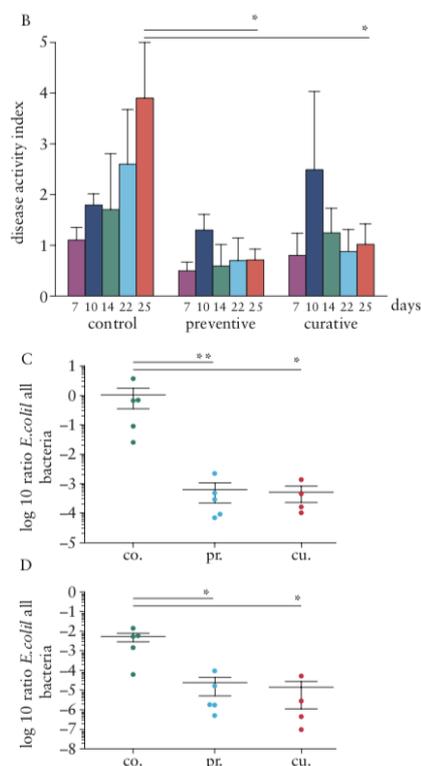


Figure 39 : B : Indice d'activité de la maladie pour chaque groupe de souris ; C et D : Diagramme présentant la quantification de E. coli dans les coupes iléales et coliques. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ (30).

Les bactériophages atténuent les symptômes de la colite chez des souris conventionnelles colonisées avec AIEC souche LF82SK (30).

Ces résultats démontrent que les bactériophages constituent une nouvelle option de traitement du ciblage de l'AIEC chez les patients atteints de MC et constituent une base solide pour l'évaluation d'un essai clinique (30).

Chapitre 4 : Traitements des aliments par les phages

1. Introduction :

La nourriture est un besoin fondamental de la vie quotidienne, mais dans de trop nombreux cas, la contamination par des bactéries pathogènes peut provoquer des maladies, voire la mort. En effet l'alimentation est la principale voie de transmission de plus de 200 maladies connues, dont beaucoup provoquées par des bactéries. Les principaux pathogènes d'origine bactérienne incriminés sont *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* et *Listeria monocytogenes* (31).

Voici, les bactéries qui nous intéressent :

	Symptômes	Source de l'infection
<i>Salmonella</i> Enterica	Salmonellose : gastro-entérite commune, fièvre entérique, bactériémie	Viandes contaminées d'origine animale et fruits et légumes
<i>Campylobacter</i>	Campylobactériose: gastro-entérite aiguë sévère, liée au développement du syndrome de Guillain-Barré	Consommation de viande insuffisamment cuite / crue, de lait pasteurisé, de légumes et d'eau dans l'environnement
<i>E. coli</i> O157 : H7	Diarrhée, colite hémorragique grave, syndrome urémique hémorragique	Consommation d'aliments bovins contaminés insuffisamment cuits
<i>Shigella</i>	Shigellose : diarrhée sanglante, fièvre, crampes d'estomac, entérite inflammatoire	Consommation d'eau contaminée, de légumes, lait, produits laitiers, volaille
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listériose : nausée, vomissement, avortement, mort foetale, septicémie, méningite	Consommation d'aliments contaminés

Figure 40 : Tableau des principales bactéries qui touchent l'alimentation (31).

2. Epidémiologie :

Selon les centres de contrôle et de prévention des maladies (CDC), on estimait qu'en 2011 environ 48 millions de cas d'intoxication alimentaire se produisaient chaque année aux États-Unis, dont 128 000 ont entraîné une hospitalisation et 3 000 le décès (31).

3. Contexte :

L'industrie alimentaire est continuellement confrontée à la menace de la contamination microbienne et la surutilisation des antibiotiques a aggravé l'émergence d'agents pathogènes résistants aux antibiotiques. C'est pourquoi, des efforts pour développer

de nouvelles méthodes pour contrôler cette contamination dans les aliments sont importants. En conséquence, les bactériophages sont apparus comme une option nouvelle, viable et sûre pour la prévention, le traitement et ou l'éradication de ces contaminants dans les aliments.

En 2006, une étape majeure dans l'histoire du phage a été franchie avec l'approbation du premier produit à base de phage : ListShield™, destiné à lutter contre *Listeria monocytogenes* dans les produits de viande et de volaille. Depuis lors, d'autres produits phagiques ont également été approuvés pour une utilisation en tant que biothérapeutiques dans les aliments. Les avancées du biocontrôle sur phage mettent en évidence leur potentiel à contrôler des agents pathogènes alimentaires et à confirmer que l'utilisation des phages est acceptable pour l'industrie alimentaire (31).

4. Étude de l'utilisation des bactériophages sur les aliments

1. *E. coli*

La première expérience est un test de bio-contrôle avec un cocktail à 6 phages contre un *E. coli* non pathogène DH5α, un entéro-pathogène (EPEC), un *Escherichia coli* O157: H7 Shiga-toxigène (STEC) et un *Escherichia coli* non-O157: H7 Shiga-toxigène (STEC) sur du bouillon, et du lait à 3 températures différentes : 4°C, 24°C et 37°C (32).

Les pathogènes EPEC et STEC sont les principales causes de diarrhées et de syndrome hémolytique et urémique. Les infections à STEC sont transmises aux humains par des aliments contaminés tels que la viande, le lait et l'eau. L'infection par EPEC est liée à contamination fécale due à une manipulation non hygiénique des aliments (32).

E. coli DH5α a été utilisée comme souche hôte sensible pour propager tous les bactériophages utilisés dans cette étude. Trois autres souches ont été utilisées dans les expériences de biocontrôle (32) :

- *E. coli* entéro-pathogène (EPEC),
- *E. coli* O157: H7 Shiga toxigène (STEC),
- *E. coli* non-O157: H7 Shiga toxigène (STEC).

Biocontrôle en bouillon : Les cultures des souches *E. coli* DH5 α , EPEC, STEC non-O157 : H7 et STEC O157 : H7 ont été utilisées séparément. Lorsque la densité cellulaire appropriée a été atteinte, le cocktail des six phages (proportions égales) a été ajouté (environ 10⁹ PFU/mL). Les cultures ont été incubées à 4 °C, 24 °C ou 37 °C sous agitation constante (150 tr / min) et les échantillons ont été prélevés après 24h et 48h pour la numération cellulaire viable sur des plaques de gélose. Le dénombrement des phages (PFU/mL) a également été effectué au début et à la fin de chaque expérience. Des cultures contenant uniquement des bactéries et du bouillon contenant uniquement des phages ont été utilisées comme contrôle de la réduction de cellules viables et pour vérifier l'absence de contamination, respectivement (32).

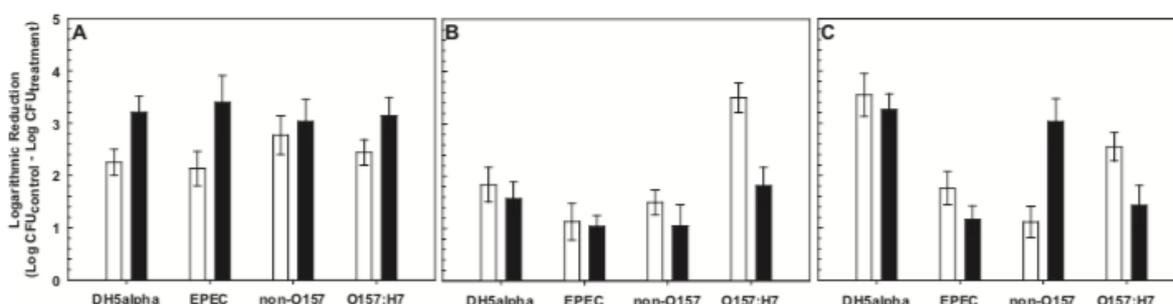


Figure 41 : Réduction des cellules viables d'*Escherichia coli* traitées avec le cocktail à six phages dans un bouillon après 24 h (barres blanches) et 48 h (barres noires) à 4 °C (A), 24 °C (B) et 37 °C (C). Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32).

L'activité du cocktail de 6 phages a été évaluée contre DH5 α et les souches pathogènes : EPEC, STEC non-O157 : H7 et STEC O157: H7 dans un bouillon, à différentes températures et à différents temps d'incubation (32).

- **Figure A :** À 4 °C et après 24 heures d'incubation, la réduction du nombre de cellules variait de 2,2 à 2,8 log₁₀ CFU, et après 48 heures, des valeurs de réduction plus élevées 3,2 à 3,4 log₁₀ CFU étaient observées.
- **Figure B :** À 24°C, on a une plus grande réduction des cellules viables après 24 h d'incubation.
- **Figure C :** À 37 °C, la réduction en log₁₀ CFU à 24h est supérieure à celles observées après 48 h pour 3 des 4 souches.

On peut dire que les cocktails de phages sont efficaces pour réduire la population de cellules bactériennes à 4 °C et surtout à 37 °C après une courte période d'exposition (24h); cependant, après des traitements plus longs, une repousse bactérienne peut être rapportée (32).

Biocontrôle dans le lait : Des expériences de biocontrôle ont été effectuées à 4 °C, 24 °C et 37 °C en lots parallèles dans du lait écrémé en poudre stérile, commercial, reconstitué, additionné de CaCl₂ pour remplacer la perte lors de la stérilisation du lait. Tous les lots ont été inoculés (sauf un : contrôle de la contamination) avec des cultures des quatre souches d'*E.coli* testées. Ensuite, les lots sont divisés en deux parties aliquotes, une aliquote de chaque lot infecté avec chaque souche de *E.coli* a été inoculée avec le cocktail de phages (environ 10⁸ - 10⁹ PFU / ml). L'autre aliquote a été utilisée comme témoin. L'incubation s'est déroulée pendant 24 h à 24 °C et à 37 °C et pendant six jours à 4 °C. Le cocktail à six phages a été évalué pour son activité lytique contre les souches non pathogènes (DH5α) et pathogènes (EPEC, STEC non-O157 : H7 et STEC O157: H7) dans du lait réfrigéré (4 °C), dans du lait à température ambiante (24 °C) et dans du lait à une température rompant la chaîne du froid (37 °C) (32).

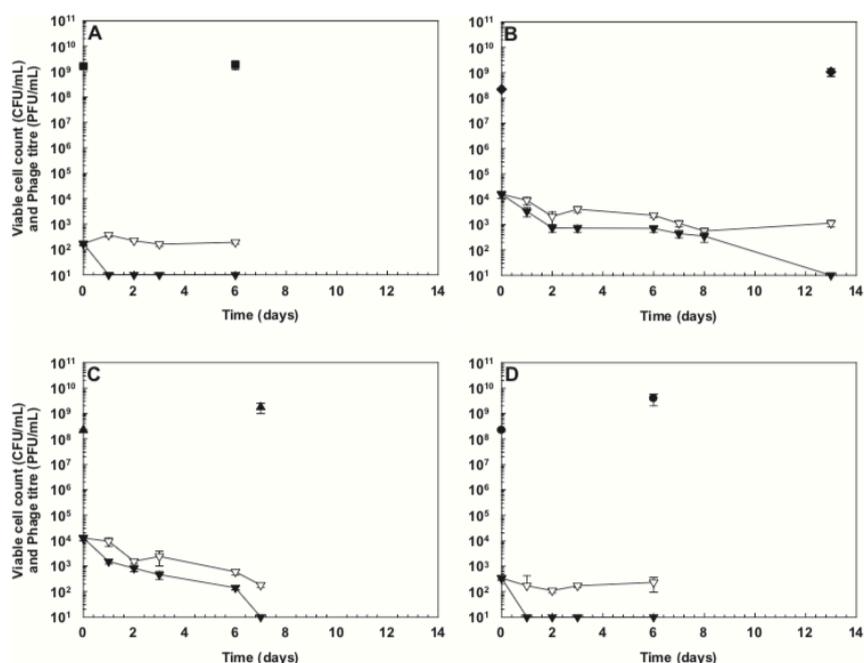


Figure 42 : Bio contrôle dans le lait par des phages à 4°C. (A) : *Escherichia coli* DH5α, (B) : EPEC, (C) STEC non-O157 : H7 et (D) STEC O157 : H7. Les symboles pleins représentent le nombre de cellules viables en présence de phages et les symboles vides sont des contrôles sans phages. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32).

Le niveau de contamination de toutes les souches de *E. coli* testées dans le lait est inférieur à la limite de détection (<10¹ UFC / mL) lorsque le cocktail de phage a été incubé à 4 °C. Spécifiquement, avec les souches DH5α (A) et STEC O157 : H7 (D) qui ont chuté de 10² CFU/mL au-dessous de la limite de détection après 1 jour. Alors que les cellules EPEC (B) et les STEC non-O157 : H7 (C) n'étaient indétectables qu'après 13 et 7 jours d'exposition aux phages, respectivement (32).

Pour déterminer si les bactériophages peuvent éliminer ou empêcher la croissance d'*E. coli* ($\sim 10^4$ CFU / mL) au cours d'une interruption de la chaîne du froid, des tests de provocation avec le cocktail ont été réalisés sur du lait à température ambiante (24 °C) (32).

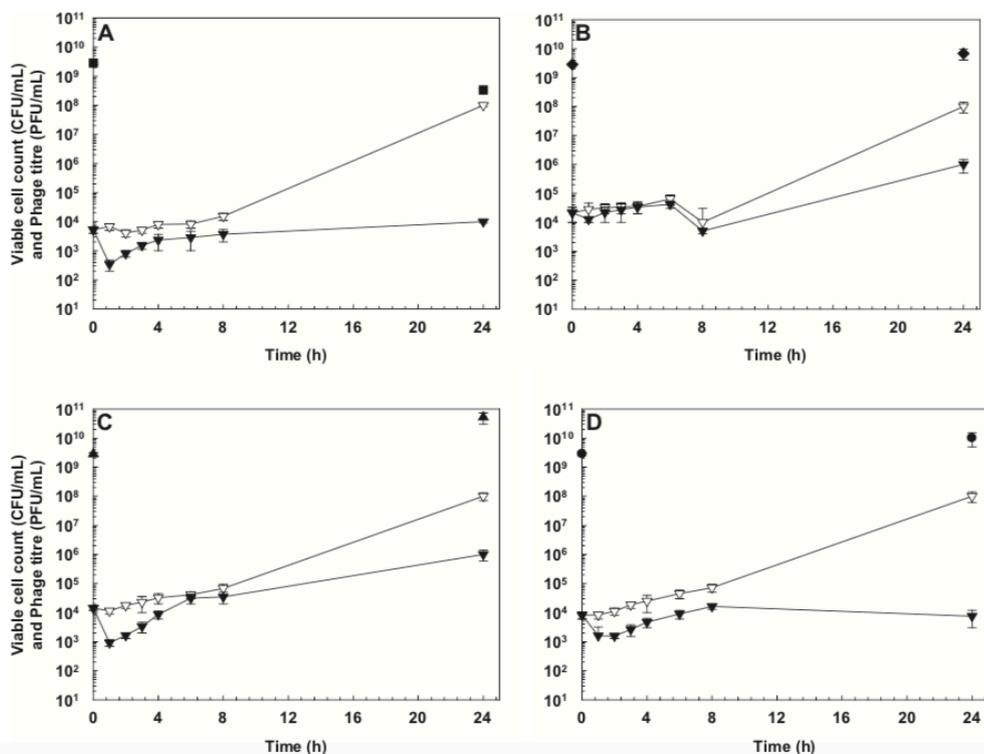


Figure 43: Bio contrôle dans le lait par des phages à 24°C. (A) : *Escherichia coli* DH5 α , (B) : EPEC, (C) STEC non-O157 : H7 et (D) STEC O157 : H7. Les symboles pleins représentent le nombre de cellules viables en présence de phages et les symboles vides sont des contrôles sans phages. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32).

Après 24 h d'incubation, les réductions obtenues étaient ≥ 4 log₁₀ CFU pour DH5 α (A) et STEC O157 : H7 (D), tandis qu'une réduction de seulement 2 log₁₀ CFU était observée pour EPEC (B) et STEC non-O157 : H7 (C). Ainsi, le cocktail de phages a maintenu la contamination bactérienne à un niveau acceptable, similaire à la contamination initiale, pour DH5 α et STEC O157: H7 après 24 heures, alors que les souches EPEC et STEC non-O157 : H7 étaient inhibées seulement après une incubation de 8 heures (32).

Les cocktails de phages utilisés à des fins de biocontrôle dans les produits laitiers sont réputés être très efficaces contre *E. coli*. Le lait exposé à la température ambiante, par exemple lors de ruptures dans la chaîne du froid du lait, pendant plus de quelques heures doit être jeté, mais ici on voit que le cocktail de phages s'est avéré utile lorsque le lait est soumis à des températures non réfrigérées (32).

Dans les dosages de biocontrôle réalisés dans le lait à 37 ° C, le cocktail de phages a réduit de manière significative les souches EPEC (B), STEC non-O157 : H7 (C) et STEC O157 : H7 (D) de 4, 3 et 4 log₁₀ CFU / mL respectivement. Cependant, 10³ à 10⁴ cellules bactériennes sont restées viables après 24 h d'incubation. Pour DH5α (A), on a une réduction en dessous du seuil de détection, au bout de 2h (32).

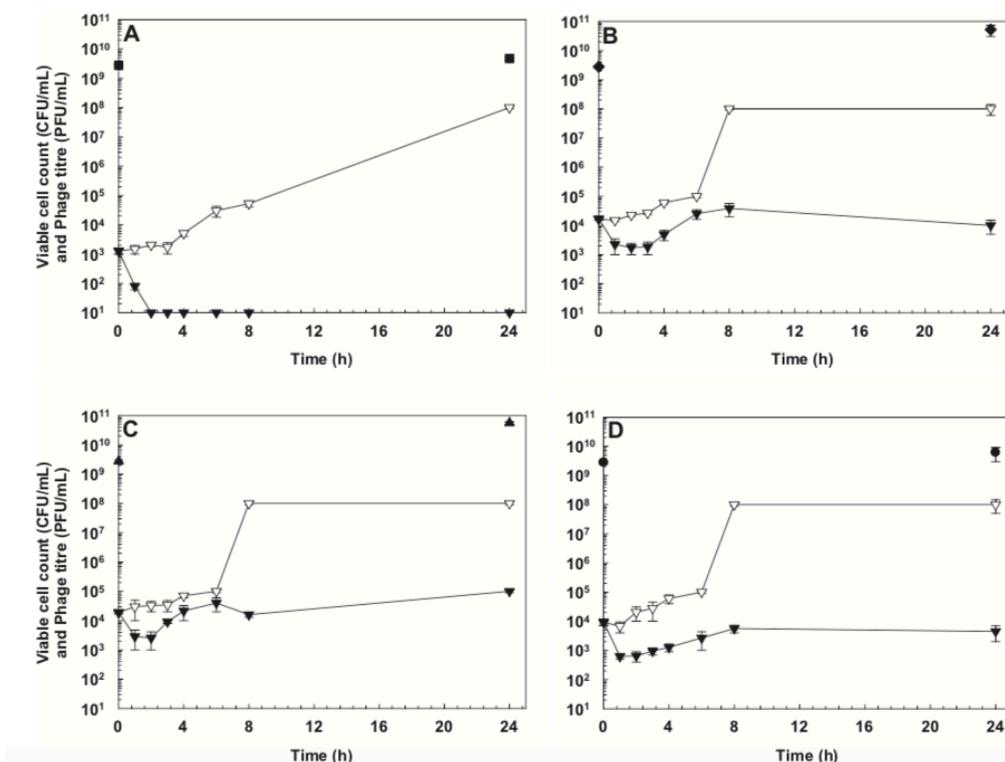


Figure 44 : Bio contrôle dans le lait par des phages à 37°C. (A) : Escherichia coli DH5α, (B) : EPEC, (C) STEC non-O157 : H7 et (D) STEC O157 : H7. Les symboles pleins représentent le nombre de cellules viables en présence de phages et les symboles vides sont des contrôles sans phages. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32)

Les six coliphages mélangés dans un cocktail ont été efficaces contre les agents pathogènes d'origine alimentaire. Notre cocktail de phages pourrait être une stratégie prometteuse pour contrôler les agents pathogènes d'origine alimentaire tels que *E. coli* EPEC et STEC à plusieurs températures dans le lait (32).

2. Salmonella

Étude sur l'application de bactériophages sur des viandes contaminées par Salmonella :

Salmonella est un agent pathogène d'origine alimentaire important qui entraîne un grand nombre d'hospitalisations. Des enquêtes ont suggéré qu'une contamination des

produits pourrait avoir lieu pendant la production, ou lors du transfert des viandes de l'abattoir et la transformation. En effet de mauvaises conditions d'hygiène lors du traitement et une mauvaise manipulation du produit semblent être les principales causes de contamination des produits carnés par *Salmonella* (33).

Cette étude se divise en deux points :

- Déterminer l'efficacité de l'application de bactériophages lors du culbutage (= mélange) de viande rouge et de volailles sur des populations de *Salmonella* dans des produits moulus
- Vérifier l'efficacité de différents temps de maintien avant la mouture (= avant le hachage).

Pour cette étude quatre souches de *Salmonella* ont été utilisées : *S. enterica*, *S. Heidelberg*, *S. Newport* et une souche résistante à la streptomycine *S. Enteritidis*. Et une préparation commerciale de bactériophages **Salmonalex™** contenant deux phages non tempérés S16 et Felix-O1a (FO1a) (33).

Pour la détermination de l'efficacité de la préparation des bactériophages : chaque souche de *Salmonella* a été déterminée en étalant en quatre exemplaires un volume de 100 µl de cultures diluées au jour le jour de souches individuelles sur de la gélose. Un volume de 100 µl de solution de phage (10^9 PFU / ml) a été appliqué sur la gélose et laissé sécher complètement avant l'incubation. Puis incubation à 37 °C pendant 24 h (33).

Pour la vérification de l'efficacité dans le temps : Des aliquotes de différents types de viandes (bœuf, porc, poulet dinde) ont été achetées et sélectionnées pour la présence de *Salmonella*. Un total de trente échantillons contenant 100g de chaque type de viande a été utilisé (33).

L'application des phages a été utilisée à 3 niveaux :

- Sans phages (témoin)
- 10^7 PFU/ml
- Et 10^8 PFU/ml

Tandis que pour le temps de maintien/conservation :

- 30 min ou 6h pour la volaille
- 6h ou 18h pour la viande rouge

L'expérience a consisté à inoculer un cocktail des quatre souches de *Salmonella* sur la surface des viandes. Les échantillons ont été mélangés puis en même temps traités par les bactériophages (10^7 ou 10^8 PFU/ml) ou par de l'eau (témoin). Puis leur conservation au réfrigérateur dépend de 2 périodes de temps (30 min ou 6h, 6h ou 18h). Par la suite, les échantillons ont été broyés, enfin 10g par échantillon ont été recueillis et passés par un Stomacher (estomac virtuel) afin de déterminer quantitativement la présence de *Salmonella* (après ingestion des viandes) (33).

Lors de la détermination de l'efficacité de la préparation des bactériophages : La préparation de bactériophages a réduit environ 99% la quantité de toutes les souches in vitro.

Strain	Bacteriophage application	Average CFU (4 plates)	Killing efficiency (%)
ATCC 51741	^a Control	126.75	99.0
	10^9 PFU/ml	1.25	
ATCC 8326	Control	334.75	99.1
	10^9 PFU/ml	3	
ATCC 27869	Control	160	99.2
	10^9 PFU/ml	1.25	
Se 13	Control	398.50	98.6
	10^9 PFU/ml	5.25	

^a No bacteriophage applied.

Figure 45 : Pourcentage de l'efficacité des phages sur les quatre souches de *Salmonella* (33).

Pour la vérification de l'efficacité dans le temps :

- Pour le bœuf haché il n'y a pas de corrélation entre l'application du bactériophage et du temps de maintien. Mais l'application des bactériophages a réduit de manière significative les populations de bactéries dans le bœuf, cela est plus efficace avec la dose de 10^8 PFU/ml
- Pour le porc haché, pas de corrélation entre l'application du bactériophage et du temps de maintien et les applications de bactériophages à 10^7 et 10^8 PFU / ml ont entraîné une réduction similaire.
- Pour le poulet haché, une corrélation a été observée entre les deux effets : application du bactériophage et temps de maintien. Pour observer une

réduction des populations de *Salmonella* il faut 6h et une concentration de 10^8 PFU/ml.

- Pour la dinde, les deux concentrations (10^7 et 10^8 PFU / ml) ont entraîné une réduction significative de la population de *Salmonella* dans les produits broyés mais le traitement avec 10^8 PFU / ml a entraîné une activité bactéricide plus élevée. Ici aussi le temps de maintien n'a pas d'incidence sur les taux dans la viande de dinde hachée.

Meat matrix	Holding time	Bacteriophage application			SEM ²	P value		
		Control ¹	10^7 PFU/ml	10^8 PFU/ml		BA ³	HT ⁴	BA + HT ⁵
Beef	6 h	7.0	6.6	5.9	0.13	<0.0001	0.29	0.06
	18 h	7.2	6.3	6.3				
Pork	6 h	7.3	6.5	6.4	0.13	<0.0001	0.24	0.83
	18 h	7.4	6.7	6.6				
Chicken	30 min	7.2 ^a	7.1 ^{A,a}	6.3 ^b	0.15	<0.0001	0.98	0.04
	6 h	7.5 ^a	6.7 ^{B,b}	6.4 ^b				
Turkey	30 min	7.2	6.6	6.4	0.13	<0.0001	0.77	0.65
	6 h	7.3	6.7	6.3				

Figure 46 : Détermination quantitative de *Salmonella* avec ou sans application des bactériophages sur 2 périodes données (33).

Cette étude montre que l'application de bactériophage est efficace et leur utilisation lors de la préparation des viandes peut être un moyen de contrôle supplémentaire pour limiter la propagation de *Salmonella* (33).

3. *Campylobacter*

La consommation d'aliments contenant du foie de poulet a été associée à l'entérite à *Campylobacter*. En effet, les *Campylobacter* peuvent contaminer la surface du foie post mortem, mais peuvent également résulter d'une infection systémique par ces bactéries colonisatrices chez des oiseaux vivants (34).

Pour cette étude un total de 109 échantillons de foie de poulet vendus au détail a été analysé pour la présence de *Campylobacter* pouvant être récupéré à partir de tissus superficiels ou internes. La prévalence de *Campylobacter* était élevée, avec 87,2% et 82,6% des échantillons positifs des tissus de surface et des tissus internes, respectivement. La plupart des échantillons contenaient de faibles quantités de *Campylobacter* qui ne pouvaient être récupérées que par enrichissement. On considère qu'il y a un risque important pour le consommateur pour une concentration de *Campylobacter* $\geq 3 \log_{10}$ CFU / g (34).

Trois bactériophages spécifiques de *Campylobacter* ont été isolés chez les 109 foies de poulet. L'un des phages provenait d'un échantillon de surface (CLP6), tandis que les deux autres provenaient des tissus internes du foie (CLP47 et CLP63). Les phages CLP47 et CLP63 présentaient des capacités lytiques similaires contre les isolats de foie de *C. jejuni* (64%), tandis que le phage CLP6 était virulent contre davantage d'isolats de *C. jejuni* (88%) (34).

Les histogrammes ci-dessous montrent l'activité des phages contre cinq souches de *C. jejuni* dans le foie de poulet.

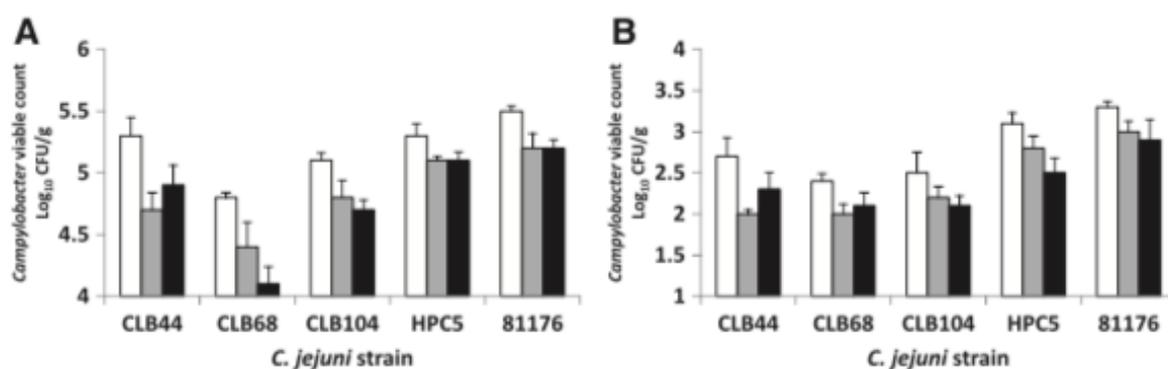


Figure 47 : Activité des phages contre des souches de *Campylobacter*. (A) à forte contamination 5 log₁₀ CFU/g et (B) à faible contamination 3 log₁₀ CFU/g. Les colonnes blanches représentent les échantillons traités de manière fictive, les colonnes grises représentent le traitement par le phage ϕ 3 et les colonnes noires représentent le traitement par le phage ϕ 15 (34).

Les échantillons de foie exempt de *Campylobacter* ont été inoculés par des suspensions de *Campylobacter*, après quoi chacune d'elles a été traitée avec une suspension de phage ou avec un tampon SM (traitement fictif). Les *Campylobacters* ont été dénombrés après une incubation à 4 °C pendant 48 h (34).

Toutes les souches de *C. jejuni* traitées par phage ont présenté une réduction significative du nombre de cellules viables par rapport au témoin pour les inoculum faibles et élevés. Cependant, les réductions observées étaient modestes (34).

L'utilisation d'un bactériophage pour réduire les niveaux de *Campylobacter* entrant dans la chaîne alimentaire est une approche d'intervention prometteuse, même si la réduction de CFU de *Campylobacter* est modeste (34). Peut-être un cocktail de phages pourrait donner de meilleurs résultats.

5. Des entreprises qui commercialisent des phages

1. Intralytix, USA

Intralytix, Inc. est une société américaine de biotechnologie spécialisée dans la découverte, la production et la commercialisation de produits à base de bactériophages destinés à contrôler les agents pathogènes bactériens dans les environnements, les aliments et dans le domaine médical (35).



Figure 48 : Slogan d'Intralytix (35).

La technologie des phages d'Intralytix repose sur la conviction que les bactériophages naturels constituent l'une des approches ciblées les plus sûres et les plus respectueuses de l'environnement pour lutter contre les infections bactériennes.

La technologie de base des phages d'Intralytix est possible grâce à la préparation de phages naturels, sûrs et efficaces à partir d'une banque de bactériophages bien caractérisés, isolés de l'environnement. Une fois dans la collection de phages d'Intralytix, les phages sont caractérisés et sélectionnés pour produire des cocktails de phages optimaux pour des applications spécifiques. Aujourd'hui, la bibliothèque de bactériophages lytiques d'Intralytix est l'une des plus grandes et des mieux caractérisées au monde. De plus, elle est continuellement mise à jour avec de nouveaux phages.

Cette société se concentre sur plusieurs domaines d'application dont : la sécurité alimentaire, la médecine humaine et vétérinaire, des problèmes environnementaux ou encore les compléments alimentaires et les probiotiques (35).

En ce qui concerne notre sujet : la sécurité alimentaire (35) :

- **Avec *Escherichia coli* O157 : H7** : Pour ce pathogène qui est contributeur important des maladies d'origine alimentaire dans le monde, Intralytix a développé un produit à base de phages, baptisé EcoShield™. Ce produit est

efficace pour réduire la contamination sur divers aliments comme le bœuf haché, les fruits et légumes etc.

- **Avec *Salmonella spp*** : qui est un lourd fardeau pour la santé dans le monde, Intralytix a mis au point une préparation à base de phages nommée SalmoFresh™, pour réduire ou éliminer le risque de salmonellose d'origine alimentaire. Ce produit est particulièrement utilisé sur la viande rouge et la volaille.
- ***Listeria monocytogenes*** : La maladie causée par *L. monocytogenes*, la listériose a l'un des taux de mortalité les plus élevés (environ 20%) parmi toutes les maladies bactériennes d'origine alimentaire et elle est donc particulièrement préoccupante pour la sécurité des personnes. Intralytix a donc mis au point une préparation à base de bactériophages, appelée ListShield™, pour réduire ou éliminer le risque de listériose d'origine alimentaire.

2. Pherecydes Pharma, France

Pherecydes Pharma est une société anonyme qui a pour mission de développer la phagothérapie personnalisée pour lutter contre les infections bactériennes. Cette société a lancé la première étude clinique multicentrique au monde pour l'évaluation de la phagothérapie chez les grands brûlés : PhagoBurn. Ce projet a été mis en place pour évaluer l'efficacité des bactériophages sur le traitement des infections cutanées à *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats de cette étude sont parus en Octobre 2018 et le traitement aurait été efficace chez 50% des patients (36).



Figure 49 : Logo PhagoBurn (36)

3. Micros Phage Guard, Belgique

PhageGuard est une entreprise qui contribue à rendre la production alimentaire plus sûre en utilisant des phages. En tant qu'ennemi naturel des bactéries, les phages tuent spécifiquement des agents pathogènes comme *Salmonella* et *Listeria*. Selon eux les phages sont (37) :

- **Facile** : pour leur application sur les aliments par pulvérisation, brumisation ou encore trempage.
- **Intelligent** : les produits utilisés par cette société ont une base scientifique solide.
- **Vert** : PhageGuard croit fermement, que la nature elle-même fournit les solutions aux défis modernes.

4. Autres

Il existe encore plusieurs autres entreprises qui innovent et développent les phages dans le monde comme Omnilytics (USA), MicroGen (Russie) ou encore Eliava (Géorgie).

Conclusion

D'après les diverses études recensées, les phages représentent une thérapie prometteuse cela est flagrant sur des pathogènes spécifiques comme *Escherichia coli*, *Salmonella*, ou encore *Clostridium difficile*. Mais leur application ne s'arrête pas là en effet un espoir est possible pour une maladie chronique : la maladie de Crohn.

Pour cela le côté naturel des phages est un élément primordial, qui joue un rôle important pour la sécurité dans l'utilisation de cette thérapeutique.

Ce qui est vraiment intéressant avec cette thérapeutique c'est qu'elle permet non seulement de traiter les maladies de l'homme mais aussi de traiter les aliments en prévention des pathologies transmissibles à l'homme. Et dans cette dernière indication nous avons vu que les États-Unis sont en avance sur nous avec la commercialisation de cocktail de phages pour l'alimentaire.

Récemment, l'ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament, a annoncé la création d'un comité scientifique spécialisé temporaire (CSST) pour s'occuper du retour d'expérience et des perspectives de la phagothérapie. Pour cela une réunion de travail se déroulera le 21 mars 2019. Le but de ce comité est de voir pour la mise en place des essais cliniques et des autorisations temporaires d'utilisation (ATU) sur l'utilisation de la phagothérapie.

Table des Illustrations

Figure 1: Apparition des résistances aux antibiotiques au cours du temps (2).....	11
Figure 2 : Schéma des principaux mécanismes de résistances (4).....	13
Figure 3 : Schéma d'un bactériophage (7).	14
Figure 4: Cycle de vie des bactériophages (1).	17
Figure 5 : Cycle de vie du médicament (9).....	20
Figure 6 : Illustration d' <i>Escherichia coli</i> (11).....	21
Figure 7 : Graphes représentant la densité optique après mise en contact durant 24h de la souche de <i>E. coli</i> avec les phages. On note (a) le phage ϕ APCEc01, (b) le phage ϕ APCEc02, (c) le phage ϕ APCEc03 et (d) le cocktail des trois phages, avec *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ (12).	23
Figure 8 : Graphes représentant la densité optique après mise en contact durant 24h (barre noire) et 48h (barre grise) de la souche de <i>E. coli</i> avec les phages. On note (a) le phage ϕ APCEc01, (b) le phage ϕ APCEc02, (c) le phage ϕ APCEc03 et (d) le cocktail des trois phages, avec *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (12).....	24
Figure 9 : Effet de la combinaison des phages avec un antibiotique après 24h d'incubation. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ (12).	25
Figure 10 : Résultats après infection à <i>E.coli</i> ZR1 chez le lapin. Groupe C : lapins témoins non infectés par <i>E.coli</i> et groupe B : lapins ayant reçu <i>E.coli</i> ZR1 (13).	27
Figure 11 : Résultats après les différents traitements sur le lapin. Groupe C : lapins témoins non infectés par <i>E.coli</i> ZR1, groupe P : lapins ayant reçu <i>E.coli</i> ZR1 et traités par phage, groupe N : lapins témoins négatifs ayant reçu <i>E.coli</i> ZR1, groupe A : lapins ayant reçu <i>E.coli</i> ZR1 et traités par antibiothérapie (13).....	27
Figure 12 : Illustration de <i>Salmonella</i> (15).....	28
Figure 13 : Tableau sur le design de l'étude, représentant les poussins répartis en quatre groupes.	30
Figure 14 : Résultats de la concentration de <i>S.Typhimurium</i> en fonction du groupe et l'âge des poussins.....	31
Figure 15: Résultat de la concentration de <i>S.Enteritidis</i> en fonction du groupe et de l'âge des poussins.....	32
Figure 16 : Résultat de l'effet de l'ACHIM sur une infection à <i>Salmonella</i> . *** : $p < 0,001$ (17).....	33
Figure 17 : Résultats des effets du traitement par les phages ou du traitement par l'Azithromycine sur le pathogène <i>Salmonella</i> .*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ et ns : non significatif (17).	34

Figure 18 : Comparaison du traitement par les phages par rapport au traitement antibiotique représenté par l'azithromycine (17).....	35
Figure 19 : Illustration de <i>Clostridium difficile</i> (19).....	36
Figure 20 : Nombre de cellules de <i>C.difficile</i> viables après traitement par des phages in vitro, sur des cellules bactériennes CD105HE1. Graphique A : en vert CDHM1, en bleu CDHM2, en violet CDHM3, en rouge CDHM6, en marron CDHM5 et noir pour le témoin. Graphique C : en vert CDHM 1 + 2, en violet CDHM 1 + 3, en bleu CDHM 2 + 3, en rouge CDHM 5 + 6 et noir pour le témoin. Graphique E : en vert CDHM 1 + 2 + 3, en bleu CDHM 1 + 5 + 6, en violet CDHM 2 + 5 + 6, en rouge CDHM 1 + 2 + 5 + 6 (20).....	37
Figure 21 : Nombre de cellules de <i>C.difficile</i> viables après traitement par les phages in vitro, sur des cellules bactériennes CD105LC2. Graphique B : en vert CDHM1, en bleu CDHM2, en violet CDHM3, en rouge CDHM6, en marron CDHM5 et noir pour le témoin. Graphique D : en vert CDHM 1 + 2, en violet CDHM 1 + 3, en bleu CDHM 2 + 3, en rouge CDHM 5 + 6 et noir pour le témoin. Graphique F : en vert CDHM 1 + 2 + 3, en bleu CDHM 1 + 5 + 6, en violet CDHM 2 + 5 + 6, en rouge CDHM 1 + 2 + 5 + 6 (20).....	38
Figure 22 : Protocole d'étude d'un traitement par les phages sur le hamster (20). ...	39
Figure 23 : Protocole d'étude d'un traitement par les phages sur le hamster (20). ...	39
Figure 24 : Niveaux de colonisation des animaux traités pour l'étude 1. Graphe A : Colonisation dans le contenu caecal. Graphe B : Colonisation dans le colon. Graphe C : Colonisation dans le caecum. Graphe D : Bactéries associées au colon. Graphe E : Nombre de spores dans le caecum et graphe F : Nombre de spores dans la lumière du colon (20).....	40
Figure 25 : Impact du traitement par les phages sur la survie des animaux (20).	41
Figure 26 : Illustration de <i>Campylobacter</i> (22).....	41
Figure 27 : Réservoir, voie d'administration et manifestations cliniques de <i>Campylobacter</i> (21).....	42
Figure 28 : Illustration de <i>Shigella</i> (24).....	43
Figure 29 : tableau présentant les manifestations cliniques de la MC et de la RCH.	44
Figure 30 : Anatomie touchée lors de la MC (28).....	44
Figure 31 : Lésions provoquées par la MC (28).	44
Figure 32 : Lésions provoquées par la RCH vs paroi saine (28).	45
Figure 33 : Tableau des traitements existants pour les MICI (28).	45

Figure 34: Histogramme du nombre de bactériophages dans les sections intestinales. Le contrôle (Ct.), Iléal (il.), Caecal (ce.), Colique (co.) et les sections intestinales fécales (fe.) (30).	47
Figure 35 : Design de l'étude (30).	47
Figure 36 : Diagramme présentant les niveaux de la souche AIEC LF82 récupérés dans les matières fécales. En rouge les souris recevant du PBS (témoin), et en bleu les souris recevant le cocktail de phage. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ et ns : non significatif (30).	48
Figure 37 : Diagramme présentant les niveaux de la souche AIEC récupérés sur les coupes intestinales. En rouge les souris ayant reçu le PBS et en bleu, les souris ayant reçu le cocktail de phages. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$ et ns : non significatif (30).....	49
Figure 38 : Design de l'étude (30).	49
Figure 39 : B : Indice d'activité de la maladie pour chaque groupe de souris ; C et D : Diagramme présentant la quantification de <i>E. coli</i> dans les coupes iléales et coliques. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ (30).....	50
Figure 40 : Tableau des principales bactéries qui touchent l'alimentation (31).	52
Figure 41 : Réduction des cellules viables d' <i>Escherichia coli</i> traitées avec le cocktail à six phages dans un bouillon après 24 h (barres blanches) et 48 h (barres noires) à 4 °C (A), 24 °C (B) et 37 °C (C). Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32).	54
Figure 42 : Bio contrôle dans le lait par des phages à 4°C. (A) : <i>Escherichia coli</i> DH5 α , (B) : EPEC, (C) STEC non-O157 : H7 et (D) STEC O157 : H7. Les symboles pleins représentent le nombre de cellules viables en présence de phages et les symboles vides sont des contrôles sans phages. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32).	55
Figure 43: Bio contrôle dans le lait par des phages à 24°C. (A) : <i>Escherichia coli</i> DH5 α , (B) : EPEC, (C) STEC non-O157 : H7 et (D) STEC O157 : H7. Les symboles pleins représentent le nombre de cellules viables en présence de phages et les symboles vides sont des contrôles sans phages. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32).	56
Figure 44 : Bio contrôle dans le lait par des phages à 37°C. (A) : <i>Escherichia coli</i> DH5 α , (B) : EPEC, (C) STEC non-O157 : H7 et (D) STEC O157 : H7. Les symboles pleins représentent le nombre de cellules viables en présence de phages et les symboles vides sont des contrôles sans phages. Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois déterminations ($p < 0,05$) (32)	57

Figure 45 : Pourcentage de l'efficacité des phages sur les quatre souches de <i>Salmonella</i> (33).	59
Figure 46 : Détermination quantitative de <i>Salmonella</i> avec ou sans application des bactériophages sur 2 périodes données (33).	60
Figure 47 : Activité des phages contre des souches de <i>Campylobacter</i> . (A) à forte contamination 5 log ₁₀ CFU/g et (B) à faible contamination 3 log ₁₀ CFU/g. Les colonnes blanches représentent les échantillons traités, les colonnes grises représentent le traitement par le phage ϕ 3 et les colonnes noires représentent le traitement par le phage ϕ 15 (34).	61
Figure 48 : Slogan d'Intralix (35).....	62
Figure 49 : Logo PhagoBurn (36).....	63

Bibliographie :

1. Kakasis A, Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1 janv 2019;53(1):16-21.
2. Lobanovska M, Pilla G. Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future? *Yale J Biol Med*. 29 mars 2017;90(1):135-45.
3. Mainardi JL. Mécanismes d'action et de résistance aux antibiotiques/ Session interactive autour de l'antibiogramme. :112.
4. 2012_156_2_04.pdf [Internet]. [cité 4 déc 2018]. Disponible sur: http://www.facmv.ulg.ac.be/amv/articles/2012_156_2_04.pdf
5. Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M. Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res*. avr 2014;78(2):110-6.
6. Résistance aux antibiotiques [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 10 déc 2018]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/resistance-antibiotiques>
7. SimplyScience - Les bactériophages: des virus qui soignent [Internet]. SimplyScience. [cité 10 déc 2018]. Disponible sur: <https://www.simplyscience.ch/archives-jeunes/articles/les-bacteriophages-des-virus-qui-soignent.html>
8. Harper DR. Criteria for Selecting Suitable Infectious Diseases for Phage Therapy. *Viruses* [Internet]. 5 avr 2018 [cité 29 oct 2018];10(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5923471/>
9. Le médicament: un parcours encadré [Internet]. euractiv.com. 2017 [cité 10 déc 2018]. Disponible sur: <https://www.euractiv.fr/section/sante-modes-de-vie/infographic/le-medicament-un-parcours-encadre/>
10. Gomes TAT, Elias WP, Scaletsky ICA, Guth BEC, Rodrigues JF, Piazza RMF, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*. déc 2016;47:3-30.
11. Study Challenges Long-Held Evolutionary Theory | Biology | Sci-News.com [Internet]. [cité 19 févr 2019]. Disponible sur: <http://www.sci-news.com/biology/evolutionary-theory-e-coli-long-term-evolution-experiment-05354.html>
12. Dalmaso M, Strain R, Neve H, Franz CMAP, Cousin FJ, Ross RP, et al. Three New *Escherichia coli* Phages from the Human Gut Show Promising Potential for Phage Therapy. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0156773.

13. Zhao J, Liu Y, Xiao C, He S, Yao H, Bao G. Efficacy of Phage Therapy in Controlling Rabbit Colibacillosis and Changes in Cecal Microbiota. *Front Microbiol.* 2017;8:957.
14. Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology Letters.* oct 2017;190:42-50.
15. La salmonelle, 1e cause de décès et 2e cause d'hospitalisation par infection alimentaire - Sciences et Avenir [Internet]. [cité 19 févr 2019]. Disponible sur: https://www.sciencesetavenir.fr/sante/la-salmonelle-1e-cause-de-deces-et-2e-cause-d-hospitalisation-par-infection-alimentaire_119696
16. Nabil NM, Tawakol MM, Hassan HM. Assessing the impact of bacteriophages in the treatment of Salmonella in broiler chickens. *Infect Ecol Epidemiol* [Internet]. 30 oct 2018 [cité 18 nov 2018];8(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6211228/>
17. Hu YOO, Hugerth LW, Bengtsson C, Alisjahbana A, Seifert M, Kamal A, et al. Bacteriophages Synergize with the Gut Microbial Community To Combat Salmonella. 2018;3(5):16.
18. Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* Infection. Longo DL, éditeur. *New England Journal of Medicine.* 16 avr 2015;372(16):1539-48.
19. Clostridium Difficile | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases [Internet]. [cité 19 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.niaid.nih.gov/research/clostridium-difficile>
20. Nale JY, Spencer J, Hargreaves KR, Buckley AM, Trzepiński P, Douce GR, et al. Bacteriophage Combinations Significantly Reduce Clostridium difficile Growth *In Vitro* and Proliferation *In Vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* févr 2016;60(2):968-81.
21. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of Campylobacter Infection. *Clinical Microbiology Reviews.* juill 2015;28(3):687-720.
22. Campylobacter uses other organisms as Trojan horse to infect new hosts [Internet]. [cité 19 févr 2019]. Disponible sur: <https://phys.org/news/2017-11-campylobacter-trojan-horse-infect-hosts.html>
23. Shigellose [Internet]. Institut Pasteur. 2015 [cité 18 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/shigellose>
24. Shigellosi Di Origine Alimentare: Sintomi, Diagnosi, Terapia, Prevenzione [Internet]. [cité 19 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.piuvi.com/salute/shigellosi-shigella-alimenti-sintomi-terapia-prevenzione.html>

25. Kim S, Kim S-H, Rahman M, Kim J. Characterization of a Salmonella Enteritidis bacteriophage showing broad lytic activity against Gram-negative enteric bacteria. *J Microbiol.* 1 déc 2018;56(12):917-25.
26. Systemic method to isolate large bacteriophages for use in biocontrol of a wide-range of pathogenic bacteria - ScienceDirect [Internet]. [cité 18 févr 2019]. Disponible sur:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172318302871>
27. Soffer N, Woolston J, Li M, Das C, Sulakvelidze A. Bacteriophage preparation lytic for Shigella significantly reduces Shigella sonnei contamination in various foods. *PLoS ONE.* 2017;12(3):e0175256.
28. Mr Bertin. Cours de 4ème année de pharmacie.
29. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 18 févr 2019]. Disponible sur:
<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/maladies-inflammatoires-chroniques-intestin-mici>
30. Galtier M, De Sordi L, Sivignon A, de Vallée A, Maura D, Neut C, et al. Bacteriophages Targeting Adherent Invasive Escherichia coli Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease. *J Crohns Colitis.* 1 juill 2017;11(7):840-7.
31. Endersen L, O'Mahony J, Hill C, Ross RP, McAuliffe O, Coffey A. Phage therapy in the food industry. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2014;5:327-49.
32. Tomat D, Casabonne C, Aquili V, Balagué C, Quiberoni A. Evaluation of a novel cocktail of six lytic bacteriophages against Shiga toxin-producing Escherichia coli in broth, milk and meat. *Food Microbiol.* déc 2018;76:434-42.
33. Yeh Y, Purushothaman P, Gupta N, Ragnone M, Verma SC, de Mello AS. Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on Salmonella population in final ground products. *Meat Sci.* mai 2017;127:30-4.
34. Firlieyanti AS, Connerton PL, Connerton IF. Campylobacters and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. *Int J Food Microbiol.* 21 nov 2016;237:121-7.
35. Intralytix, Inc. [Internet]. [cité 18 févr 2019]. Disponible sur:
<http://www.intralytix.com/>
36. Les bactériophages pour combattre les infections [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur: <https://fr.pherecydes-pharma.com/>
37. Micros – PhageGuard [Internet]. [cité 4 mars 2019]. Disponible sur:
<https://www.phageguard.com/tag/micros/>

REÇU le
1. 0. 2019
18h

DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : AVEZ MORGANE INE : 0905018444A

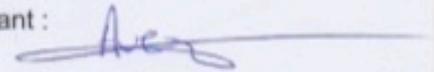
Date, heure et lieu de soutenance :

Le 25 04 2019 à 18h15 Amphithéâtre ou salle : PAULING

Engagement de l'étudiant - Charte de non-plagiat

J'atteste sur l'honneur que tout contenu qui n'est pas explicitement présenté comme une citation est un contenu personnel et original.

Signature de l'étudiant :



Avis du directeur de thèse

Nom : NEUT

Prénom : CHRISTEL

- Favorable
 Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 8/3/19
Signature: 

Avis du président du jury

Nom : NEUT

Prénom : CHRISTEL

- Favorable
 Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 8/3/19
Signature: 

Décision du Doyen

- Favorable
 Défavorable

Le Doyen

B. DÉCAUDIN


NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2018/2019

Nom : AVEZ
Prénom : Morgane

Titre de la thèse : Intérêt de la phagothérapie dans le traitement et la prévention des maladies du tube digestif

Mots-clés : Phagothérapie, Bactériophage, MICI, Maladie de Crohn, Antibiotiques, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter*, *Shigella*,

Résumé :

Dès la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming l'utilisation des antibiotiques a explosé, mais malheureusement cela s'est accompagné d'un réel fléau pour la santé publique : la résistance aux antibiotiques. Cette menace est réelle, c'est pourquoi la recherche de nouveaux traitements contre les bactéries résistantes est très importante.

Connus depuis les années 1915, les bactériophages semblent une thérapeutique prometteuse par leur spécificité et leur sécurité d'utilisation sur des bactéries du tube digestif telles qu'*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Clostridium difficile*, *Shigella* ou encore *Campylobacter*. Cependant les bactériophages nous laissent entrevoir d'autres espoirs notamment dans leur utilisation sur une maladie chronique : la maladie de Crohn. En effet dans cette pathologie, une cible spécifique a été découverte : un *Escherichia coli* adhérent et invasif. Actuellement cette thérapeutique est déjà utilisée pour le bio contrôle alimentaire, des cocktails de phages sont commercialisés afin de réduire les risques de contamination des aliments en amont de leur consommation afin de prévenir les pathologies liées à ces bactéries.

Membres du jury :

Président, conseiller de thèse : (Neut, Christel, Maître de Conférences des Universités émérite, Lille)

Assesseur : (Standaert, Annie, Maître de Conférences des Universités, Lille)

Membre extérieur : (Minart, Valérie, Docteur en pharmacie d'officine, Isbergues)