

**Faculté de pharmacie
et des sciences biomédicales**

**Le ciblage de *Escherichia coli*
adhérent-invasif par les
bactériophages constitue-t-il un
traitement potentiel de la
maladie de Crohn ?**

Auteur : EN-NAIZI Amal
Promoteur : MICHIELS Thomas
Année académique 2019-2020
Master en Sciences Pharmaceutiques, finalité spécialisée

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à témoigner ma reconnaissance à tous les professeurs que j'ai eus pendant mes études universitaires pour leurs enseignements de qualité. Je les remercie d'avoir partagé leurs connaissances et leurs expériences qui ont alimenté mes réflexions et m'ont fait grandir intellectuellement.

Je tiens à montrer toute ma gratitude et mon respect envers mon promoteur le Professeur Thomas Michiels. Premièrement, pour m'avoir transmis sa passion de la microbiologie lors de ses cours et ses travaux pratiques qui ont déterminé mon choix de mémoire. Deuxièmement, pour son aide et son encadrement. Je le remercie pour ses relectures, ses disponibilités, son regard critique et pour ses conseils judicieux qui m'ont permis de rédiger ce mémoire.

J'adresse également mes remerciements aux membres du jury d'avoir accepté d'examiner et juger mon travail.

Je tiens à dédier ce travail à mes parents pour leur amour, leur aide émotionnel et inconditionnel qui m'ont permis d'aller jusqu'au bout de mes études.

Je remercie mon catalyseur, mon frère Mehdi de m'avoir donné le goût de relever les défis.

Pour terminer, je tiens à exprimer ma reconnaissance envers tous mes amis qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de cette merveilleuse aventure humaine.

« Je déclare sur l'honneur que ce mémoire a été écrit de ma plume, sans avoir sollicité d'aide extérieure illicite, qu'il n'est pas la reprise d'un travail présenté dans une autre institution pour évaluation, et qu'il n'a jamais été publié, en tout ou en partie. Toute les informations (idées, phrases, graphes, cartes, tableaux...) empruntées ou faisant référence à des sources primaires ou secondaires sont référencées adéquatement selon la méthode universitaire en vigueur. Je déclare avoir pris connaissance et adhérer au Code de déontologie pour les étudiants en matière d'emprunts, de citations et d'exploitation de sources diverses et savoir que le plagiat constitue une faute grave. »

Abréviations

AIEC	<i>Escherichia coli</i> Adhérent-Invasif
ATG16L1	<i>Autophagy Related 16-Like 1</i>
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
BP	Peptidoglycane Bactérien
CD	Cellule dendritique
CEACAM6	<i>CarcinoEmbryonic Antigen related Cell Adhesion Molecule 6</i>
Cellule M	<i>Cellule Microfold</i>
CHI3L1	<i>Chitinase 3-like-1</i>
CRP	<i>C-Reactive protein</i> (protéine C réactive)
CU	Colite Ulcéreuse
DAI	<i>Disease Activity Index</i> (index de l'activité de la maladie de Crohn)
DSS	<i>Dextran Sulfate Sodium</i>
HBI	Indice de Harvey-Bradshaw
ICTV	International Committee on Taxonomy of Virus
IM	Intramusculaire
LPF	Longue Polaire Fimbriae
LPS	LipoPolysaccharides Bactérien
MC	Maladie de Crohn
MD2	Différenciation Myéloïde 2
MICI	Maladie inflammatoire chronique de l'intestin
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene 88</i>
NFκB	Facteur Nucléaire Kappa B
NOD2	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (tampon phosphate salin)
TJ	<i>Tight Junction</i> (jonction serrée)
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i> (Toll-Like Récepteur)
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (facteur de nécrose tumorale alpha)
TRIF	<i>TIR-containing adaptator inducing interferon-β</i>
UFC	Unité Formant Colonisation
UFP	Unité Formant Plaque

Liste des figures

- Figure 1 :** Cartographie de l'incidence mondiale des MICI
- Figure 2 :** Mécanismes immunitaires permettant le maintien de l'homéostasie intestinale
- Figure 3 :** Prévalence, abondance, richesse de l'AIEC chez des patients atteints de maladie de Crohn vs patients contrôles sains
- Figure 4 :** Escherichia coli adhérent-invasif vu au microscope électronique
- Figure 5 :** Mécanismes de pathogénèse de l'AIEC responsables de l'inflammation de l'intestin
- Figure 6 :** Principales familles des bactériophages
- Figure 7 :** Cycles infectieux des bactériophages
- Figure 8 :** Phagothérapie conventionnelle et enzymes phagiques
- Figure 9 :** Synergie antibiotiques-système immunitaire et bio-ingénierie
- Figure 10 :** Chronologie du mode opératoire sur des souris transgéniques CEABAC10
- Figure 11 :** Concentration d'AIEC dans les selles des souris transgénique CEABAC10
- Figure 12 :** Diminution de la concentration d'AIEC dans les coupes intestinales des souris transgéniques CEABAC10
- Figure 13 :** Chronologie du mode opératoire sur les souris sauvages
- Figure 14 :** Suivi de l'indice de l'activité de la maladie des souris sauvages
- Figure 15 :** Quantité E. coli dans des coupes intestinales chez les souris sauvages

Liste des Tableaux

- Tableau 1 :** Les 13 souches d'AIEC isolées des muqueuses intestinales humaines

Table des matières

1	Avant-propos	- 1 -
2	La maladie de Crohn.....	- 1 -
2.1	Introduction	- 1 -
2.2	Épidémiologie.....	- 2 -
2.3	Symptomatologie	- 2 -
2.4	Complications.....	- 3 -
2.5	Diagnostic.....	- 3 -
2.6	Étiologie	- 3 -
2.6.1	Génétique	- 4 -
2.6.2	Immunité	- 4 -
2.6.3	Environnement	- 5 -
2.6.4	Microbiote	- 5 -
2.6.4.1	Composition du microbiote	- 5 -
2.6.4.2	Fonction du microbiote.....	- 6 -
2.6.4.3	Dysbiose	- 7 -
2.7	Stratégies thérapeutiques.....	- 8 -
3	L'Escherichia coli adhérent-invasif	- 9 -
3.1	Définition	- 9 -
3.2	Prévalence des AIEC dans la MC.....	- 9 -
3.3	Morphologie de l'AIEC	- 11 -
3.3.1	Flagelles	- 11 -
3.3.2	Fimbriae.....	- 11 -
3.3.3	Lipopolysaccharide	- 12 -
3.4	Pathogénèse de l'AIEC	- 13 -
3.5	AIEC une bonne cible thérapeutique ?	- 14 -
3.6	Stratégie thérapeutique ciblant l'AIEC	- 16 -
3.6.1	Antibiotiques	- 16 -
3.6.2	Probiotiques	- 16 -
3.6.3	Prébiotiques	- 17 -
3.6.4	Postbiotiques.....	- 17 -
3.6.5	Transplantation fécale.....	- 18 -
3.6.6	Molécule anti-adhésive	- 18 -
3.6.7	Phagothérapie	- 19 -
4	Les bactériophages.....	- 19 -
4.1	Définition	- 19 -
4.2	Classification	- 20 -
4.3	Structure des phages caudés.....	- 21 -
4.4	Mécanisme d'action des bactériophages	- 21 -
4.4.1	Cycle de réplication	- 21 -
4.4.1.1	Cycle lytique	- 22 -
4.4.1.2	Cycle lysogénique.....	- 22 -

4.4.2	Enzymes phagiques	- 22 -
4.4.2.1	Holines	- 23 -
4.4.2.2	Endolysines	- 23 -
4.4.2.3	Enzymes dépolymérase.....	- 23 -
4.5	Applications des Bactériophages	- 23 -
5	Phagothérapie	- 24 -
5.1	Principe	- 24 -
5.1.1	Phagothérapie conventionnelle	- 24 -
5.1.2	Enzymes dérivés des phages	- 24 -
5.1.3	Synergie entre les phages et les agents antibactériens.....	- 25 -
5.1.4	Bio-ingénierie	- 25 -
5.2	Pharmacologie.....	- 26 -
5.2.1	Pharmacocinétique.....	- 26 -
5.2.1.1	Absorption	- 26 -
5.2.1.2	Distribution	- 27 -
5.2.1.3	Métabolisation.....	- 27 -
5.2.1.4	Élimination	- 28 -
5.2.2	Pharmacodynamique.....	- 28 -
5.2.2.1	Effet direct	- 28 -
5.2.2.2	Effet indirect	- 28 -
5.3	Innocuité	- 29 -
5.4	Avantages.....	- 29 -
5.5	Inconvénients.....	- 31 -
5.6	Usage actuel de la phagothérapie	- 33 -
6	Bactériophages dans la Maladie de Crohn.....	- 33 -
6.1	Test <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> sur des souris.....	- 33 -
6.2	Essai Clinique.....	- 37 -
7	Discussion	- 39 -
8	Conclusion.....	- 41 -
9	Méthodologie	- 42 -
10	Bibliographie	- 43 -
10.1	Articles	- 43 -
10.2	Sites internet consultés	- 48 -
10.3	Ouvrage.....	- 49 -
11	Annexes.....	- 50 -

1 Avant-propos

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) constituent une importante problématique de la gastroentérologie. En effet, de nos jours, ces maladies toucheraient plus de 5 millions de personnes dans le monde et ce nombre est sans cesse à la hausse (ASBL-Association Crohn-RCUH, 2019). Les MICI englobent : la maladie de Crohn, MC (59 %), la colite ulcéreuse, CU (37%) et des MICI indéterminées (4%) (Observatoire-crohn-rch, 2019). Les MICI sont des pathologies inflammatoires touchant différents segments du tube digestif. La MC se caractérise par une alternance de tissus sains et de tissus enflammés qui vont le plus souvent de l'iléon au côlon. Contrairement à la MC, la CU est une atteinte continue du tractus digestif qui concerne plus particulièrement le côlon et le rectum. Dans ce travail, il sera uniquement question de la MC.

Aujourd'hui, la MC reste incurable bien qu'il existe de nombreux traitements différents qui ont pour objectif de raccourcir les phases d'aggravation et de prolonger les phases de rémission. Depuis quelques années, on distingue divers traitements ciblant un pathogène particulier : l'*Escherichia coli* Adhérent-Invasif (AIEC). Ce dernier serait impliqué dans le développement et l'aggravation des lésions chez les patients atteints de la MC.

Ce mémoire vise d'une part à étudier l'AIEC afin de voir si ce pathogène constitue une cible prometteuse dans le traitement de la MC et d'autre part d'évaluer l'intérêt de la phagothérapie dans le ciblage du pathogène.

2 La maladie de Crohn

2.1 Introduction

La maladie de Crohn est une pathologie inflammatoire auto-immune idiopathique pouvant toucher n'importe quel segment du tube digestif et ce, de la bouche à l'anus. Il s'agit d'une maladie chronique qui alterne des phases d'aggravation suivies de phases de rémission pouvant durer de quelques semaines à plusieurs années. Lors des phases d'aggravation, on observe un épaissement de la paroi ainsi que des ulcérations (Feuerstein & Cheifetz 2017).

La MC peut concerner tout le monde mais elle touche tout particulièrement les sujets jeunes. Toutefois, 10 à 30% des patients ont développé la pathologie après 60 ans (Taleban et coll. 2015).

2.2 Épidémiologie

A l'échelle mondiale, les patients atteints de MICI sont estimés à 5 millions. En 2007, la Belgique comptait un peu plus 20 000 personnes atteintes de la MC (ASBL-Association Crohn-RCUH, 2019). L'incidence et la prévalence de cette maladie ont fortement augmenté depuis ces dernières années atteignant respectivement : 6-15 pour 100 000 personnes et 50-200 pour 100 000 personnes (Cosnes et coll. 2011). Cette incidence est plus élevée dans les pays développés comme le Canada, les États-Unis, le Royaume-Uni et d'autres pays d'Europe du Nord (figure 1).

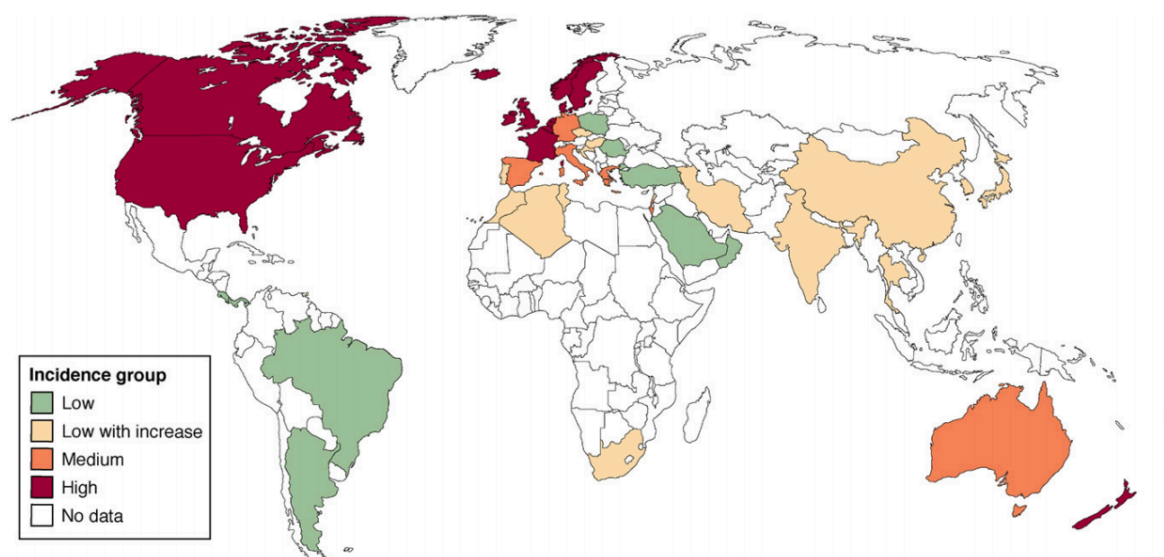


Figure 1. Cartographie de l'incidence mondiale des MICI. Rouge = incidence annuelle de plus de $10/10^5$, orange = $5-10/10^5$, vert = moins de $4/10^5$, jaune = faible incidence qui augmente petit à petit, blanc = absence de données (Cosnes et coll., 2011).

Cette localisation de l'augmentation de l'incidence suggère un rôle important des facteurs environnementaux tels que la surconsommation d'antibiotiques et d'additifs alimentaires, des régimes riches en graisses, en sucre et en protéines, la réfrigération des aliments et enfin de la pollution industrielle (Cosnes et coll. 2011).

2.3 Symptomatologie

Les symptômes sont variés et dépendent du segment digestif touché. Les plus courants sont :

- diarrhée aiguë ou chronique, pouvant être sanglante,
- douleurs abdominales,
- fatigue,
- perte d'appétit et de poids (Feuerstein & Cheifetz 2017 ; HAS 2019).

Au-delà de cette symptomatologie, la MC affecte et altère véritablement la qualité de vie personnelle et professionnelle du patient.

2.4 Complications

Les complications de la sphère digestive sont le plus souvent des maladies périanales telles que des fissures, des fistules, des abcès, des ulcères ou encore des sténoses. Ces complications sont en général présentes dans les formes les plus sévères de la maladie (Feuerstein & Cheifetz 2017).

La maladie de Crohn peut aussi avoir des manifestations extra-intestinales telles que des atteintes oculaires, cutanées, hépatiques, sanguines et enfin articulaires (Vavricka et coll. 2015).

2.5 Diagnostic

Le diagnostic de la MC se fait généralement entre 20 et 30 ans et pendant une période de poussée inflammatoire. Lors d'un examen clinique, on observera une distension abdominale douloureuse avec le plus souvent des signes de fatigue, de perte de poids ou d'anémie (HAS 2019).

Le critère de diagnostic de la MC étant l'observation de lésions intestinales, un examen endoscopique ou radiographique doit être réalisé afin de confirmer la pathologie. Lors d'un tel examen, on doit y voir des lésions discontinues dans l'ensemble du tube digestif situées le plus souvent dans la portion terminale de l'iléon et au niveau du côlon. Ces lésions peuvent se retrouver sous la forme de fissures dans la muqueuse ou encore de pseudo-polypes. Outre le diagnostic, ces méthodes permettent d'identifier l'intensité de la poussée ainsi que la gravité des lésions (Tontini et coll. 2015).

La recherche de deux biomarqueurs de l'inflammation et non-spécifiques de la MC (la protéine C-réactive et calprotectine) peut être réalisée mais ne constitue pas un critère diagnostique. Cependant, ces biomarqueurs permettent le suivi de la MC et d'objectiver l'efficacité d'un traitement (Tontini coll. 2015).

2.6 Étiologie

L'étiologie de la maladie de Crohn reste encore mal comprise et semble être multifactorielle. Cependant, de multiples facteurs déclencheurs et/ou aggravants ont été identifiés :

- Prédispositions génétiques,
- Facteurs immunologiques,
- Facteurs environnementaux,
- Microbiote intestinal (Baumgart & Sandborn 2012 ; Feuerstein & Cheifetz 2017).

2.6.1 Génétique

Diverses études génomiques ont mis en évidence 71 loci pouvant être responsables de la maladie de Crohn et ce, répartis sur 17 chromosomes différents (Baumgart & Sandborn 2012). Les variants génétiques sont impliqués dans les mécanismes de défenses bactériennes et dans l'homéostasie intestinale (annexe 1) (Kökten 2016).

Les gènes mutés les plus connus sont :

- *NOD2* : Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2 est responsable de l'apoptose lors de la rencontre avec les lipopolysaccharides bactériens (Strober & Watanabe 2011).
- *ATG16L1* : Autophagy Related 16-Like 1 est un gène responsable dans l'autophagie, une voie indispensable au maintien de l'homéostasie intestinale. De ce fait, sa mutation entraîne des perturbations du microbiote intestinal (Kabat et coll. 2016).

Cette étiologie ne peut pas être la seule mise en cause. En effet, ce n'est pas une condition nécessaire ou suffisante pour développer la MC. C'est pour cela qu'on parle de gène de susceptibilité à la MC. De ce fait, il n'est pas utile de faire un phénotypage afin de réaliser un dépistage précoce de la maladie. Outre la présence de ces gènes de susceptibilité, il faut d'autres facteurs pour développer la maladie (Baumgart & Sandborn 2012).

Le risque de transmission d'un parent malade à son enfant est en moyenne de 2 à 13 fois plus grand que si le parent est sain (Orholm et coll. 1999).

2.6.2 Immunité

Dans la maladie de Crohn, la perméabilité de l'épithélium intestinal étant altérée, la muqueuse intestinale laisse pénétrer toutes sortes d'antigènes et de bactéries dans la lamina propria. Les Toll Like Récepteurs (TLR) sont chargés de reconnaître les motifs bactériens. Une fois reconnus, les TLR s'activent et induisent alors premièrement la production de cytokines pro-inflammatoires et deuxièmement la co-stimulation nécessaire à la réponse immunitaire adaptative (Baumgart & Sandborn 2012).

Les antigènes vont aussi stimuler les cellules dendritiques (CD) entraînant alors le recrutement et la prolifération de lymphocytes (Th1, Th2 et Th17). La MC semble tout particulièrement être médiée par une réponse immunitaire de type Th1 et Th17 tandis que la CU concerne le Th2.

Cette dérégulation immunitaire innée et adaptative constitue un facteur de risque dans le développement de la pathologie (Shih et coll. 2008).

2.6.3 Environnement

Plusieurs facteurs environnementaux ont été identifiés et reconnus comme ayant une grande place dans le déclenchement de la maladie ou des phases de poussées inflammatoires et dans la sévérité des lésions. Ces facteurs altèrent soit l'intégrité des muqueuses, soit la réponse immunitaire, soit le microbiote intestinal ou encore favorise l'inflammation. Les facteurs environnementaux le plus souvent incriminés sont : le tabac, l'appendicectomie, la prise d'antibiotiques, la prise d'AINS, l'allaitement, l'alimentation, le stress (Feuerstein & Cheifetz 2017).

2.6.4 Microbiote

Le microbiote intestinal est l'ensemble des microorganismes colonisant la surface des muqueuses intestinales. Il regroupe des bactéries, des virus, des champignons, des protozoaires et des archées. Ce sont les bactéries qui apportent la plus grande contribution à l'organisme (Alhagamhmad et coll. 2016). La colonisation bactérienne a lieu directement après la naissance grâce aux contacts directs avec le microbiote maternel. Ensuite, ce microbiote subit diverses modifications durant les premiers mois de vie. L'allaitement maternel permet la colonisation par les bactéries symbiotiques : le *Bifidobacterium* et le *Lactobacillus*. Le microbiote se stabilise vers l'âge de 3 ans (Jandhyala et coll. 2015).

2.6.4.1 Composition du microbiote

Dans le microbiote intestinal, on dénombre 4 grandes familles bactériennes qui sont majoritaires : les *Firmicutes*, les *Actinobacteria*, les *Bacteroidetes* et les *Proteobacteria*. La proportion de ces bactéries est en permanence régulée (Alhagamhmad et coll. 2016).

La composition du microbiote intestinal varie en fonction de la localisation. En effet, au niveau des portions proximales du tube digestif (estomac et duodénum), on retrouve essentiellement des bactéries aérobies et anaérobies facultatives (*Entérobactéries*, *Entérocoques* et *Lactobacilles*). Par contre, dans les parties distales de l'intestin grêle et dans le colon, on retrouve des bactéries anaérobies strictes. Cette distribution s'explique par la présence d'oxygène dans les portions proximales du tractus digestif qui ensuite se raréfie de plus en plus. Outre cette distribution, il y a une augmentation du nombre de bactéries tout le long du tractus. Le côlon dispose de la plus grande densité et variété de bactéries (Alhagamhmad et coll. 2016 ; Reinoso Webb et coll. 2016).

- Les cellules plasmatiques produisant des IgA.

Ces trois éléments constituent une ligne défensive supplémentaire contre la colonisation bactérienne de la muqueuse intestinale.

Troisièmement, si la microflore pénètre dans les cellules épithéliales, le système immunitaire inné et adaptatif est activé pour éliminer les pathogènes infiltrés.

Ces mécanismes permettent de maintenir l'homéostasie des muqueuses intestinales en gérant les bactéries du microbiote et le système immunitaire de l'hôte. La perturbation de cette homéostasie semble être un élément clé dans le développement de MICI (Zhang et coll. 2017).

2.6.4.3 *Dysbiose*

Le terme dysbiose fait référence à un déséquilibre dans l'organisme entre les bactéries saprophytes et les bactéries pathogènes menant alors à la perturbation de l'homéostasie intestinale. Dès les premières descriptions des MICI, l'implication du microbiote dans la pathogénèse et l'évolution de la maladie ne fait aucun doute. En effet, les lésions inflammatoires sont majoritairement situées au niveau terminal de l'iléon et au côlon, deux sites présentant la plus grande densité et variété de microorganismes. De plus, plusieurs études ont rapidement mis en évidence des différences dans la composition du microbiote intestinal entre les patients atteints de la MC et des personnes saines (Alhagamhmad et coll. 2016).

Chez les patients atteints de la MC, il y a une diminution de bactéries saprophytes et tout particulièrement des *Firmicutes*, *Lactobacillus* et de *Bifidobactéries* (Favier et coll. 1997). On observe également une diminution du nombre de *Clostridium* qui sont des sources de butyrates, un carburant essentiel aux cellules épithéliales. Ce butyrate exerce aussi une activité anti-inflammatoire via la suppression de la signalisation NFkB. Dès lors, cette diminution de butyrates altère le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale (Segain et coll. 2000).

En plus de la diminution des bactéries bénéfiques du microbiote, une augmentation de bactéries pathogènes a été rapportée dans la MC notamment : les *Bactéroides*, *Escherichia coli* adhérent-invasif. Ce dernier pathogène semblerait jouer un rôle déclencheur dans la MC.

Au vu des résultats, la surveillance du microbiote pourrait s'avérer utile comme biomarqueur pour évaluer le risque de rechute et/ou de récurrence. Cependant, cela reste encore hypothétique car de plus amples recherches sont nécessaires afin de déterminer la sensibilité et la spécificité de ce biomarqueur (Alhagamhmad et coll. 2016).

2.7 Stratégies thérapeutiques

Malheureusement, de nos jours, il n'existe aucun traitement curatif. Les traitements de la maladie de Crohn ont 3 objectifs distincts. Premièrement, contrôler les poussées inflammatoires et maintenir les périodes de rémission le plus longtemps possible. Deuxièmement, prévenir les complications de la maladie. Troisièmement, améliorer la qualité de vie des patients et minimiser les effets secondaires des traitements (Hart & Ng 2015).

La gravité des poussées inflammatoires et leur localisation constituent deux paramètres essentiels à l'orientation de la stratégie thérapeutique. Il existe d'autres paramètres qui aideront le médecin à choisir le traitement, comme la sensibilité aux médicaments ou l'âge du patient.

Les classes de traitements les plus utilisées sont : les anti-inflammatoires avec aminosalicylés pour les formes légères et les corticostéroïdes pour les formes modérées à sévères, les immunosuppresseurs (Thiopurine et Méthotrexate), les antibiotiques et les agents de biothérapie (Sales-Campos coll. 2015 ; Hvas et coll. 2018). Tous ces traitements visent à diminuer la réponse immunitaire exacerbée du patient. Toutefois, ces médicaments ont une efficacité limitée et variable. Le traitement idéal devrait spécifiquement soigner l'inflammation sans induire une immunosuppression (Sales-Campos et coll. 2015).

De nos jours, on retrouve d'autres traitements qui ont pour objectif la modulation du microbiote intestinal soit avec l'apport de micro-organismes vivants appelés probiotiques, soit avec de substrats du microbiote intestinal, les prébiotiques, ou encore avec des transplantations fécales. Les compléments alimentaires sont très consommés mais les preuves de leurs bénéfices sont minces et difficiles à obtenir. Toutefois, la vitamine D aiderait à réguler les réponses immunitaires qu'elles soient innées ou adaptatives (Hvas et coll. 2018).

La majorité des patients auront recours à une chirurgie durant leur vie. En moyenne, 50% des patients subiront cette intervention chirurgicale dans les 10 ans suivant leur diagnostic. Les indications de la chirurgie sont nombreuses : fistules, sténose avec des symptômes obstructifs, complication infectieuse, échecs thérapeutiques, dépendance aux stéroïdes, dysplasie et cancer. Il s'agit d'une chirurgie non curative. En effet, le patient pourra toujours développer une poussée inflammatoire à un autre endroit du tube digestif (Hvas et coll. 2018).

3 L'Escherichia coli adhérent-invasif

3.1 Définition

L'*Escherichia coli* adhérent-invasif, AIEC est un pathovar des *E. coli* ayant développé une certaine virulence et un mécanisme d'invasion des muqueuses intestinales.

En 1998, la souche LF82 est la première souche du pathovar à être mise en évidence dans la muqueuse des patients atteints de la MC. Cette souche d'AIEC est la plus référencée mais il en existe d'autres colonisant la muqueuse intestinale des patients atteints de MICI. Toutefois, la majorité des recherches ont été effectuées sur cette souche afin de comprendre la physiopathologie du pathovar dans la MC ou dans d'autres MICI.

3.2 Prévalence des AIEC dans la MC

Depuis ces dernières années, la dysbiose intestinale comme une étiologie de la MC prend de plus en plus de place et incrimine plus particulièrement un pathogène : l'AIEC.

Il y a une forte variabilité génomique entre les souches du pathovar, compliquant ainsi les recherches. Pour qu'une souche soit identifiée comme étant un pathovar AIEC, il faut qu'elle réponde au test d'adhésion, d'invasion mais aussi au test de survie et de réplication dans les macrophages (Darfeuille-Michaud et coll. 2004). Dès lors, on a identifié treize souches comme étant des AIEC (tableau 1). Parmi elles, onze souches concernent la MC, une souche concerne la CU et une autre est non-associée à une MICI.

E. coli strain	AIEC phenotype	IBD affection status	Anatomic site	Pathology
LF82	AIEC	CD	ileum	diseased
NRG857c	AIEC	CD	ileum	-
UM146	AIEC	CD	ileum	-
HM605	AIEC	CD	colon	-
541_1	AIEC	CD	ileum	-
541_15	AIEC	CD	ileum	-
576_1	AIEC	CD	ileum	-
MS-107-1	AIEC	CD	ileum	-
MS-115-1	AIEC	UC	colon	diseased
MS-119-7	AIEC	CD	colon	-
MS-124-1	AIEC	CD	ileum	unaffected
MS-145-7	AIEC	CD	colon	-
MS-57-2	AIEC	Non-IBD	ileum	unaffected

Tableau 1. Les 13 souches d'AIEC isolées des muqueuses intestinales humaines. Maladie de Crohn : CD, Colite ulcéreuse : UC ; Maladie inflammatoire chronique de l'intestin : IBD. (Zhang, Rowehl et coll. 2015)

D'autres souches d'*E. coli* non-invasives concernent la MC : T75 et MS-84-1 (Zhang et coll. 2015). La compréhension du rôle et de la contribution de toutes ces souches dans la MC nécessite encore de plus amples recherches.

Les souches d'AIEC semblent coloniser préférentiellement les muqueuses iléales des patients atteints de la MC : 36,6% contre 6% des patients sains. Selon les travaux de Darfeuille-Michaud

et coll., l'AIEC colonise moins le côlon. En effet, dans les muqueuses coliques, le pathovar est retrouvé seulement chez 3,7% des patients atteints de la MC et chez 1,9% des patients contrôles (Darfeuille-Michaud et coll. 2004).

Outre cette plus grande prévalence, on retrouve aussi une plus grande abondance des AIEC par rapport au *E. coli* soit $3,8\% \pm 5,0$ chez les patients atteints de la MC pour $1,5\% \pm 3,8$ chez les patients sains ($P = 0,039$). De même qu'on retrouve une plus grande richesse des AIEC chez les patients atteints de la MC. En effet, on dénombre plus de sous-types du pathovar par patient chez les patients atteints de la MC : $0,8 \pm 1,4$ que chez la population contrôle : $0,2 \pm 0,4$ ($P = 0,015$) (Martinez-Medina et coll. 2009).

La figure 4, issue de l'article Martinez-Medina et coll., illustre cette augmentation de la prévalence, de l'abondance et de la diversité de l'AIEC chez les patients atteints de la MC par rapport à une population contrôle (A). Ensuite, la figure détaille ces mêmes résultats en fonction de la localisation des différentes atteintes (B). Cette étude rejoint donc celle de Darfeuille-Michaud et coll., sur le fait que le pathovar AIEC est plus présent chez les patients atteints de la MC par rapport aux sujets sains et qu'il coloniserait plus les muqueuses iléales que coliques.

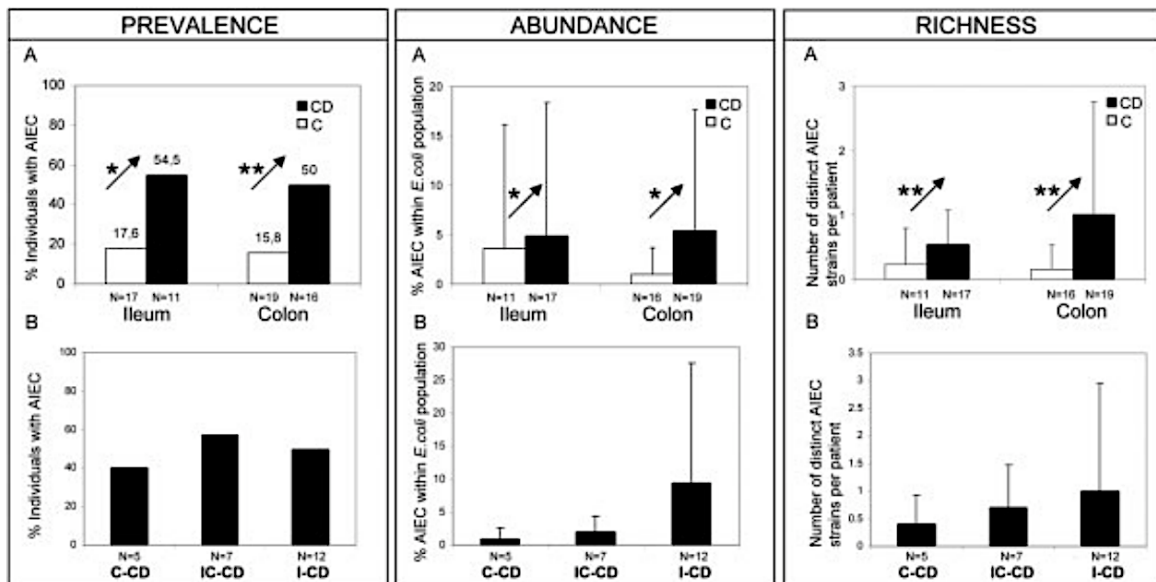


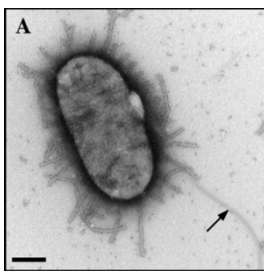
Figure 3. Prévalence, abondance, richesse de l'AIEC chez des patients atteints de maladie de Crohn (CD) vs patients contrôles sains (C). C-CD = MC avec une atteinte au niveau colique ; IC-CD = MC avec une atteinte au niveau iléo-colique et I-CD = MC avec une atteinte au niveau de l'iléon * $p = 0,05$, ** $p = [0,05 ; 0,001]$ (Martinez-Medina et coll. 2009).

Il est à noter que l'AIEC dans la littérature est très peu associée à la CU qui touche uniquement le côlon (Palmela et coll. 2017). Au vu des résultats concernant la localisation des AIEC, l'idée de la non-implication de l'AIEC dans la CU est renforcée.

En moyenne, selon plusieurs études, les pathovars AIEC sont détectés chez 22 à 63% des patients atteints de la MC au niveau de la muqueuse iléale et chez 6 à 19% des sujets contrôles sains (annexe 2).

Toutefois, aucune étude a pour le moment clairement montré que l'augmentation des AIEC était bel et bien une cause de la MC plutôt qu'une conséquence. La MC reste encore mal comprise et son étiologie reste sans aucun doute multifactorielle. Ce pathovar étant retrouvé chez des sujets sains, on peut dès lors supposer qu'il est nécessaire d'avoir un contexte génétique et/ou environnemental afin de déclencher la pathologie.

3.3 Morphologie de l'AIEC



La morphologie de l'AIEC participe à ses propriétés de virulence. En effet, ce sont : les flagelles, les fimbriae et les lypopolysaccharides qui donnent à l'AIEC leur capacité d'adhésion, d'envahissement des muqueuses, de survie et de réplication à l'intérieur des cellules de l'hôte.

Figure 4. Escherichia coli adhérent-invasif vu au microscope électronique. La flèche montre un flagelle. La barre correspond à 0,5 µm (Bringer et coll. 2007).

3.3.1 Flagelles

Les AIEC possèdent des flagelles qui leur permettent de se mouvoir. Cependant, cela ne constituerait pas leurs seules fonctionnalités. Selon une étude, l'inactivation du gène *fliC* (gène codant pour la majorité des protéines du flagelle) conduirait l'AIEC à une réduction de sa capacité à :

- Adhérer aux muqueuses intestinales de 50,4%,
- Envahir les tissus de 74%,
- Former le biofilm de 59% (Yang et coll. 2017).

3.3.2 Fimbriae

La plupart des bactéries à Gram négatif possèdent des fimbriae. On distingue chez l'AIEC deux types de fimbriae : les fimbriae de type 1, appelées également pili et fimbriae polaires longues.

Les pili de type 1 permettent à l'AIEC d'adhérer fortement à la muqueuse intestinale en se liant au résidu mannose du récepteur CEACAM6 (carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6). De plus, chez les patients atteints de la MC, ce récepteur est surexprimé à la surface des cellules de l'épithélium intestinal ce qui augmente d'autant plus la colonisation anormale par l'AIEC. Cette surexpression est due à la stimulation par les cytokines inflammatoires (Yang et coll. 2017).

Plusieurs expériences ont montré la capacité d'adhésion de l'AIEC par ses pili et l'implication de ces derniers dans la pathogénèse de l'AIEC. Premièrement, chez des souris transgéniques CEABAC10, exprimant le récepteur CEACAM6 humain, après infection par la souche LF82, une colite sévère a été observée (Agus et coll. 2014). Deuxièmement, lorsque la sous-unité FimH du pili responsable de la liaison au récepteur CEACAM6 est remplacée par une autre provenant d'une *E. coli* commensale, une réduction significative de la réponse inflammatoire a été observée chez les souris transgéniques (Yang et coll. 2017). Enfin, chez des souris transgéniques nourries avec un régime occidental, riche en sucre (mannose), une forte colonisation des muqueuses intestinales par l'AIEC a été montrée. Cela peut s'expliquer par le fait que les pili du pathovar sont capables de se lier à toutes sortes de résidus mannoses autres que celui du récepteur CEACAM6, favorisant alors la colonisation des muqueuses intestinales par l'AIEC. Cette hypothèse est intéressante car elle permet d'expliquer en partie l'augmentation de l'incidence de la MC dans les pays développés qui mènent ce fameux régime occidental (Agus et coll. 2014).

Les fimbriae polaires longues, quant à elles, permettent au pathovar AIEC d'interagir avec les plaques de Peyer en permettant à la bactérie de traverser la barrière intestinale via les cellules « microfolds » (cellules M). Ces cellules permettent le développement du système immunitaire de l'hôte en réalisant l'échantillonnage bactérien (Shawki & McCole 2017). Elles sont le lieu de transit du pathovar qui peut donc ensuite accéder aux cellules lymphoïdes (Agus et coll. 2014 ; Yang et coll. 2017).

3.3.3 Lipopolysaccharide

L'AIEC étant une bactérie à Gram négatif, elle possède des lipopolysaccharides (LPS) dans sa membrane externe. Le LPS est une endotoxine qui se lie spécifiquement à un complexe de récepteurs : Toll-Like Receptor 4/Différenciation Myéloïde 2 (TLR4/MD2). Cette liaison active alors deux voies de signalisation : MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) et TRIF (TIR-containing adaptator inducing interferon- β). Il s'en suit une série de réponses immunitaires comme la production de cytokines pro-inflammatoires. Chez les patients atteints d'une MICI, il y a une augmentation de l'expression des TLR4. Cela suggère une sensibilité accrue aux LPS impliquant un excès de la réponse immunitaire innée dans le mécanisme de pathogénicité de la maladie (Yang et coll. 2017).

3.4 Pathogénèse de l'AIEC

Le pathovar AIEC possède plusieurs mécanismes différents lui permettant de déclencher et d'exacerber l'inflammation de la muqueuse intestinale (figure 6).

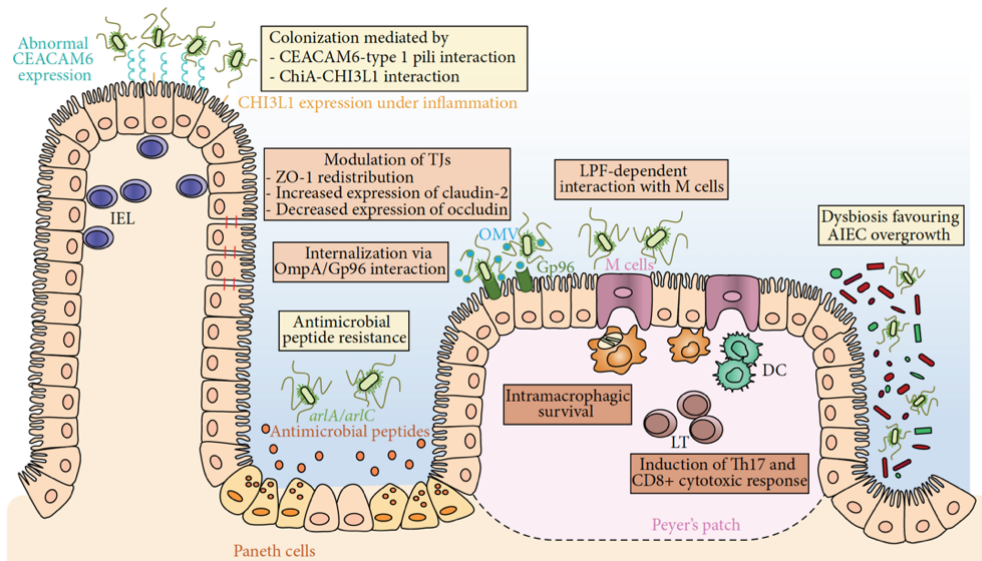


Figure 5. Mécanismes de pathogénèse de l'AIEC responsables de l'inflammation de l'intestin. Les pili de types 1 permettent l'adhésion aux récepteurs CEACAM6 anormalement surexprimés. L'AIEC adhère aux récepteurs Chitinase 3-like-1 grâce à leur domaine à la chitine. L'AIEC est résistant aux peptides antimicrobiens grâce aux gènes : *arlA* et *arlC*. L'AIEC cause des réponses cytotoxiques via Th17 et CD8+. L'AIEC module les jonctions serrées (TJ) en diminuant l'expression des occludines, en redistribuant ZO-1, en augmentant la claudine-2 responsable de la formation de pores. L'AIEC est capable de se répliquer dans les macrophages où il est capable de survivre. Les cellules M constituent le lieu de translocation qui est rendu possible grâce aux longues fimbriae polaires (LPF). L'état de dysbiose favorise la croissance de l'AIEC. IEL = Lymphocyte Intra-épithélial ; LT = Lymphocyte T ; CD = Cellule Dendritique (Agus et coll. 2014).

- 1) Le pathovar AIEC est résistant aux peptides antimicrobiens excrétés par les cellules de Paneth. En effet, il possède deux gènes :
 - *arlA* codant pour une protéine responsable de la résistance aux défenses
 - *arlC* codant pour une protéase de la membrane externe de la famille OmpT
- 2) L'AIEC produit une protéine autotransporteuse Vat qui dégrade la mucine excrétée par les cellules caliciformes. En dégradant la mucine, l'AIEC perturbe l'homéostasie intestinale. Le pathovar peut alors se mouvoir plus facilement et adhérer à l'épithélium intestinal par la suite.
- 3) Les fimbriae de type 1 de l'AIEC lui permettent d'adhérer fortement à la muqueuse intestinale en se liant aux récepteurs CEACAM6, d'autant plus qu'ils sont surexprimés dans le contexte inflammatoire des patients atteints de la MC.
- 4) Son domaine de liaison à la chitine de la protéine ChiA permet au pathovar AIEC d'adhérer à la muqueuse via le récepteur de la Chitinase 3-like-1 (CHI3L1).
- 5) Le pathovar AIEC peut ensuite traverser la muqueuse iléale via les cellules M grâce à ses LPF qui interagissent avec les plaques de Peyer et permettent à l'AIEC d'accéder aux cellules lymphoïdes.

- 6) L'AIEC module les jonctions serrées (TJ) : en diminuant l'expression des occludines, une protéine des TJ, en redistribuant ZO-1, et en augmentant de la claudine-2 responsable de la formation de pores. De ce fait, la barrière paracellulaire devient plus perméable. La perméabilité des muqueuse est d'autant plus augmentée dans un contexte inflammatoire de par l'action des cytokines pro-inflammatoires.
- 7) La glycoprotéine Gp96 est surexprimée à la surface de l'épithélium iléale chez les patients atteints de la MC. Elle agit comme un récepteur pour les vésicules de la membrane externe (OMV) de l'AIEC qui transporte la protéine OmpA. Cette dernière favorise l'invasion du pathovar dans la muqueuse intestinale.
- 8) Le pathogène AIEC survit dans les endosomes qui peuvent devenir des phagosomes et sortir basolatéralement des cellules de l'épithélium intestinal. Après cette sortie basolatérale, le pathovar est exposé aux cellules défensives de la lamina propria qui induisent une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Shawki & McCole 2017).
- 9) L'AIEC est ensuite phagocyté par les macrophages où il survit et se réplique librement. Cette survie intramacrophagique résulte d'un défaut d'autophagie de l'hôte. La réplication accrue du pathogène conduit alors à une réponse immunitaire.
- 10) Enfin, l'AIEC est responsable de réponses cytotoxiques via Th17 et CD8+ (Agus et coll. 2014).

Lorsque le patient a un terrain génétique et/ou environnemental favorable, l'AIEC conduira à une réponse immunitaire accrue déclenchant ou exacerbant une poussée inflammatoire. Par exemple, le récepteur NOD2 est un capteur de peptidoglycane des bactéries (BP). Lorsque le BP interagit avec le récepteur NOD2 de l'hôte, cela entraîne l'activation du facteur nucléaire kappa B (NFkB). La voie NFkB est un médiateur clé responsable d'une réponse immunitaire accrue et de l'autophagie de par la production de cytokines pro-inflammatoires. Lors de la mutation du récepteur NOD2, très souvent incriminée dans la MC, il y a une perte de l'autophagie permettant à des pathogènes de vivre et se répliquer librement dans les cellules de l'hôte (Shawki & McCole 2017).

3.5 AIEC une bonne cible thérapeutique ?

De nos jours, il y a un véritable engouement autour de ce pathovar AIEC mais est-il justifié ?

Plusieurs études s'accordent sur le fait que la prévalence de l'AIEC ainsi que son abondance et sa variété soient augmentés chez les sujets atteints de la MC par rapport aux patients sains. Ces même études ont montré que le pathovar AIEC colonisait préférentiellement les muqueuses iléales par rapport aux muqueuses coliques justifiant ainsi le fait que la colite ulcéreuse ne soit

pas associée à ce pathovar (Darfeuille-Michaud et coll. 2004 ; Martinez-Medina et coll. 2009 ; Palmela et coll. 2017).

Les études menées sur les souris transgéniques CEABAC10 ont permis de montrer un lien entre la colonisation importante du pathovar et des lésions inflammatoires. Outre ce lien, ces souris ont permis de lier la pathogénicité de l'AIEC avec une alimentation occidentale, ce qui nous a permis de justifier l'incidence croissante dans les pays dit « développés ». L'idée que la MC a une étiologie multifactorielle est alors renforcée.

La colonisation de l'AIEC ne permet pas à elle seule de justifier le déclenchement de la MC. En effet, la présence de l'AIEC n'a pas été objectivée chez tous les patients atteints de la MC. De plus, ce pathogène a également été décelé dans la muqueuse iléale de patients sains. Il semblerait dès lors qu'il faut un territoire propice à la pathogénicité de l'AIEC tels qu'une génétique favorable à un contexte inflammatoire important, une dysbiose intestinale ou des facteurs environnementaux (stress, alimentation, tabacs...).

Par contre, aucune étude n'a montré que la colonisation des muqueuses intestinales par l'AIEC était bel et bien la cause de la MC plutôt qu'une conséquence du contexte inflammatoire. En effet, lors d'une inflammation, les cytokines pro-inflammatoires augmentent d'une part la perméabilité de l'épithélium intestinal et d'autre part l'expression des récepteurs d'attaches de l'AIEC. Ces pourquoi, il aurait été plus judicieux, lors des études de prévalence de l'AIEC, de différencier les stades de la maladie : poussée inflammatoire et rémission. Cela aurait permis de confirmer l'implication de l'AIEC dans les formes actives de la maladie.

Les études sur la prévalence de l'AIEC ont été réalisées aux États-Unis et en Europe (annexe 1). Ce sont notamment des pays où l'incidence de la MC est élevée et croissante. Il serait intéressant de faire cette étude de prévalence dans les pays où l'incidence de la MC est faible afin d'étudier un éventuel lien entre l'augmentation de l'incidence des MICI et le pathovar.

Bon nombre d'études détaillent les mécanismes d'action du pathovar dans la pathogénèse de l'homéostasie intestinale. Dès lors, l'implication de l'AIEC dans le déclenchement et l'aggravation des poussées inflammatoires fait de moins en moins de doute.

Des études supplémentaires devraient être menées sur les différentes souches d'AIEC. Actuellement, seul l'implication de la souche LF82 a été amplement étudiée. Cela est important afin d'identifier un biomarqueur sélectif et spécifique permettant d'objectiver le risque de rechute/aggravation des lésions.

Seulement après cela, on pourra envisager une thérapeutique ciblant l'AIEC. En effet, sans des recherches supplémentaires, on ne pourrait pas avec certitude valider la cible, ce qui occasionnerait alors un échec thérapeutique accompagné d'une perte de temps et d'argent.

Toutefois, on retrouve déjà actuellement des essais thérapeutiques ciblant le pathovar. Il est à noter que ces thérapeutiques ne traiteront pas tous les patients atteints de la MC mais uniquement les patients chez qui on a pu objectiver un taux important de pathovars car cela traduirait une susceptibilité au traitement.

3.6 Stratégie thérapeutique ciblant l'AIEC

3.6.1 Antibiotiques

Actuellement, la prise d'antibiotiques est limitée aux complications bactériennes de la MC car leurs efficacités n'ont pas été clairement démontrées. De plus, ils présentent de nombreux effets secondaires, c'est pour cela que l'antibiothérapie est peu appréciée. Celle-ci contribue :

- au développement de dysbiose intestinale,
- à la promotion de bactéries pathogènes,
- à la formation de bactéries multi-résistantes (Palmela et coll. 2017).

Toutefois, les antibiotiques sont capables d'induire une rémission dans la MC, en particulier chez les personnes atteintes de lésions coliques. Dans le cadre de la prévention des récurrences postopératoires, les antibiotiques ont aussi été étudiés mais les résultats de ces études sont contradictoires. Néanmoins, les antibiotiques nécessiteraient de plus amples recherches, notamment chez des patients atteints de la MC et porteur du pathovar AIEC (Agus et coll. 2014).

3.6.2 Probiotiques

Pour le moment, les essais cliniques portant sur l'utilisation de probiotiques chez les patients atteints de la MC ont montré des résultats décevants. La capacité des probiotiques à induire une rémission n'a pas été montrée. Toutefois, ils continuent à être très largement consommés surtout en prophylaxie pour le maintien de la rémission postopératoire. La prise de probiotiques inhibant l'adhésion et l'invasion du pathovar AIEC pourrait présenter un réel intérêt dans la thérapeutique afin de contrôler l'inflammation intestinale liée à l'AIEC (Agus et coll. 2014 ; Palmela et coll. 2017).

L'étude récente de Sivignon et coll. a montré que les *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 réduisaient la colonisation de l'AIEC et la colite des souris transgéniques CEABAC10 infectées par l'AIEC. Les levures *S cerevisiae* restaurent l'intégrité de la barrière en évitant la perméabilité des jonctions serrées. Outre ces effets, l'étude a montré qu'il y avait diminution

des cytokines pro-inflammatoires. Par contre, d'autres levures ont exercé les mêmes effets, suggérant ainsi que la sélection d'une souche précise de levure n'était pas essentielle au développement des effets bénéfiques (Sivignon et coll. 2015). Une autre étude a montré une réduction de la colonisation de l'AIEC lorsqu'il était en co-culture avec *Lactobacillus rhamnosus* GG et *Lactobacillus reuteri* 1063 (Van den Abbeele et coll. 2016)

Cependant, certaines études appellent à la prudence car l'administration de microorganismes vivants n'est pas sans conséquence, surtout dans un contexte inflammatoire où la perméabilité intestinale est altérée. En effet, certains probiotiques ont causé une aggravation des lésions inflammatoires chez les patients atteints de MICI. Cela s'explique par le fait que la barrière intestinale étant altérée, le risque de translocation des microorganismes y est plus grand. C'est pourquoi, l'innocuité des probiotiques doit bien être évaluée avant que ceux-ci soient administrés à un patient atteint de MICI (Agus et coll. 2014).

3.6.3 Prébiotiques

Les prébiotiques sont des composés non-digestibles administrés dans le but de stimuler la croissance ou l'activité métabolique de bactéries bénéfiques. Cette stratégie thérapeutique est actuellement à l'étude chez les patients atteints de la MC colonisés par le pathovar AIEC. Toutefois, certains prébiotiques ont déjà prouvé leur intérêt clinique dans la pathologie :

- l'arabinoxylane à longue chaîne diminue l'adhésion de l'AIEC aux mucines
- l'inuline et le galacto-oligosaccharide limitent la croissance et la survie de l'AIEC (Van den Abbeele et coll. 2016).

3.6.4 Postbiotiques

Les postbiotiques sont des facteurs solubles sécrétés par la bactérie probiotique vivante ou libérés après la lyse de la bactérie.

Les bactériocines constituent un postbiotique de choix. Ce sont des protéines agissant sur un spectre étroit de bactéries. C'est pourquoi, elles pourraient être une approche thérapeutique intéressante dans le ciblage du pathovar AIEC.

Selon les travaux de Brown et coll., les colicines E1 et E9 sont plus efficaces pour lyser l'AIEC que le métronidazole et la ciprofloxacine, deux antibiotiques. De plus, contrairement aux antibiotiques, la colicine présente une grande sélectivité n'entraînant pas alors de dysbiose intestinale. Toutefois, il a été constaté que la lyse de l'AIEC n'a pas été associée à une diminution de la sécrétion TNF- α par les macrophages. Les colicines ne semblent pas causer de dommages aux cellules intestinales ni aux macrophages mais de plus amples études doivent

être menées avant que ces colicines soient administrées à l'homme. Cette colicine pourrait être administrée directement sous la forme de protéines purifiées ou encore indirectement, via des bactéries vivantes sécrétrices de la colicine (Brown et coll. 2015).

Un récent travail a constitué à modifier une souche d'*E. coli* afin qu'elle sécrète de la colicine donnant alors la souche : *E. coli* Nissle 1917. Cette dernière a fait l'objet d'un essai clinique dans la CU, où les résultats ont été concluants (Palmela et coll. 2017).

La lactocépine, un autre postbiotique, est une sérine protéase sécrétée par *Lactobacillus casei* qui réduit l'inflammation des colites chez les souris. Ce postbiotique dégraderait sélectivement des cytokines pro-inflammatoires (Agus et coll. 2014).

3.6.5 Transplantation fécale

La transplantation fécale est une méthode simple et radicale pour modifier la composition du microbiote du patient. De nombreux résultats ont affirmé l'efficacité de la méthode dans le cas d'une infection récurrente à *Clostridium difficile*.

Conceptuellement, la restauration du microbiote intestinal pourrait diminuer la réponse immunitaire inappropriée de la MC et créer un environnement moins propice à la colonisation des muqueuses par le pathovar AIEC. L'innocuité et l'efficacité du traitement dans les MICI sont encore à l'étude. Plusieurs études indépendantes ont cependant montré des résultats mitigés dans les MICI. Toutefois, cela pourrait être dû aux variations de la méthodologie à savoir : le choix du donneur, la sélection du type de MICI et les stades différents de la maladie.

Pour le moment, aucune étude n'a examiné l'impact de la transplantation fécale sur la colonisation de l'AIEC (Agus et coll. 2014, Palmela et coll. 2017).

3.6.6 Molécule anti-adhésive

Utiliser des composés anti-adhésifs contre le pathovar AIEC dans la MC est une autre option thérapeutique intéressante. De petites molécules glycomimétiques ont été développées afin de saturer la reconnaissance des pili de type 1 en imitant le ligand naturel. On parle dès lors d'antagonistes de FimH, extrémité des pili de type 1 responsable de la liaison au récepteur CEACAM6. Le pathovar ne pouvant plus adhérer aux muqueuses intestinales est alors éliminé.

Cette thérapeutique permet la clairance de l'AIEC sans perturbation du microbiote intestinal. Le développement d'antagonistes synthétiques de FimH constitue une nouvelle stratégie thérapeutique pour traiter les patients atteints de la MC colonisés par le pathovar AIEC (Palmela et coll. 2017).

3.6.7 Phagothérapie

La phagothérapie est un traitement biologique utilisant des bactériophages, virus qui infectent spécifiquement certaines bactéries (Palmela et coll. 2017). Ce traitement possède toutes sortes d'avantages et de limites qui seront étudiés dans la seconde partie de ce mémoire.

4 Les bactériophages

Historiquement, la première trace des bactériophages semblerait dater de 1896 dans les travaux d'Hankin sur le choléra en Inde (Dublanche 2017).

4.1 Définition

Les bactériophages, également connu sous le nom de phages, sont des virus infectant de manière spécifique des cellules procaryotes : les bactéries. Hautement spécifiques, les phages lysent un sous-groupe ou une souche d'une espèce bactérienne et sont incapables d'infecter les cellules eucaryotes. Plusieurs phages différents peuvent lyser une même bactérie (Dublanche 2017).

Les bactériophages sont omniprésents dans l'environnement et sont dix à cent fois plus nombreux que les bactéries (Dublanche & Patey 2011). De ce fait, ils sont les microorganismes les plus abondants sur Terre avec une estimation de 10^{30} à 10^{32} bactériophages. On les retrouve dans les sols, les océans, l'alimentation ou encore à l'intérieur des organismes vivants, partout où sont retrouvées des bactéries. Ils peuvent être isolés des urines, des selles, de la salive ou du sérum. Ils sont capables de pénétrer dans nos différents organes et tissus (Barr 2017).

Les bactériophages ont un important impact écologique. En effet, ils constituent le principal facteur limitant de la population bactérienne. A titre d'exemple, les bactériophages lysent quotidiennement 10 à 20% des bactéries aquatiques (Suttle 1994).

Outre la régulation de la biomasse bactérienne, ils sont responsables de divers transferts d'informations génétiques entre deux bactéries. En effet, un virion peut emporter par erreur un bout du génome bactérien lors de l'encapsulation et le transférer à son prochain hôte. De nombreuses études de phylogénie moléculaire ont montré que ces échanges de matériel génétique ont été fréquents et importants dans l'évolutions des deux espèces (Koskella & Brockhurst 2014).

Enfin, ils interviennent dans des cycles biogéochimiques tels que celui de l'azote, du carbone et du phosphore (Clokie et coll. 2011).

4.2 Classification

Les bactériophages sont très diversifiés, allant de 100 000 à plusieurs millions d'espèces différentes (Keen 2015). Leur classification a beaucoup évolué depuis leur découverte à nos jours. Ils étaient autrefois classés en fonction de leur taille et de leur hôte (Dublanche 2017). Actuellement, c'est l'ICTV, International Committee on Taxonomy of Virus qui s'occupe de la classification des virus qu'ils soient des phages ou non. Celle-ci est basée sur leur morphologie : taille, queue, gaine, enveloppe et leur composition en acides nucléiques (ARN, ADN simple brin ou double brin). Les bactériophages sont alors regroupés par : ordre, famille, sous-famille, genre et espèce (Elbreki et coll. 2014).

Plus de 95% des phages appartiennent à l'ordre des Caudovirales, appelés aussi les phages caudés. Ils sont constitués d'une capsidie protéique icosaédrique qui contient leur génome sous la forme d'ADN linéaire double brin. La capsidie est reliée à une queue permettant d'assurer le transfert du génome dans le cytoplasme de la bactérie (Dublanche 2017). Les virions caudés sont ensuite répartis en trois familles en fonction des caractéristiques de leur queue (figure 6) :

- Myoviridae : queue contractile.
- Siphoviridae : queue longue et non contractile, représente 60% des phages caudés.
- Podoviridae : queue courte et non contractile (Ackermann 2007, Ackermann & Kropinski 2007, Elbreki et coll. 2014).

Ces phages caudés sont plus largement étudiés de par leur caractère lytique, essentiel à la phagothérapie (Dublanche 2017).

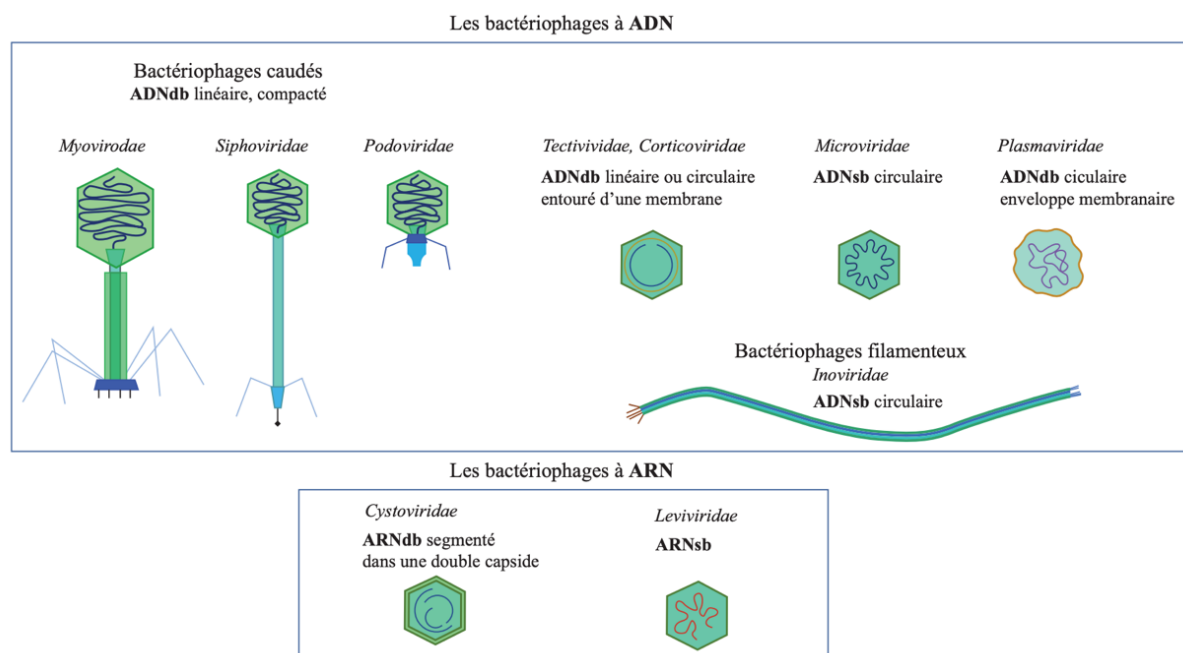


Figure 6. Les principales familles des bactériophages (Mireille et coll. 2020).

Les autres ordres se distinguent des Caudovirales par leur absence de queue (figure 6). Ils ont également des génomes différents : ADN simple brin, ARN simple brin ou encore ARN double brin. La forme de ces phages est aussi très diversifiée avec ou sans membrane lipidique (Ackermann 2007 ; Ofir & Sorek 2018).

4.3 Structure des phages caudés

Les phages caudés sont très variés et mesurent en moyenne 25 à 300 nm, soit plus ou moins un centième de la taille de leur hôte. De ce fait, les phages ne peuvent être observés qu'avec un microscope électronique. Ils sont constitués de (figure 6):

- Une capsidie protéique non enveloppée qui protège le génome viral (ADN double brin linéaire de taille variable allant de 17 à 498kpb) ;
- Une queue creuse de longueur variable ;
- Des fibres permettant la reconnaissance et la fixation à leur hôte (Dufour & Debarbieux 2017 ; Dublanche 2017).

4.4 Mécanisme d'action des bactériophages

4.4.1 Cycle de réplication

Tout comme les autres virus, les bactériophages sont des parasites absolus. Étant dépourvus d'une machinerie nécessaire à leur réplication, ils doivent emprunter celle de leur hôte afin de pouvoir se répliquer. Tout d'abord, les phages diffusent librement jusqu'à ce qu'ils rencontrent, par collision aléatoire, une bactérie qu'ils sont en mesure d'infecter. A l'aide de leurs fibres, ils entrent spécifiquement en contact avec un site récepteur composé de plusieurs protéines de surface comme le peptidoglycane, l'acide teichoïque, un pilus, une protéine, un flagelle ou encore les lipopolysaccharides. Une fois qu'ils sont bien fixés, ils libèrent des enzymes afin de percer la membrane bactérienne. Dès lors, ils y insèrent leur queue et injecte leur génome dans le cytoplasme de la bactérie. Ils vont ensuite conduire un cycle soit lytique soit lysogénique (Campbell 2003).

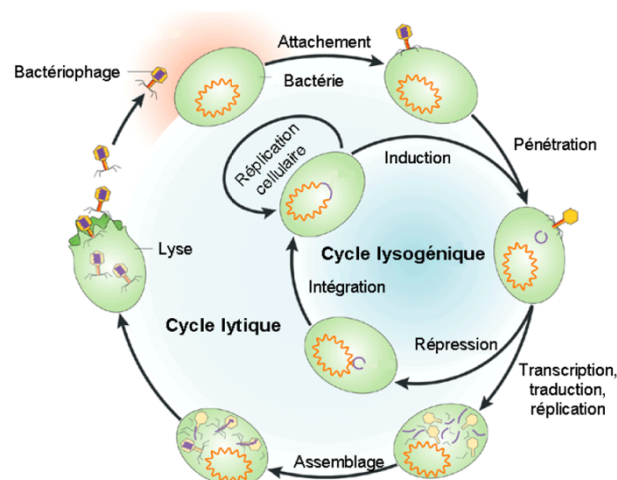


Figure 7. Cycles infectieux des bactériophages (Campbell 2003).

4.4.1.1 Cycle lytique

Les phages menant un cycle lytique sont appelés phages virulents du fait qu'ils conduisent irrémédiablement à la lyse de l'hôte. Cela est rendu possible de par l'expression de gènes viraux précoces permettant ainsi le détournement de la machinerie bactérienne afin de produire des acides nucléiques et des protéines virales. Entre autre, une endonucléase qui découpe le génome bactérien en fragments inactifs. De nouveaux virions sont produits par assemblage au sein de la bactérie. Ils sont ensuite libérés grâce à la synthèse des enzymes : holine et lysine qui permettent la lyse bactérienne. L'éclatement bactérien permet la libération de nouveaux phages qui pourront, à leur tour, infecter d'autres bactéries. Ces phages ont donc une activité bactéricide. Ce cycle dure quelques minutes à une heure et engendre la libération de plusieurs dizaines de nouveaux phages identiques en même temps (Campbell 2003 ; Dublanche 2017).

4.4.1.2 Cycle lysogénique

Le cycle lysogénique, également appelé la lysogénisation, est réalisé par des bactériophages qu'on nomme phages tempérés. Ces phages possèdent des enzymes, comme des intégrases qui permettent l'insertion du génome viral dans le chromosome de l'hôte bactérien. Dès lors, le génome viral fait partie intégrante du génome bactérien et porte le nom de prophage. Les phages tempérés protègent ensuite la bactérie infectée d'une réinfection par d'autres phages en exprimant des gènes viraux qui modifient la bactérie. Cette transformation est appelée conversion lysogénique (Gordillo & Barr 2019). Cette bactérie lysogène va transmettre le génome viral silencieusement à sa descendance jusqu'à l'activation du cycle lytique, où le génome viral est excisé du chromosome bactérien. Le passage au cycle lytique est rare, il s'observe spontanément pour 1 phage sur 100 000 mais est augmenté lors d'un stress : exposition aux Ultra-Violet, aux rayons X, aux composés chimiques oxydants ou encore à une élévation de température (Campbell 2003 ; Dublanche 2017).

Contrairement aux phages virulents, les phages tempérés n'ont pas leur propre rythme de réplication mais ils dépendent du rythme de la réplication bactérienne. Ces phages tempérés n'ont pas d'intérêt dans la phagothérapie, d'autant plus qu'ils sont associés à une augmentation du risque de transfert de matériel génétique entre bactéries. Toutefois, ces phages tempérés sont très largement utilisés en laboratoire comme vecteurs transducteurs de gènes (Dublanche 2014)

4.4.2 Enzymes phagiques

Les enzymes phagiques contribuent aux mécanismes de virulence des phages rendant notamment possible le cycle lytique grâce à la synthèse d'un couple d'enzymes agissant de manière synergique : holine-endolysine.

4.4.2.1 *Holines*

Les holines sont des enzymes qui perforent la membrane plasmique bactérienne afin de permettre la sortie des nouveaux virions. Pour que cette enzyme soit effective, il faut qu'elle se concentre dans le cytoplasme bactérien ce qui permet un contrôle optimal du moment de la lyse. Les pores ainsi formés sont au nombre de 1 à 3 et font en moyenne 340nm (Wang et coll. 2000).

4.4.2.2 *Endolysines*

L'endolysine, ou lysine, est un complexe d'enzymes qui se concentre dans le cytoplasme de l'hôte jusqu'à ce que les holines forment un pore dans la membrane bactérienne. Une fois ce pore formé, les lysines permettent la dégradation du peptidoglycane grâce aux différentes activités du complexe enzymatique spécifique en fonction du type de paroi de la bactérie ciblée. Ensuite, le compartiment bactérien étant plus concentré, la pression osmotique entraîne alors le contenu bactérien vers l'extérieur, libérant ainsi les nouveaux virions.

Ces enzymes peuvent constituer un traitement bactéricide alternatif à la phagothérapie : l'enzymothérapie. Actuellement, on retrouve notamment des endolysines CF-301 ciblant les staphylocoques (Schmelcher et coll. 2012). Ces lysines font l'objet d'un essai clinique pour le traitement des patients atteints des bactériémies à *S. doré* (Clinicaltrials 2020).

4.4.2.3 *Enzymes dépolymérase*

Les bactériophages possèdent une enzyme à activité polysaccharide dépolymérase permettant la destruction du biofilm protecteur des bactéries. Les phages peuvent alors diffuser librement dans le biofilm jusqu'à atteindre les bactéries-cibles (Dublanche 2017).

4.5 Applications des Bactériophages

Les bactériophages ont plusieurs applications bien que leur utilisation soit fortement limitée par la législation. On retrouve trois gros domaines :

- La biologie moléculaire développée ces dernières années grâce aux phages tempérés qui constituent un puissant outil de sélection et de production de protéines combinatoires.
- L'industrie agroalimentaire où les bactériophages sont devenus une alternative biologique aux pesticides et antibiotiques nécessaires dans la production et conservation des aliments.
- La thérapeutique où les phages virulents ont été administrés en vue de soigner toutes sortes d'infections : dysenterie, pneumonie, méningite, septicémie, ostéomyélite... Cette stratégie thérapeutique porte le nom de phagothérapie (Dublanche 2017).

5 Phagothérapie

Bien qu'aujourd'hui la phagothérapie soit vue comme un traitement révolutionnaire ou un agent antimicrobien de qualité, cela n'a pas toujours été le cas. En effet, après la découverte des antibiotiques, les études menées sur les bactériophages ont été laissées à l'abandon. Toutefois, les chercheurs soviétiques ont continué leurs travaux. C'est pourquoi, aujourd'hui la phagothérapie est plus développée en Pologne, Géorgie, Russie. Malheureusement, ces travaux n'ont pas toujours été bien menés ni publiés dans de bons journaux scientifiques ni traduits en anglais. C'est seulement après un siècle d'utilisation massive d'antibiotiques à des fins thérapeutiques ou comme agents antimicrobiens que la phagothérapie revient sur le devant de la scène (Dublanche 2017).

5.1 Principe

Actuellement, il existe quatre stratégies thérapeutiques employant les bactériophages.

5.1.1 Phagothérapie conventionnelle

La thérapie conventionnelle fait usage de bactériophages virulents pouvant être administrés en monothérapie ou polythérapie (figure 10) (Gordillo & Barr 2019).

La thérapie monophagique doit être personnalisée à chaque pathogène dont l'isolement n'est pas toujours facile. Elle présente toutefois deux avantages comparés à la thérapie polyphagique. Premièrement, elle exige une préparation et une purification moins stricte. Deuxièmement, elle présente un risque plus faible de réponses immunitaires inappropriées (Abedon et coll. 2011).

Les phages d'un cocktail peuvent cibler soit différemment un même hôte soit une autre espèce bactérienne. Un cocktail a l'avantage de diminuer l'apparition de phagorésistances bactériennes et d'augmenter le spectre thérapeutique. Outre ces deux avantages, la polythérapie est surtout pratique en cas d'urgence lorsque le pathogène n'a pas été isolé. L'administration séquentielle du cocktail présenterait de meilleurs résultats par rapport à une administration simultanée. Cela permettrait de maintenir des taux plus bas de bactéries et ce, plus longtemps, permettant au système immunitaire de limiter l'infection à son tour (Gordillo & Barr 2019).

Dans ce travail, il ne sera question que de la phagothérapie conventionnelle.

5.1.2 Enzymes dérivés des phages

Les enzymes phagiques n'ont pas encore d'applications actuelles. Cependant, de par leur mécanisme d'action, ils pourraient présenter de sérieux avantages. Pour rappel, on y retrouve les holines qui permettent de trouser la membrane plasmique de l'hôte, les endolysines qui

permettent la dégradation du peptidoglycane bactérien ou encore des dépolymérase permettant la destruction du biofilm (Gordillo & Barr 2019).

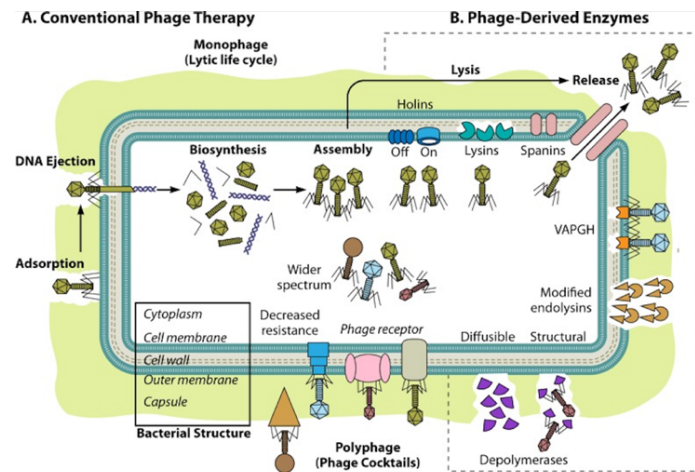


Figure 8. **Phagothérapie conventionnelle et enzymes phagiques.** Schéma d'une bactérie avec : capsule, membrane externe, paroi, membrane interne et cytoplasme. La partie gauche A représente le cycle lytique en mono ou polyphages ciblant d'autres récepteurs. La partie droite B représente des enzymes phagiques : dépolymérase dégradant le biofilm, endolysines dégradant la paroi bactérienne, holins, spanins et peptidoglycanes hydrolases responsables de la formation de pores dans la membrane. (Gordillo & Barr 2019)

5.1.3 Synergie entre les phages et les agents antibactériens

Une synergie entre les phages et les agents antimicrobiens est observée grâce à la dégradation du biofilm par les phages (figure 9). Cela permet alors aux antibiotiques et aux effecteurs du système immunitaire d'accéder aux bactéries, où ils peuvent être actifs. La réponse immunitaire est médiée par des anticorps, le complément, ou encore des cellules phagocytaires comme les polynucléaires neutrophiles, macrophages et cellules dendritiques. De plus, la combinaison permet de diminuer la dose d'antibiotique permettant alors de réduire le risque de résistance bactérienne et d'effets secondaires. Ainsi, on n'envisage plus forcément les bactériophages comme une thérapie de remplacement aux antibiotiques mais comme une combinaison intéressante (Gordillo & Barr 2019).

5.1.4 Bio-ingénierie

La bio-ingénierie permet une utilisation détournée des phages à des fins thérapeutiques (figure 9). On peut, dès lors, fixer divers composés à la capsid du bactériophage comme des antibiotiques ou agents photosensibilisants afin d'assurer leur entrée spécifique dans le cytoplasme bactérien. On peut également insérer dans la capsid toutes sortes de gènes permettant d'arrêter la résistance aux antibiotiques ou la pathogénicité de la bactérie-hôte (Gordillo & Barr 2019).

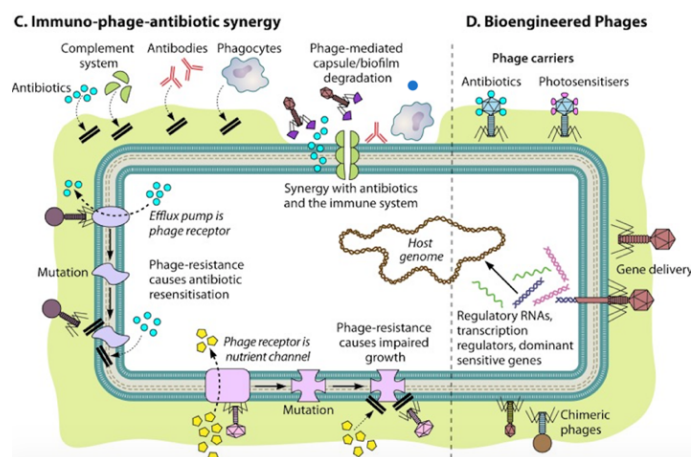


Figure 9. Synergie phage-antibiotiques-système immunitaire et bio-ingénierie. La partie C représente la synergie entre les phages, les antibiotiques et le système immunitaire. Les phages dégradent le biofilm permettant aux antibiotiques et aux médiateurs immunitaires (anticorps, compléments, phagocytes) d'être efficaces. La phagorésistance peut aussi contribuer à la perte d'un gène de résistance à un antibiotique ou à l'altération de la croissance bactérienne. La partie D représente l'approche par bio-ingénierie où on attache aux phages des antibiotiques ou autres composés pour avoir une libération ciblée ou encore afin de configurer des gènes annulant une virulence ou une résistance (Gordillo Altamirano & Barr 2019).

5.2 Pharmacologie

La pharmacologie de la phagothérapie conventionnelle est complexe car elle est changeante et propre à chaque couple bactérie-phage ou au modèle animal utilisé (Nilsson 2019). Toutefois, il est nécessaire d'étudier ces propriétés pharmacologiques car l'efficacité du traitement pourrait être diminuée conduisant ainsi précocement à l'arrêt d'un essai clinique.

5.2.1 Pharmacocinétique

5.2.1.1 Absorption

Les phages doivent traverser les différentes barrières de l'organisme afin d'atteindre le site de l'infection et ce, avec des quantités suffisantes à l'effet thérapeutique. Les injections constituent la meilleure voie d'administration car elles permettent d'avoir d'une part de plus grandes quantités de phages au site d'infection et d'autre part un effet thérapeutique plus rapide. La voie intrapéritonéale présente un taux et une vitesse d'absorption supérieurs à la voie intramusculaire (IM) et sous cutanée. Une injection au site d'infection permet, quant à elle, de contourner encore plus aisément les problèmes d'absorption des phages. Toutefois, les voies d'injections semblent conduire à des réponses immunitaires plus importantes (Dąbrowska & Abedon 2019).

Lors d'une administration de phages per os, la présence de phages dans le sang a été observée. Dès lors, l'absorption des phages ne fait aucun doute et les muqueuses intestinales sembleraient être le lieu de la translocation phagique. Le temps nécessaire à l'absorption varie d'une étude à l'autre allant de quelques minutes à plusieurs jours (Górski et coll. 2006). Toutefois, cette voie d'administration conduit à une faible concentration de phages dans le sang limitant alors l'efficacité du traitement per os. C'est pourquoi, seuls 20% des traitements phagiques

administrés per os ont été efficaces tandis que 33% de ces traitements ont montré la présence d'aucun phage dans le sang. Cependant, une administration per os en vue d'un effet local sur le tractus digestif n'est pas impactée par ces problèmes d'absorption (Dąbrowska & Abedon 2019).

L'administration intra-rectale présente des quantités de phages dans le sang aussi élevées qu'en IM. Toutefois, la vitesse d'absorption de la voie intra-rectale est supérieure à celle en IM donnant un Tmax respectivement de 5 minutes et de 15 minutes (Górski et coll. 2006).

5.2.1.2 Distribution

Lors d'une administration de phages per os, il a été montré (dans les expériences de Bogovazova) que les phages atteignaient le sang au bout de 2h à 4h et ils se distribuaient après dix heures dans plusieurs organes notamment le foie, la rate ou encore les reins (Sulakvelidze et coll. 2001). Par la suite, la présence d'une faible quantité de phages a été mise en évidence dans divers organes : les muscles squelettiques, le cœur, la vessie, la moelle osseuse, le tube digestif, les glandes salivaires et le thymus. Dès lors, l'infection de l'un de ces sites peut constituer une potentielle indication de la phagothérapie (Dąbrowska & Abedon 2019).

En outre, la présence de phages a aussi été mise en évidence dans le tissu cérébral impliquant alors un passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Toutefois, ce passage de la BHE par les phages est lent et s'observe seulement 24 h après l'administration de phages. De par cette distribution, les phages ont été utilisés avec succès dans le traitement d'infections intracérébrales (Dąbrowska & Abedon 2019).

Les mécanismes des mouvements des phages hors du sang sont pour le moment méconnus. Certains travaux évoquent une possibilité de liaison entre les phages et les érythrocytes mais cela n'a pas toujours été observé (Górski et coll. 2006). Il est à noter que les infections bactériennes altèrent la qualité des tissus, les rendant ainsi plus perméables. Cela est donc favorable à la distribution des phages (Abedon et coll. 2011). Outre ce changement de perméabilité tissulaire, la capacité d'amplification des phages aux sites d'infection permet de compenser le défaut de distribution des phages (Nilsson 2019).

5.2.1.3 Métabolisation

Dans la phagothérapie, la phase de métabolisation correspond à la phase d'inactivation des bactériophages. Cette inactivation est réalisée en partie par : l'acidité gastrique, une température non-optimale ou par le système immunitaire notamment par des anticorps neutralisants (Dublanche 2017).

5.2.1.4 *Élimination*

De par la nature protéique des phages, leur clairance se fait par le système mononucléaire phagocytaire et tout particulièrement dans le foie et la rate (Dąbrowska & Abedon 2019 ; Mireille et coll. 2020). Outre cette voie d'élimination, les phages ont été retrouvés dans les urines et les selles (Nilsson 2019).

5.2.2 **Pharmacodynamique**

L'effet antibactérien des phages peut résulter soit d'un effet direct des phages virulents soit d'un effet indirect de par l'activation du système immunitaire.

5.2.2.1 *Effet direct*

Les bactériophages ont trois effets directs :

- La destruction du biofilm protecteur permettant l'accès aux bactéries. Dès lors le système immunitaire et/ou les composés bactéricides peuvent être efficaces.
- L'effet bactéricide actif caractérisé par la lyse bactérienne de l'intérieur qui s'observe à la sortie des nouveaux virions en fin de cycle lytique.
- L'effet bactéricide actif caractérisé par la lyse bactérienne de l'extérieur qui s'observe lors d'une infection abortive. Cette appellation vient du fait que la lyse bactérienne n'est pas accompagnée de la production de nouveaux virions. Cet effet passif peut être dû à un manque de spécificité du phage ou encore à une phagorésistance bactérienne. Dès l'adsorption du phage à la bactérie, il s'en suit une déstabilisation de la paroi bactérienne à cause des enzymes phagiques qui entraînent alors la lyse rapide de la bactérie (Curtright & Abedon 2012).

Il est nécessaire, lors de la production phagique, de distinguer si la lyse bactérienne est due à un effet actif ou passif des phages car la posologie sera différente. En effet, les phages à action bactéricide active étant capables de s'amplifier, une seule administration pourrait se montrer suffisante. Tandis qu'avec des phages à action bactéricide passive, des administrations répétées sont nécessaires afin de maintenir des densités phagiques suffisantes à l'effet thérapeutique (Curtright & Abedon 2012).

5.2.2.2 *Effet indirect*

L'activité antibactérienne de la phagothérapie pourrait provenir d'un effet indirect de par l'activité immunomodulatrice des bactériophages. Lors de l'administration de phages, on observe une réponse immunitaire innée avec l'action des macrophages, des polynucléaires, des lymphocytes NK et des cellules dendritiques mais aussi une réponse immunitaire adaptative

menant à la production d'anticorps neutralisants (Górski et coll. 2012) De par l'omniprésence des phages, le patient a déjà toutes sortes d'anticorps neutralisants et ce, bien avant l'administration d'une thérapie phagique. De ce fait, ces anticorps anti-phages peuvent conduire à un échec de la phagothérapie chez certains patients qualifiés alors de « non-répondants » (Kortright et coll. 2019 ; Dublanche 2017).

Les réponses immunitaires rapportées sont très changeantes en fonction du type de phage, du mode d'administration, de la quantité administrée ou encore de l'infection et de sa localisation. C'est pourquoi, chaque phage devrait faire l'objet d'une recherche individualisée sur des modèles animaux comme chez l'homme. Par ailleurs, les réponses immunitaires peuvent être induites par des fragments bactériens provenant soit de la solution soit de la lyse bactérienne par les phages (Górski et coll. 2012).

L'évaluation de la réponse immunitaire est indispensable car elle peut conduire à une baisse d'efficacité du traitement ou à des réactions inflammatoires accrues, dangereuses pour l'organisme. Cette variabilité de la réponse immunitaire en fait une des principales limitations de la phagothérapie (Górski et coll. 2012).

5.3 Innocuité

Après un siècle d'utilisation de la phagothérapie dans les pays d'Europe de l'Est, aucun réel souci de tolérance et de sécurité n'a été montré. Toutefois, pour cela, il faut que les préparations phagiques soient suffisamment purifiées afin d'être exemptes de tout composé bactérien immunogène provenant de la production phagique (Dufour & Debarbieux 2017).

L'innocuité de la phagothérapie ne peut pas être évaluée de manière générale parce qu'elle dépend essentiellement du couple phage-bactérie. En effet, chaque phage donne des réponses immunitaires différentes.

Aucune toxicité de surdosage a été relevée car les phages sont simplement éliminés s'ils ne rencontrent pas la bactérie-hôte (Curtright & Abedon 2012). De même qu'aucun effet allergisant n'a été rapporté (Dublanche 2017).

5.4 Avantages

1) Omniprésence

Les phages étant omniprésents dans l'environnement, leur récolte est facile, rapide et pas chère. Sachant que pour chaque bactérie, il existe plusieurs phages qui lui correspondent. Il existe, dès lors dans la nature, un traitement potentiel pour chaque infection (Dublanche 2017).

2) Spécificité

Grâce aux ciblage précis des phages à une espèce de bactéries, les impacts sur la composition des microbiotes ne sont que minimes, contrairement aux antibiotiques qui ont généralement un spectre plus large. Cette spécificité permet d'éviter des phénomènes de surinfection de micro-organismes opportunistes qui d'ordinaire ne sont pas pathogènes (Loc-Carrillo & Abedon 2011).

3) Distribution

Les bactériophages se distribuent dans tout l'organisme ce qui permet de traiter des infections plus compliquées comme la septicémie et la méningite (Dabrowska et coll. 2005).

4) Activité sur biofilm

Les bactériophages détruisent le biofilm de par leurs enzymes à activité polysaccharide dépolymérase rendant alors les bactéries exposées et vulnérables aux agents antibactériens.

5) Agent bactéricide

Les phages virulents exercent un effet bactéricide contrairement à certains antibiotiques qui présentent un effet bactériostatique. En plus, l'activité bactériostatique des antibiotiques est propice au développement de résistances bactériennes et dépend surtout du système immunitaire pour se débarrasser de l'infection (Loc-Carrillo & Abedon 2011 ; Gordillo & Barr 2019).

6) Résistance non croisée avec les antibiotiques

Après une ère de surconsommation d'antibiotiques, les bactéries sont devenues de plus en plus résistantes et ce, à plusieurs antibactériens. C'est pourquoi, la nécessité de trouver des alternatives aux antibiotiques est plus pressante. Les phages virulents constituent une vraie arme bactéricide pour les bactéries multi-résistantes surtout que la résistance aux antibiotiques n'est pas croisée avec celle des phages (Carlton 1999).

7) Amplification

Après chaque cycle lytique qui ne dure qu'un court laps de temps, des dizaines de nouveaux phages sont libérés et prêts à infecter d'autres bactéries. La propagation des phages est plus prolifique que celle des bactéries ce qui permet aux phages d'aboutir à des concentrations bactériennes cliniquement insignifiantes sans pour autant nécessiter des doses élevées. On parle alors de médicaments intelligents capables de cibler un hôte précis et d'avoir un effet persistant jusqu'à ce que l'infection soit contrôlée. Cependant, ce « dosage » automatique n'est possible qu'en présence d'une certaine densité bactérienne (Loc-Carrillo & Abedon 2011).

8) Pas de multiplication phagique sans bactéries-hôtes

Pour que chaque phage se multiplie, il faut qu'il infecte sa bactérie-hôte, étant incapable d'infecter une autre cellule. Si les phages ne rencontrent pas de bactéries-hôtes, ils seront simplement éliminés de l'organisme. Ainsi, s'il y a une erreur dans le diagnostic, cela n'aura pas de conséquence sur le patient : pas d'effet thérapeutique, ni d'effet indésirable (Loc-Carrillo & Abedon 2011).

9) Peu d'effets secondaires

La phagothérapie présenterait peu d'effets indésirables contrairement aux antibiotiques qui présentent habituellement : des risques de diarrhées, de mycoses secondaires par l'altération du microbiote intestinal, un risque d'atteinte fonctionnelle (rénale, auditive) ou d'autres... Les effets secondaires rapportés sont principalement liés à un manque de purification (Loc-Carrillo & Abedon 2011).

10) Transmission

Une transmission de phages entre plusieurs individus peut s'observer, on parle alors « d'immunisation » collective. Ceci représente surtout un avantage dans l'industrie agroalimentaire (Loc-Carrillo & Abedon 2011).

5.5 Inconvénients

1) Sélection phagique :

Tous les phages ne peuvent pas être utilisés en phagothérapie. Les phages tempérés sont peu recommandés pour deux principales raisons. Premièrement, ces phages induisent une immunité à l'hôte bactérien après leur infection. Deuxièmement, lors de la conversion lysogénique, la bactérie-hôte acquiert soit de nouvelles fonctions souvent pathogènes comme la formation de toxines soit des gènes de résistances aux antibiotiques. Dès lors, l'utilisation de phages tempérés doit être strictement limitée dans des cas d'urgence lorsque des phages virulents ne sont pas disponibles ou si le temps fait défaut (Gordillo & Barr 2019).

2) Caractérisation

La caractérisation de la solution phagique est nécessaire premièrement pour exclure la présence de phages indésirables et deuxièmement pour s'assurer que les phages ne vont pas véhiculer des gènes ou protéines conférants un avantage à la bactérie infectée. Enfin, la caractérisation permet de vérifier qu'il n'y ait pas d'autres phages pouvant infecter des bactéries saprophytes. Les étapes de caractérisation sont onéreuses et fastidieuses (Gordillo & Barr 2019 ; Dublanche 2017).

3) Purification

La purification est une étape importante qui doit être rudement menée afin de limiter tout risque de réaction immunitaire face à des impuretés. Cependant, cela augmente les coûts de la production et diminue la quantité de phages produite (Dublanche 2017).

4) Phagorésistance

Tout comme les antibiotiques, les phages exercent une forte pression de sélection de mutants bactériens résistants aux phages. Des propriétés antiphages peuvent être développées à n'importe quel moment du cycle. Le plus souvent, on observe soit une mutation des récepteurs empêchant l'adhésion des phages à leur hôte bactérien soit un système protégeant l'ADN bactérien et dégradant l'ADN viral via des enzymes de restriction CRISPR-Cas. Ces ensembles de modifications confèrent à la bactérie, une véritable immunité. Actuellement, il est important d'étudier ces mécanismes de résistance afin d'optimiser l'efficacité des phages (Gordillo & Barr 2019).

5) Dépendance à la concentration bactérienne

Pour avoir une bonne efficacité de la phagothérapie, il faut pouvoir objectiver chez le patient des taux élevés de bactéries cibles. Sans cela, la probabilité qu'un phage rencontre sa cible est plus petite (Nilsson 2019).

6) Réponses immunitaires

L'administration de phages peut induire une réponse immunitaire néfaste pour l'organisme et diminuer l'effet du traitement phagique. Cette réponse va dépendre en partie du type de phage, de la concentration, de la voie d'administration et de la susceptibilité du système immunitaire du patient (Górski et coll. 2012).

7) Synergie « immunophage »

Une collaboration entre les phages et le système immunitaire est nécessaire dans la lutte contre l'infection bactérienne. Cette synergie constitue une limite à l'indication de la phagothérapie. En effet, la thérapie phagique devrait être administrée dans une moindre mesure chez les patients immunodéficients (Gordillo & Barr 2019).

8) Adhésion aux débris bactériens

Une adhésion des phages aux bactéries précédemment infectées et lysées a été observée *in vitro*. Cela constitue une autre limitation de l'efficacité des bactériophages car in fine cela conduit à des réductions de la quantité de phages actifs (Mireille et coll. 2020).

5.6 Usage actuel de la phagothérapie

Actuellement, l'usage de phages thérapeutiques est fortement limité et fait l'objet de bon nombre de restrictions dans les pays de l'Europe occidentale et aux États-Unis. Pourtant, cette thérapie est bien développée depuis plusieurs années en Pologne, en Géorgie et en Russie. Dans ces pays, on y trouve même des cliniques spécialisées dans la phagothérapie (Górski et coll. 2018).

En dehors des essais cliniques, une voie généralisée de la phagothérapie est désormais possible pour des utilisations compassionnelles, où une alternative de traitements n'est plus possible et que le patient est en phase terminale. Dès lors, il sera possible d'administrer à ce patient des phages thérapeutiques et ce, pour une utilisation « hors licence ». Par ailleurs, ces données seront, par la suite, non cliniquement utilisables car elles concerneront que des patients isolés. Toutefois, cela constituera quand même une idée de thérapeutiques futures à développer (Gordillo & Barr 2019).

6 Bactériophages dans la Maladie de Crohn

Comme développé dans la première partie de ce mémoire, l'*Escherichia coli* adhérent-invasif aurait un rôle dans le développement et l'aggravation des poussées inflammatoires dans la MC. Actuellement, diverses stratégies thérapeutiques sont à l'étude afin de cibler spécifiquement le pathovar AIEC dont la phagothérapie. Dans la littérature, on retrouve une étude expérimentale de Galtier et coll. qui évalue l'utilisation d'un cocktail de phages ciblant la souche LF82 de l'AIEC chez des souris transgéniques CEABAC10 et sauvages (Galtier et coll. 2017).

6.1 Test *in vivo* et *ex vivo* sur des souris

A partir d'un échantillon d'eau usée, Galtier et coll. ont isolé trois phages virulents : LF82_P2, LF82_P6 et LF82_P8. Tous ciblent plus largement la collection de référence *Escherichia coli* car le pathovar AIEC ne fait pas partie d'un groupe phylogénique particulier. Ces phages forment alors un cocktail triphagique contenant des concentrations similaires pour chaque phage (10^7 UFP¹). Les phages sélectionnés infectent bien les souches LF82 et LF82SK [souche génétiquement modifiée pour être résistante à la streptomycine et à la kanamycine].

Dans un premier temps, les chercheurs ont étudié la capacité du cocktail phagique à infecter l'AIEC *in vivo* et *ex vivo*. Pour ce faire, ils ont mesuré l'amplification phagique dans les coupes

¹ UFP = Unité Formant Plage est l'unité utilisée pour l'estimation du nombre de phages actifs

intestinales et dans les selles des souris infectées par la souche LF82SK après leur avoir administré per os le cocktail. Les 3 phages ont bien été en mesure d'infecter le pathovar et de s'amplifier dans le tractus intestinal et dans les selles mais ils présentaient un spectre d'hôtes complémentaires. En effet, des différences de localisations se sont fait remarquer : les phages LF82_P2 et LF82_P6 étaient plus particulièrement présents dans les coupes iléales et coliques et moins dans les coupes caecales ou encore dans les selles. Les phages LF82_P8 étaient quant à eux présents un peu partout en quantités égales.

Dans un second temps, chez les souris transgéniques CEABAC10 exprimant les récepteurs humains CEACAM6 nécessaires à l'adhésion du pathovar AIEC, du sulfate de dextrane (DSS) à 0,25% a été administré via l'eau de boisson afin de favoriser la colonisation par la souche LF82 (figure 10). Une solution unique de 5mg de streptomycine a aussi été administrée et ce, 24h avant l'infection, toujours dans le but de permettre la bonne colonisation du pathovar. Au J0, les chercheurs administrent aux souris un inoculum de la souche LF82. Ensuite, au J1, ils administrent deux fois, avec un intervalle de 7h, soit le cocktail triphagique soit un placebo à base d'une solution tampon phosphate salin (PBS).

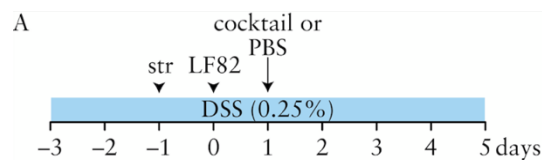


Figure 10. **Chronologie du mode opératoire sur des souris transgéniques CEABAC10.** Les chercheurs ont administré per os aux souris transgéniques : 0,25% de DSS en continue, 5mg de streptomycine (str) au J-1, un inoculum de 10^9 bactéries de la souche LF82 au J0. Au J1, les souris ont été traitées 2 fois par jour avec 7h d'intervalle par soit du PBS (placebo) soit le cocktail triphagique (3×10^7 PFU) (Galtier et coll. 2017).

Les résultats obtenus sur les souris transgéniques ont montré, le lendemain de l'administration du traitement triphagique (J2), une diminution significative des concentrations de pathovars dans les selles (figure 11), comparée au groupe placebo et ce, malgré la surexpression des récepteurs CEACAM6. Cette diminution s'est observée progressivement et durablement même 5 jours suivants l'administration du cocktail. Toutefois, il est à noter que les dénombrements bactériens directs sous-estiment la quantité de bactérie de par la présence des bactériophages dans les échantillons qui peuvent encore réduire la population bactérienne. Par contre, la diminution de la quantité d'AIEC n'a pas été associée à une variation de poids des souris ou de la quantité de Myeloperoxydases (MPO) [enzyme des neutrophiles et macrophages utilisée comme marqueur de suivi des MICI], provenant des muqueuses iléales ou coliques recueillies au J5.

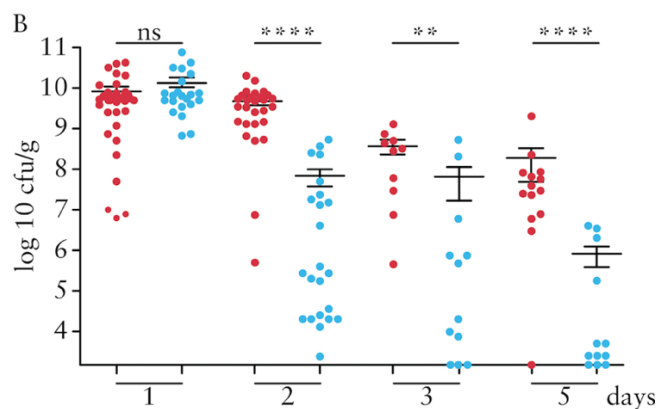


Figure 11. Concentration d'AIEC dans les selles des souris transgéniques CEABAC10. Cette figure représente la concentration d'AIEC exprimée en CFU/g² dans les selles des souris transgéniques préalablement infectées par la souche LF82 en fonction du temps après administration de PBS (rouge) ou du cocktail phagique (bleu). ns=non-significatif ** $p < 0,01$ et **** $p < 0,0001$ (Galtier et coll. 2017).

Un dénombrement bactérien indirect a été également réalisé par une PCR semi-quantitative pour les coupes iléales et coliques au jour 2 et au jour 5. Ici aussi, les résultats obtenus indiquent une réduction significative des souches de pathovar (figure 12).

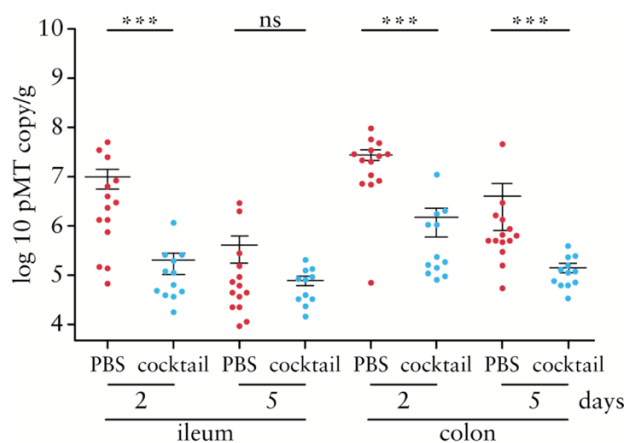


Figure 12. Diminution de la concentration d'AIEC dans les coupes iléales et coliques des souris transgéniques CEABAC10 (préalablement infectées par la souche LF82) au J2 et J5 après administration de PBS (rouge) ou du cocktail triphagique (bleu). Le dénombrement bactérien a été réalisé par qPCR. ns=non-significatif ; *** $p < 0,005$ (Galtier et coll. 2017).

Dans un troisième temps, chez des souris sauvages, les chercheurs ont voulu mimer un état clinique proche de la MC. Pour ce faire, du DSS a été administré aux souris à une concentration de 2% (figure 13). Cette concentration de DSS a été étudiée afin de pouvoir obtenir une colite évaluée par le score DAI (Disease Activity Index) entre 7 à 9 jours après l'administration de la souche du pathovar. De la streptomycine a été administrée continuellement à une concentration de 0,5g/L pour favoriser la colonisation par la souche LF82SK. Sur ces souris le but de l'expérimentation est d'établir un éventuel lien entre la diminution de la quantité de pathovars et le contrôle des symptômes de la colite. Le DAI score permet d'objectiver l'état clinique de

² CFU = Unité Formant Colonie est une unité utilisée pour estimer le nombre de bactéries

la MC en tenant compte de plusieurs facteurs : perte de poids, consistance des selles et présence de sang dans les selles (annexe 3). Outre le lien entre l'AIEC et l'état clinique, les chercheurs ont voulu voir l'impact du cocktail phagique dans le cadre d'un traitement préventif (administré avant la colite, au J8) et d'un traitement curatif (administré après la colite, au J10). Les groupes préventifs et curatifs ont été comparés à un groupe contrôle ayant reçu du PBS comme placebo.

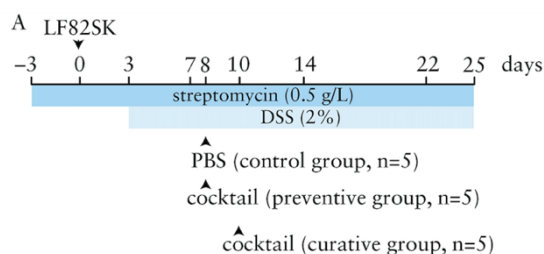


Figure 13. **Chronologie du mode opératoire sur les souris sauvages.** 0,5g/L de streptomycine a été administré 3 jours avant l'infection per os par la souche LF82SK. Du DDS à 2% a été donné 3 jours après l'infection. Chez le groupe contrôle, du PBS (placebo) a été administré au J8. Chez le groupe préventif, les souris sauvages ont été traitées par le cocktail triphagique (3×10^7 PFU) au J8 contrairement au groupe curatif traité au J10 (Galtier et coll. 2017).

Les résultats des souris sauvages, chez qui on a induit une colite par l'administration de DSS, montrent une diminution du score DAI, se traduisant par une amélioration de l'état clinique dans les groupes ayant reçu le cocktail phagique. Cette diminution est nettement plus importante et rapide pour le groupe « préventif » (figure 14). Dans le groupe « curatif », l'abaissement du score est plus tardif et s'observe 4 jours après l'administration du traitement. Ces diminutions de scores se maintiennent jusqu'au 25^e jour.

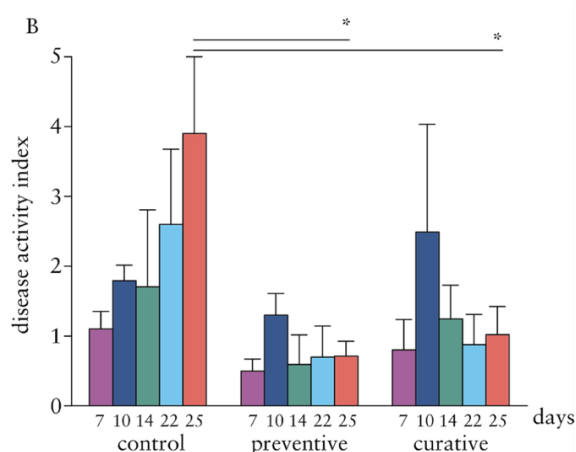


Figure 14. **Suivi de l'indice de l'activité de la maladie des souris sauvages.** Suivi du score DAI sur 25 en fonction du temps après traitement chez les différents groupes : control, preventive, curative. * $p < 0,05$ (Galtier et coll. 2017).

Enfin, Galtier et coll. ont montré une diminution significative de la quantité de pathovars dans les selles du groupe préventif et curatif par rapport à celle observée dans les selles du groupe contrôle. Plus précisément, concernant le groupe « préventif », au 25^e jour, les fèces contenaient : 6 000 fois moins de pathovars ($4,8 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^9$ à $7,7 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^6$ UFC/g) et 43 000 fois moins pour le groupe « curatif » ($4 \times 10^9 \pm 1,4 \times 10^9$ à $9,3 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^5$

UFC/g). Cette diminution de la quantité de pathovars s'est également confirmée sur les coupes iléales et coliques des souris sauvages recueillies au 25^e jour pour le groupe curatif et préventif par rapport au groupe contrôle (figure 15). Toutefois, aucune différence significative entre le groupe préventif et le groupe curatif n'a été constatée sur les coupes iléales et coliques contrairement aux précédents résultats, où les quantités de pathovars étaient bien inférieures dans le groupe curatif comparées à celles du groupe préventif.

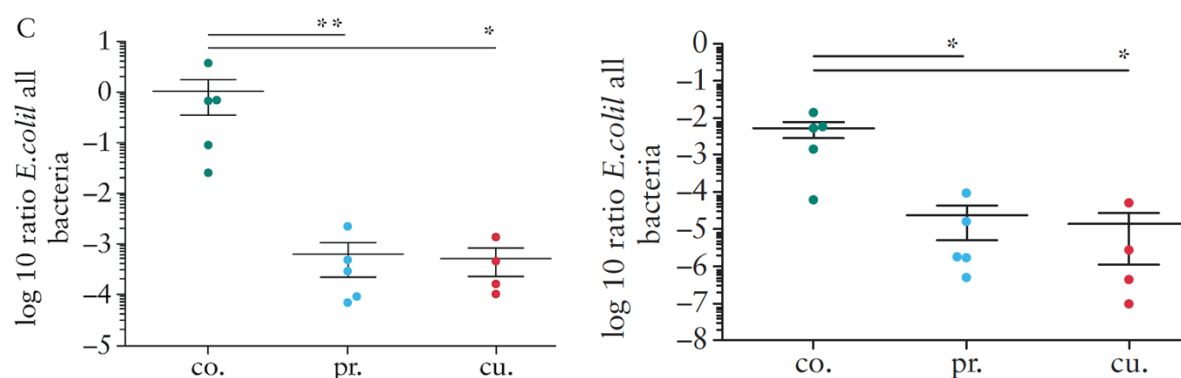


Figure 15. **Quantité *E. coli* dans des coupes intestinales chez les souris sauvages.** Cette figure montre le ratio entre la quantité d'*E. coli* et celle de toutes les bactéries retrouvées au J25 dans des coupes iléales (image de gauche) et coliques (image de droite) des différents groupes de souris sauvages : contrôle (co.), préventif (pr.) et curatif (cu.). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Galtier et coll. 2017).

En résumé, les travaux de Galtier et coll. ont montré qu'un seul jour d'administration de phages permet de diminuer durablement la colonisation du pathovar AIEC dans les muqueuses intestinales ainsi que les symptômes de la colite.

6.2 Essai Clinique

Le 15 février 2018, la FDA a approuvé l'utilisation de bactériophages comme traitement de la MC dans un essai clinique de phase I et II à l'hôpital Mount Sinai, à New York. Cela constitue un tournant dans l'histoire, pour la compréhension de la MC et aussi pour la phagothérapie.

L'objectif de cet essai clinique est d'évaluer l'innocuité et l'efficacité du cocktail phagique, appelé EcoActive, ciblant le pathovar AIEC. Le design choisi pour cet essai clinique est le suivant : étude randomisée, en double aveugle, sur 30 patients atteints de la MC, traitement versus placebo. Le comparateur est une solution saline de 0,9% dont 1mL est administré aux patients deux fois par jour pendant 15 jours. Concernant le traitement évalué, 1mL d'EcoActive a été administré de la même façon que le placebo. Le comparateur choisi permet d'étudier les éventuels effets secondaires du traitement. Bien qu'il aurait fallu, pour mieux faire, administrer également le traitement chez des patients contrôles sains afin d'avoir une meilleure appréciation des effets secondaires du traitement. Cependant, pour juger de l'efficacité du traitement, il aurait été plus judicieux que le comparateur soit le traitement actuellement recommandé.

Les outcomes primaires concernent l'état clinique. Sur 6 mois, les outcomes récoltés sont :

- L'incidence des évènements indésirables,
- La gravité des évènements selon Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4,
- L'effet sur la MC objectivé grâce à l'Indice Harvey-Bradshaw, HBI (annexe 4),
- L'effet sur l'inflammation via les protéines C-réactives (CRP) du sang,
- L'effet sur l'inflammation intestinale via le taux de calprotectines fécales.

Le CRP est un biomarqueur de l'inflammation générale tandis que la calprotectine est un marqueur spécifique de l'inflammation intestinale. Cependant, tous les deux sont des biomarqueurs non-spécifiques de la MC. Ils sont utiles dans le suivi de la maladie et dans l'estimation de la gravité des poussées inflammatoires (Labtestonline, 2020).

Les outcomes secondaires évalués sont l'incidence et le taux de pathovars dans les selles.

Cet essai comporte selon moi plusieurs points négatifs :

- L'étude n'est pas multicentrique (patients proviennent d'un seul hôpital) ;
- L'échantillon de patients est trop petit (30 patients) et ne possède pas de contrôle sain ;
- La composition du cocktail et le type de phage n'ont pas été transmis ;
- Les critères de sélection excluent les formes actives de la MC, de même que les formes plus sévères avec un HBI ≥ 4 ;
- La durée d'évaluation est courte ; un suivi de 6 mois ne nous permet pas d'évaluer un traitement pour une telle pathologie car les périodes de rémission peuvent durer plus longtemps.

Concernant les critères d'inclusion, on retrouve bien évidemment la nécessité de la présence du pathovar AIEC dans les selles du patient.

Cette étude interventionnelle a débuté le 1^{er} mai 2019 et devrait se terminer en juin 2021. De ce fait, les résultats de cet essai clinique ne sont malheureusement pas encore disponibles (Clinicaltrials, 2019).

7 Discussion

Cette discussion s'attardera uniquement sur les différents aspects de la phagothérapie étant donné que l'intérêt du ciblage de l'AIEC a déjà été développé dans la première partie de ce mémoire (cf : 3.5 L'AIEC une bonne cible thérapeutique ?)

La phagothérapie a l'avantage de cibler spécifiquement le pathovar sans impacter la totalité de la flore intestinale. De plus, elle permettrait de résoudre les problèmes de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques. Cependant, cette résolution n'est que temporaire car les bactériophages induisent également des résistances. Toutefois, cette résistance peut être contournée afin de promouvoir une efficacité de la phagothérapie à long-terme. En effet, plusieurs facteurs influençant cette résistance ont été mis en évidence. Cette résistance serait dépendante du type de phages, de leur concentration, de leur cible et de leur schéma d'administration. Dès lors, un cocktail développerait moins de résistance s'il est constitué de phages ciblant des récepteurs différents de la bactérie-hôte et si ceux-ci sont administrés simultanément. De même que l'ordre d'exposition pour un même couple de phage impacte différemment le développement de résistance (Wright et coll. 2019). Concernant les expériences de Galtier et coll., il est dommage que la cible précise de chaque phage n'ait pas été identifiée. Le choix des chercheurs, d'une administration simultanée des différents phages et d'une double dose, était judicieux pour diminuer le risque de résistance.

Un autre avantage de la phagothérapie est l'amplification virale dans les zones colonisées par la bactérie-hôte permettant notamment de palier les problèmes de distribution des phages. Dès lors, la phagothérapie sera plus efficace dans les régions où le pathogène est plus concentré. A contrario, l'administration phagique sera sans conséquence et les phages seront éliminés rapidement si le patient n'est pas porteur de pathovars. Toutefois, la phagothérapie est un traitement peu sensible car elle est dépendante d'une certaine quantité de bactéries-hôtes. De ce fait, le moment précis du traitement doit être étudié afin de maximiser l'efficacité de la phagothérapie. En effet, la thérapie phagique est plus efficace en début de traitement où la quantité de bactéries-hôtes est plus importante. Ensuite, l'effet sur la réduction bactérienne stagne car les quantités bactériennes sont basses. Cette autolimitation s'est vue dans l'étude expérimentale de Galtier et coll., où on a pu constater une diminution de la présence des bactériophages dans les selles et dans les coupes intestinales au fil du temps et parallèlement à la diminution des quantités de pathovars.

Dans l'article de Galtier et coll., chaque phage virulent du cocktail a su cibler le pathovar AIEC et se répliquer dans le tractus gastro-intestinal. En plus, il semblerait que les phages ont une

capacité à se lier au mucus, induisant ainsi une persistance dans la muqueuse intestinale. En utilisant ce cocktail phagique, Galtier et coll. ont montré premièrement une baisse de colonisations de l'AIEC chez les souris transgéniques surexprimant le récepteur CEACAM6 humain, comme c'est le cas chez les patients atteints de la MC. Deuxièmement, ils ont montré que l'infection par le pathovar aggravait la colite induite par le DSS chez des souris sauvages. Enfin, l'administration du cocktail phagique chez les souris sauvages a permis de diminuer la colonisation de l'AIEC des selles et du tractus intestinal, de même que les symptômes de la colite que ce soit en traitement préventif ou curatif. Par ailleurs, pour avoir une meilleure évaluation de l'efficacité du traitement préventif, il aurait mieux fallu administrer le traitement plus tôt au jour 5 au lieu de l'administrer au jour 7 soit 1 à 2 jours seulement avant la colite.

La sécurité des phages n'a pas été évaluée dans l'article expérimental. Galtier et coll. se sont reposés essentiellement sur des autres études, où la phagothérapie a été utilisée per os chez des adultes ou des nourrissons pour des infections intestinales. Actuellement, on retrouve notamment bon nombre d'essais cliniques concernant des diarrhées infectieuses. Cette sécurité d'utilisation n'est pas forcément étonnante lorsqu'on sait que le viriome est plus abondant que le bactériome au sein du tractus gastro-intestinal. En effet, les bactériophages font entièrement partie du microbiote intestinal. D'ailleurs, une étude intéressante, publiée dans Cell Press de Norman et coll., évoque un potentiel rôle du viriome intestinal dans les MICI où les compositions du viriome intestinal étaient différentes (Norman et coll. 2015).

Le choix de l'administration orale des phages pour ce type de traitement est le plus judicieux. En effet, l'administration per os est facile à mettre en œuvre et elle est appréciée par les patients. De plus, elle induit moins de réponses immunitaires. Enfin, elle permet d'avoir un effet local contournant ainsi les problèmes d'absorption et de distribution des phages.

Les résultats de l'étude expérimentale de Galtier et coll. sont encourageants mais il faut attendre les résultats de l'essai clinique pour pouvoir se positionner sur l'intérêt de la phagothérapie dans la MC. Bon nombre de travaux expérimentaux sur la phagothérapie étaient prometteurs mais qui ne sont pas confirmés sur un modèle humain. Surtout que la réponse immunitaire ne peut pas être anticipée car elle est propre au type de phage, au mode d'administration, à la quantité administrée, à l'infection et la localisation. L'évaluation de la réponse immunitaire est nécessaire car elle peut conduire à une baisse d'efficacité du traitement ou à des réactions inflammatoires accrues, dangereuses pour l'organisme.

8 Conclusion

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin dont l'incidence ne cesse aujourd'hui d'augmenter et tout particulièrement dans les pays développés. L'étiologie de cette pathologie est encore mal connue mais semblerait être multifactorielle. La MC résulterait ainsi de plusieurs facteurs comme une susceptibilité génétique, des facteurs environnementaux (le tabac, alimentation, médicaments...) qui entraînent alors des réponses immunitaires anormales et une dysbiose intestinale.

Dans l'état de dysbiose intestinale des patients atteints de la MC, la présence d'un pathogène, l'Adhérent-Invasif *Escherichia coli*, a été identifiée. Ce pathovar AIEC possède de nombreux mécanismes de virulence conférant alors à la bactérie des capacités d'adhésion, d'envahissement des muqueuses, de survie et de réplication à l'intérieur des cellules de l'hôte. De par la prévalence, l'abondance et la richesse de l'AIEC relevées dans les muqueuses intestinales des patients atteints de la MC, l'implication de l'AIEC dans le développement ou l'aggravation des poussées inflammatoires ne fait plus aucun doute. C'est pourquoi, l'AIEC est devenu une cible jugée prometteuse dans la MC. De ce fait, diverses stratégies thérapeutiques ciblant le pathovar ont été développées. Parmi elles, la phagothérapie, traitement bactéricide utilisant des bactériophages, semble s'imposer de par ses nombreux avantages.

Premièrement, les phages étant omniprésents, l'environnement constitue un réservoir phagique incommensurable et gratuit. Deuxièmement, les phages ont un spectre étroit permettant alors un ciblage précis du pathovar, sans impacter la totalité des microflore. Troisièmement, la capacité d'amplification des phages permet d'avoir un effet bactéricide persistant et de limiter les problèmes de biodisponibilité. Enfin, jusqu'à présent aucune toxicité de la phagothérapie n'a été rapportée. Cependant, elle présente également certaines limitations : une faible sensibilité exigeant alors une certaine quantité de bactéries, le développement de phagorésistance, des réactions immunitaires imprévisibles pouvant diminuer l'efficacité du traitement ou être dangereuse pour l'organisme. C'est pourquoi, la route vers l'acceptation et la réintroduction de la phagothérapie est lente et ce, malgré la pression croissante des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques.

Les travaux expérimentaux de Galtier et coll. éveillent encore plus l'intérêt de la phagothérapie dans la MC. Les chercheurs ont montré une réduction significative du nombre de pathovars dans les selles et les coupes intestinales des souris traitées par un cocktail phagique. Cette diminution a en plus été associée à une réduction des symptômes coliques confirmant alors l'implication du pathovar dans les poussées inflammatoires de certains patients de la MC. De

plus, les chercheurs ont montré que les phages du cocktail étaient capables de coloniser les muqueuses intestinales. Dès lors, il a suffi d'un seul jour d'administration per os pour diminuer l'inflammation due à l'AIEC. Cependant, avant de pouvoir réellement se positionner sur la question, il est nécessaire d'attendre les résultats de l'essai clinique qui se déroule actuellement aux États-Unis car bon nombre de travaux expérimentaux se sont soldés par un échec lors du passage à l'essai clinique.

9 Méthodologie

Étant intéressé par le sujet des bactériophages et leurs diverses applications, j'ai cherché sur pubmed les dernières avancées de la phagothérapie et je suis tombé sur l'article de Galtier et coll. à savoir : Bacteriophages Targeting Adherent Invasive *Escherichia coli* Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease.

Pour analyser et comprendre cet article, il m'a fallu premièrement me renseigner sur la maladie de Crohn et son étiologie à travers divers articles recueillis sur pubmed.

Deuxièmement, il me fallait étudier la cible : *Escherichia coli* adhérent-invasif et son implication de la MC afin d'évaluer s'il s'agissait d'une cible prometteuse pour le développement de nouveaux traitements.

Troisièmement, j'ai tenté de dresser le tableau plus ou moins exhaustif de la phagothérapie, des preuves actuelles et des divers avantages et inconvénients qui ont été rencontrés.

Finalement, j'ai réalisé l'analyse de l'article de Galtier et coll. et des résultats obtenues. Les résultats de l'essai clinique n'étant pas disponible, il m'a fallu me contenter de l'analyse de la méthodologie de l'essai.

J'ai sélectionné l'ensemble de mes articles sur pubmed : je les ai choisis en favorisant des articles scientifiquement pertinents et, tout en veillant, à avoir également des sources récentes. Pour approfondir ma compréhension et mes connaissances sur le sujet, j'ai lu le livre de Dublanche intitulé : « La phagothérapie : Des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. »

Durant la rédaction de ce mémoire, j'ai été confrontée à de nombreux problèmes notamment concernant la partie phagothérapie. En effet, plusieurs articles sont contradictoires. Certains travaux expérimentaux présentent des résultats prometteurs sur des animaux mais malheureusement ces travaux se sont avérés non confirmés lors des essais cliniques sur l'homme. J'ai donc trouvé plus judicieux de ne pas donner d'exemple pour illustrer mes propos.

10 Bibliographie

10.1 Articles

- Abedon, S. T., S. J. Kuhl, B. G. Blasdel and E. M. Kutter (2011). "Phage treatment of human infections." Bacteriophage **1**(2): 66-85.
- Ackermann, H. W. (2007). "5500 Phages examined in the electron microscope." Arch Virol **152**(2): 227-243.
- Ackermann, H. W. and A. M. Kropinski (2007). "Curated list of prokaryote viruses with fully sequenced genomes." Res Microbiol **158**(7): 555-566.
- Agus, A., S. Massier, A. Darfeuille-Michaud, E. Billard and N. Barnich (2014). "Understanding host-adherent-invasive Escherichia coli interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies." Biomed Res Int **2014**: 567929.
- Alhagamhmad, M. H., A. S. Day, D. A. Lemberg and S. T. Leach (2016). "An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis." J Med Microbiol **65**(10): 1049-1059.
- Barr, J. J. (2017). "A bacteriophages journey through the human body." Immunol Rev **279**(1): 106-122.
- Baumgart, D. C. and W. J. Sandborn (2012). "Crohn's disease." The Lancet **380**(9853): 1590-1605.
- Bringer, M.-A., N. Rolhion, A.-L. Glasser and A. Darfeuille-Michaud (2007). "The Oxidoreductase DsbA Plays a Key Role in the Ability of the Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive *Escherichia coli* Strain LF82 To Resist Macrophage Killing." Journal of Bacteriology **189**(13): 4860-4871.
- Brown, C. L., K. Smith, D. M. Wall and D. Walker (2015). "Activity of Species-specific Antibiotics Against Crohn's Disease-Associated Adherent-invasive *Escherichia coli*." Inflammatory Bowel Diseases **21**(10): 2372-2382.
- Campbell, A. (2003). "The future of bacteriophage biology." Nat Rev Genet **4**(6): 471-477.
- Carlton, R. M. (1999). "Phage therapy: past history and future prospects." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **47**(5): 267-274.
- Clokie, M. R., A. D. Millard, A. V. Letarov and S. Heaphy (2011). "Phages in nature." Bacteriophage **1**(1): 31-45.
- Cosnes, J., C. Gower-Rousseau, P. Seksik and A. Cortot (2011). "Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases." Gastroenterology **140**(6): 1785-1794.

- Curtright, A. J. and S. T. Abedon (2012). Phage Therapy: Emergent Property Pharmacology.
- Dąbrowska, K. and S. T. Abedon (2019). "Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies." Microbiology and Molecular Biology Reviews **83**(4): e00012-00019.
- Dabrowska, K., K. Swiła-Jelen, A. Opolski, B. Weber-Dabrowska and A. Gorski (2005). "Bacteriophage penetration in vertebrates." J Appl Microbiol **98**(1): 7-13.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie and J. F. Colombel (2004). "High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease." Gastroenterology **127**(2): 412-421.
- Dublanquet, A. (2009). Des virus pour combattre les infections - la phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Fabre.
- Dublanquet, A. (2014). "Qu'est-ce que la phagothérapie ?" HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale.
- Dublanquet, A. and O. Patey (2011). "La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation)." Immuno-analyse & Biologie Spécialisée **26**: 165–175.
- Dufour, N. and L. Debarbieux (2017). "[Phage therapy: a realistic weapon against multidrug resistant bacteria]." Med Sci (Paris) **33**(4): 410-416.
- Elbreki, M., R. P. Ross, C. Hill, J. O'Mahony, O. McAuliffe and A. Coffey (2014). "Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment." Journal of Viruses **2014**: 382539.
- Favier, C., C. Neut, C. Mizon, A. Cortot, J. F. Colombel and J. Mizon (1997). "Fecal β -D-Galactosidase Production and Bifidobacteria Are Decreased in Crohn's Disease." Digestive Diseases and Sciences **42**(4): 817-822.
- Feuerstein, J. D. and A. S. Cheifetz (2017). "Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management." Mayo Clinic Proceedings **92**(7): 1088-1103.
- Galtier, M., L. De Sordi, A. Sivignon, A. de Vallée, D. Maura, C. Neut, O. Rahmouni, K. Wannerberger, A. Darfeuille-Michaud, P. Desreumaux, N. Barnich and L. Debarbieux (2017). "Bacteriophages Targeting Adherent Invasive Escherichia coli Strains as a Promising New Treatment for Crohn's Disease." J Crohns Colitis **11**(7): 840-847.

- Gordillo Altamirano, F. L. and J. J. Barr (2019). "Phage Therapy in the Postantibiotic Era." Clin Microbiol Rev **32**(2).
- Górski, A., R. Międzybrodzki, J. Borysowski, K. Dąbrowska, P. Wierzbicki, M. Ohams, G. Korczak-Kowalska, N. Olszowska-Zaremba, M. Łusiak-Szelachowska, M. Kłak, E. Jończyk, E. Kaniuga, A. Gołaś, S. Purchla, B. Weber-Dąbrowska, S. Letkiewicz, W. Fortuna, K. Szufnarowski, Z. Pawełczyk, P. Rogóż and D. Kłosowska (2012). "Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy." Adv Virus Res **83**: 41-71.
- Górski, A., R. Międzybrodzki, M. Łobočka, A. Głowacka-Rutkowska, A. Bednarek, J. Borysowski, E. Jończyk-Matysiak, M. Łusiak-Szelachowska, B. Weber-Dąbrowska, N. Bagińska, S. Letkiewicz, K. Dąbrowska and J. Scheres (2018). "Phage Therapy: What Have We Learned?" Viruses **10**(6).
- Górski, A., E. Wazna, B. W. Dabrowska, K. Dabrowska, K. Switała-Jeleń and R. Międzybrodzki (2006). "Bacteriophage translocation." FEMS Immunol Med Microbiol **46**(3): 313-319.
- Hart, A. L. and S. C. Ng (2015). "Crohn's disease." Medicine **43**(5): 282-290.
- Hvas, C. L., M. Bendix, A. Dige, J. F. Dahlerup and J. Agnholt (2018). "Current, experimental, and future treatments in inflammatory bowel disease: a clinical review." Immunopharmacol Immunotoxicol **40**(6): 446-460.
- Jandhyala, S. M., R. Talukdar, C. Subramanyam, H. Vuyyuru, M. Sasikala and D. Nageshwar Reddy (2015). "Role of the normal gut microbiota." World J Gastroenterol **21**(29): 8787-8803.
- Kabat, A. M., O. J. Harrison, T. Riffelmacher, A. E. Moghaddam, C. F. Pearson, A. Laing, L. Abeler-Dörner, S. P. Forman, R. K. Grencis, Q. Sattentau, A. K. Simon, J. Pott and K. J. Maloy (2016). "The autophagy gene Atg1611 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation." Elife **5**: e12444.
- Keen, E. C. (2015). "A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology." Bioessays **37**(1): 6-9.
- Kökten, T., Hansmannel, F., Melhem, H. & Peyrin-Biroulet, L. (2016). "Physiopathologie des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)." HEGEL - HEpato-GastroEntérologie Libérale.
- Kortright, K. E., B. K. Chan, J. L. Koff and P. E. Turner (2019). "Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria." Cell Host & Microbe **25**(2): 219-232.

- Koskella, B. and M. A. Brockhurst (2014). "Bacteria-phage coevolution as a driver of ecological and evolutionary processes in microbial communities." FEMS Microbiol Rev **38**(5): 916-931.
- Loc-Carrillo, C. and S. T. Abedon (2011). "Pros and cons of phage therapy." Bacteriophage **1**(2): 111-114.
- Martinez-Medina, M., X. Aldeguer, M. Lopez-Siles, F. González-Huix, C. López-Oliu, G. Dahbi, J. E. Blanco, J. Blanco, L. J. Garcia-Gil and A. Darfeuille-Michaud (2009). "Molecular diversity of Escherichia coli in the human gut: new ecological evidence supporting the role of adherent-invasive E. coli (AIEC) in Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **15**(6): 872-882.
- Mireille, A., B. Pascale, B. Charlotte, D. Laurent, D. Nicolas, F. Rémy, G. Sylvain, H. Claire Le, P. Marie-Agnès, R. Eduardo and T.-B. Clara (2020). "Les applications antibactériennes des bactériophages." Virologie **24**(1): 23-36.
- Nilsson, A. S. (2019). "Pharmacological limitations of phage therapy." Ups J Med Sci **124**(4): 218-227.
- Norman, Jason M., Scott A. Handley, Megan T. Baldrige, L. Droit, Catherine Y. Liu, Brian C. Keller, A. Kambal, Cynthia L. Monaco, G. Zhao, P. Fleshner, Thaddeus S. Stappenbeck, Dermot P. B. McGovern, A. Keshavarzian, Ece A. Mutlu, J. Sauk, D. Gevers, Ramnik J. Xavier, D. Wang, M. Parkes and Herbert W. Virgin (2015). "Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease." Cell **160**(3): 447-460.
- O'Hara, A. M. and F. Shanahan (2006). "The gut flora as a forgotten organ." EMBO Rep **7**(7): 688-693.
- Ofir, G. and R. Sorek (2018). "Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights." Cell **172**(6): 1260-1270.
- Orholm, M., K. Fonager and H. T. Sørensen (1999). "Risk of ulcerative colitis and Crohn's disease among offspring of patients with chronic inflammatory bowel disease." Am J Gastroenterol **94**(11): 3236-3238.
- Palmela, C., C. Chevarin, Z. Xu, J. Torres, G. Sevrin, R. Hirten, N. Barnich, S. Ng and J.-F. Colombel (2017). "Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease." Gut **67**: gutjnl-2017.
- Reinoso Webb, C., I. Koboziev, K. L. Furr and M. B. Grisham (2016). "Protective and pro-inflammatory roles of intestinal bacteria." Pathophysiology **23**(2): 67-80.

- Sales-Campos, H., P. J. Basso, V. B. Alves, M. T. Fonseca, G. Bonfá, V. Nardini and C. R. Cardoso (2015). "Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases." Braz J Med Biol Res **48**(2): 96-107.
- Schmelcher, M., D. M. Donovan and M. J. Loessner (2012). "Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials." Future Microbiol **7**(10): 1147-1171.
- Segain, J. P., D. Raingeard de la Blétière, A. Bourreille, V. Leray, N. Gervois, C. Rosales, L. Ferrier, C. Bonnet, H. M. Blottière and J. P. Galmiche (2000). "Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease." Gut **47**(3): 397-403.
- Shawki, A. and D. F. McCole (2017). "Mechanisms of Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Adherent-Invasive Escherichia coli." Cell Mol Gastroenterol Hepatol **3**(1): 41-50.
- Shih, D. Q., S. R. Targan and D. McGovern (2008). "Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology." Curr Gastroenterol Rep **10**(6): 568-575.
- Sivignon, A., A. de Vallée, N. Barnich, J. Denizot, C. Darcha, G. Pignède, P. Vandekerckove and A. Darfeuille-Michaud (2015). "Saccharomyces cerevisiae CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **21**(2): 276-286.
- Strober, W. and T. Watanabe (2011). "NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease." Mucosal Immunol **4**(5): 484-495.
- Sulakvelidze, A., Z. Alavidze and J. G. Morris (2001). "Bacteriophage Therapy." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**(3): 649-659.
- Suttle, C. A. (1994). "The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities." Microb Ecol **28**(2): 237-243.
- Taleban, S., J.-F. Colombel, M. J. Mohler and M. J. Fain (2015). "Inflammatory Bowel Disease and the Elderly: A Review." Journal of Crohn's and Colitis **9**(6): 507-515.
- Tontini, G. E., M. Vecchi, L. Pastorelli, M. F. Neurath and H. Neumann (2015). "Differential diagnosis in inflammatory bowel disease colitis: state of the art and future perspectives." World J Gastroenterol **21**(1): 21-46.
- Van den Abbeele, P., M. Marzorati, M. Derde, R. De Weirdt, V. Joan, S. Possemiers and T. Van de Wiele (2016). "Arabinoxylans, inulin and Lactobacillus reuteri 1063 repress the adherent-invasive Escherichia coli from mucus in a mucosa-comprising gut model." NPJ Biofilms Microbiomes **2**: 16016.

- Vavricka, S. R., A. Schoepfer, M. Scharl, P. L. Lakatos, A. Navarini and G. Rogler (2015). "Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease." Inflamm Bowel Dis **21**(8): 1982-1992.
- Wang, I. N., D. L. Smith and R. Young (2000). "Holins: the protein clocks of bacteriophage infections." Annu Rev Microbiol **54**: 799-825.
- Wright, R. C. T., V.-P. Friman, M. C. M. Smith and M. A. Brockhurst (2019). "Resistance Evolution against Phage Combinations Depends on the Timing and Order of Exposure." mBio **10**(5): e01652-01619.
- Yang, Y., Y. Liao, Y. Ma, W. Gong and G. Zhu (2017). "The role of major virulence factors of AIEC involved in inflammatory bowel disease-a mini-review." Appl Microbiol Biotechnol **101**(21): 7781-7787.
- Zhang, M., K. Sun, Y. Wu, Y. Yang, P. Tso and Z. Wu (2017). "Interactions between Intestinal Microbiota and Host Immune Response in Inflammatory Bowel Disease." Frontiers in Immunology **8**(942).
- Zhang, Y., L. Rowehl, J. M. Krumsiek, E. P. Orner, N. Shaikh, P. I. Tarr, E. Sodergren, G. M. Weinstock, E. C. Boedeker, X. Xiong, J. Parkinson, D. N. Frank, E. Li and G. Gathungu (2015). "Identification of Candidate Adherent-Invasive E. coli Signature Transcripts by Genomic/Transcriptomic Analysis." PLOS ONE **10**(6): e0130902.

10.2 Sites internet consultés

- Proportion des différentes MICI <http://www.observatoire-crohn-rch.fr/epimad-le-plus-grand-registre-de-malades-au-monde/> (page consultée le 10 mai 2020)
- Statistique MC : <http://www.mici.be/crohn/tabac-alcool-drogues/> (page consultée le 10 mai 2020)
- Haute Autorité de Santé (HAS) : https://www.has-sante.fr/jcms/c_671094/fr/ald-n-24-maladie-de-crohn (page consultée le 10 mai 2020)
- Safety, Efficacy and Pharmacokinetics of CF-301 vs. Placebo in Addition to Antibacterial Therapy for Treatment of S. Aureus Bacteremia <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03163446> (page consultée le 10 juin 2020)
- Étude clinique de l'utilisation des bactériophages dans la maladie de Crohn : <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03808103> (page consultée le 24 juin 2020)
- Calprotectin Labtestonline : <https://labtestsonline.org/tests/calprotectin> (page consultée le 25 juin 2020)

- CRP Labtestonline : <https://labtestsonline.org/tests/c-reactive-protein-crp> (page consultée le 25 juin 2020)

10.3 Ouvrage

- Dublanchet A. La phagothérapie : Des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Favre; 2017.

11 Annexes

- Annexe 1 :

Fonctions biologiques	RCH	MC	RCH et MC
Barrière épithéliale	<i>GNA12, HNF4A, CDH1, ERFF1</i>	<i>MUC19, ITLN1</i>	
Recrutement cellule immunitaire	<i>IL8RA, IL8RB</i>	<i>CCL11, CCL2, CCL7, CCL8, CCR6</i>	<i>MST1</i>
Présentation antigénique		<i>ERAP2, LNPEP, DENND1B</i>	
Voie Th17	<i>IL21</i>	<i>STAT3</i>	<i>IL23R, JAK2, TYK2, ICOSLG, TNFSF15</i>
Régulation LT	<i>IL2, IL7R, PIM3, TNFR-SF9, TNFSF8, IFNG</i>	<i>NDFIP1, TAGAP, IL2R</i>	<i>TNFSF8, IL12B, IL23, PRDM1, ICOSLG</i>
Régulation LB	<i>IL7R, IRF5</i>	<i>IL5, IKZF1, BACH2</i>	
Tolérance immunitaire	<i>IL1R1, IL1R2</i>	<i>IL27, SBNO2, NOD2</i>	<i>IL10, CREM</i>
Autophagie	<i>DAP, PARK7</i>	<i>ATG16L1, IRGM, NOD2, LRRK2</i>	<i>CUL2</i>
Apoptose/Nécrose	<i>DAP</i>	<i>FASLG, THADA</i>	<i>PUS10, MST1</i>
Stress oxydative	<i>HSPA6, DLD, PARK7</i>	<i>PRDX5, BACH2, ADO, GPX4, GPX1, SLC22A4, LRRK2, NOD2</i>	<i>CARD9, UTS2, PEX13</i>
Stress du RE	<i>SERINC3</i>	<i>CPEB4</i>	<i>ORMDL3, XBP1</i>
Migration cellulaire	<i>ARPC2, LSP1, AAMP</i>		

Gènes de susceptibilités impliqués dans les MICI (Kökten 2016)
RCH = rectocolite hémorragique, un autre nom de la colite ulcéreuse.

- Annexe 2 :

Reference	Country	Sample type	Number of patients			AIEC prevalence (%)		
			CD	UC	Non-IBD controls	CD	UC	Non-IBD controls
Adult population								
Darfeuille-Michaud et al ¹⁷	France	Ileal biopsies	63	–	16	Chronic lesions: 21.7 CD early: 36.4 CD healthy mucosa: 22.2	–	6.2
Baumgart et al ¹⁶	USA	Colonic biopsies	27	8	102	3.7	0	1.9
		Ileal biopsies	21 (13 ICD, 8 CCD)	–	7	ICD 38.5 CCD 37.5	–	14.3
Martinez-Medina et al ⁴¹	Spain	Ileal biopsies	11	–	17	54.5	–	17.6
		Colonic biopsies	16	–	19	50	–	15.8
Raso et al ²³	Italy	Colonic and ileocolonic anastomosis biopsies	8	6	4	62.5	0	0
Dogan et al ¹⁶⁰	USA	Ileal biopsies	32	–	28	25	–	19
Paediatric population								
Negrini et al ²⁷	Italy	Ileal and colonic biopsies	17	10	23	6	10	0
Conte et al ³³	Italy	Ileal biopsies	4	–	4	75	–	50

CCD, colonic Crohn's disease; CD, Crohn's disease; ICD, ileal Crohn's disease.

Prévalence de l'AIEC chez des patients sains, atteints de MC et UC (Palmela coll. 2017).

- Annexe 3 :

Table S1 Score DAI (Disease Activity Index)	
Symptoms/score	Characteristics
Body weight loss	
0	No loss
1	1-5 % loss of body weight
2	5-10 % loss of body weight
3	10-20 % loss of body weight
4	>20 % loss of body weight
Stool consistency	
0	Normal feces
1	Loose stool
2	Watery diarrhea
3	Slimy diarrhea, little blood
4	Severe watery diarrhea with blood
Blood in stool	
0	No blood
2	Presence of blood assessed by ColoScreen III test
4	Visible bleeding

Score DAI : https://cdn-links.lww.com/permalink/ibd/a/ibd_2014_12_29_sivignon_14-0359_sdc1.pdf
(page consultée le 3 juillet 2020)

- Annexe 4 :

	Valeur
Bien être général	
<ul style="list-style-type: none"> o Bon = 0 o Moyen = 1 o Médiocre = 2 o Mauvais = 3 o Très mauvais = 4 	
Douleurs abdominales	
<ul style="list-style-type: none"> o Absentes = 0 o Faibles = 1 o Moyennes = 2 o Intenses = 3 	
Selles liquides : Nombre/jour	
Masse abdominale	
<ul style="list-style-type: none"> o Absente = 0 o Douteuse = 1 o Certaine = 2 o Certaine avec défense 	
Signes extra-digestifs, fistule, fissure anale :	
1 point par item présent	
Score (= somme)	

Score < 4 : maladie inactive

Score compris entre 4 et 12 : maladie active

Score supérieur à 12 : maladie active très sévère

Indice de Harvey-Bradshaw : <https://www.cregg.org/commissions/mici/outils-mici/scores-de-la-maladie-de-crohn/indice-de-harvey-bradshaw/> (page consultée le 5 juillet 2020)

La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin qui reste à ce jour incurable. Elle constitue une importante problématique de santé publique de par son incidence croissante et tout particulièrement dans les pays développés. Son étiologie est encore mal comprise mais semblerait être multifactorielle. La maladie résulterait alors de plusieurs facteurs comme une susceptibilité génétique, des facteurs environnementaux (tabac, alimentation, médicaments, stress...) entraînant ainsi des réponses immunitaires anormales et une dysbiose intestinale.

Depuis peu, un photogène particulier a été identifié dans les muqueuses intestinales des patients atteints de la MC : l'Escherichia coli adhérent-invasif (AIEC). Ce pathogène a de nombreux facteurs de virulence déclenchant ou aggravant ainsi des poussées inflammatoires chez les malades.

Dans un premier temps, ce mémoire étudiera le pathogène AIEC afin de voir si celui-ci constitue une cible prometteuse dans la MC. Dans un deuxième temps, les diverses stratégies thérapeutiques ciblant l'AIEC seront survolées. Ensuite, nous étudierons les avantages et les limites de la phagothérapie, traitement bactéricide biologique employant des virus. Finalement, une étude expérimentale sera analysée afin de juger du potentiel intérêt de la phagothérapie dans la MC.

Crohn's disease (CD) is an inflammatory bowels disease which is nowadays incurable. CD is a main public health problem due to its increasing incidence, especially in developed countries. Its etiology is still poorly understood but seems to be multifactorial. The disease might result from several factors such as genetic susceptibility, environmental factors (tobacco, diet, drugs, stress, etc.) leading to abnormal immune responses and intestinal dysbiosis.

Recently, a particular pathogen has been identified in the intestinal mucosa of CD patients: Adherent-Invasive Escherichia coli (AIEC). This pathogen has many virulence factors that trigger or aggravate patients' inflammatory outbreaks.

First of all, this thesis is going to study the pathogen AIEC in order to see if it's a promising target in CD. Secondly, the different therapeutic strategies targeting AIEC strains will be reviewed. Then, we will focus on the advantages and the limits of phage therapy, a bactericide treatment using viruses. Finally, an experimental study will be analyzed in order to assess the potential benefit of phage therapy in CD.