

# Phagothérapie: concept et modèles animaux

• Laurent Debarbieux

• 22/03/2016

# Découverte de la Phagothérapie

***Utiliser des bactériophages ciblant les bactéries pathogènes***

***Date:*** 1917

***Paternité:*** Félix d'Herelle (1873-1949)

***Lieu:*** Institut Pasteur, Paris, France



***Particularités:*** premier traitement anti-bactérien spécifique

***1920's-1940's:*** expansion mondiale (Brésil, Egypte, Géorgie,...)

***1950's-1990's:*** déclin mondial (sauf en Europe de l'Est)

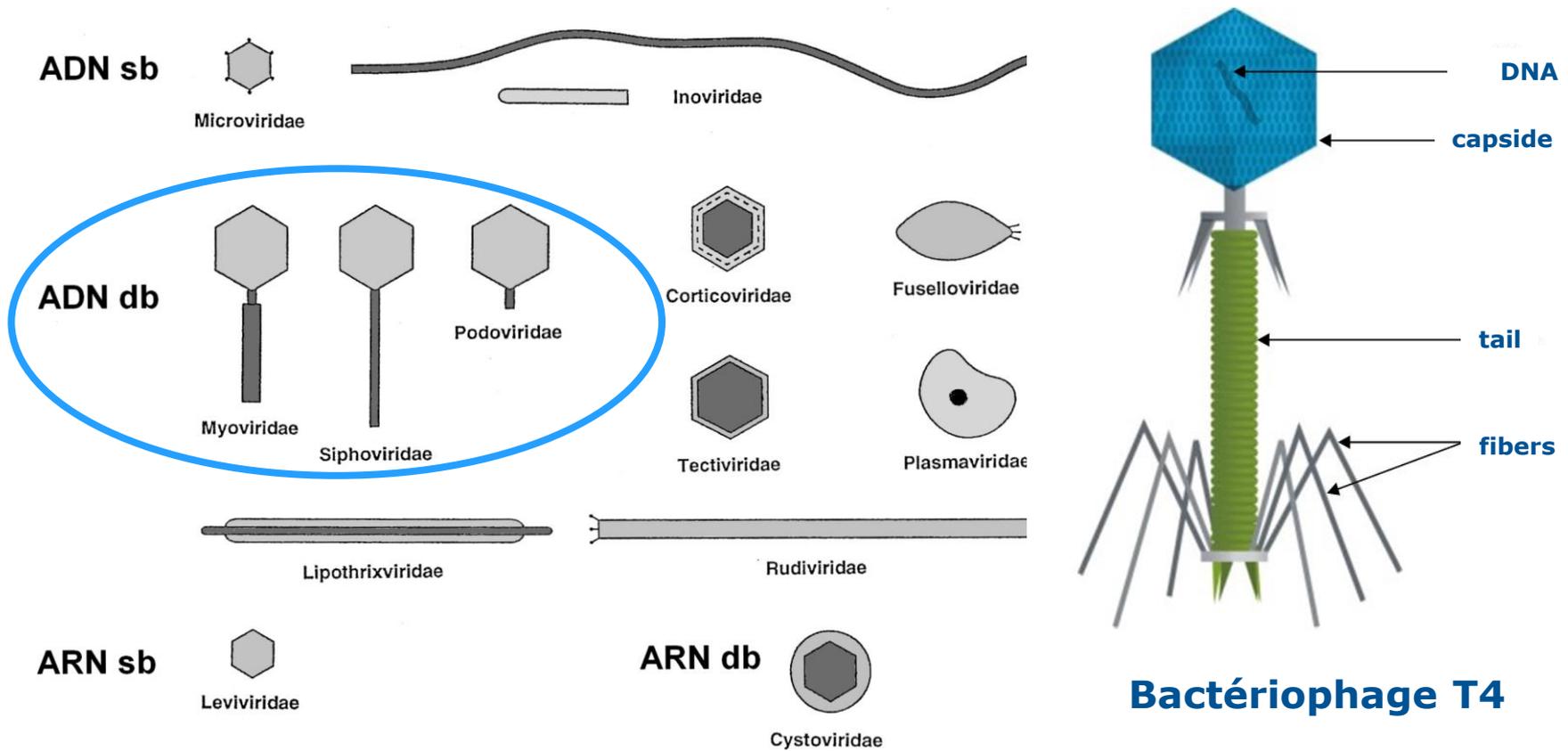
# La phagothérapie ne fût pas totalement abandonnée

En Europe de l'Est, plusieurs pays ont développé la phagothérapie



... et aujourd'hui ils l'utilisent toujours pour soigner des patients !

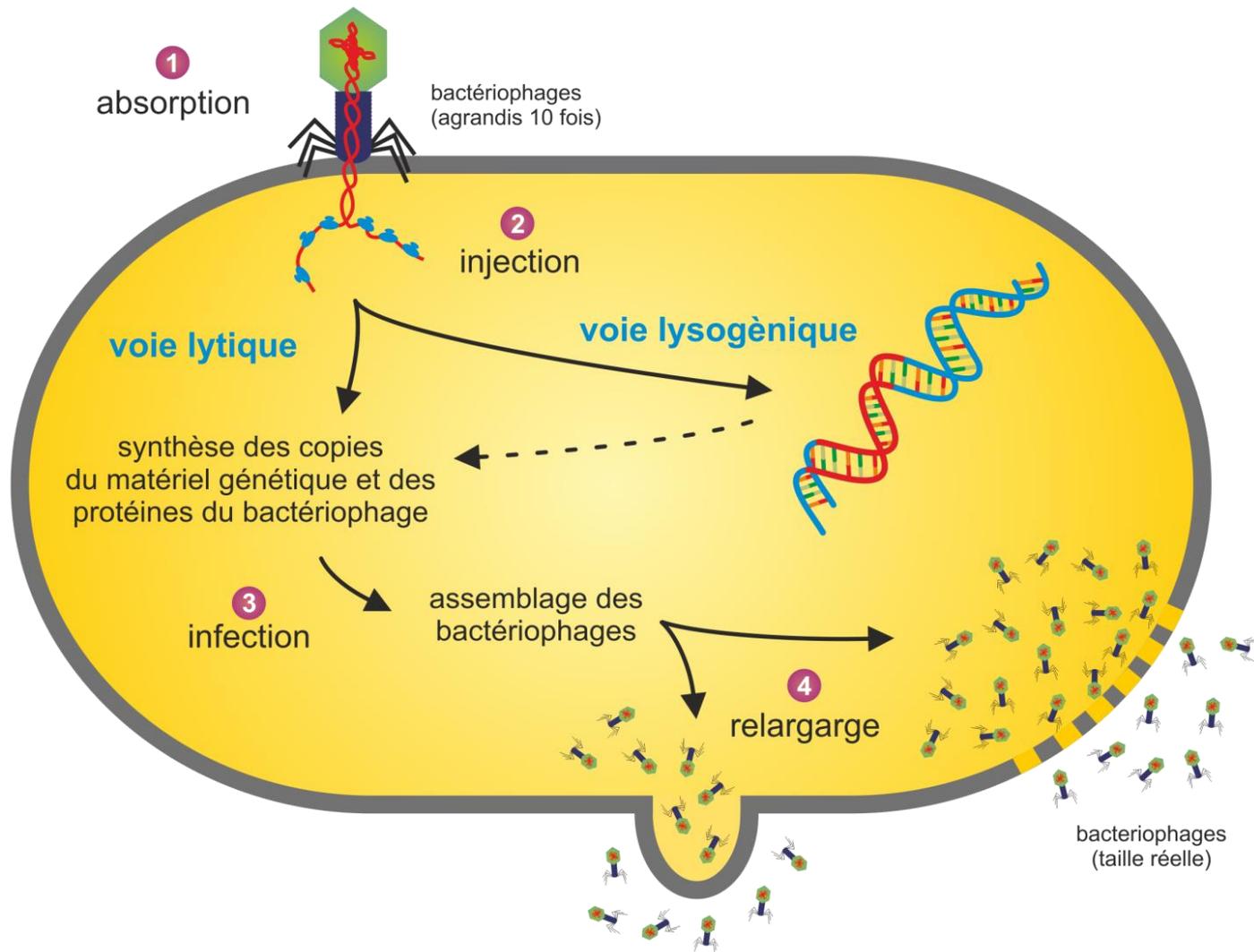
# Les bactériophages, des virus infectant les microbes



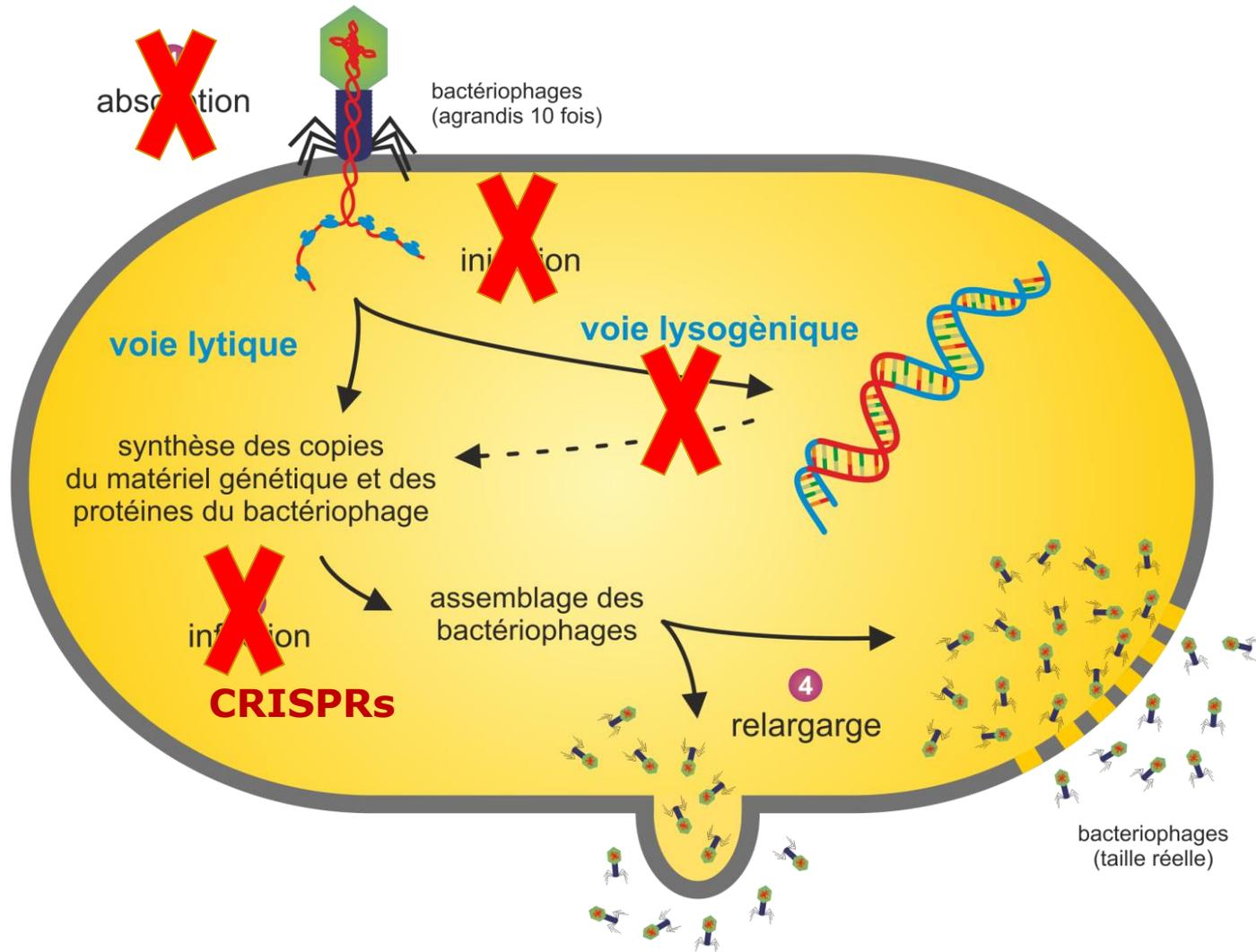
96% des bacteriophages décrits appartiennent à la famille des *Caudovirales*  
Ils sont très abondants ( $1 \times 10^{30}$  vs  $7 \times 10^9$  humains)



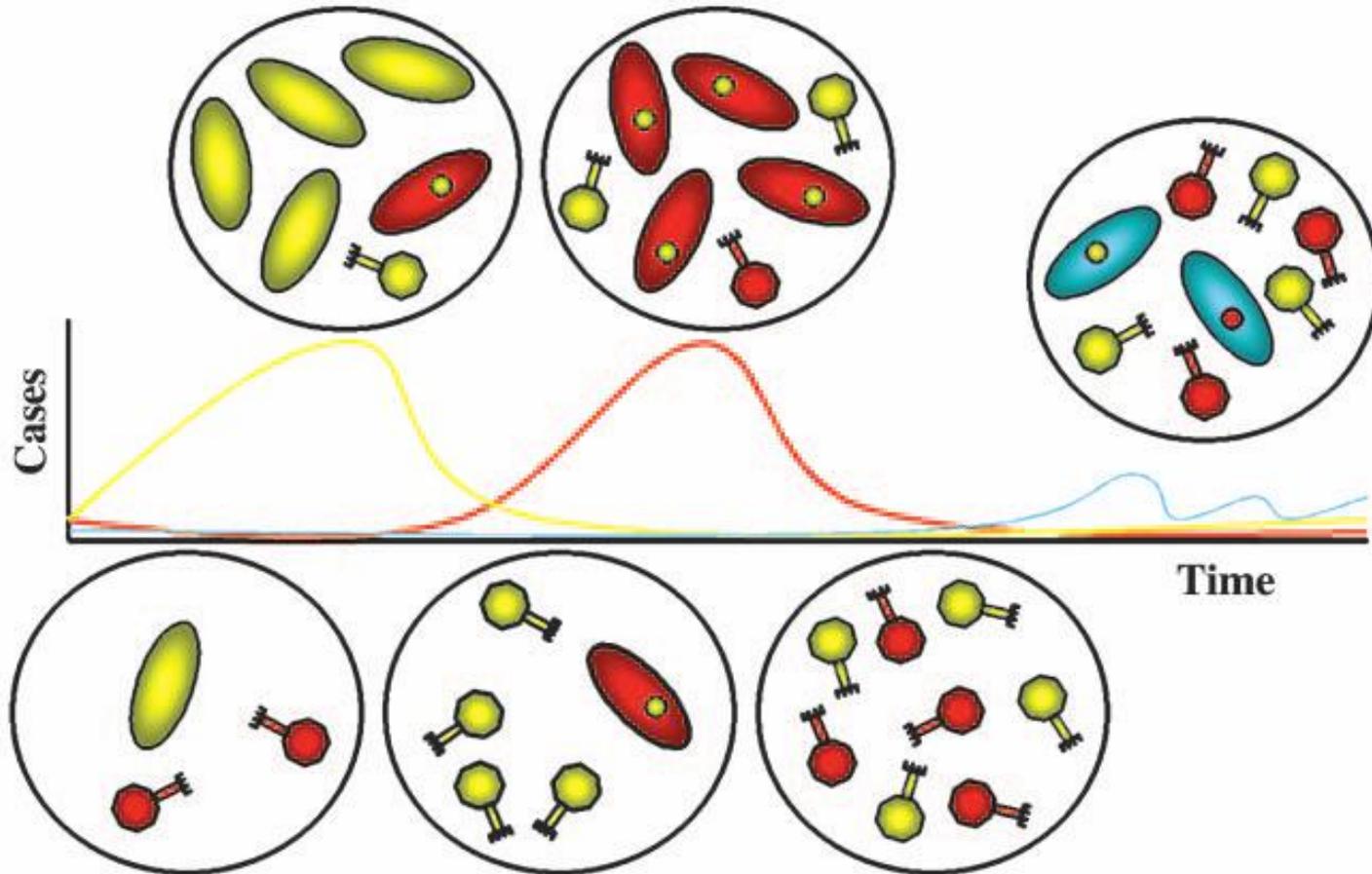
# Cycle infectieux: virulent vs tempéré



# Défenses bactériennes



# Coévolution Bactériophages/Bactéries



Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages  
Faruque et al., 2005, PNAS, vol 102, p1702

# Comment utiliser les bactériophages?

Deux stratégies principales et une plus récente

1°) Les protéines de bactériophages

Chaque nouveau génome de bactériophage séquencé contient 20 à 50% de séquences totalement inconnues dans les bases de données:

cela représente une source de protéines avec des fonctions potentiellement antibactériennes (*les lysines par exemple*).

2°) Les bactériophages eux-mêmes

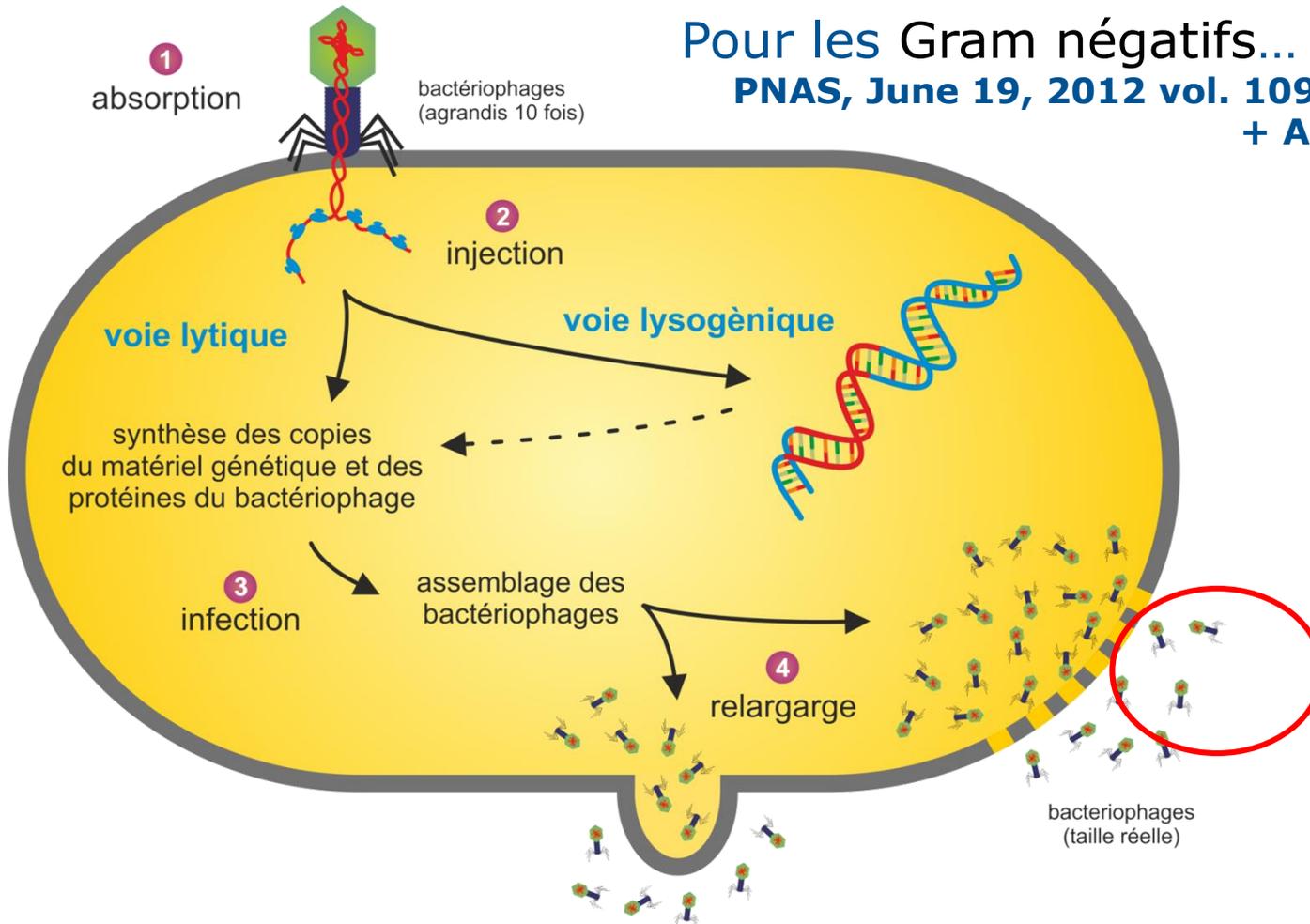
Les bactériophages sont les prédateurs naturels des bactéries, laissons-les faire !

3°) Phagemides / Biologie de synthèse

# Les endolysines purifiées

Les lysines sont efficaces contre les bactéries à Gram positif

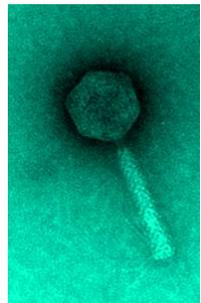
Pour les Gram négatifs... c'est en cours  
**PNAS, June 19, 2012 vol. 109 no. 25 9857-9862**  
**+ Artilysins (Lysando)**



Travaux de  
V. Fischetti  
(Contrafect)

# Modèles Animaux

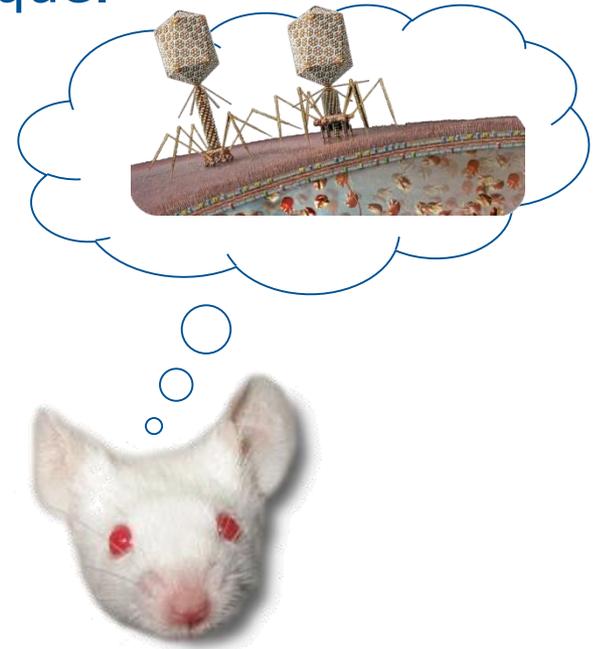
1° un modèle d'infection pulmonaire aiguë à *Pseudomonas aeruginosa* pour tester l'efficacité thérapeutique.



+



=



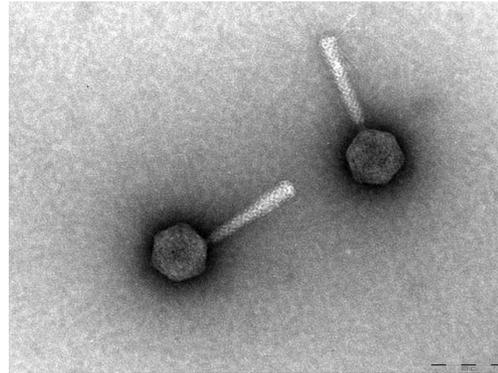
2° un modèle de colonisation de l'intestin par des souches d'*Escherichia coli* pour tester l'impact des bactériophages au sein d'une communauté complexe.

# Isolement et caractérisation des bactériophages

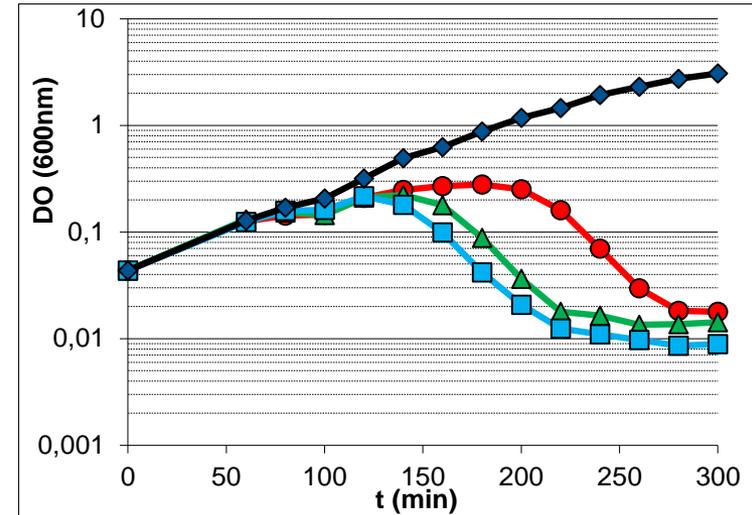
Plages de lyse



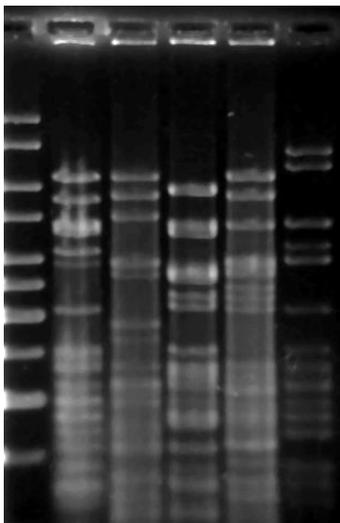
Microscopie élec.



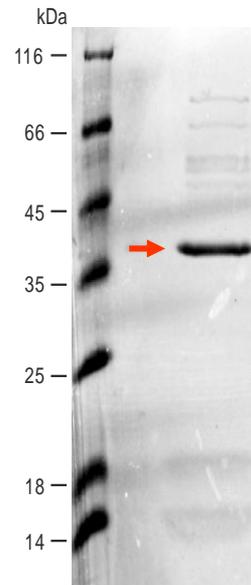
Cinétiques de lyse



RFLP



Mass Spec



Séquençage des génomes



Classification des virus



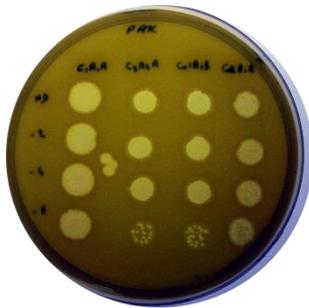
Etudes moléculaires

# Caractérisation des bactériophages

## Détermination du spectre d'hôte

PAK strain

O:6



ND  
-2  
-4  
-6

O:4



clinical isolates (serotypes)

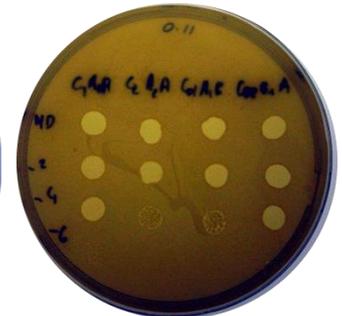
O:9



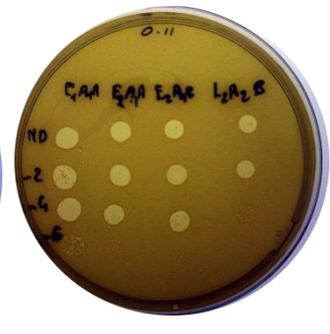
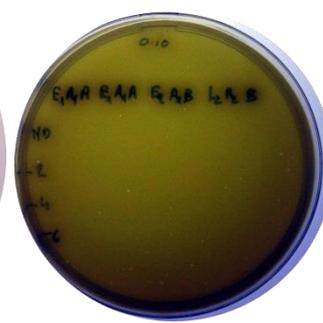
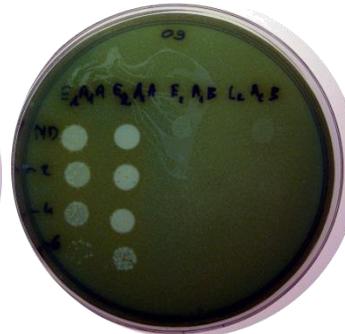
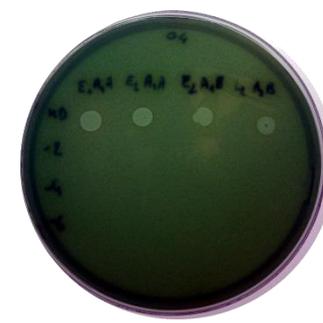
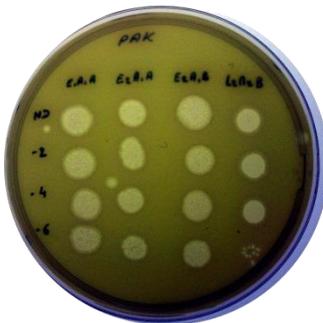
O:10



O:11



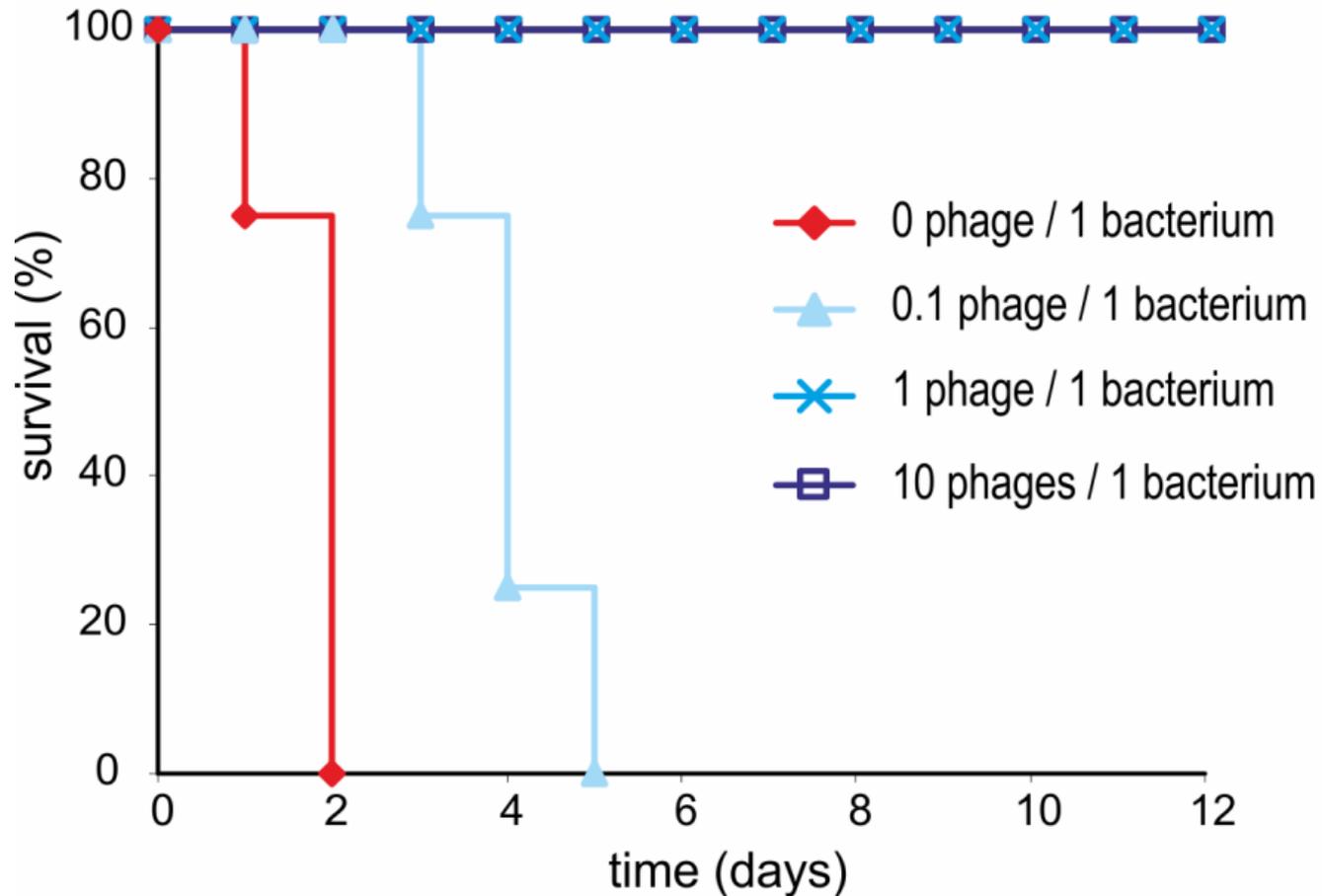
ND  
-2  
-4  
-6



Carte d'identité des bactériophages

# Traitement d'une infection pulmonaire aiguë

Infection par  $1 \times 10^7$  bactéries et 2H plus tard traitement par bactériophages



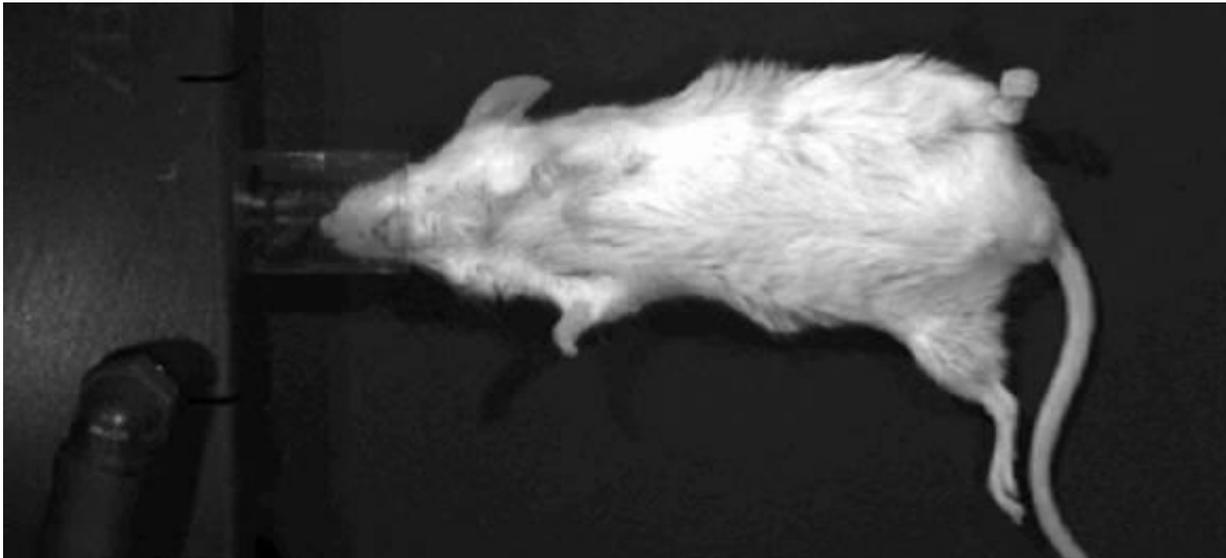
# Interactions bactériophages/bactéries chez l'animal

Les technologies actuelles permettent de suivre le développement du processus infectieux chez l'animal vivant en utilisant des bactéries reportrices (fluorescence, luminescence).

Avantages de la bioluminescence:

suivi de chaque animal (pas d'euthanasie)

quantification de l'infection



# Cinétique du traitement par les bactériophages

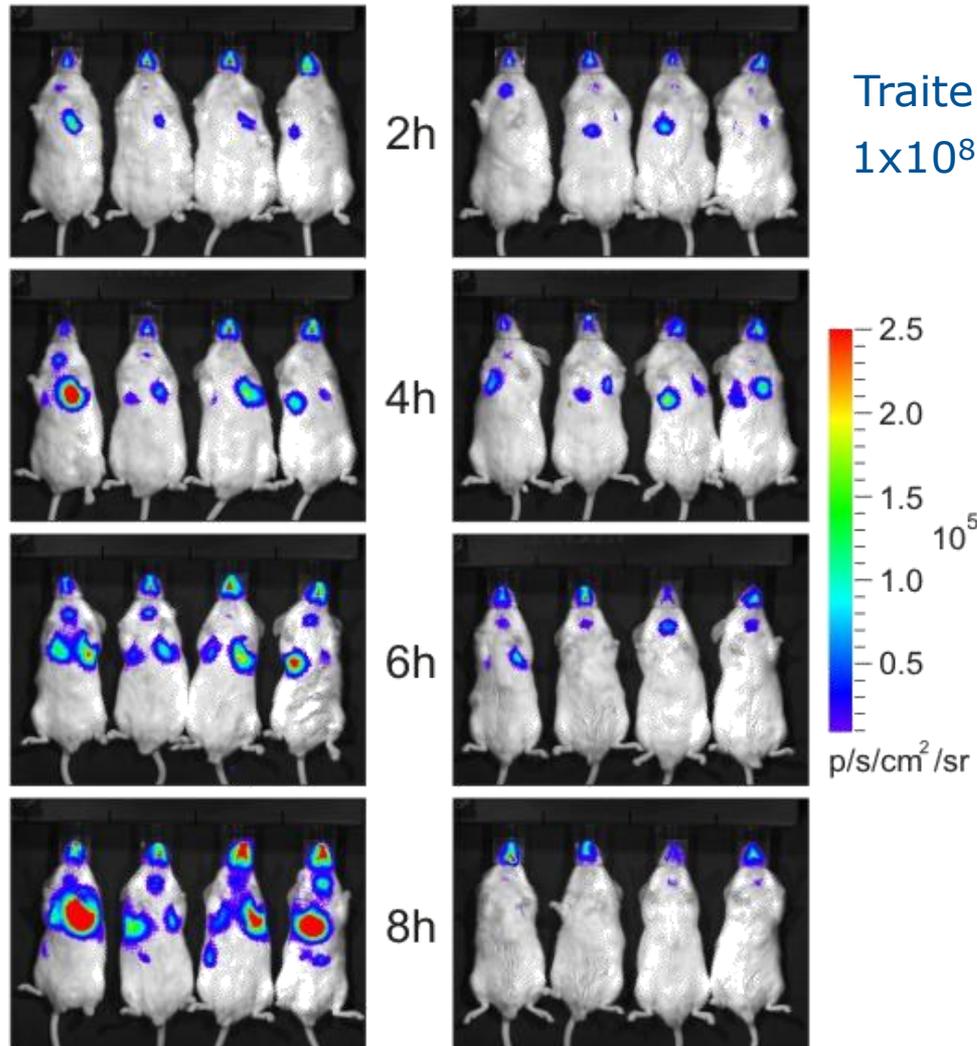
Infection à  $t=0$  par  $1 \times 10^7$  bactéries

sans bactériophages

avec bactériophages

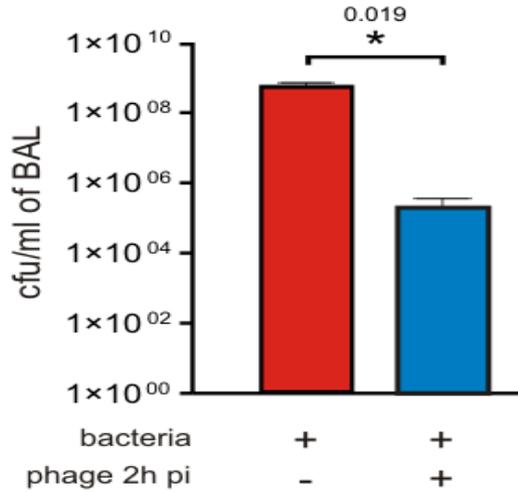
Traitement à 2H  
avec PBS

Traitement à 2H avec  
 $1 \times 10^8$  bactériophages

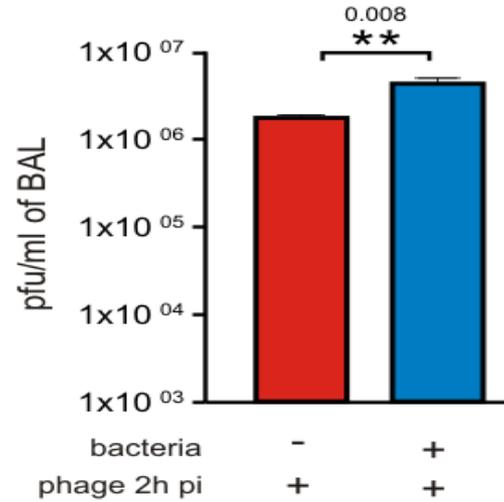


# Contenu des poumons à 20h post-infection

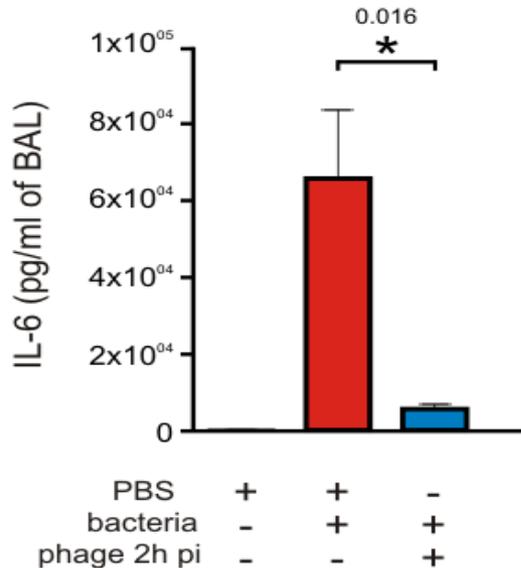
**Bacteria**



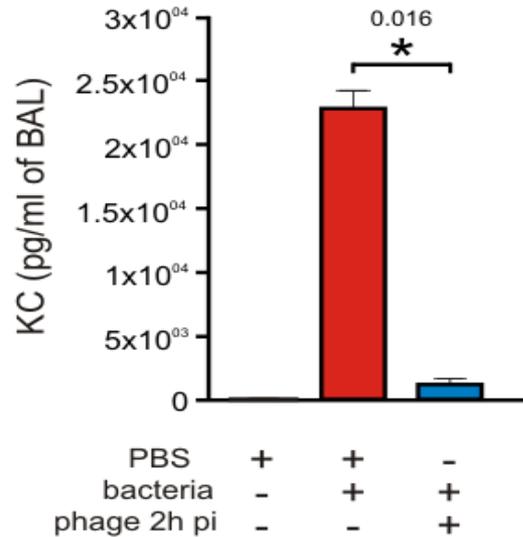
**Bacteriophages**



**IL-6**



**KC**



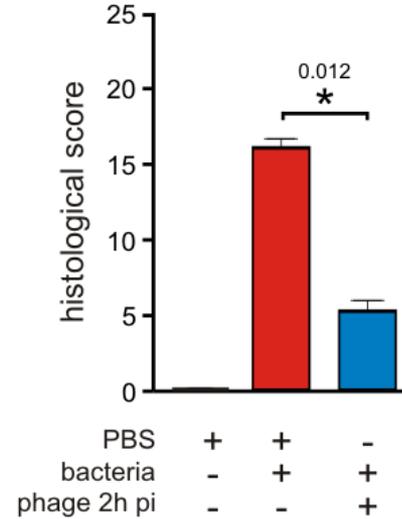
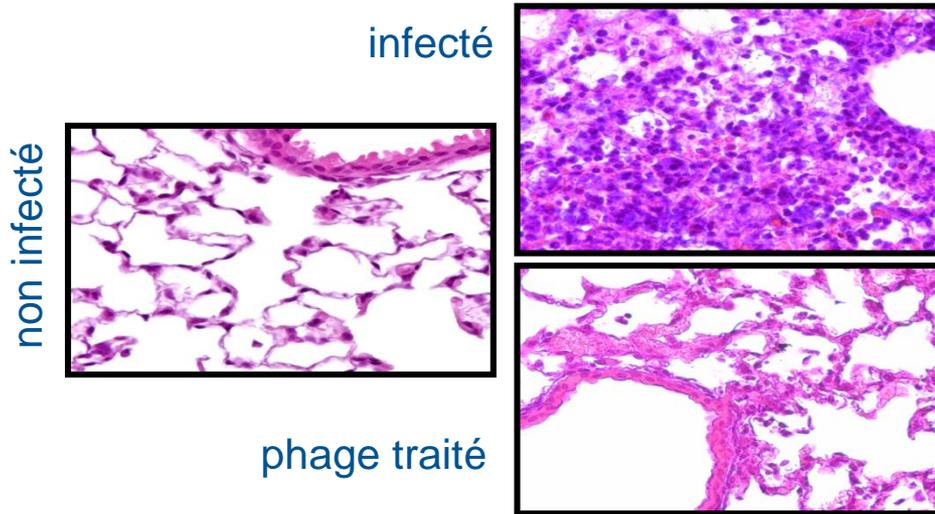
**Bactéries** ↘

**Bactériophages** ↗

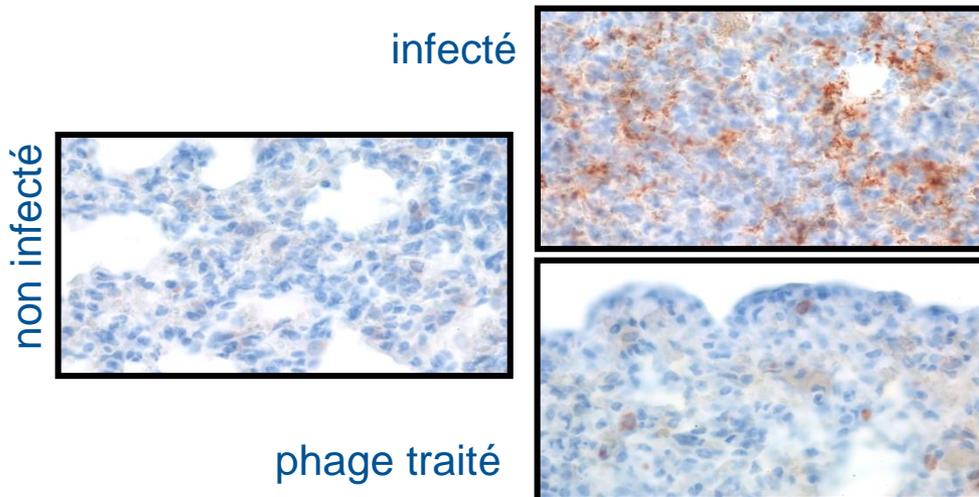
**Inflammation** ↘

**Survie** ↗

# Analyses histologiques et immuno-histochimiques



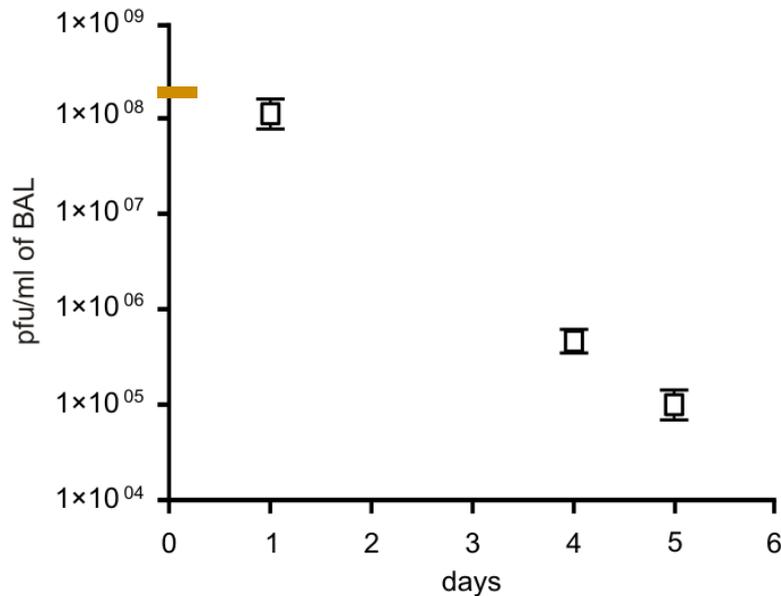
PMNs,  
Lymphocytes,  
Infiltration,  
Alvéolite,  
Brochite,  
Nécrose



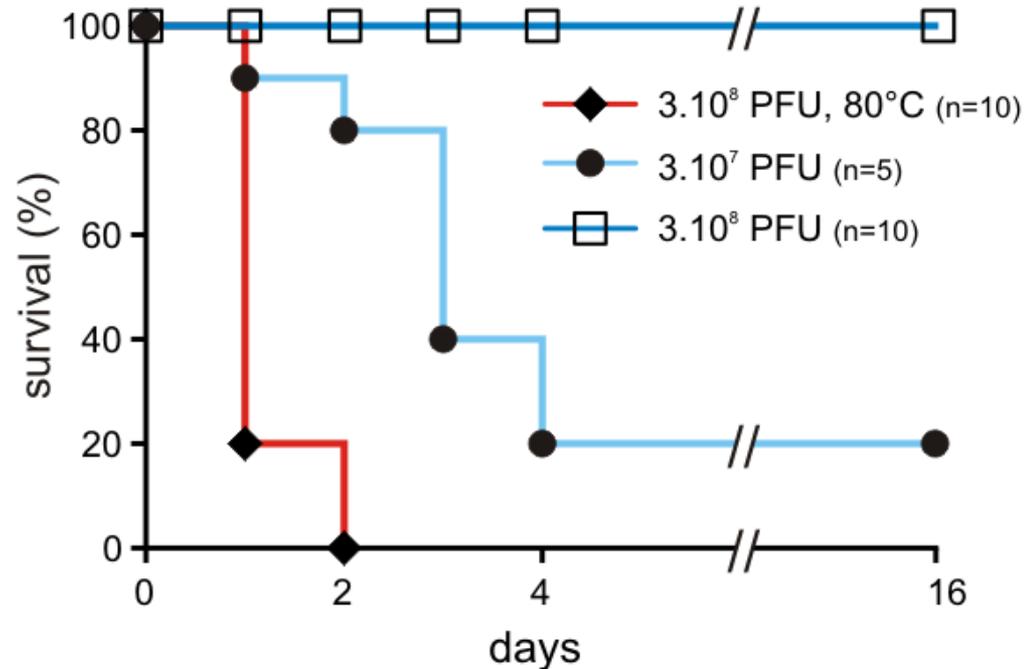
anticorps *P. aeruginosa*

Disparition des bactéries  
dans les échantillons traités  
par les bactériophages

# Action préventive des bactériophages ?

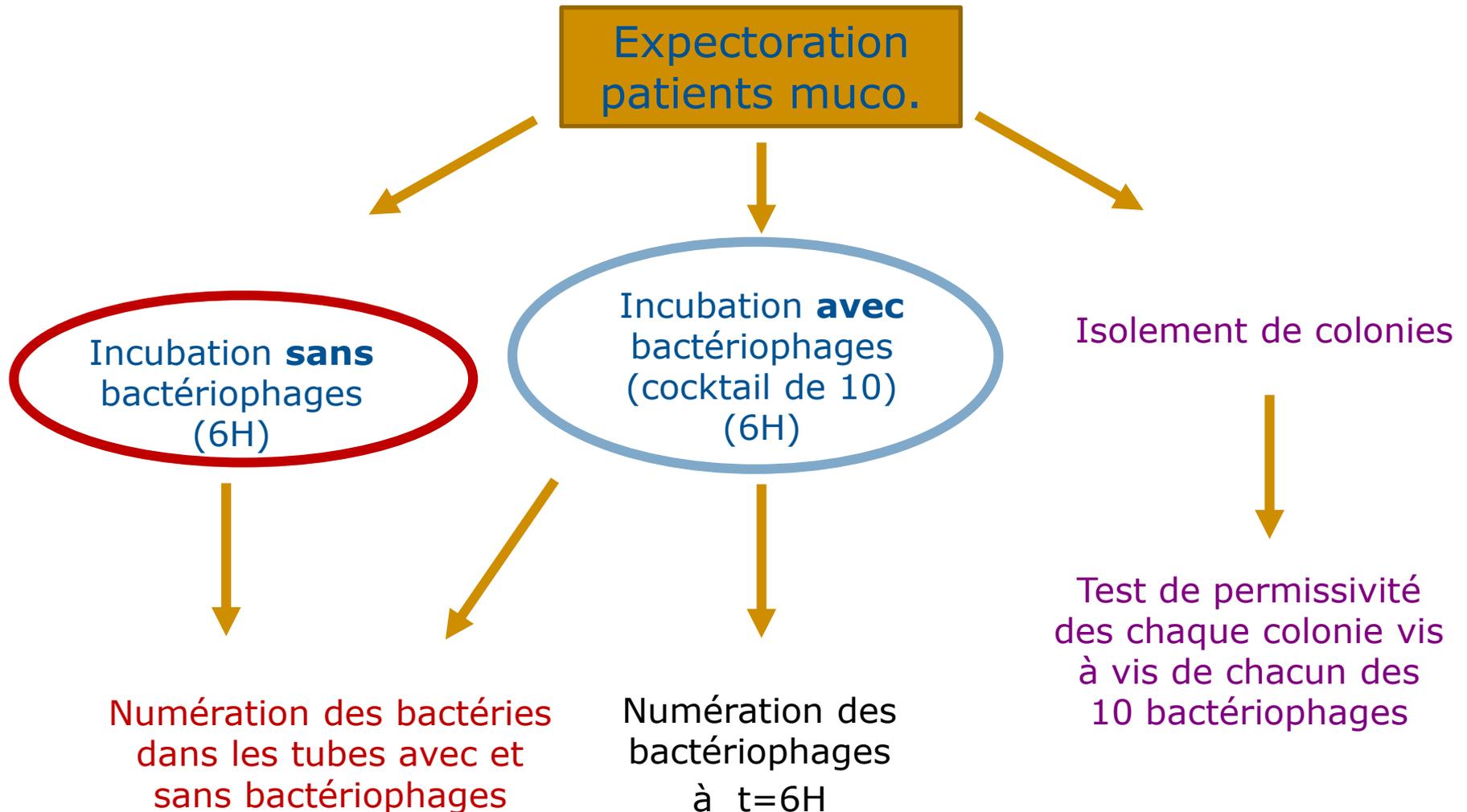


½ vie des bactériophages  
dans les poumons



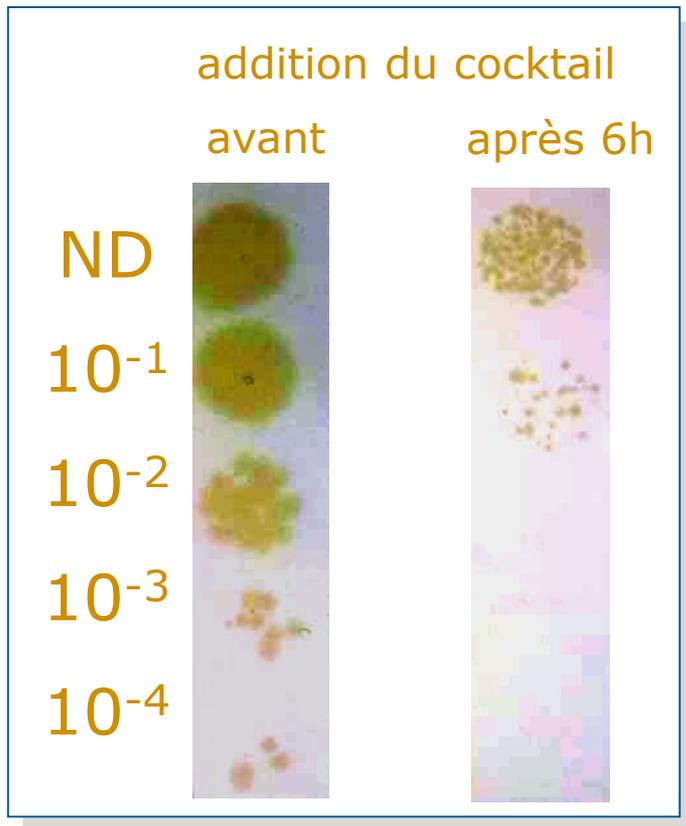
Pré-traitement de 4 jours  
conduit à la protection totale

# Efficacité des bactériophages dans les expectorations

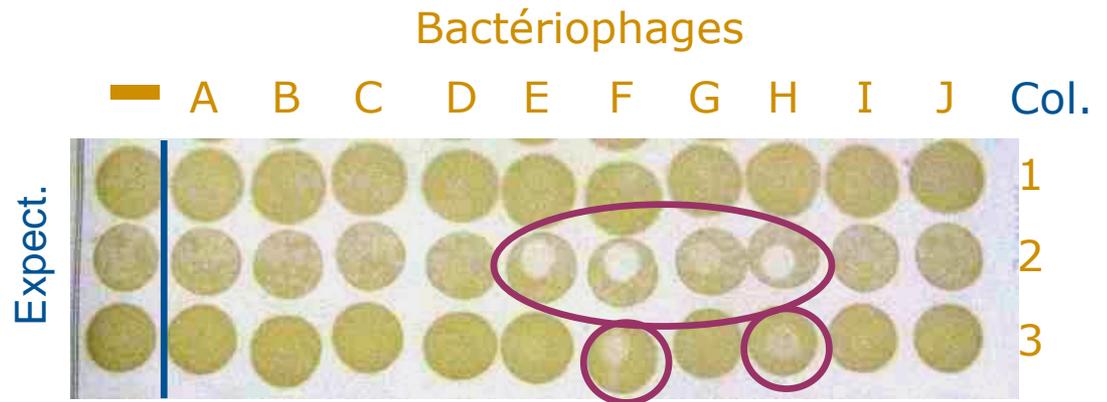


# Efficacité des bactériophages dans les expectorations

- Numération bactérienne



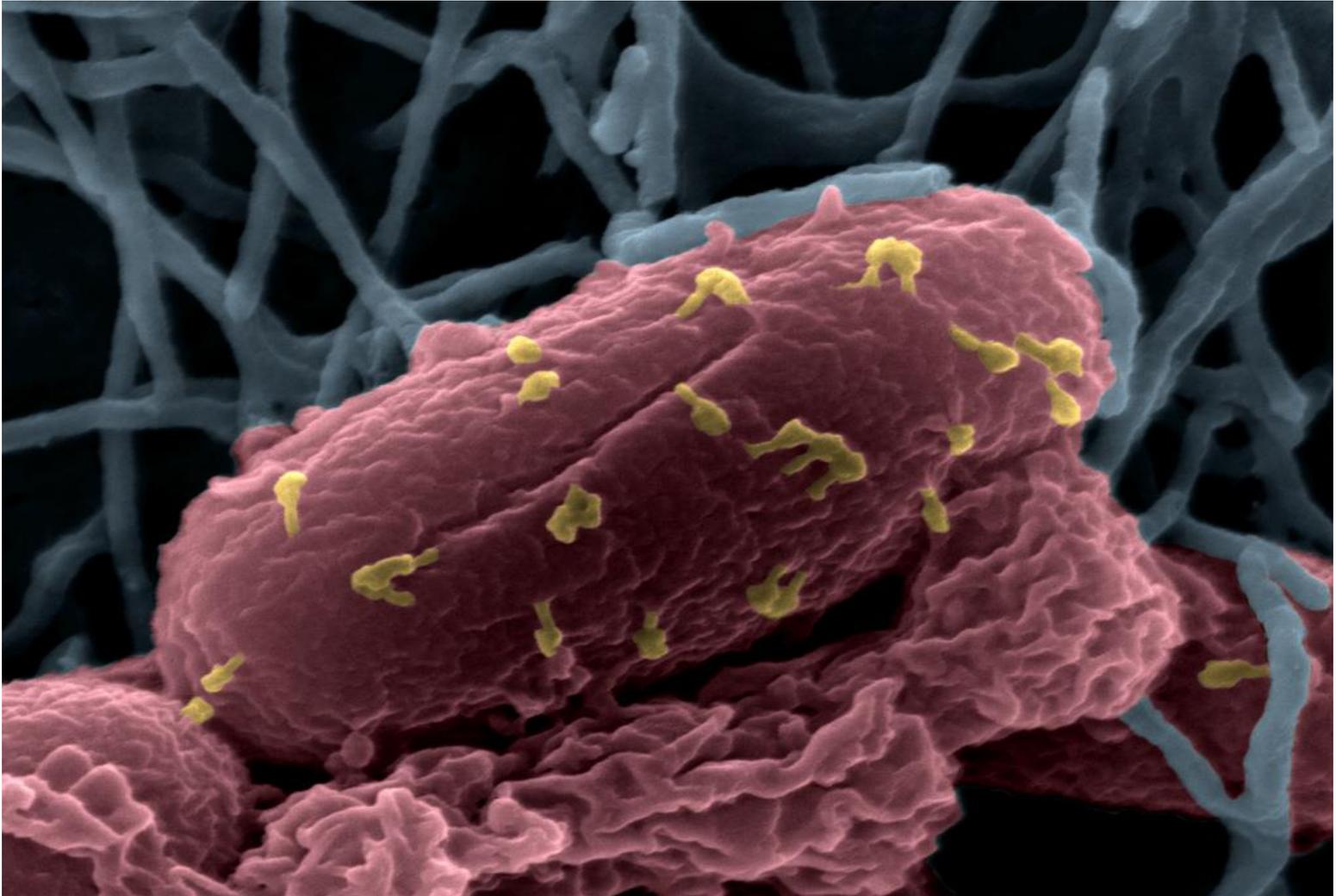
- Test de permissivité (>8.000 tests)



# Le tractus digestif, un environnement complexe et...



... très riche en bactériophages !



# MICI: un contexte favorable pour les bactériophages ?

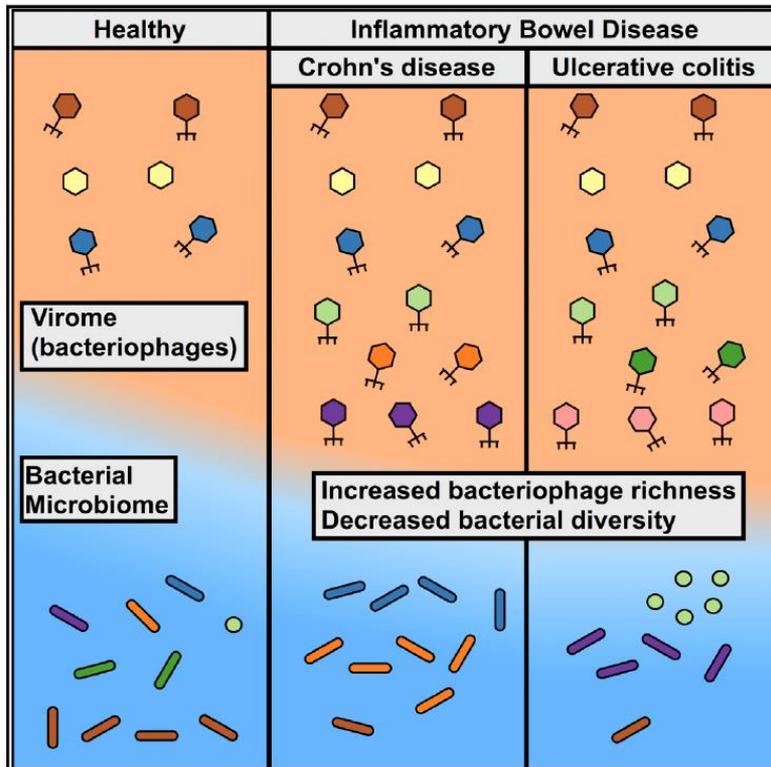
Cell

Norman et al., 2015, Cell 160, 447–460  
January 29, 2015 ©2015 Elsevier Inc.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.002>

Article

## Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease

### Graphical Abstract



### Authors

Jason M. Norman, Scott A. Handley, ...,  
Miles Parkes, Herbert W. Virgin

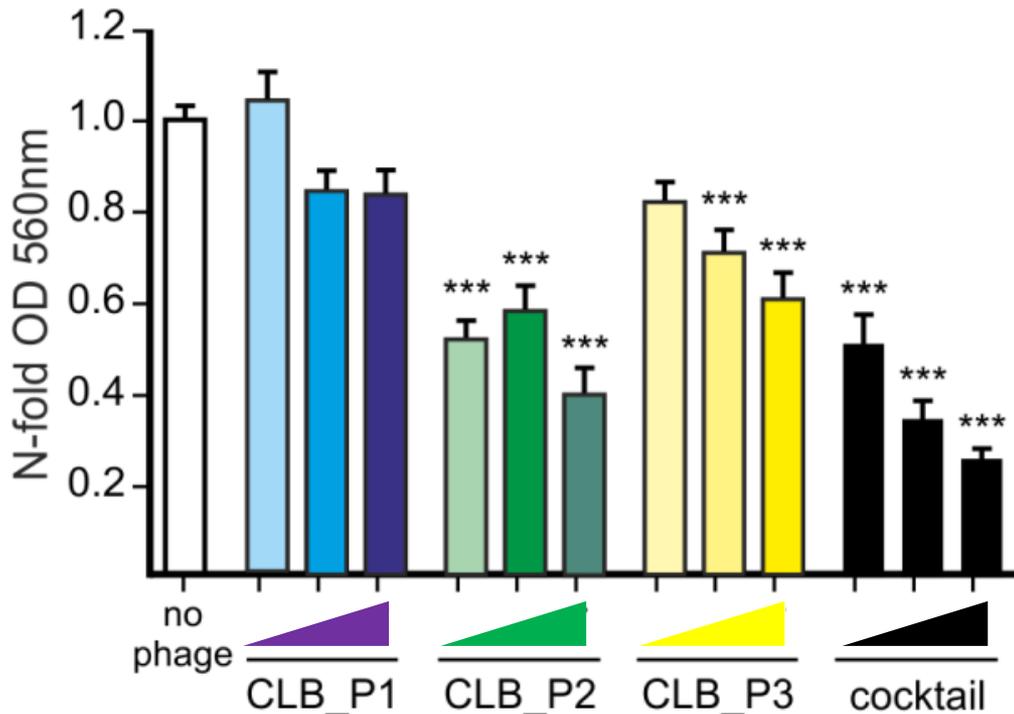
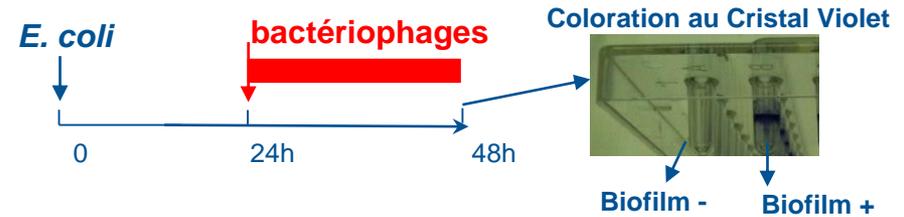
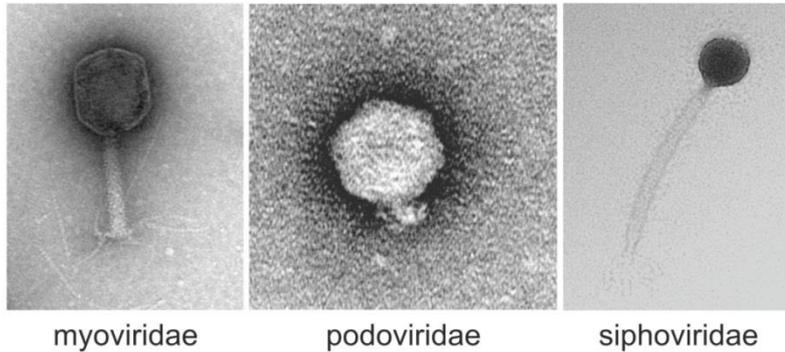
### Correspondence

virgin@wustl.edu

### In Brief

The enteric virome is abnormal in multiple cohorts of inflammatory bowel disease patients, exhibiting disease-specific features that are not explained by changes in bacterial diversity and richness.

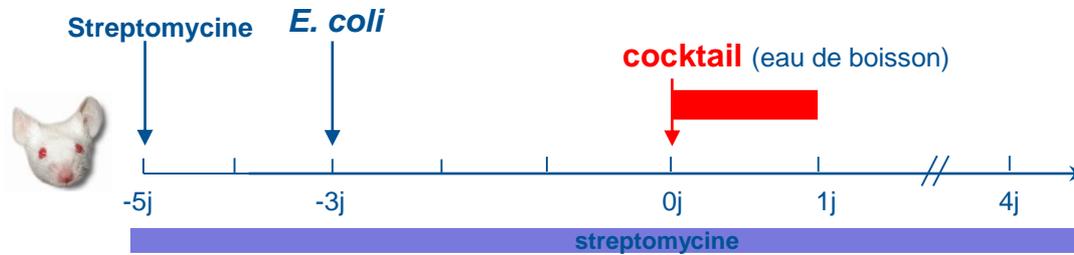
# Biofilm d'*E. coli* EAEC réduit par des bactériophages



Le cocktail est actif de manière dose-dépendante

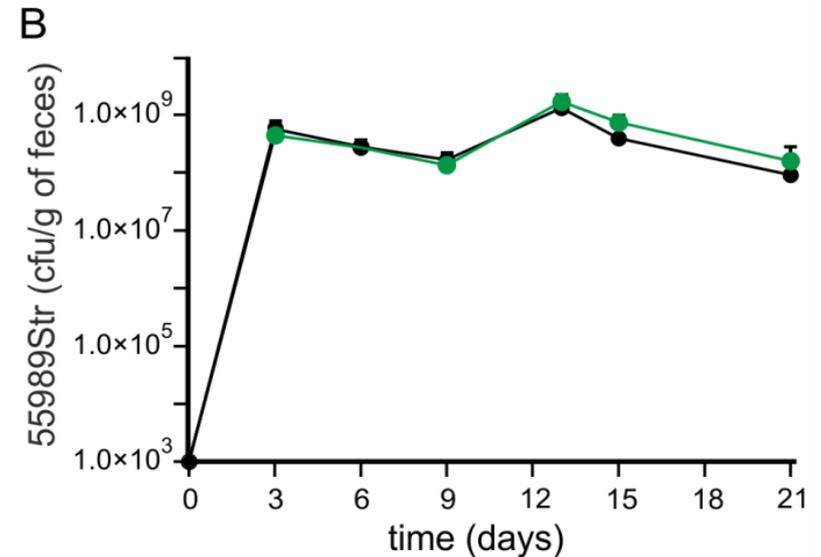
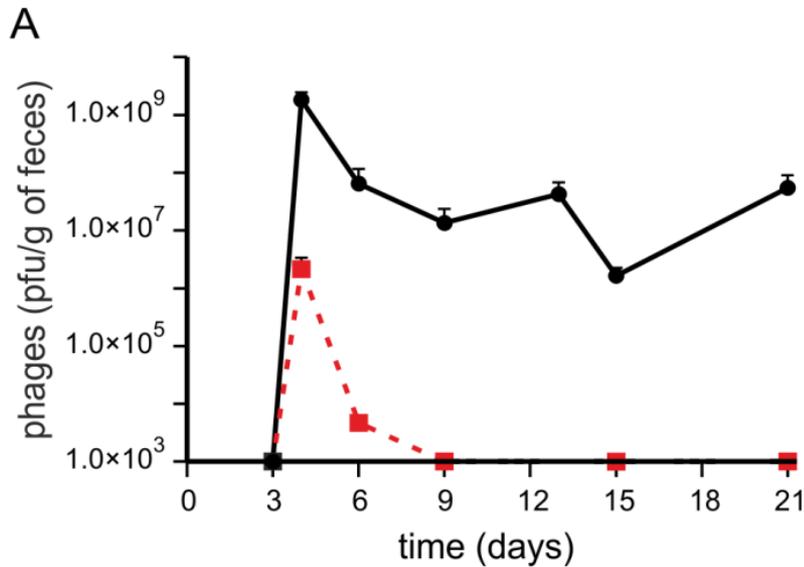
Le cocktail présente un effet synergique

# Impact des bactériophages *in vivo*



**Rouge, souris non colonisées par *E. coli***

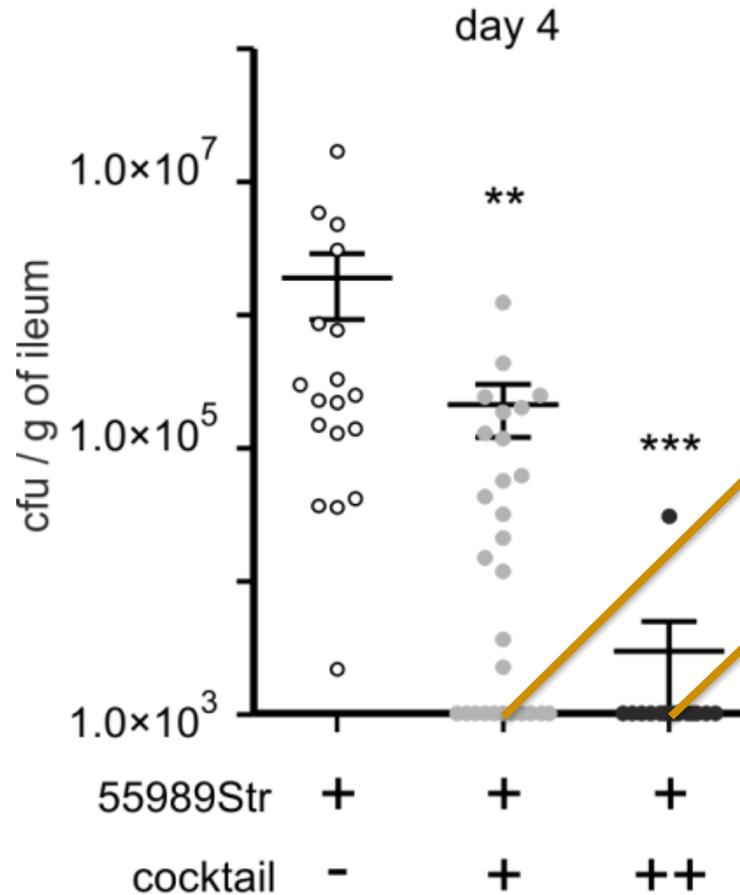
**Vert, souris sans bactériophages**



Multiplication des phages *in vivo* uniquement lorsque la souche *E. coli* est présente

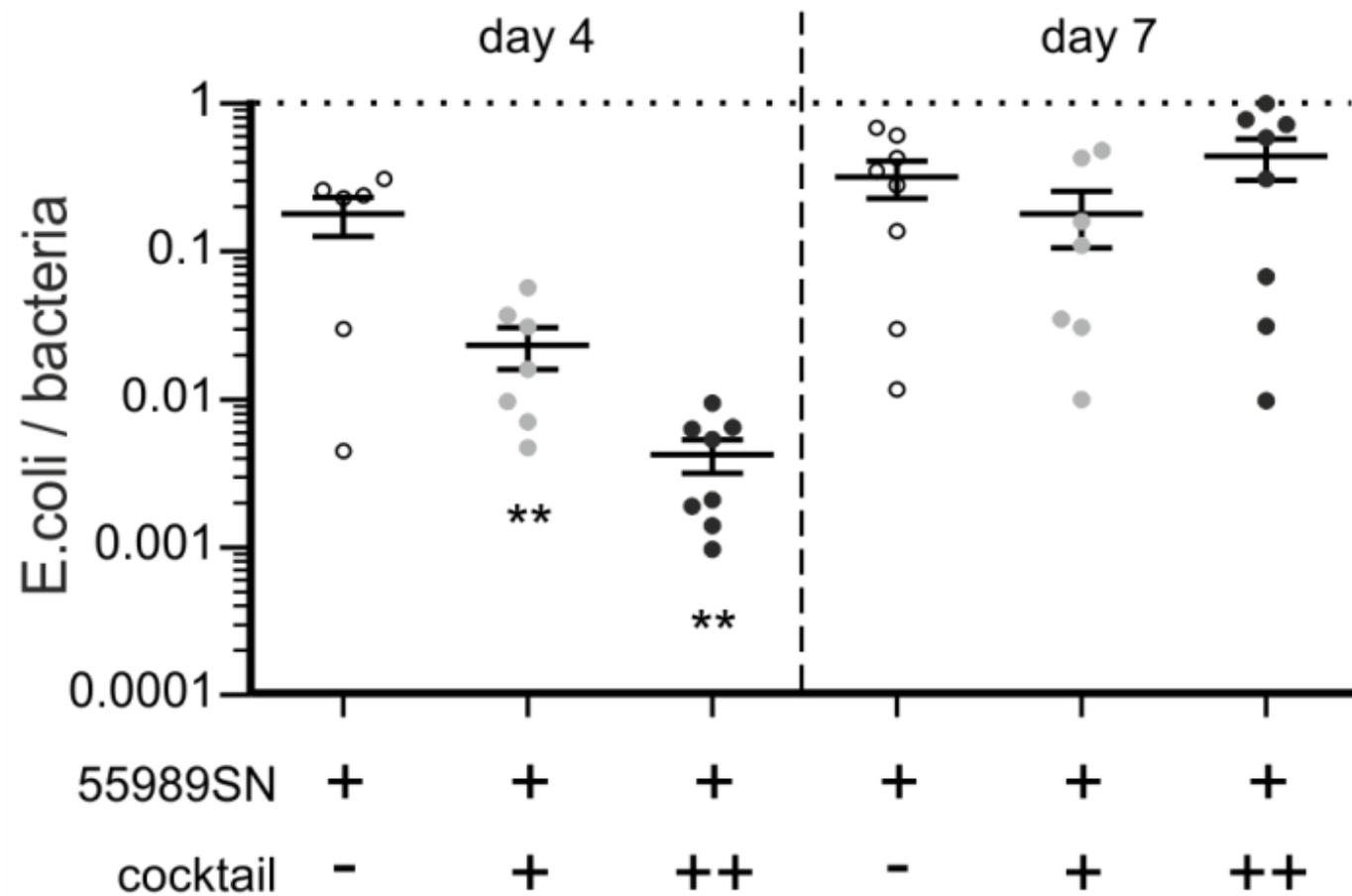
La quantité de bactéries *E. coli* reste stable malgré la présence de phages

# Effet des bactériophages sur la colonisation iléale



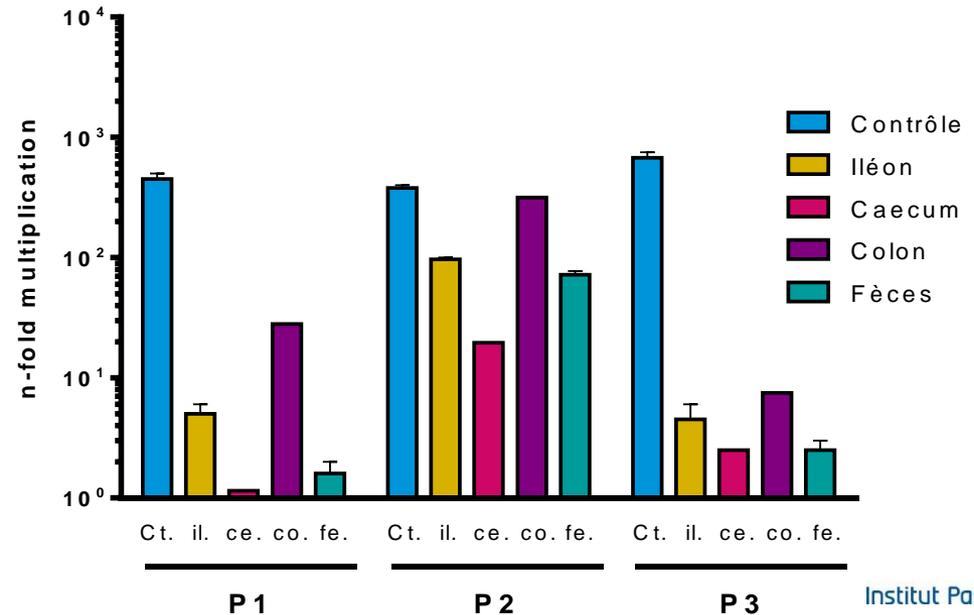
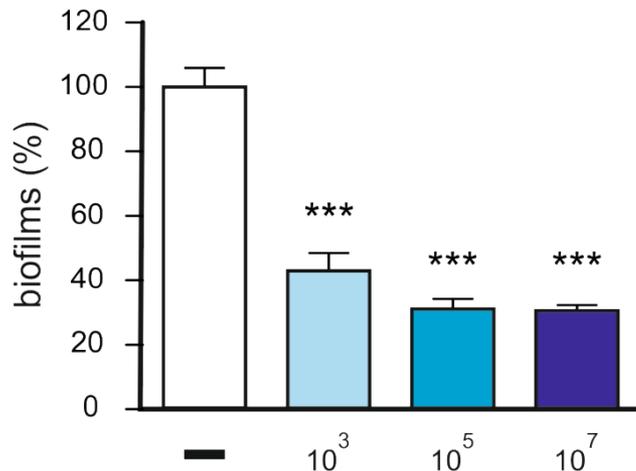
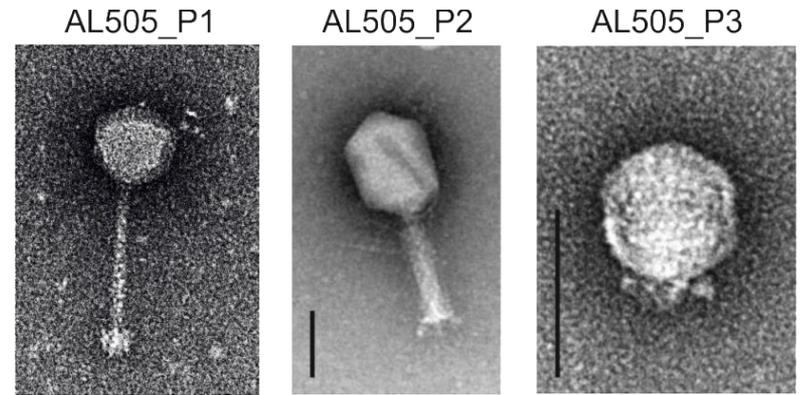
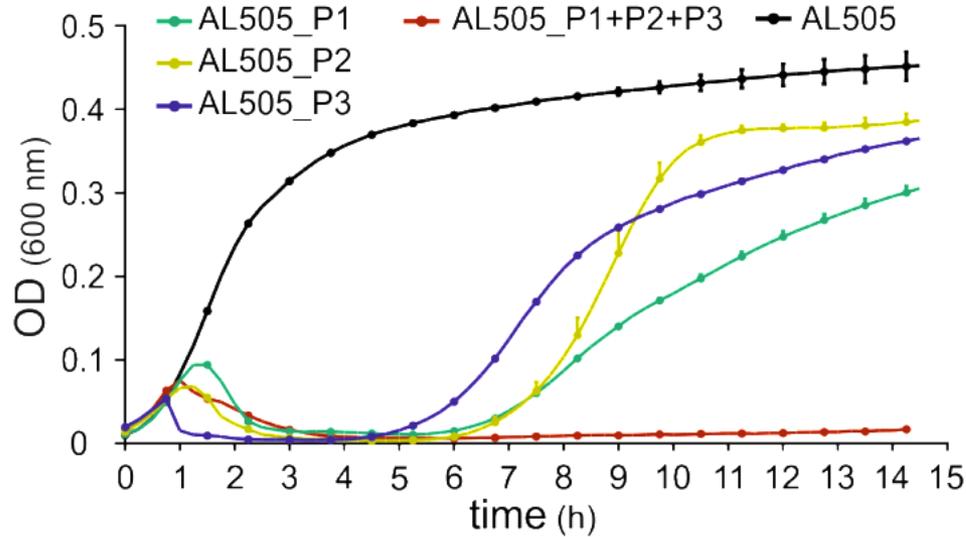
Effet dose-dépendant ... mais temporaire

# « Correction » moléculaire

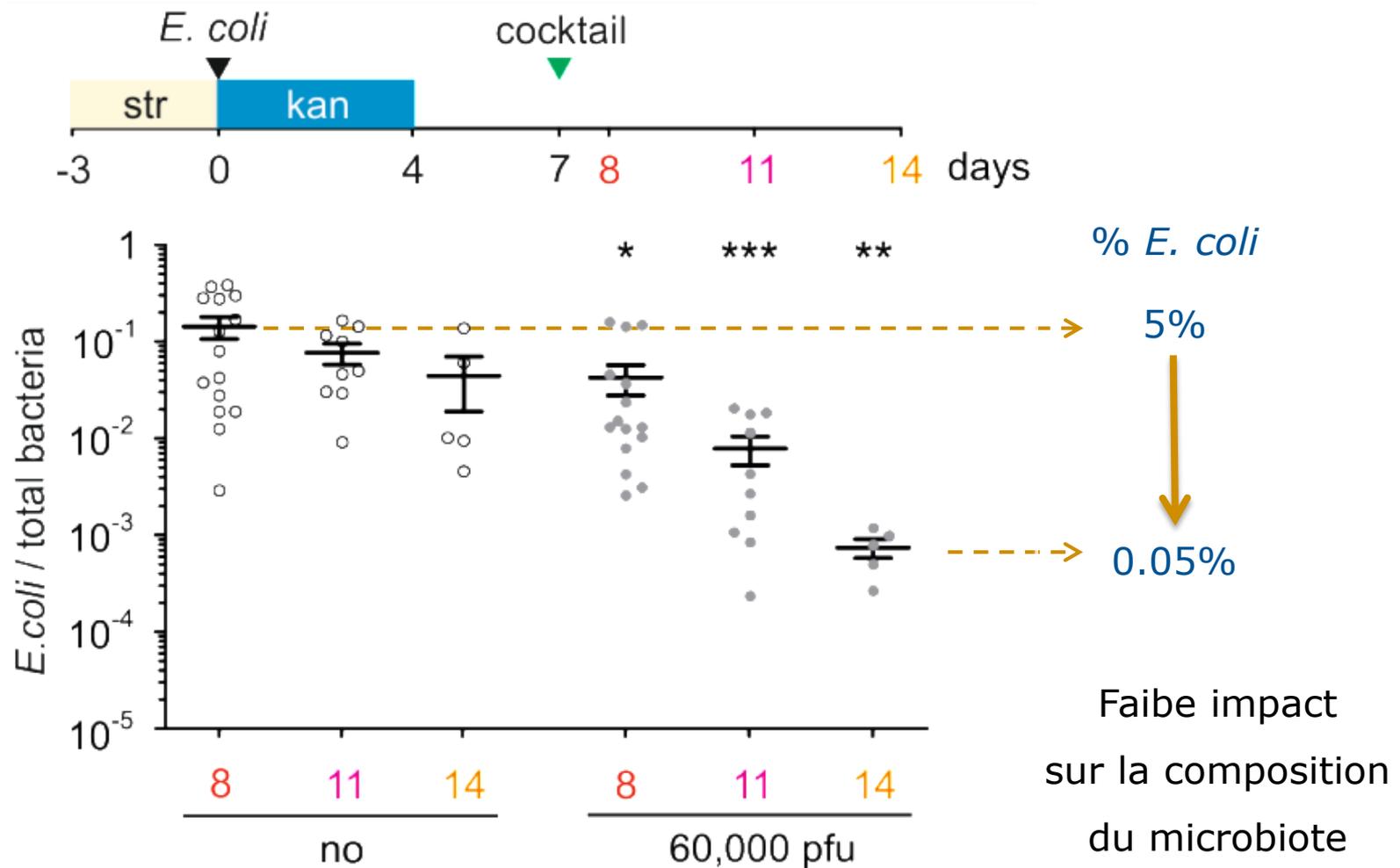


Effet dose-dépendant et temporaire confirmés

# Souche *E. coli* UPEC et ses bactériophages



# Réduction durable du niveau de colonisation



# Conclusions et Perspectives

## Les bactériophages virulents

tuent les bactéries

fonctionnent dans des environnements complexes

sont adaptables

sont indépendants de la résistance aux antibiotiques

sont peu ou pas immuno-stimulants

**MAIS NE SONT PAS UNE MAGIC BULLET !**

## Un domaine en plein renouveau

**2006:** la FDA autorise l'utilisation en agroalimentaire

**2009:** publication du premier essai Phase II chez l'homme (otites)

**2010-2014:** essai clinique sur diarrhées au Bangladesh (pas concluant)

**2013:** 1<sup>er</sup> essai clinique financé par l'UE ([www.phagoburn.eu](http://www.phagoburn.eu))

**2014:** 1<sup>er</sup> essai vétérinaire financé par l'UE (AntibioPhage)

**2016:** l'ANSM autorise des ATUs

# Interactions Bactériophages Bactéries chez l'Animal

## **Membres de l'équipe**

Anne CHEVALLEREAU (PhD)

Nicolas DUFOUR (MD-PhD, Post-doc)

Marta MANSOS LOURENÇO (PhD)

Luisa De SORDI (Post-doc)

Dwayne ROACH (Post-doc)

## **Collaborateurs:**

Lhousseine Touqui (I. Pasteur)

Rob Lavigne (K.U. Leuven)

Angus Buckling (Univ. Exeter)

James Di Santo (I. Pasteur)

Spencer Shorte (I. Pasteur)

Isabelle Sermet-Gaudelus (H. Necker)

Jean-Damien Ricard (H. L. Mourier)

Raphaël Chiron (H. Montpellier)

Stephen Lory (Harvard Medical School)

Marie-Agnès Petit (INRA)

Guy Schoehn (IBS Grenoble)

Nicolas Barnich (Univ. Auvergne)

Pierre Desreumaux (Univ. Lille)

Erick Denamur (INSERM, Bichat)



[www.p-h-a-g-e.org](http://www.p-h-a-g-e.org)

[www.pasteur.fr/recherche/phages](http://www.pasteur.fr/recherche/phages)