

## Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 24 mars 2020

Par Flora Guillaume

Née le 2 décembre 1993 à Bourges

# La phagothérapie : une thérapeutique d'espoir face à l'antibiorésistance ?

Thèse dirigée par Mme le Professeur Sylvie ROGEZ

Examineurs :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ, Professeur des Universités  
M. David LEGER, Maître de conférences des Universités  
M. Jean-Michel PENNETIER, Docteur en Pharmacie

Présidente du Jury  
Juge  
Juge





## Faculté de Pharmacie

Année 2020

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 24 mars 2020

Par Flora Guillaume

Née le 2 décembre 1993 à Bourges

# La phagothérapie : une thérapeutique d'espoir face à l'antibiorésistance ?

Thèse dirigée par Mme le Professeur Sylvie ROGEZ

Examineurs :

Mme le Professeur Sylvie ROGEZ, Professeur des Universités  
M. David LEGER, Maître de conférences des Universités  
M. Jean-Michel PENNETIER, Docteur en Pharmacie

Présidente du Jury  
Juge  
Juge

## Liste des enseignants

---

Le 1<sup>er</sup> septembre 2019

### **PROFESSEURS :**

<b>BATTU</b> Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
<b>CARDOT</b> Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>DESMOULIERE</b> Alexis	PHYSIOLOGIE
<b>DUROUX</b> Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>FAGNERE</b> Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
<b>LIAGRE</b> Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>MAMBU</b> Lengo	PHARMACOGNOSIE
<b>ROUSSEAU</b> Annick	BIOSTATISTIQUE
<b>TROUILLAS</b> Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
<b>VIANA</b> Marylène	PHARMACOTECHNIE

### **PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

<b>PICARD</b> Nicolas	PHARMACOLOGIE
<b>ROGEZ</b> Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
<b>SAINT-MARCOUX</b> Franck	TOXICOLOGIE

### **ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :**

<b>CHAUZEIX</b> Jasmine	HÉMATOLOGIE (du 01.11.2018 au 31.10.2019)
<b>JOST</b> Jérémy	PHARMACIE CLINIQUE (du 01.11.2018 au 31.10.2019)

## **MAITRES DE CONFERENCES :**

<b>BASLY</b> Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>BEAUBRUN-GIRY</b> Karine	PHARMACOTECHNIE
<b>BÉGAUD</b> Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTRÔLE DU MÉDICAMENT
<b>BILLET</b> Fabrice	PHYSIOLOGIE
<b>CALLISTE</b> Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
<b>CLÉDAT</b> Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
<b>COMBY</b> Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>COURTIOUX</b> Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
<b>DELEBASSÉE</b> Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
<b>DEMIOT</b> Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
<b>FABRE</b> Gabin	SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUES ET INGÉNIERIE APPLIQUÉE
<b>FROISSARD</b> Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>JAMBUT</b> Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
<b>LABROUSSE</b> Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE
<b>LAVERDET-POUCH</b> Betty	PHARMACIE GALÉNIQUE
<b>LEGER</b> David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MARION-THORE</b> Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE (jusqu'au 31.01.2019)
<b>MARRE-FOURNIER</b> Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE
<b>MERCIER</b> Aurélien	PARASITOLOGIE
<b>MILLOT</b> Marion	PHARMACOGNOSIE
<b>MOREAU</b> Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

**PASCAUD-MATHIEU** Patricia

PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATÉRIAUX  
CERAMIQUES

**POUGET** Christelle

CHIMIE ORGANIQUE ET THÉRAPEUTIQUE

**VIGNOLES** Philippe

BIOPHYSIQUE, BIOMATHÉMATIQUES ET  
INFORMATIQUE

**ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :**

**BOUDOT** Clotilde

MICROBIOLOGIE  
(du 01/09/2018 au 31/08/2020)

**MARCHAND** Guillaume

(du 01/09/2019 au 31/08/2020)

**PROFESSEURS EMERITES :**

**DREYFUSS** Gilles (jusqu'au 31/03/2020)

## Remerciements

---

Mme le Professeur Sylvie Rogez, j'aimerais tout d'abord vous exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté de diriger cette thèse. Je souhaiterais également vous remercier de me faire l'honneur de présider ce jury et vous témoigner mon plus grand respect pour la qualité de votre enseignement tout au long de mes années d'études. Cela a renforcé l'intérêt et la curiosité que j'avais pour votre matière, m'amenant à choisir ce sujet de thèse, en lien avec la bactériologie et la virologie.

Monsieur David Léger, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de faire partie de ce jury et vous remercie de votre présence.

Monsieur Jean-Michel Pennetier, je vous remercie chaleureusement d'avoir pu m'accorder du temps et d'avoir accepté de prendre part à ce jury.

J'ai également une pensée particulière pour Mme Maguy Paul-Hazard, Mme Christelle Brunet et Mme Catherine Jandeaux qui m'ont accueilli au sein de leurs équipes tout au long de mes années d'études. Un grand merci pour votre accueil et votre investissement dans ma formation. Tous vos conseils m'accompagnent au quotidien.

J'aimerais ensuite remercier ma famille et ma belle-famille pour l'amour et le soutien qu'elles m'ont apporté tout au long de l'élaboration de cette thèse.

À mes parents, plus particulièrement, merci pour votre amour, votre confiance inaltérable et votre soutien indéfectible. Il y a quelques années, je n'aurais jamais imaginé faire un tel parcours. Vous m'avez poussé à croire en moi et à surmonter toutes les difficultés qui ont pu se dresser sur mon chemin. Depuis ma première année et jusqu'à cet aboutissement, vous avez été là au quotidien. Je vous dédie cette thèse.

À mes grands-parents, merci pour votre soutien au fil de toutes ces années. Quel plaisir de partager ce moment avec vous aujourd'hui !

Yoan, cette année aura été spéciale pour nous deux... Merci d'être présent chaque jour à mes côtés, merci pour ta confiance en moi, ton soutien et ton aide technique dans mes innombrables recherches d'articles et problèmes informatiques !

Aude, merci d'avoir partagé toutes ces années à mes côtés et de les avoir rendues parfois moins difficiles... Je nous revois encore dans le bus, et nous voilà aujourd'hui toutes les deux diplômées ! Merci pour ton soutien et tous tes précieux conseils.

Mes amis, on dit souvent que les années étudiantes sont les plus belles... Même si tout n'a pas toujours été rose, je suis heureuse d'avoir vécu chaque jour de cette aventure à vos côtés. Je vous souhaite un avenir professionnel et personnel radieux !

*« Le vrai mystère du monde est le visible, non l'invisible. » Oscar Wilde.*

## Droits d'auteurs

---

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>





## Table des matières

---

<b>Introduction .....</b>	<b>16</b>
<b>Partie I : Des bactériophages à la phagothérapie au 20<sup>e</sup> siècle.....</b>	<b>17</b>
1. Les bactériophages, de leur état naturel à la découverte de leur utilité thérapeutique .....	18
1.1) Généralités sur les bactériophages.....	18
1.1.1) Définition.....	18
1.1.2) Morphologie .....	18
1.1.3) Classification .....	20
1.1.4) Virulence et cycles phagiques .....	23
a) Cycle lytique .....	23
b) Cycle lysogène .....	24
c) Autres types de cycles .....	25
1.1.5) Les bactériophages à l'état naturel .....	26
a) Habitat naturel des phages.....	26
b) Rôle des phages dans la nature .....	27
1.1.6) Rôle des bactériophages dans la biologie moléculaire et les nouvelles technologies	28
1.2) Histoire de la découverte des bactériophages.....	29
1.3) Propriétés thérapeutiques.....	32
1.3.1) Spécificité des bactériophages.....	32
1.3.2) Autres propriétés des bactériophages .....	33
2. Traiter les infections grâce aux virus, naissance et déclin de la phagothérapie.....	33
2.1) Histoire de la phagothérapie .....	33
2.2) Principe de la phagothérapie .....	36
2.3) Indications et espèces sensibles.....	36
2.4) Avantages et inconvénients des phages et de la phagothérapie.....	37
2.4.1) Avantages des bactériophages .....	37
2.4.2) Inconvénients des phages et limites de la phagothérapie .....	38
3. L'antibiorésistance, un enjeu de santé publique mondiale .....	39
3.1) Définition et état des lieux.....	39
3.2) Mécanismes de résistance des bactéries .....	40
3.2.1) Résistances aux antibiotiques .....	40
3.2.2) Résistances aux bactériophages.....	40
3.3) Comparaison entre antibiotiques et bactériophages .....	41
<b>Partie II : La phagothérapie actuelle en pratique et son avenir.....</b>	<b>44</b>
1. Modalités d'utilisation des bactériophages en thérapeutique .....	45
1.1) Préparation des suspensions thérapeutiques en laboratoire .....	45
1.1.1) Propagation.....	45
1.1.2) Purification .....	45
1.1.3) Numération ou titrage.....	46
1.1.4) Contrôles .....	46
1.2) Précautions à prendre avant toute thérapie phagique .....	46
1.3) Facteurs influençant la phagothérapie .....	47
1.3.1) MOI ou ratio bactériophages / bactéries.....	47
1.3.2) Conditions environnementales .....	47
1.3.3) Dose et moment du traitement.....	48
1.3.4) Accessibilité des phages .....	48

1.3.5) Autres facteurs.....	48
a) Spécificité .....	48
b) Neutralisation.....	48
c) Résistance.....	49
d) Voie d'administration.....	49
1.4) Voies d'administration .....	50
1.5) Stratégies thérapeutiques .....	51
2. Réglementation, législation et utilisation des bactériophages.....	52
2.1) Statut actuel des bactériophages.....	52
2.2) Situation et utilisation actuelle de la phagothérapie .....	53
2.3) Problématiques concernant la légalisation .....	54
2.4) Pistes et statuts envisagés pour une future légalisation .....	55
3. Autres utilisations des bactériophages et applications futures .....	57
3.1) Phagoprophylaxie.....	57
3.2) Utilisation non-médicale des bactériophages .....	57
3.2.1) Usage vétérinaire.....	57
3.2.2) Utilisation dans l'industrie agro-alimentaire .....	58
3.2.3) Utilisation en agriculture .....	58
3.3) Potentialités futures des bactériophages .....	59
<b>Partie III : Analyse d'études et projets de recherche en cours.....</b>	<b>61</b>
1. Développement d'un médicament et études cliniques.....	62
1.1) Les étapes de développement d'un médicament .....	62
1.2) Les études cliniques.....	63
2. Traitement expérimental d'infection pulmonaire à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> chez les souris par un bactériophage.....	64
2.1) Objectif de l'étude .....	64
2.2) Contexte et mise en place de l'expérience.....	64
2.3) Analyse des résultats .....	65
2.4) Conclusion.....	68
3. Analyse d'un essai clinique contrôlé sur une préparation thérapeutique de bactériophages dans le traitement de l'otite chronique due à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistant aux antibiotiques .....	69
3.1) Objectif de l'étude .....	69
3.2) Contexte et mise en place de l'essai clinique .....	69
3.3) Analyse des résultats .....	70
3.4) Conclusion.....	72
4. Analyse de l'essai clinique PhagoBurn : efficacité et tolérance d'un cocktail de bactériophages à soigner les brûlures infectées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	73
4.1) Objectif de l'étude .....	73
4.2) Contexte et mise en place de l'essai clinique .....	73
4.3) Analyse des résultats .....	75
4.4) Conclusion.....	77
5. Projets de recherche sur la phagothérapie au stade préclinique .....	78
5.1) Le projet PHOSA .....	78
5.2) Le projet PneumoPhage.....	78
5.3) Le projet PhagUTI.....	79
<b>Conclusion.....</b>	<b>80</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>82</b>

<b>Annexes .....</b>	<b>87</b>
<b>Serment De Galien.....</b>	<b>98</b>

## Table des illustrations

---

Figure 1 : morphologies des bactériophages .....	19
Figure 2 : représentation schématique d'un bactériophage à symétrie binaire (ordre des <i>Caudovirales</i> ) .....	19
Figure 3 : micrographie électronique de bactériophages attachés à une cellule bactérienne (les virus ont la taille et la forme du coliphage T1).....	20
Figure 4 : cycles lytique et lysogénique des bactériophages .....	24
Figure 5 : cycles chronique et pseudolysogénique des bactériophages (7) .....	26
Figure 6 : comparaison de l'évolution du nombre de cas de choléra et des populations bactériennes (A) et phagiques (B) (15).....	28
Figure 7 : plages de lyse à la surface de boîtes de Pétri sur une culture de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	30
Figure 8 : articles consacrés aux bactériophages et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011 (11) .....	35
Figure 9 : précautions à prendre avant une phagothérapie. ....	47
Figure 10 : schéma récapitulatif des facteurs influençant l'efficacité de la phagothérapie. ....	49
Figure 11 : étapes de fabrication des phages thérapeutiques selon les stratégies « prêt-à-porter » et « sur mesure » (32).....	52
Figure 12 : les grandes étapes du développement d'un médicament .....	63
Figure 13 : images de luminescence de souris infectées par <i>P. aeruginosa</i> traitées par PBS (à gauche) ou par phage (à droite) en fonction du temps (49) .....	66
Figure 14 : taux des marqueurs inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$ 24 heures après infection par <i>P. aeruginosa</i> chez les différents groupes de souris (49) .....	67
Figure 15 : évolution dans le temps de la lumière émise par les souris traitées par PBS (barres blanches) ou par le phage PAK-P1 (barres noires) après infection par <i>P. aeruginosa</i> (49).....	68
Figure 16 : moyennes des scores EVA rapportés par les patients pour chaque jour de clinique (51)...	71
Figure 17 : moyennes des scores EVA rapportés par les médecins pour chaque jour de clinique (51)	71
Figure 18 : moyennes (a) et médianes (b) des numérations de <i>P. aeruginosa</i> pour chaque jour de clinique (51) .....	72
Figure 19 : représentation schématique de la méthode des quatre quadrants utilisée pour définir le critère principal d'évaluation dans l'étude PhagoBurn .....	75
Figure 20 : exemple, après incubation et sur plusieurs jours, de résultats de la détermination semi-quantitative du nombre de colonies de <i>P. aeruginosa</i> après prélèvement sur une brûlure infectée .....	75

## Table des tableaux

---

Tableau 1 : classification des bactériophages.....	21
Tableau 2 : comparaison des caractéristiques des antibiotiques et de la phagothérapie. ....	43

## Liste des abréviations

---

ADN : Acide désoxynucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMM : Association Médicale Mondiale

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé

ARN : Acide ribonucléique

ATB : Antibiotique

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

BMR : Bactéries multi-résistantes

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

CRISP : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (groupement d'éléments palindromiques courts répétés et régulièrement espacés)

CSP : Code de la Santé Publique

CSST : Comité Scientifique Spécialisé Temporaire

*E. coli* : *Escherichia coli*

EMA : European Medicines Agency (Agence européenne des médicaments)

EPA : (United States) Environmental Protection Agency (Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis)

EVA : Echelle Visuelle Analogique

FDA : Food and Drug Administration (Agence des produits alimentaires et médicamenteux des Etats-Unis)

ICH : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (Conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain)

ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité international de taxonomie des virus)

IL-6 : Interleukine 6

INSERM : Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale

LPS : LipoPolySaccharide

MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin

MOI : Multiplicity Of Infection (multiplicité d'infection)

MTI : Médicament de Thérapie Innovante

MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAS : Phage – Antibiotic Synergy (synergie phage – antibiotique)

PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate salin)

PFU : Plages Formant Unité

*P. aeruginosa* : *Pseudomonas aeruginosa*

*S. aureus* : *Staphylococcus aureus*

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline

Système CRISP-Cas : système de CRISP associé aux protéines

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ )

UMR : Unité Mixte de Recherche

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## Introduction

---

Découverte il y a plus de cent ans en France, la phagothérapie consiste à utiliser des bactériophages, aussi appelés phages, pour traiter ou prévenir de multiples infections bactériennes. Les phages sont des virus de bactéries qui infectent uniquement et spécifiquement leurs bactéries hôtes. La phagothérapie constituait, avant l'ère des antibiotiques, le premier traitement antibactérien spécifique mondial.

Les bactériophages sont présents en très grand nombre partout sur la planète depuis des milliers d'années et sont d'une grande diversité, chaque phage étant spécifique d'une espèce bactérienne. On en trouve dans le sol, les eaux, à la surface de notre peau et même dans notre corps. Utilisés depuis de nombreuses années en biologie moléculaire, les phages ont permis de nombreuses avancées scientifiques. Cependant, on découvre aujourd'hui seulement le rôle fondamental qu'ils jouent au sein de nombreux microécosystèmes, comme dans notre microbiote intestinal par exemple.

Les phages lytiques participent de façon naturelle à la régulation des populations bactériennes en les contrôlant, notamment lors des épidémies ; et ils forment avec elles un véritable duo dynamique, chacun évoluant en s'adaptant à l'autre.

Un autre type de phages, les phages tempérés, participent, eux, au transfert horizontal de gènes et à l'évolution des bactéries. Au gré de leur multiplication, ces phages peuvent, en effet, véhiculer des gènes porteurs de facteurs de virulence ou de mécanismes de résistance qu'ils transmettent de bactérie en bactérie.

Les bactéries peuvent donc, par différents mécanismes, devenir résistantes aux bactériophages comme aux antibiotiques. Au 21<sup>e</sup> siècle, l'antibiorésistance est devenue un enjeu de santé publique mondiale et le manque de nouveaux antibiotiques à disposition pour traiter les malades pousse les autorités et les chercheurs à s'intéresser de nouveau à la phagothérapie. Progressivement délaissée puis totalement abandonnée après la Seconde Guerre mondiale, sauf dans les pays de l'ex-bloc de l'Est, la phagothérapie intéresse à nouveau. Cependant, de nombreuses questions restent encore sans réponse afin de permettre la légalisation de la phagothérapie et l'utilisation des phages en garantissant leur efficacité, leur qualité et leur sécurité.

Dans une première partie, nous nous intéresserons de plus près aux bactériophages et à l'histoire de la phagothérapie. Nous verrons ce qu'est l'antibiorésistance et quelles réponses peuvent apporter les phages par rapport aux antibiotiques.

Dans une deuxième partie, nous verrons comment est actuellement utilisée la phagothérapie, quel est son statut et quelles sont les pistes qui permettraient sa future légalisation. Nous verrons que les phages sont déjà utilisés dans différents domaines et que de nombreuses autres applications potentielles sont à l'étude.

Enfin, dans la troisième partie, nous réaliserons l'analyse de différentes études cliniques et expérimentales réalisées récemment afin de faire le point sur les connaissances actuelles puis nous évoquerons les projets de recherche sur la phagothérapie actuellement en cours.



**Partie I :**  
**Des bactériophages à la phagothérapie au 20<sup>e</sup> siècle**

---

# 1. Les bactériophages, de leur état naturel à la découverte de leur utilité thérapeutique

## 1.1) Généralités sur les bactériophages

### 1.1.1) Définition

Le terme bactériophage est formé des mots grecs « *bacteria* » (bâton, dû à la forme des premières bactéries observées) et « *phagein* » (manger) et il signifie « mangeur de bactéries » (1).

On doit ce nom au découvreur des bactériophages, Félix d'Hérelle, microbiologiste autodidacte, en 1917. Nous reviendrons sur l'histoire de la découverte des bactériophages dans un paragraphe ultérieur.

Les bactériophages, ou virus de bactéries, que l'on nomme aussi plus simplement « phages » sont donc des virus capables d'infecter des bactéries et, pour certains, de les détruire, on les appelle alors phages lytiques. Les phages sont spécifiques des espèces de bactéries qu'ils infectent (on les nomme bactéries hôtes) et sont inoffensifs pour les cellules eucaryotes (humaines, animales et végétales).

Les virus sont des entités biologiques composés d'acide nucléique (ADN ou ARN) et de protéines. Leur taille est de l'ordre du nanomètre (entre 60 et 300 nanomètres (2)) quand celle des bactéries est de l'ordre du micromètre. Les bactériophages ont une taille comprise entre 25 et 200 nanomètres (3). Ils sont donc uniquement visibles au microscope électronique.

Ce sont des **parasites obligatoires** car ils ont besoin de pénétrer dans les cellules et d'utiliser la machinerie cellulaire de la bactérie hôte pour se multiplier. Les phages utilisent uniquement les cellules procaryotes pour leur multiplication.

À l'heure actuelle, plus de 5 500 bactériophages ont été décrits et plusieurs centaines d'espèces de phages sont connues mais l'on estime que cela représente seulement 10% du nombre total de phages existants.

Il existe une grande diversité de bactériophages, chacun spécifique d'une espèce bactérienne voire de quelques souches, et, pour chaque bactérie, il existe plusieurs phages spécifiques. On dénombrerait  $10^8$  génomes de phages sur Terre (4). Ils représentent les entités biologiques les plus nombreuses et les plus variées sur la planète ; on estime leur nombre entre  $10^{30}$  et  $10^{32}$  (2).

### 1.1.2) Morphologie

Bien que connus depuis les années 1917, il aura fallu attendre 1940 pour avoir les premières observations de bactériophages par le médecin et biologiste Allemand Helmut Ruska et son frère, le physicien Ernst Ruska, grâce au microscope électronique, et 1942 pour les premières photographies réalisées par le microbiologiste Salvador Luria (5).

Comme la majorité des virus, les phages se composent d'une capsid de nature protéique qui protège un ADN ou un ARN. D'autres éléments facultatifs peuvent s'ajouter (enveloppe, queue, spicules) comme nous le verrons plus bas.

Les bactériophages présentent une grande variété de morphologies différentes. On dénombre actuellement vingt groupes morphologiques (voir Figure 1) (2).

Les phages peuvent avoir une symétrie binaire, cubique, hélicoïdale ou complexe.

Certains phages ont une structure assez simple quand d'autres possèdent une structure dite binaire.

Les virus à symétrie binaire ou caudés sont constitués de deux éléments principaux : une tête et une queue, qui, avec d'autres éléments (voir Figure 2), participe à l'injection du matériel génétique du phage dans la bactérie. Les phages à symétrie binaire appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*. Cet ordre représente actuellement la majorité des phages connus (près de 5 000 membres) ; c'est également dans cet ordre que l'on trouve l'essentiel des phages lytiques utilisés en thérapeutique.

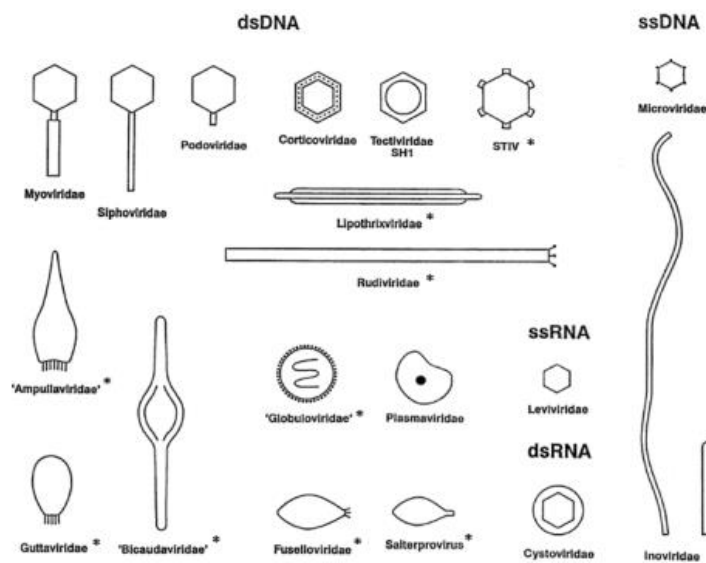


Figure 1 : morphologies des bactériophages

D'après HW Ackermann (6)

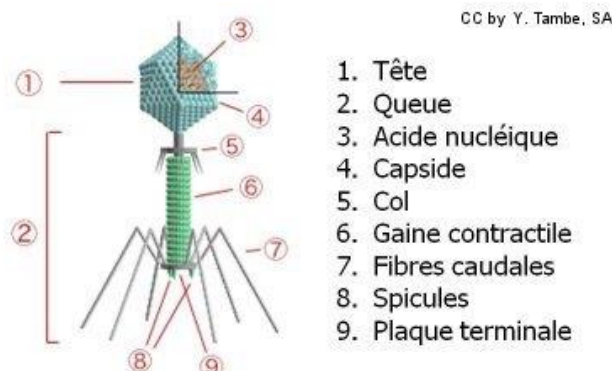


Figure 2 : représentation schématique d'un bactériophage à symétrie binaire (ordre des *Caudovirales*)

Source : <http://sites.crdp-aquitaine.fr/stl/files/2013/11/Bacteriophage2.jpg>

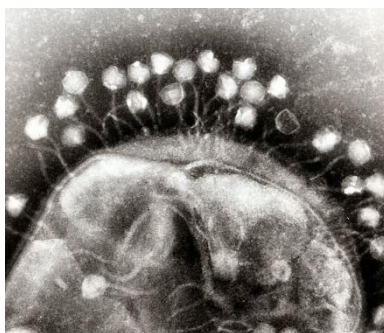


Figure 3 : micrographie électronique de bactériophages attachés à une cellule bactérienne (les virus ont la taille et la forme du coliphage T1)

Source : <https://en.wikipedia.org/wiki/Bacteriophage> (Dr Graham Beards)

### 1.1.3) Classification

Tout d'abord, il faut savoir que les virus sont classifiés par le Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) par ordre, famille, sous-famille, genre et espèce.

Ensuite, ils sont regroupés selon leur structure.

Les bactériophages sont des virus qui peuvent être constitués d'un génome à ADN ou à ARN, chacun pouvant être à simple ou double brin. C'est le critère principal de la classification (voir Tableau 1).

Viennent ensuite la forme de la capsid (tubulaire ou icosaédrique) et la présence ou l'absence d'enveloppe extérieure.

On peut également les différencier par leurs structures très variées : certains sont constitués d'une capsid à symétrie icosaédrique simple, d'autres sont plus complexes, comme les bactériophages caudés, qui sont composés d'une tête icosaédrique et d'une queue de structure hélicoïdale. Enfin, certains possèdent des structures lipidiques leur servant d'enveloppe.

Les bactériophages sont divisés en plusieurs catégories selon les caractéristiques de leur génome : ADN double brin, ADN simple brin, ARN double brin et ARN simple brin.

Les phages à ADN double brin représentent la majorité de ces virus, on en dénombre onze familles. Parmi eux, on trouve les bactériophages caudés que l'on regroupe dans l'ordre des *Caudovirales* (ils représentent 96% des bactériophages connus) (7).

L'ordre des *Caudovirales* contient cinq familles de virus : les *Siphoviridae* (avec comme représentant le phage  $\lambda$ ), les *Myoviridae* (avec le phage T4), les *Podoviridae* (représenté par le phage T7), les *Ackermannviridae* et les *Herelleviridae*. Ce sont notamment les phages d'*Escherichia coli* et d'Entérobactéries. Ce sont les phages les plus connus et les plus étudiés à ce jour.

Les phages à ADN simple brin comportent deux familles parmi lesquelles on trouve les virus filamenteux et lysogènes.

Les phages à ARN double et simple brin comportent chacun une famille.

Tableau 1 : classification des bactériophages

D'après Virologie humaine, coordonné par Alain Le Faou, éditions Pradel (8) et mis à jour avec la classification de l'ICTV en novembre 2019 (9)

Ordre	Famille	Genres (nombre de genres)	Bactérie hôte (exemple de phage)	Particularités
<b>ADN double brin</b>				
<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>T4-like viruses</i> (87)	<i>E. coli</i> (T4)	Queue contractile
	<i>Siphoviridae</i>	<i>P2-like viruses</i> <i>λ-like viruses</i> (210)	Entérobactéries (P2) <i>E. coli</i> (λ)	Queue longue et non contractile
	<i>Podoviridae</i>	<i>T7-like viruses</i> (48)	<i>E. coli</i> (T7)	Queue courte
	<i>Ackermannviridae</i>	<i>Agtrevirus</i> , <i>Limestonevirus</i> , <i>Kutternvirus</i>	<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i>	-
	<i>Herelleviridae</i>	<i>Agatevirus</i> (15)	<i>Bacillus</i>	-
<i>Ligamenvirales</i>	<i>Rudiviridae</i>	<i>Rudivirus</i>	<i>Sulfolobus</i>	-
	<i>Lipothrixviridae</i>	<i>Lipothrixvirus</i> (3)	<i>Thermoproteus</i>	Enveloppe lipidique
-	<i>Tectiviridae</i>	<i>Tectivirus</i> (3)	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i>	Vésicule interne (lipoprotéine)
-	<i>Corticoviridae</i>	<i>Corticovirus</i>	<i>Alteromonas</i>	Capside complexe, lipidique
-	<i>Plasmaviridae</i>	<i>Plasmavirus</i>	<i>Acholeplasma</i>	Enveloppe lipidique, pas de capsid
-	<i>Fuselloviridae</i>	<i>Fusellovirus</i> (2)	<i>Sulfolobus</i>	Fusifforme, pas de capsid

<b>ADN simple brin</b>				
-	<i>Inoviridae</i>	<i>Inovirus</i> (7)	<i>E. coli</i> (M13)	Filamenteux ou allongés
-	<i>Microviridae</i>	<i>Microvirus</i> (6)	<i>E. coli</i>	-
<b>ARN double brin</b>				
-	<i>Cystoviridae</i>	<i>Cystovirus</i>	<i>Pseudomonas</i>	Enveloppe lipidique
<b>ARN simple brin</b>				
-	<i>Leviviridae</i>	<i>Levivirus</i> , <i>Allolevivirus</i>	<i>E. coli</i>	-

#### 1.1.4) Virulence et cycles phagiques

Il est important de savoir, qu'en plus de leur morphologie et de leur classification, on différencie les bactériophages selon leur virulence et leur cycle infectieux. On trouve différents types de phages : les phages dits lytiques, tempérés ou filamenteux, avec un cycle de multiplication qui leur correspond. Il existe quatre types de cycles phagiques : le cycle lytique, lysogénique, pseudolysogénique et chronique.

Ce sont les phages lytiques qui sont utilisés pour la phagothérapie tandis que les phages tempérés ne doivent pas être présents dans les préparations thérapeutiques car ils peuvent transmettre des gènes favorables aux bactéries pathogènes. Les phages tempérés sont minoritaires dans la nature et ne représentent qu'environ 10% des phages (10). Ils sont en revanche très utilisés en biologie moléculaire.

##### a) *Cycle lytique*

Les **phages lytiques** ou virulents se multiplient par cycle lytique ou productif. Ce cycle est indépendant du cycle de la bactérie hôte et débute dès l'entrée du phage dans la bactérie. Ce cycle de reproduction ou de réplication dure de 9 à 45 minutes et aboutit à la formation et à la libération par lyse bactérienne de 30 à 300 nouveaux virus par bactérie (3). L'action lytique des phages est très importante et dépasse les capacités de renouvellement de la bactérie, qui, elle, se divisera au mieux en une heure pour produire une bactérie fille (11).

Pour décrire un cycle lytique nous utiliserons l'exemple du bactériophage T4 (infectant *Escherichia coli*) qui est le plus étudié à ce jour. Ce cycle général connaît des particularités propres à chaque famille de phages.

- Tout d'abord, il y a reconnaissance entre des fibres présentes sur la queue du bactériophage et des récepteurs présents à la surface de la bactérie hôte. C'est l'arrimage. Une fois le phage bien fixé à la paroi externe de l'hôte, une enzyme sécrétée par le virus perce la paroi bactérienne et la queue du phage entre en contact avec la membrane plasmique. On appelle cette phase de fixation l'adsorption.
- Cette adhésion entraîne la perforation de la membrane plasmique en de nombreux endroits puis la contraction de la queue du phage qui s'introduit dans le cytoplasme bactérien.
- Immédiatement, l'acide nucléique contenu dans la tête du phage est injecté dans le cytoplasme.
- Une nucléase virale fragmente l'ADN de la bactérie afin de le rendre inefficace, les éléments et le métabolisme cellulaire sont utilisés par l'acide nucléique viral pour sa propre reproduction. Il y a réplication de l'acide nucléique puis transcription et traduction de nouvelles protéines virales.
- Les protéines virales nouvellement synthétisées vont pouvoir s'assembler de façon précise et prédéfinie autour des acides nucléiques, pour former de nombreux bactériophages identiques qui vont alors s'accumuler dans le cytoplasme bactérien.

- Enfin, des enzymes virales vont détruire la membrane plasmique et faire éclater la bactérie (*burst size*<sup>1</sup>) afin de libérer les nouveaux bactériophages produits. Il y a donc lyse de la bactérie et les phages peuvent immédiatement aller infecter d'autres bactéries.

### b) Cycle lysogène

Les **phages tempérés** utilisent un cycle lysogène ou lysogénique. Les phages tempérés intègrent leur matériel génétique au chromosome bactérien et se répliquent en suivant le rythme de réplication de la bactérie : on parle alors de **prophages**. Les prophages sont silencieux et sont transmis aux bactéries filles. En cas d'induction par certains stimuli (agents physiques ou chimiques, état métabolique de la bactérie, stress bactérien), le génome du phage (prophage) s'excise et il y a reprise d'un cycle lytique. Le phage retournera par la suite en phase lysogène. C'est lors de l'excision que le phage peut emporter avec son génome un morceau de génome bactérien. On appelle ce phénomène la **transduction**. Ces gènes bactériens sont alors transmis à la nouvelle bactérie infectée par le phage. Or, si la bactérie précédente était une bactérie pathogène, elle porte dans son génome des informations de facteurs de pathogénicité ou de mécanismes de résistance. C'est ainsi qu'une bactérie inoffensive peut devenir pathogène. On parle de **conversion lysogène** ou lysogénique. Ce phénomène de transduction, qui existe dans la nature et permet l'échange d'informations et de caractères entre bactéries, est source d'inquiétude pour les opposants à la phagothérapie. Cependant, lors des préparations de phages à visée thérapeutique on s'assure toujours que le ou les phages utilisés ne présentent aucun caractère lysogène et sont strictement lytiques.

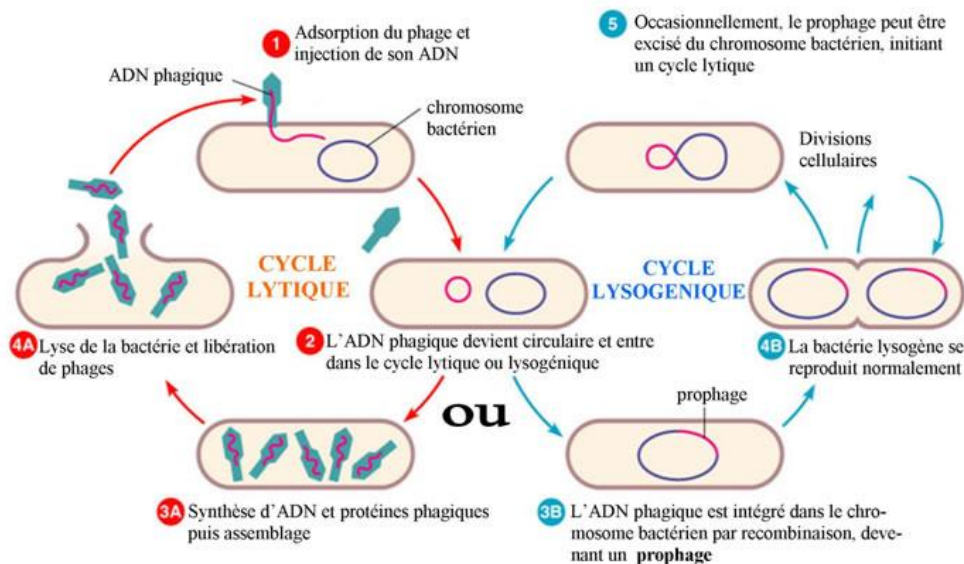


Figure 4 : cycles lytique et lysogénique des bactériophages

Source : <http://www.microbiologie-medicale.fr/virologie/generalitesvirus.htm>

<sup>1</sup> *Burst size* : en français, « taille à éclatement » ou fécondité, définit le nombre de phages produits par bactérie infectée lors d'un cycle lytique.



Nous avons vu, que, lors d'un cycle lysogène, sous certaines conditions inductrices, le prophage peut s'exciser du génome bactérien. Ces conditions de stress peuvent être, entre autres, des rayons X, des rayons ultra-violetes ou des oxydants. Il a également été démontré que des antibiotiques peuvent aussi être des inducteurs et entraîner la mobilisation de prophages. Or, ces prophages sont transducteurs de résistance bactérienne. Il faudrait donc choisir avec précaution les antibiothérapies afin d'éviter de propager des résistances *via* les phages. Par exemple, une étude réalisée à Marseille en 2009 sur un staphylocoque doré résistant à la méticilline, a montré l'implication de l'induction de phages par des antibiotiques, induction responsable de la diffusion de gènes de résistances aux antibiotiques (12).

### **Les différents types de transduction :**

En bactériologie, la transduction peut être définie comme le transfert d'une séquence d'ADN au moyen d'un vecteur viral (un phage), d'une bactérie à une autre. Il existe deux types de transduction : la transduction généralisée et la transduction spécialisée (13).

- La **transduction généralisée** peut être réalisée par les phages lytiques. Lors du cycle lytique, le génome bactérien est fragmenté par des nucléases afin d'être rendu inefficace. Plus tard, lors de l'assemblage des virions et de l'encapsidation de l'ADN viral, des morceaux d'ADN bactérien peuvent aussi être accidentellement encapsidés. Ces morceaux pourront ensuite être intégrés par recombinaison au génome d'une autre bactérie infectée par le phage, sans entraîner de cycle lytique, ou rester libres dans le cytoplasme bactérien. Cette transduction peut concerner tout le génome de l'hôte du moment que sa taille est compatible avec l'encapsidation.
- La **transduction spécialisée** est effectuée par les phages tempérés. Dans un cycle lysogène, le génome viral est intégré au génome bactérien sous forme de prophage. C'est lors de son excision que le prophage peut emporter avec lui des fragments d'ADN bactérien. On obtient alors un génome hybride contenant de l'ADN phagique et bactérien. Seules les régions du chromosome bactérien proches des sites d'attachement du phage peuvent être transduites. Les phages contenant un ADN hybride ne peuvent généralement pas être à l'origine de nouveaux virus si leur génome n'est pas intégral (7).

### *c) Autres types de cycles*

Il existe un état intermédiaire minoritaire, le **cycle chronique**, qui concerne les phages filamenteux. Dans le cycle d'infection chronique, il s'instaure un équilibre entre la bactérie et le phage. La bactérie produit les particules virales et les nouveaux phages sont excrétés par bourgeonnement de la membrane sans que cela ne détruise la cellule bactérienne. Les bactéries continuent de se diviser et transmettent le phage à leur descendance.

Enfin, le cycle pseudolysogénique ou **pseudolysogénie** est un état particulier, entre le cycle lytique et lysogénique. Dans ce cas, le matériel génétique du phage est injecté dans la bactérie puis reste quiescent dans la cellule comme un plasmide. Le génome peut être transmis ainsi pendant plusieurs générations puis le phage peut finir par entrer en cycle lysogène ou lytique.

Cet état est souvent retrouvé en cas de conditions de croissance défavorables pour l'hôte et il aboutit à une transmission asymétrique du génome viral (le génome n'est pas répliqué, il est donc transmis à une seule des bactéries filles) (7).

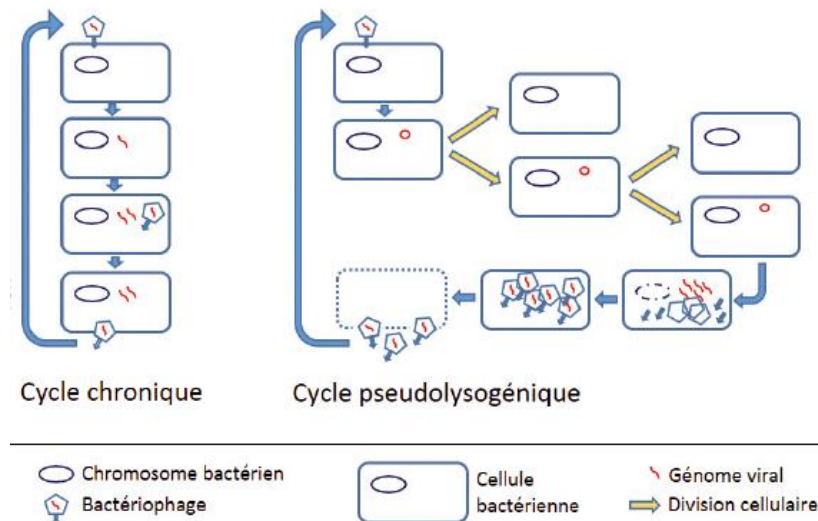


Figure 5 : cycles chronique et pseudolysogénique des bactériophages (7)

### 1.1.5) Les bactériophages à l'état naturel

#### a) *Habitat naturel des phages*

Bien que tous les bactériophages existants n'aient pas encore été étudiés, on estime qu'ils représentent les entités biologiques les plus nombreuses sur Terre. Ils seraient en effet  $10^{30}$  à  $10^{32}$  sur notre planète, ce qui représente dix à cent fois plus que les bactéries. On estime leur présence sur Terre à plusieurs milliards d'années car ils seraient apparus en même temps que les premières bactéries (11).

Il existe une grande diversité de phages et ceux-ci sont présents partout où il y a des bactéries. On trouve donc des phages en abondance dans la nature : dans le sol, les eaux douces et salées, les sédiments, où ils sont présents en grand nombre, dans des environnements plus extrêmes comme les déserts ou les glaces, et aussi chez tous les êtres vivants, dans leur système digestif, leur peau et leurs muqueuses. Les eaux usées représentent le lieu où les phages sont les plus abondants et où il est le plus simple de s'en procurer.

Les phages sont très résistants et ils peuvent rester des mois en suspension dans l'eau ou le sol sous forme inerte que l'on appelle virion, ainsi qu'à l'état sec, ce qui permet de les conserver.

Les bactériophages sont plus résistants que la plupart des bactéries car ils supportent mieux des environnements hostiles et survivent à des conditions physico-chimiques plus importantes que les bactéries.

Bien que chaque bactériophage présente ses propres particularités, la majorité d'entre eux n'est détruite qu'à une température de  $65^{\circ}\text{C}$ , et ils sont encore virulents après exposition à des rayonnements ultra-violetts, des substances antiseptiques ou des conditions acides ou basiques.

Cependant, le facteur temps est un élément important à prendre en compte dans la survie des bactériophages car on sait qu'une action prolongée de facteurs physico-chimiques sur les phages entraîne leur neutralisation (2).

Nous manquons encore actuellement d'informations sur la survie et la disparition des bactériophages dans leur environnement naturel.

#### *b) Rôle des phages dans la nature*

Pour chaque bactérie on trouve au moins un phage lui correspondant, sans compter les mutations de chacun. On peut les considérer comme un couple bactérie – bactériophage, dont l'un ne peut exister sans l'autre, et qui participe à de nombreux équilibres biologiques. Les bactériophages, parasites obligatoires, ne peuvent exister sans les bactéries qu'ils utilisent pour se répliquer, et les bactéries utilisent les phages pour évoluer en échangeant des gènes transportés par les phages. Il s'agit d'une véritable relation dynamique et l'on parle, pour expliquer cette relation, de coévolution adaptative antagoniste (2). Cette coévolution ne s'applique pas qu'aux bactériophages mais elle est particulièrement adaptée pour eux car pour que l'une ou l'autre des parties survive elle doit être plus forte que l'autre. Cela passe principalement par des mutations obtenues à la faveur d'erreurs lors des duplications. Ces erreurs, si elles sont favorables aux bactéries, entraînent des phénomènes de résistance, mais, les phages ayant besoin des bactéries pour survivre, peuvent également s'adapter et muter à leur tour très rapidement.

Les phages virulents participent à la régulation du nombre de bactéries sur la planète et au renouvellement bactérien car ils constituent le principal prédateur naturel des bactéries. On estime en effet que les phages sont responsables d'au moins 50% de la mortalité bactérienne tous les deux jours, en l'absence d'autres prédateurs.

Pour mieux comprendre le rôle des phages dans l'environnement il est intéressant d'évoquer, entre autres, les travaux de Shah M. Faruque. Cet auteur a réalisé plusieurs études qui montrent le rôle des bactériophages dans l'épidémiologie du choléra (14).

Tout d'abord, il s'est rendu compte que les épidémies de choléra coïncident avec l'augmentation de la concentration des bactéries responsables (*Vibrio cholerae*) dans les eaux au Bangladesh. Une étude (15) lui a aussi montré que le pic de l'épidémie se produit lorsqu'il y a une forte population bactérienne dans l'eau et que la fin de l'épidémie se produit quand le niveau des bactériophages spécifiques augmente à son tour, comme le montre la figure 6 ci-dessous.

Les observations réalisées ont démontré que la prolifération des phages coïncide avec la diminution des bactéries dans l'eau des zones d'endémie (15), (16).

En effet, les phages diminuent les quantités de bactéries jusqu'à un nombre inférieur au seuil épidémique et stoppent la transmission des bactéries. Ces résultats permettent donc d'imaginer des mesures afin de lutter contre les épidémies de choléra.

Ces travaux permettent par ailleurs d'illustrer le rôle des phages dans la régulation des populations bactériennes et la dynamique des équilibres bactéries – phages dans les cycles

épidémiques. C'est aussi ce que Félix d'Hérelle appelait l'histoire naturelle des épidémies (voir 1.2) Histoire de la découverte des bactériophages).

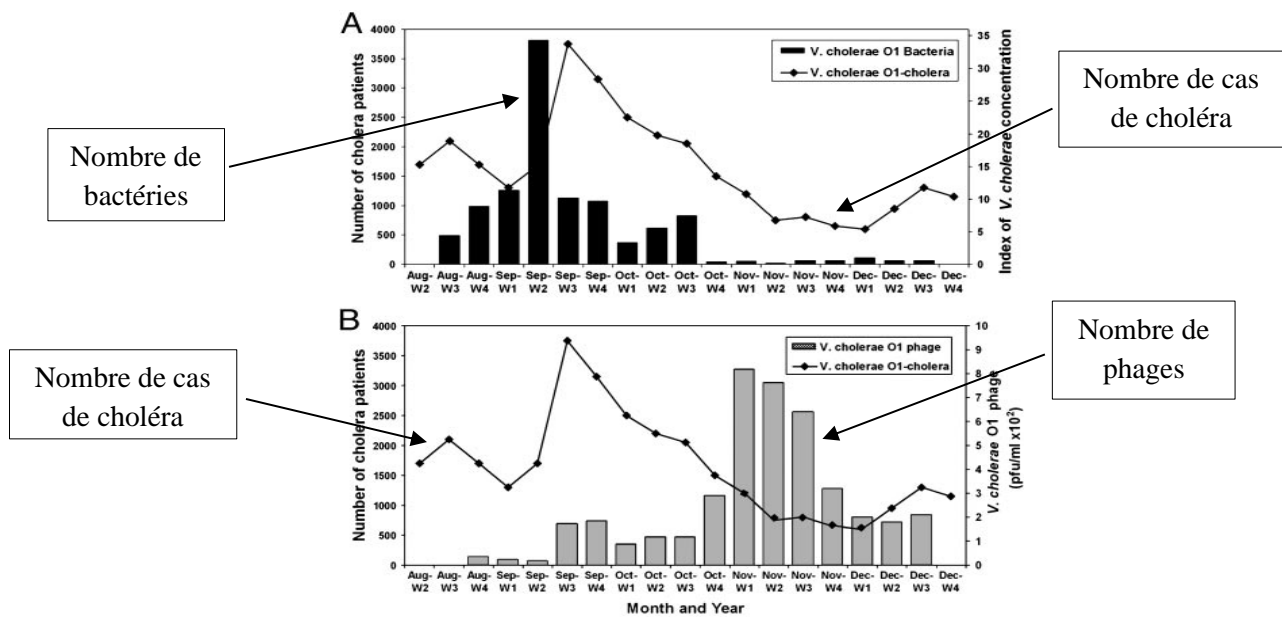


Figure 6 : comparaison de l'évolution du nombre de cas de choléra et des populations bactériennes (A) et phagiques (B) (15)

Les virus de bactéries ont un rôle essentiel dans la biosphère car ils participent également aux cycles de renouvellement biochimique, les produits de lyse des phages lytiques transformant le carbone présent dans les cellules en carbone organique biodisponible.

Les phages tempérés contribuent quant à eux au brassage génétique entre les bactéries et à l'acquisition de nouvelles propriétés en transportant des gènes de virulence, de toxines, ou de résistances par exemple. En effet, de nombreux facteurs de virulence responsables de la pathogénicité de certaines espèces bactériennes sont codés par des prophages (par exemple : shigatoxine, toxine cholérique, toxine diphtérique... ) (7).

À l'heure actuelle, on commence seulement à entrevoir le rôle des bactériophages dans les microécosystèmes, mais on sait qu'ils participent à leur équilibre. De même, on s'intéresse depuis quelques années aux différents microbiotes, notamment humain (intestinal, cutané, vaginal...) car on s'est rendu compte que leur déséquilibre pouvait concourir à l'apparition de diverses pathologies. Or, les virus, qui constituent la majorité des représentants d'un microbiote, et, parmi eux, les bactériophages, interagissent avec de nombreux autres micro-organismes au sein de ces microbiotes qui font partie intégrante des individus et dont le rôle est fondamental. Par leur action sur les bactéries pathogènes, leur coévolution et leur équilibre, on comprend aisément l'importance des bactériophages dans le maintien des flores.

### 1.1.6) Rôle des bactériophages dans la biologie moléculaire et les nouvelles technologies

Depuis la création de la biologie moléculaire en 1938, les bactériophages ont joué un rôle important dans la compréhension de nombreux mécanismes biologiques ainsi que dans le

développement de techniques d'analyses. Ils ont également fait progresser les connaissances et la recherche en génétique, en servant à la fois d'outils et d'objets d'étude.

Dès 1940, l'étude de bactériophages a permis de montrer que les acides nucléiques sont les principaux constituants du matériel génétique, puis, plus tard, ils ont permis de mettre en évidence le rôle de l'ARN messager. En 1962, une expérience réalisée avec des phages a permis de découvrir les enzymes de restriction. En 1980, le biochimiste Frederick Sanger reçoit le prix Nobel de chimie pour avoir réussi à séquencer pour la première fois de l'ADN en utilisant un phage (17).

La propriété des phages tempérés à s'intégrer dans le génome bactérien est un outil précieux en biologie moléculaire car elle permet d'implanter des gènes dans les bactéries afin de modifier leur génome et donc, leurs caractéristiques. Les phages servent de vecteurs de clonage et cela permet également d'utiliser la bactérie afin de synthétiser des molécules d'intérêt.

Dans le domaine des nanosciences, plus particulièrement en nanomédecine et en nanobiologie, la propriété des phages filamenteux appelée *phage display*<sup>2</sup> (voir 1.3.2) (Autres propriétés des bactériophages) découverte en 1985 par George Smith, est exploitée en laboratoire pour de nombreuses applications tant diagnostiques que thérapeutiques. George Smith et Gregory Winter ont d'ailleurs reçu le prix Nobel de chimie en 2018 pour leurs travaux sur le *phage display* des bactériophages permettant de synthétiser des anticorps à visée thérapeutique.

## 1.2) Histoire de la découverte des bactériophages

L'histoire des bactériophages est intimement liée à l'histoire de ses découvreurs, et notamment le franco-canadien Félix d'Hérelle (1873-1949) (18).

Nous sommes en Angleterre en 1915, le bactériologiste Frederick Twort constate que des colonies bactériennes sont détruites par un agent invisible. Cet agent invisible passe au travers du filtre de la bougie de Chamberland, capable de filtrer bactéries et champignons, mais laissant passer les micro-organismes plus petits comme les virus. Frederick Twort émet donc l'hypothèse que l'agent invisible responsable de la disparition des colonies bactériennes est un virus (19). C'est à lui qu'on doit la description du principe lytique. Cependant, il n'approfondira pas cette hypothèse et se consacrera à d'autres travaux de recherche.

Dans les années 1910, le bactériologiste Félix d'Hérelle travaille sur le terrain, en Amérique du Sud. On lui confie d'abord différentes missions, puis il part au Mexique afin de travailler sur une maladie d'insecte car on cherche à lutter contre les invasions de sauterelles. Il souhaite identifier une maladie naturelle des sauterelles qu'il pourrait leur inoculer afin de les tuer. Pour cela, il récupère des insectes morts et les analyse ; il découvre alors de nombreuses bactéries dans leur intestin. Ce sont des coccobacilles, qu'il nomme *Coccobacillus acridiorum*, et qui sont bien responsables de la maladie des sauterelles. Il peut donc utiliser ces coccobacilles afin de lutter contre les ravages des sauterelles. D'Hérelle va alors préparer ces coccobacilles en grande quantité afin de traiter plusieurs régions d'Argentine. Alors qu'il met les bactéries en culture, il observe à plusieurs reprises des taches claires apparaissant au milieu des colonies

---

<sup>2</sup> *Phage display* : présentation de peptides à la surface de phages filamenteux, cela permet la sélection et la synthèse combinatoire de nombreux peptides.

bactériennes à la surface des boîtes de Pétri (voir Figure 7). Il s'interroge : cet agent bactéricide invisible au microscope, et donc plus petit qu'une bactérie, pourrait-il être un virus ?

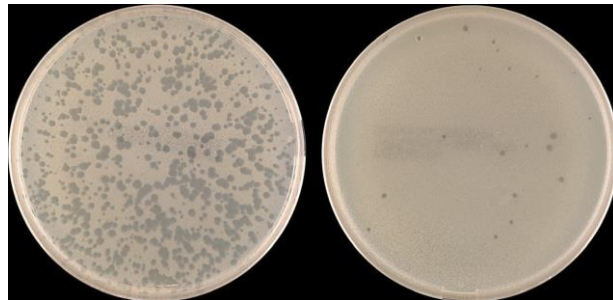


Figure 7 : plages de lyse à la surface de boîtes de Pétri sur une culture de *Staphylococcus aureus*.

Le titre des bactériophages est plus élevé à gauche qu'à droite (les plages de lyse apparaissent plus sombres ici). Cliché du Dr Alain Dublanche.

De retour en France, en 1915, Félix d'Hérelle s'attache à l'étude de la dysenterie bacillaire de soldats et observe le même phénomène de destruction bactérienne (plages claires) sur certaines cultures de *Shigella dysenteriae* recueillies dans des selles de patients.

À ce moment-là, il émet l'hypothèse que l'agent en question pourrait être impliqué dans la guérison des patients car les taches claires n'apparaissent que sur les cultures de patients en fin de maladie.

L'expérience qu'il réalisa ensuite sur une patiente atteinte de dysenterie bacillaire lui permit de prouver cette hypothèse, mais également d'acquérir la certitude que ces agents étaient bien des virus. Ces virus, qu'il nomme bactériophages, détruisent la bactérie pathogène et permettent la guérison des malades. Maintenant qu'il a identifié les phages, le chercheur doit prouver que ce n'est pas un phénomène isolé.

Félix d'Hérelle est alors chef du laboratoire des vaccins à l'Institut Pasteur de Paris et profite des échantillons de diverses maladies étudiées à l'Institut pour filtrer et conserver différents phages.

Dans la note lue par Emile Roux (directeur de l'Institut Pasteur) à l'Académie des sciences en 1917 « *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques* » (20) (Annexe 1), Félix d'Hérelle explique comment isoler les bactériophages :

« L'isolement du microbe anti-Shiga est simple : onensemence un tube de bouillon avec quatre à cinq gouttes de selles, on place à l'étuve à 37° pendant 18 heures puis on filtre à la bougie Chamberland L2. Une petite quantité d'un filtrat actif ajoutée, soit à une culture en bouillon de bacilles de Shiga, soit à une émulsion de ces bacilles dans du bouillon ou même dans de l'eau physiologique, provoque l'arrêt de la culture, la mort des bacilles puis leur lyse qui est complète après un laps de temps variant de quelques heures à quelques jours suivant l'abondance plus ou moins grande de la culture et la quantité de filtrat ajoutée. »

C'est dans cette même note que Félix d'Hérelle appelle ces « microbes anti » des bactériophages pour la première fois. Il pensait alors qu'il s'agissait d'un seul et unique

bactériophage, qu'il baptisa *Bacteriophagum intestinale*, capable d'acquérir des spécificités particulières pour infecter toutes sortes de bactéries. On sait aujourd'hui qu'il existe des milliers de phages, chacun spécifique d'une espèce bactérienne.

Pour étayer son hypothèse concernant la guérison et vérifier les propriétés thérapeutiques des bactériophages, Félix d'Hérelle s'intéresse tout d'abord à d'autres maladies animales. En 1919, il apprend qu'une épidémie de typhose aviaire a lieu dans des élevages de volailles. La maladie, due à une Salmonelle (*Salmonella gallinarum*), décime les animaux en provoquant d'intenses diarrhées. Félix d'Hérelle doit d'abord identifier une poule qui semblerait en voie de guérison car c'est dans ce cas que l'on peut trouver des phages actifs contre la bactérie en question. Il prélève ensuite des déjections de l'animal qu'il analyse et constate la présence de phages. Le microbiologiste peut alors filtrer les phages actifs et réaliser une collection d'échantillons. Il en profite pour administrer des préparations de phages aux poules malades qui guérissent !

Ayant réussi à traiter une maladie animale, Félix d'Hérelle décide de réaliser un essai thérapeutique chez l'homme et comme il dispose déjà de phages actifs contre la dysenterie depuis 1915 il choisit cette maladie. À l'hôpital des enfants malades de Paris, il traite avec succès en quelques jours plusieurs enfants souffrant de dysenterie en leur administrant la solution de bactériophages. On retrouve ces expériences dans le livre de Félix d'Hérelle publié en 1921 « *Le bactériophage, son rôle dans l'immunité* ».

Toujours en 1919, Félix d'Hérelle rencontre Alexandre Yersin qui lui parle du barbone, ou « peste du buffle », une maladie due à la bactérie *Pasteurella multocida*, touchant les buffles en Indochine notamment. Félix d'Hérelle se rend alors en Indochine afin de mettre au point un vaccin contre cette maladie et de trouver des phages du barbone. Pour cela, il utilise toujours la même méthode : il identifie des animaux ayant guéri seuls de la maladie et analyse leurs selles dans lesquelles il trouve des phages actifs contre *Pasteurella*. À partir de ces phages, il réalise un vaccin qu'il administre aux buffles en prévention du barbone.

Pendant ce séjour en Indochine, Félix d'Hérelle traite également avec succès des malades atteints de la peste avec des phages isolés de déjections de rats. Plus tard, en 1926, il traite en Egypte avec ces mêmes phages, plusieurs patients atteints de la peste.

Félix d'Hérelle rentre à Paris en 1921, puis accepte un poste à l'université de Leyde aux Pays-Bas avant de partir en Egypte en 1924 pour un poste de directeur d'un service de bactériologie.

En 1927, Félix d'Hérelle se rend en Inde pour étudier le choléra. Dans les hôpitaux de Calcutta, il se rend compte que les malades en voie de guérison transmettent les phages aux autres malades s'ils sont placés ensemble, permettant ainsi leur guérison.

Le chercheur isole des bactériophages actifs contre le choléra à partir de patients guéris et prépare des cultures de phages avec lesquelles il soigne plusieurs malades, dont lui-même. Il se rend ensuite dans plusieurs villages du Pendjab qui subissent l'épidémie de choléra pour traiter les villageois ; ses résultats sont encourageants et l'amènent à verser directement les préparations de phages dans les puits ce qui arrête l'épidémie dans plusieurs villages. Ce succès conduit le gouvernement indien à reproduire cette méthode de prophylaxie par les bactériophages dans plusieurs districts du pays, le nombre de morts diminue alors de façon importante.

De 1928 à 1933, Félix d'Hérelle continue ses recherches dans un laboratoire de l'université de Yale aux Etats-Unis. En 1933, il accepte un poste à l'université de Tbilissi en Géorgie. C'est George Eliava, ami et ancien élève de Félix d'Hérelle, qui l'invite à le rejoindre. En 1923, George Eliava crée un institut de microbiologie à Tbilissi puis collabore avec Félix d'Hérelle afin de créer un institut du bactériophage qui verra le jour en 1938.

Actuellement, l'institut Eliava de Tbilissi est le centre de référence mondial de recherche sur la phagothérapie, de production de phages mais aussi d'accueil et de traitement de patients souffrant d'infections en impasse thérapeutique.

### *Histoire naturelle des épidémies :*

Avec les connaissances et les moyens à sa disposition au 20<sup>e</sup> siècle, Félix d'Hérelle a néanmoins formulé plusieurs hypothèses concernant l'histoire naturelle des épidémies, c'est-à-dire, comment celles-ci se développent et se terminent. En effet, dès la mise en évidence des bactériophages et grâce à ses observations sur plusieurs maladies animales et humaines, d'Hérelle pense que le phage est ce qui correspond au phénomène de guérison naturelle. Il ajoute également que le bactériophage exprime une activité lytique contre la bactérie responsable de la maladie, que l'individu doit cependant être infecté par un phage pour pouvoir guérir, que ce bactériophage s'exprime en fin de maladie et que les virus se transmettent entre les malades, ce qui permet, après quelque temps, de mener à la fin de l'épidémie (car, nous l'avons vu plus haut, les virus se multiplient bien plus rapidement que les bactéries et, plus elles sont nombreuses, plus le nombre de phages nouvellement synthétisés sera important). De plus, un individu porteur du bactériophage spécifique ne développe pas la pathologie correspondante ; c'est sur ce principe que se base la phagoprophylaxie, utilisée par d'Hérelle et encore actuellement.

## **1.3) Propriétés thérapeutiques**

### 1.3.1) Spécificité des bactériophages

Les bactériophages, par leur mode de reproduction, ont une action bactéricide qui est recherchée en thérapeutique. Cette bactéricidie présente des avantages due à la nature virale des phages. Cela a en effet pour conséquence que cette bactéricidie soit rapide (reproduction des virus plus rapide que le cycle bactérien), spécifique et efficace, avec une croissance exponentielle du nombre de nouveaux phages jusqu'à ce que toutes les bactéries soient détruites.

Pour chaque bactérie on trouve au moins un bactériophage correspondant et chaque phage est spécifique d'une espèce bactérienne voire même de quelques clones uniquement. C'est ce qui fait la spécificité des phages et entraîne un spectre d'action étroit qui définit une gamme d'hôtes (21). Cet étroit spectre d'activité représente un avantage car il permet de cibler uniquement la bactérie pathogène en épargnant la flore commensale et en évitant l'apparition d'effets indésirables. Cela implique cependant de devoir identifier la bactérie à l'origine de l'infection, de trouver le phage lui correspondant et de le tester préalablement afin de s'assurer de son



efficacité. Cette caractéristique exclut de fait tout traitement probabiliste sous peine d'échec et limite également la prise en charge des infections urgentes et/ou systémiques.

### 1.3.2) Autres propriétés des bactériophages

Outre leur bactéricidie, les phages possèdent d'autres propriétés qui peuvent avoir des qualités intéressantes dans divers domaines d'action.

Certains bactériophages produisent des enzymes, comme notamment des dépolymérase capables de détruire les polysaccharides qui composent les biofilms ou les capsules bactériennes, leur permettant ainsi d'atteindre les bactéries ou de les rendre accessibles aux antibiotiques. Il existe en effet une action synergique entre phages et antibiotiques qui peut s'exprimer de différentes manières.

Les biofilms se développent sur une surface (du matériel médical, comme les prothèses, ou les cavités du corps) et entraînent des infections longues et difficiles à traiter. Cette propriété de destruction des biofilms est donc intéressante car les biofilms constituent un état protecteur dans lequel les bactéries sont inaccessibles aux défenses de l'hôte et aux médicaments (phages comme antibiotiques).

Certains éléments constituant les bactériophages sont de nature protéique et jouent un rôle sur l'immunité. Les réactions engendrées par le contact des phages avec le système immunitaire peuvent être de plusieurs natures, on les regroupe sous le terme d'immunomodulation. On peut avoir affaire à une stimulation, une suppression, ou à une tolérance du système immunitaire.

Le *phage display* est une autre propriété intéressante des phages utilisée en nanosciences et ayant de nombreuses applications dans le domaine médical à des fins diagnostiques ou thérapeutiques. Il s'agit de la capacité des phages filamenteux à présenter sur leur surface protéique des peptides, fragments d'anticorps ou autres protéines, qui sont exprimés par le phage grâce à l'introduction des séquences leur correspondant dans son génome. Une fois le choix des molécules à exprimer par le phage réalisé, il peut alors aller se lier à la cible visée. Cela permet d'identifier de nouveaux substrats, épitopes ou ligands.

Les applications possibles sont, par exemple, d'utiliser ces phages pour transporter des médicaments jusqu'à leur cible et ainsi traiter la maladie ou leur permettre de reconnaître et de révéler des tissus malades ou des tumeurs.

## 2. Traiter les infections grâce aux virus, naissance et déclin de la phagothérapie

### 2.1) **Histoire de la phagothérapie**

Après la découverte des bactériophages en 1917, la phagothérapie, c'est-à-dire, le traitement des infections bactériennes par les phages, naît et se développe sous l'impulsion de Félix d'Hérelle qui entrevoit très vite les diverses applications thérapeutiques possibles pour ses phages. Dès 1919, nous l'avons vu précédemment, il traite avec succès des enfants atteints de dysenterie bacillaire à Paris. Il utilise également les phages pour traiter des cas de peste en Egypte et une épidémie de choléra en Inde.

Dès lors, la découverte de d'Hérelle se diffuse dans le monde, de nombreux travaux de recherche sont entrepris et les publications sur le sujet commencent à apparaître aux Etats-Unis, au Brésil et dans toute l'Europe.

En 1921, une équipe belge publie la première étude sur ce qui deviendra la phagothérapie (22). En 1922, Gratia, qui a déjà travaillé sur « le phénomène de d'Hérelle », publie les résultats d'une étude sur le traitement d'infections à Staphylocoque à Bruxelles (23).

En 1925, la renommée de la phagothérapie est mondiale et en 1926 Félix d'Hérelle publie son deuxième livre « *Le bactériophage et son comportement* ».

Dans les années 1920, les premières productions de bactériophages en laboratoire à plus grande échelle sont lancées pour faire face à une demande mondiale. En Allemagne, on trouve l'Enterofagos®, en France en 1928 est créé le laboratoire du Bactériophage par les laboratoires Robert & Carrière qui commercialise cinq spécialités, et aux Etats-Unis c'est Eli Lilly, notamment, qui produit des phages. En Russie, l'entreprise Microgen commercialise toujours actuellement plusieurs spécialités bactériophagiques (24).

Les cinq spécialités de phages disponibles en France étaient Bacté-intesti-phage, Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-pyo-phage et Bacté-staphy-phage et permettaient de répondre aux infections les plus courantes. Elles firent l'objet d'une monographie dans la Pharmacopée française et dans le dictionnaire Vidal jusqu'en 1974 et leur production s'arrêta en 1978.

On peut dire que de 1920 à 1930 les phages sont utilisés et reconnus comme une thérapeutique efficace sur de nombreuses infections.

Malheureusement, plusieurs éléments défavorables vont contribuer à l'abandon et à l'oubli de la phagothérapie après la Seconde Guerre mondiale.

Tout d'abord, dans les années 1930, une polémique fait rage entre partisans et détracteurs des phages et de la phagothérapie. En effet, la nature virale des bactériophages (qui n'ont pas encore été observés) est remise en cause par certains chercheurs, notamment Jules Bordet (prix Nobel de médecine en 1919), qui pensent qu'il s'agit plutôt d'une protéine avec une activité enzymatique (diastase). Aux Etats-Unis, deux rapports dont les conclusions sont aussi défavorables sont rédigés.

Les résultats de certains traitements par les phages sont inégaux et contribuent à la méfiance vis-à-vis de cette thérapeutique. Le problème est qu'à l'époque on ne dispose pas des techniques de préparation et d'analyse modernes. Les spécialités et préparations de phages que l'on tente alors de produire à grande échelle ne répondent pas aux critères de qualité nécessaires à l'efficacité des phages, et aucun contrôle n'est réalisé.

En effet, pour être efficaces, les préparations de phages doivent avoir une activité réelle contre la bactérie ciblée et doivent donc être testées avant toute administration ; deuxièmement, elles doivent avoir une concentration en phages virulents minimale pour pouvoir agir. Malgré les avertissements de Félix d'Hérelle, certaines préparations de phages n'en contiennent pas assez pour qu'ils soient efficaces, c'est-à-dire, à un titre minimum de  $10^5$  PFU/mL<sup>3</sup>. Bien souvent, les

---

<sup>3</sup> Le titre, exprimé en Plages Formant Unité par millilitre (PFU/mL), représente la concentration de bactériophages actifs dans une préparation.

préparations phagiques ne sont ni contrôlées qualitativement ni quantitativement, ce qui, vu le mode d'action des bactériophages concourt à l'échec du traitement.

De plus, il faut conserver ces préparations dans des conditions définies et respecter la date limite de validité comme pour tout médicament.

La polémique dans les années 1930, l'inconstance des résultats obtenus avec la phagothérapie à l'époque, la découverte de la pénicilline et la commercialisation des premiers antibiotiques (plus simples à utiliser) signeront la fin de l'âge d'or de la phagothérapie et son abandon progressif. Les phages seront encore produits dans les Instituts Pasteur de Paris et de Lyon jusqu'au début des années 1990. Peu à peu, les banques de phages disparaîtront et les recherches sur la phagothérapie cesseront progressivement. Les phages, quant à eux, continueront à être utilisés en laboratoire dans le domaine de la biologie moléculaire.

En Europe de l'Est, côté soviétique, du fait de l'isolement des chercheurs et de l'absence d'alternatives thérapeutiques (nonaccès aux antibiotiques produits côté occidental), les recherches et l'utilisation des phages en thérapeutique perdureront jusqu'à nos jours.

Actuellement, on trouve d'ailleurs toujours deux centres de référence en phagothérapie à Wroclaw en Pologne (Ludwik Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy) et à Tbilissi en Géorgie (Institut Eliava).

Il existe par ailleurs le Centre de référence pour les virus bactériens Félix d'Hérelle de l'Université Laval à Québec au Canada créé en 1982 par le professeur Hans-Wolfgang Ackermann. Ce centre étudie et héberge une collection de bactériophages unique au monde parmi laquelle il est possible de s'en procurer à des fins d'enseignement ou de recherche. On y trouve toutes les informations qui s'y rattachent ainsi que de la documentation utile.

Après un déclin progressif à la suite de la Seconde Guerre Mondiale et l'arrêt de toute publication concernant la phagothérapie, on observe depuis les années 2000 un regain d'intérêt pour cette thérapeutique tant du côté des scientifiques que des patients qui se sentent parfois bien démunis face à l'apparition de bactéries multi-résistantes.

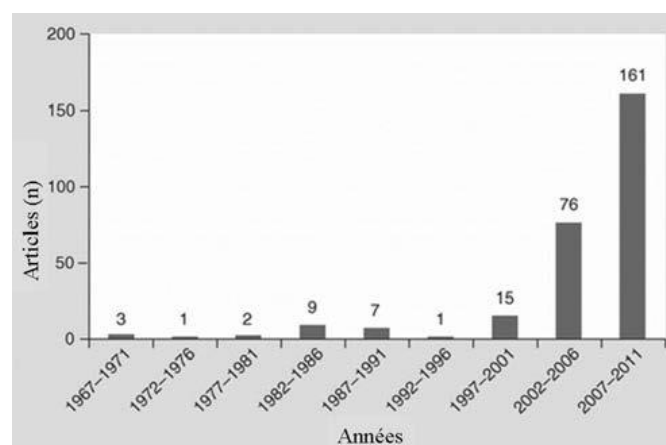


Figure 8 : articles consacrés aux bactériophages et à la phagothérapie publiés dans les revues internationales entre 1967 et 2011 (11)

## 2.2) Principe de la phagothérapie

La phagothérapie, ou thérapie phagique, repose sur le principe de bactéricidie, c'est-à-dire la mort des bactéries, entraînée par le mode de reproduction des bactériophages. Ce terme est véritablement attribué à la thérapie par les bactériophages à partir de 1926 où il est employé pour la première fois par Félix d'Hérelle dans son ouvrage « *Le bactériophage et son comportement* ».

En effet, comme tous les virus, les phages sont des parasites obligatoires, ils sont donc contraints d'utiliser leur hôte pour se multiplier. En plus d'utiliser la machinerie de la cellule hôte pour la synthèse de leurs constituants, la libération des nouveaux virus entraîne la destruction de la bactérie hôte (dans le cas des phages lytiques). C'est cette propriété des phages lytiques qui est utilisée en phagothérapie. Comme nous l'avons dit précédemment, il existe en outre des phages dits tempérés qui intègrent le génome de leur hôte sans entraîner de lyse. Ces phages sont, eux, à écarter de toute préparation à but thérapeutique.

L'action bactéricide des phages présente quelques spécificités dues à la nature virale de ces entités :

- Spécificité d'action : chaque bactériophage étant spécifique d'une espèce bactérienne cela entraîne un spectre d'action étroit avec une action ciblée sur telle ou telle bactérie.
- Rapidité d'action : un cycle phagique étant plus rapide que celui des bactéries (en moyenne 30 minutes contre une heure pour les bactéries), la lyse bactérienne est rapide et dépasse les capacités de renouvellement des bactéries ce qui aboutit à la destruction de toutes les bactéries présentes dans le milieu.
- Croissance exponentielle : contrairement aux médicaments traditionnels dont la concentration diminue avec le temps, la concentration des bactériophages augmente tant qu'il y a des bactéries présentes. Chaque cycle de multiplication donne lieu à la synthèse de 30 à 300 phages par bactérie jusqu'à disparition de toute bactérie.

Les phages font aussi preuve de grandes capacités d'évolution afin de s'adapter aux modifications des bactéries qui se produisent dans cet équilibre dynamique. Cette capacité d'évolution est mise à profit dans l'entraînement évolutif des bactériophages.

L'entraînement évolutif des phages est réalisé par passages successifs de phages sur une souche bactérienne. En exposant de nombreuses fois des bactériophages à une population importante de bactéries que l'on renouvelle à chaque passage, cela crée une pression de sélection qui pousse les bactériophages à augmenter leur répllication, l'affinité pour l'espèce bactérienne visée et la rapidité de l'infection virale.

L'objectif final est de créer un traitement « sur mesure » en entraînant les phages contre une bactérie précisément responsable de l'infection d'un patient, de rendre sa résistance plus difficile et d'améliorer l'efficacité du traitement.

## 2.3) Indications et espèces sensibles

On le sait, chaque phage est spécifique d'une espèce bactérienne (ou de quelques souches uniquement) et, pour chaque espèce de bactérie, il existe au moins un phage lui

correspondant (parfois 10 à 100). De plus, les phages représentent les entités les plus nombreuses sur la planète, présentes dans tous les milieux, et même dans notre corps. Théoriquement, la plupart des espèces bactériennes pourraient leur être sensibles. Les indications potentielles de la phagothérapie sont donc aussi larges que le nombre d'infections causées par des bactéries pathogènes. Certaines limites s'appliquent cependant aux indications des phages, nous les verrons plus loin.

Les phages ont principalement été utilisés afin de traiter les infections gastro-intestinales ; on les utilise également en cas d'infections nosocomiales, d'infections respiratoires (pneumonies), d'infections urinaires, de surinfections des plaies des grands brûlés et d'infections ostéo-articulaires. De nombreuses études ont été publiées sur divers types d'infections chez l'Homme et l'animal. Cependant, les essais réalisés dans l'ex-Union Soviétique qui ne répondent pas aux normes actuelles et l'absence de législation adaptée aux phages font que nous ne disposons pas d'essais contrôlés récents pouvant servir de support à la réintroduction de la phagothérapie. Pour remédier à cela des essais thérapeutiques ont été mis en place en Europe : PhagoBurn (infections cutanées chez des patients brûlés), dont les résultats viennent d'être publiés et PHOSA (infections ostéo-articulaires), dont la phase clinique devrait bientôt débiter. Nous y reviendrons dans la troisième partie.

## **2.4) Avantages et inconvénients des phages et de la phagothérapie**

### **2.4.1) Avantages des bactériophages**

La spécificité est l'une des caractéristiques principales des bactériophages. La spécificité étroite d'un phage sur une espèce bactérienne donnée a pour effet que seule la bactérie concernée est traitée. Cela entraîne donc comme conséquence que :

- Les phages n'ont pas d'impact sur la flore commensale et le microbiote intestinal ce qui évite les effets secondaires dus au déséquilibre de cette flore.
- Il n'y a pas de pression de sélection induite par l'utilisation des phages et donc pas d'augmentation des résistances bactériennes aux phages. De plus, l'emploi de la phagothérapie permet de réduire l'usage des antibiotiques et donc de diminuer les résistances aux antibiotiques (11).
- L'utilisation des phages n'entraîne pas de résistances croisées entre antibiotiques et phages. Aussi, le fait qu'une bactérie soit résistante à un ou plusieurs antibiotiques n'empêche absolument pas le traitement par un phage.

Les bactériophages constituent une ressource illimitée contre toute bactérie potentiellement pathogène par leur présence dans l'environnement, leur capacité d'adaptation naturelle et l'entraînement évolutif que l'on peut réaliser en laboratoire. On peut dire qu'il n'existe pas de bactérie définitivement résistante aux phages !

Nous vivons entourés de phages et nous y sommes exposés dès notre plus jeune âge car ils sont présents partout dans l'environnement, notre organisme et notre alimentation. Les phages ne présentent donc aucun problème d'innocuité et de tolérance. L'expérience a montré qu'ils présentent très peu d'effets indésirables et n'induisent pas d'effets allergisants.

Leur présence naturelle dans l'environnement fait qu'il est également aisé de se procurer des phages. La préparation et la purification de suspensions thérapeutiques sont aussi relativement simples et peu coûteuses, si l'on dispose d'un laboratoire capable de réaliser cette préparation.

Toujours en laboratoire, il est possible d'augmenter la concentration et la virulence des phages par entraînement évolutif. Grâce aux techniques de biologie moléculaire actuelles, il est aussi possible de modifier un phage pour lui donner des caractéristiques supplémentaires, mais nous entrons là dans le domaine des OGM... Les conséquences de l'utilisation et du rejet dans l'environnement de phages génétiquement modifiés sont pour l'instant encore inconnues et nécessitent une surveillance active.

#### 2.4.2) Inconvénients des phages et limites de la phagothérapie

Le spectre d'action étroit des phages est, on l'a vu, un avantage mais il constitue aussi un inconvénient. Effectivement, cette spécificité impose de devoir prélever, isoler et identifier la bactérie responsable de l'infection sous peine d'administrer au patient un phage inefficace sur la bactérie en question. Toutes ces étapes demandent du temps et imposent une collaboration étroite entre médecins et bactériologistes. Cela signifie donc qu'il ne peut pas y avoir de traitement probabiliste avec la phagothérapie comme avec les antibiotiques et qu'elle n'est pas indiquée dans les infections aiguës nécessitant une prise en charge rapide. Nous verrons plus tard qu'il est possible dans certains cas de contourner cette affirmation en optant pour une stratégie de traitement « prêt-à-porter » par l'administration d'un cocktail de phages à large spectre. Un « cocktail » peut être un mélange de plusieurs phages de spectres différents pour une même espèce bactérienne ou pour plusieurs espèces ou genres bactériens (10).

Le spectre d'action étroit des phages pose également un problème dans le cas d'infections à germes multiples. Là encore, on peut administrer un cocktail de plusieurs phages spécifiques des différents germes afin de traiter cette infection.

À cause de leur mode de reproduction, les phages seront peu ou pas actifs sur des bactéries quiescentes car ils ont besoin d'utiliser la machinerie d'une bactérie en division.

Un autre inconvénient, dû à leur nature de parasite obligatoire, est le fait que les bactéries doivent être accessibles aux phages pour qu'ils puissent les coloniser. Cette caractéristique exclut donc des indications de la phagothérapie les infections à germes intracellulaires. Des recherches sur la vectorisation des phages sont en cours afin de trouver des moyens de surmonter cette limite. Les infections comme les infections neuro-méningées ou qui nécessitent l'injection des phages sont pour l'instant difficiles à prendre en charge car la diffusion des phages n'est pas assurée.

Un inconvénient utilisé comme argument de défiance par les détracteurs de la phagothérapie est la transmission par transduction de gènes de virulence, de résistance, de toxine ou induisant un pouvoir pathogène à des bactéries par les phages. Des tests (analyse génomique) doivent donc être effectués de façon à s'assurer que le phage d'intérêt est strictement lytique.

Enfin, comme nous l'avons dit plus haut, les phages sont très bien tolérés et entraînent peu d'effets indésirables par rapport aux antibiotiques. Quelques effets secondaires ont tout de même été rapportés. En début de traitement il peut s'agir de fièvre, de céphalées ou d'une

douleur hépatique dues à la libération d'endotoxines (LPS), produits de la lyse bactérienne. La survenue d'un choc anaphylactique est possible à cause de la réaction immunitaire entraînée par l'apparition d'anticorps neutralisants contre des protéines virales. Ces phénomènes restent cependant rares et la majorité des traitements par phages n'entraîne pas d'effets secondaires (2).

### **3. L'antibiorésistance, un enjeu de santé publique mondiale**

#### **3.1) Définition et état des lieux**

L'antibiorésistance (ou résistance aux antibiotiques), est la capacité pour certaines bactéries d'être insensibles aux effets d'un ou de plusieurs antibiotiques. C'est un phénomène qui peut être naturel ou acquis.

On parle de résistance acquise lorsqu'une bactérie normalement sensible à un ou plusieurs antibiotiques devient résistante à ces antibiotiques.

Les mécanismes de résistance étant variés et s'étant répandus parmi toutes les familles de bactéries on parle maintenant de bactéries multi-résistantes (BMR), de bactéries très résistantes (« *superbug* » pour superbactéries) voire même de bactéries totalement résistantes aux antibiotiques (*pandrug resistant* PDR) (2).

L'émergence de ces bactéries résistantes remet donc en cause le monopole de l'antibiothérapie dans la lutte contre les infections bactériennes et implique de trouver de nouvelles alternatives thérapeutiques (modification des caractéristiques d'un antibiotique ou découverte de nouvelles molécules) afin que nous n'assistions pas, impuissants, au retour d'une ère pré-antibiotique. C'est dans ce contexte de « pénurie » de traitement face à certaines situations que la phagothérapie montre – à nouveau – son intérêt dans la prise en charge des infections bactériennes. L'enjeu actuel est d'adapter la phagothérapie aux règles en vigueur de nos jours et de transformer un traitement empirique, utilisé à titre compassionnel, en médicaments efficaces et disponibles dès que nécessaire.

Différents facteurs entrent en jeu dans le problème de l'antibiorésistance et une prise de conscience de tous les acteurs impliqués est nécessaire afin de parvenir à maîtriser ce fléau. Au niveau mondial, européen et français, plusieurs plans d'action ont été adoptés et mis en œuvre afin de lutter contre l'antibiorésistance.

En 2017, l'OMS a publié une liste de douze bactéries résistantes représentant une menace mondiale et pour lesquelles il est urgent de trouver un traitement. Ces bactéries sont classées en trois niveaux de priorité : critique, élevée ou moyenne, selon le risque de mortalité qu'elles entraînent et le nombre d'antibiotiques auxquels elles résistent (18).

Quelques chiffres permettent de mieux comprendre la situation : dans le monde, les microbes résistants à divers antimicrobiens seraient responsables de 700 000 décès par an (étude de Jim O'Neill, 2016), dont 25 000 en Europe. En 2050, si rien ne change, les infections résistantes pourraient causer 10 millions de décès dans le monde, et dépasser ainsi le cancer (18).

En France, en 2012, une étude estimait le nombre d'infections à BMR à 158 000 conduisant à 12 500 décès (étude Burden BMR (25), agence Santé publique France).

Concernant les dépenses de santé, les coûts des conséquences de l'antibiorésistance sont estimés à 1,5 milliard d'euros par an en Europe.

### **3.2) Mécanismes de résistance des bactéries**

#### **3.2.1) Résistances aux antibiotiques**

Certaines bactéries sont naturellement insensibles à certains antibiotiques (résistance naturelle), par la production d'enzymes les dégradant par exemple, d'autres vont acquérir une résistance au cours de l'évolution, c'est alors une résistance acquise.

Les résistances acquises peuvent résulter de plusieurs mécanismes. Les bactéries peuvent obtenir des caractères de résistance *via* l'apparition de mutations génétiques sur leur chromosome ou, *via* le transfert d'une bactérie résistante à une autre, d'information génétique porteuse de gènes de résistance sous la forme de plasmides ou de transposons. Ce transfert peut s'effectuer soit par transduction (transfert indirect de gènes *via* les bactériophages) soit par conjugaison (transfert direct entre bactéries) (2). La conjugaison peut être multiple et être source de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques.

Les résistances plasmidiques concernent souvent plusieurs antibiotiques alors que les résistances chromosomiques ne concernent en général qu'un antibiotique ou qu'une seule famille d'antibiotiques.

La résistance peut s'exprimer par la production d'enzymes dégradant les antibiotiques comme dans la nature, nous l'avons dit ; la modification de la cible de l'antibiotique ou l'imperméabilisation de la membrane de la bactérie sont aussi des moyens de résistance (26).

La formation d'un biofilm constitue également un moyen de résistance car, dans cet état, les bactéries deviennent inaccessibles aux antibiotiques (et aux bactériophages).

Le phénomène de résistance s'est amplifié avec l'utilisation massive des antibiotiques chez l'homme et l'animal (en tant que facteurs de croissance notamment). En effet, plus l'utilisation des antibiotiques est importante, plus les résistances augmentent rapidement. Cela entraîne une pression de sélection sur les populations bactériennes qui élimine notamment les bactéries commensales sensibles et laisse le champ libre aux bactéries résistantes pour se développer.

#### **3.2.2) Résistances aux bactériophages (3)**

L'infection d'une bactérie par un phage se fait en plusieurs étapes avec à chaque étape l'intervention d'éléments spécifiques. Selon l'espèce bactérienne considérée, le phage correspondant aura des protéines de liaison spécifiques et des mécanismes adaptés à son hôte. Pour riposter, les bactéries ont donc développé des moyens de résistance qu'elles peuvent mettre en place à chaque étape de l'infection par le phage.

Ces mécanismes sont nombreux et variables selon l'espèce bactérienne et le phage considéré.

La résistance bactérienne aux phages reste un phénomène rare et beaucoup moins important que celle concernant les antibiotiques.

Les principaux mécanismes de résistance sont notamment :



- L'inhibition de l'adsorption virale. Par mutation, masquage ou non expression des récepteurs bactériens des phages, la bactérie empêche le virus de la reconnaître et de s'y arrimer.
- Le blocage de l'injection de l'ADN viral ce qui stoppe la poursuite du cycle phagique.
- La variation de phase qui permet à la bactérie de s'adapter à des variations de conditions environnementales.
- L'infection abortive, qui entraîne le suicide de l'hôte et enraye la multiplication virale, ou un système toxine / antitoxine.
- La dégradation du génome viral par des nucléases bactériennes (système CRISP-Cas, qui constitue une mémoire héréditaire des bactéries entraînant des réponses de type immunitaire contre de l'ADN étranger)

On peut tout de même prévenir le risque de résistance des bactéries aux phages en associant plusieurs phages ayant des cibles différentes dans une préparation (cocktail de phages spécifiques de différentes souches d'une même espèce bactérienne ou d'espèces différentes) comme on le ferait avec plusieurs antibiotiques.

La résistance des bactéries aux phages n'est pas toujours un phénomène complètement négatif. En effet, dans de rares cas, si la résistance entraîne une modification physique de la bactérie ou si le récepteur modifié ou supprimé est un facteur de virulence, cela diminue ou fait perdre le pouvoir de virulence de la bactérie. Cela peut aussi être à l'origine d'une re-sensibilisation de la bactérie à des antibiotiques auxquels elle était résistante.

### 3.3) Comparaison entre antibiotiques et bactériophages

Du fait de leur nature, l'une chimique, l'autre virale, les antibiotiques et les bactériophages possèdent de nombreuses différences. Il ne faut cependant pas chercher à les opposer et tenter d'exclure totalement l'une ou l'autre de ces thérapeutiques. Souvent présentée comme une alternative à l'antibiothérapie, la phagothérapie constitue plutôt une option thérapeutique, une arme supplémentaire dans la lutte contre l'antibiorésistance et la prise en charge des infections à BMR. Parmi d'autres pistes, c'est celle qui représente, pour certaines infections, la plus aboutie. La manière la plus prometteuse, et sûrement la plus efficace d'utiliser la phagothérapie, serait de l'utiliser de façon complémentaire, en association à une antibiothérapie appropriée. On a en effet observé une synergie d'action entre antibiotiques et phages agissant par potentialisation des deux antibactériens ou grâce à l'inhibition des biofilms par les phages. Plusieurs études ont suggéré que l'association des deux thérapeutiques serait plus efficace que l'une ou l'autre utilisée seule.

Une équipe française a découvert un phénomène qu'elle a appelé la « synergie phages – antibiotiques » (PAS) (27). Cette découverte va dans le sens de l'utilisation concomitante de ces traitements et montre aussi la capacité d'adaptation des phages dans la nature. En effet, les chercheurs ont observé que l'ajout d'antibiotiques à faible dose sur une culture bactérienne a augmenté la production de phages et la rapidité de la lyse bactérienne. Ce phénomène a été observé avec plusieurs types de phages et des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et des quinolones. En présence d'antibiotiques, les bactéries sont « stressées » et les phages

profitent de cet état pour augmenter le nombre de virus produits par cycle. Ils assurent ainsi leur survie dans le cas où les bactéries seraient détruites par les antibiotiques.

Les organismes naturellement producteurs d'antibiotiques et les phages seraient capables de s'associer afin de mieux combattre d'autres bactéries concurrentes. En thérapeutique, l'utilisation de ces traitements mixtes (antibiotiques + phages) devrait permettre une meilleure efficacité et une meilleure tolérance. De plus, il semblerait que l'utilisation de ces traitements mixtes soit mieux acceptée (28).

D'autres arguments vont dans le sens de cette association. Tout d'abord, on sait que l'association de plusieurs agents permet de diminuer la pression de sélection. Ensuite, on sait qu'il est utile de réduire la masse bactérienne avant un traitement. Ce sera le rôle des bactériophages qui agiront en premier dans une stratégie en deux temps : d'abord, les phages entraîneront une baisse rapide du nombre de bactéries, puis les antibiotiques pourront agir sur la population bactérienne restante. Enfin, l'association phages – antibiotiques permettrait de ralentir la résistance des bactéries aux antibiotiques en augmentant la durée d'utilisation de certains antibiotiques et permettrait aussi, par la stratégie vue ci-dessus, de diminuer les doses d'antibiotiques afin de limiter leurs effets toxiques.

Actuellement, la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques est au ralenti, pour certaines infections nous avons même à faire à une pénurie de molécules efficaces. Plusieurs raisons expliquent l'absence d'arrivée de nouveaux antibiotiques sur le marché. Le coût et le temps nécessaires à la recherche de molécules ainsi que le nombre d'étapes à franchir avant la commercialisation d'un nouvel antibiotique constituent un frein pour l'industrie pharmaceutique. En outre, les antibiotiques ne représentent pas les classes médicamenteuses les plus rentables par rapport à d'autres traitements chroniques. De plus, les nouvelles recommandations qui sont apparues pour faire face à l'antibiorésistance (diminuer la durée de traitement, limiter les molécules de dernier recours, utiliser des molécules au spectre le plus étroit possible) ne poussent pas les industries pharmaceutiques à investir. Enfin, le développement rapide et l'utilisation massive de nombreuses familles d'antibiotiques jusqu'à maintenant font qu'il est également plus complexe de trouver de nouvelles molécules qui agissent sur un mécanisme bactérien encore sensible à ces molécules.

La nature constitue quant à elle un réservoir inépuisable de phages déjà disponibles. La préparation de suspensions thérapeutiques est beaucoup plus rapide, simple et moins coûteuse à mettre en œuvre que le développement de nouveaux antibiotiques.

Le mode d'action, la spécificité, la pharmacologie ou les effets secondaires sont les principales différences entre phages et antibiotiques. C'est aussi ce qui permet de les associer et de les utiliser de façon complémentaire. Le Tableau 2 synthétise ces principales différences.

Tableau 2 : comparaison des caractéristiques des antibiotiques et de la phagothérapie.  
D'après (10), (11)

	<b>ANTIBIOTIQUES</b>	<b>BACTÉRIOPHAGES</b>
<b>MODE D'ACTION</b>	Bactériostatique ou bactéricide (selon site d'action)	Bactéricide (cycle lytique)
<b>PHARMACOLOGIE</b>	Métabolisés <i>in vivo</i> , pharmacocinétique connue → modalités d'administration bien définies	Auto-réplication et auto-limitation au site de l'infection Pharmacocinétique et pharmacodynamie mal connues
<b>SPÉCIFICITÉ D'ACTION</b>	Peu spécifiques (action sur la flore commensale)	Très spécifiques → spectre d'activité étroit
<b>CIBLE</b>	Selon le mode d'action  Traitement probabiliste ou documenté	Une espèce bactérienne / quelques souches  Bactérie connue ou supposée, le diagnostic bactériologique doit être établi
<b>FABRICATION</b>	Développement industriel long et très coûteux	Procédé industriel rapide et peu coûteux (phages naturels)
<b>RÉGLEMENTATION</b>	Réglementation adaptée et médicaments autorisés	Phages absents des textes
<b>EFFETS SECONDAIRES</b>	Nombreux et variés	Très rares, minimes
<b>LIMITES</b>	* Tolérance et effets secondaires * Antibiorésistance	* Bactéries intracellulaires * Infections parenchymateuses et à germes multiples

**Partie II :**  
**La phagothérapie actuelle en pratique et son avenir**

---

## **1. Modalités d'utilisation des bactériophages en thérapeutique**

### **1.1) Préparation des suspensions thérapeutiques en laboratoire (2)**

Pour préparer une suspension thérapeutique à partir d'un échantillon de bactériophages que l'on a prélevé dans la nature (on en trouve facilement, dans des eaux usées par exemple) plusieurs étapes sont à respecter. Les échantillons contenant de nombreux phages différents, on pourra identifier le phage d'intérêt contre la bactérie cible en utilisant ce qui a permis la découverte des phages, c'est-à-dire, la présence de plages claires à la surface des boîtes de Pétri signifiant une activité lytique du phage envers cette bactérie. Si l'on dispose d'un phage de spécificité déjà connue extrait d'une phagothèque (collection de phages identifiés et purifiés) par exemple, on réalisera directement la propagation et l'adaptation des phages afin de garantir l'efficacité de la préparation sur la souche bactérienne incriminée.

#### **1.1.1) Propagation**

Tout d'abord, commencer par centrifuger et décanter l'échantillon naturel pour éliminer les gros débris, puis filtrer avec un filtre de 0,2 µm afin d'éliminer les bactéries et particules étrangères.

Mettre les bactéries cibles et les phages en contact en mélangeant les bactéries dispersées dans un bouillon à l'échantillon filtré obtenu précédemment.

Incuber ce mélange pendant quelques heures à 35°C sous agitation douce. À ce moment-là, s'il y a présence de phages spécifiques de la bactérie cible il y aura une forte multiplication de ces phages. Dans le cas contraire, il n'y aura rien.

À la fin de l'incubation, ajouter quelques gouttes de chloroforme au mélange afin de détruire les bactéries restantes et d'arrêter la multiplication des phages.

Centrifuger et filtrer à nouveau afin d'éliminer les débris bactériens.

À l'issue de cette étape, si l'échantillon contenait des phages spécifiques ils se seront multipliés. Cependant, il est possible qu'il y ait plusieurs types de phages spécifiques de la même bactérie. Il est donc nécessaire d'effectuer une purification afin de séparer les différents clones.

#### **1.1.2) Purification**

Le principe à connaître pour réaliser l'opération de purification est qu'une plage de lyse correspond à un clone phagique.

Diluer plusieurs fois (de dix en dix) la solution obtenue précédemment afin d'obtenir une dispersion de phages isolés.

Mettre les bactériophages et les bactéries cibles en contact sur une boîte de Pétri soit par isolement direct (déposer un tapis bactérien à la surface d'une gélose puis les bactériophages) soit par la méthode en double couche (mélanger bactéries et phages dans une gélose liquide coulée à la surface de la gélose).

Après incubation, choisir une ou plusieurs plages de lyse à purifier, sachant que les plages différentes correspondent à des phages différents. Prélever et propager chaque plage sur une suspension fraîche contenant la bactérie cible en suivant la technique de la propagation.

Recommencer cette étape plusieurs fois (en général deux à trois fois suffisent) afin d'obtenir un clonage parfait. Cette étape correspond à l'adaptation ou entraînement évolutif des phages.

### 1.1.3) Numération ou titrage

Afin de garantir une efficacité thérapeutique à la préparation phagique il faut s'assurer que le titre, c'est-à-dire, la concentration en particules phagiques actives, est suffisant. Le titre recommandé pour toute suspension thérapeutique est de  $10^5$  PFU/mL voire  $10^7$  à  $10^9$  PFU/mL.

### 1.1.4) Contrôles

Les principaux contrôles consistent en la vérification de l'activité en réalisant un phagogramme et en celle du titre qui doit être suffisant.

On peut définir le phagogramme comme l'équivalent de l'antibiogramme. Afin de vérifier si un phage aura une activité contre une bactérie désignée on peut tout à fait réaliser le dépôt d'un tapis de bactéries sur une gélose puis déposer une goutte de chaque suspension de phages que l'on souhaite tester à la surface. On incube 18 à 24 heures puis on observe l'aspect de la gélose : l'apparition de « trous » au niveau des colonies bactériennes correspond aux plages de lyse et montre que le ou les phages ont bien une activité lytique envers cette bactérie.

Afin de respecter les règles de Bonnes Pratiques et de permettre l'administration aux patients en toute sécurité, d'autres contrôles qualité doivent aussi être effectués sur le produit fini : stérilité ou apyrogénicité, pureté en phages, dosage des impuretés chimiques (excipients, agents de purification) et dosage des résidus bactériens.

## 1.2) **Précautions à prendre avant toute thérapie phagique**

Plusieurs étapes sont à respecter avant l'administration de phages si l'on veut s'assurer de l'efficacité de la phagothérapie (voir Figure 9). Ces quelques précautions sont indispensables à un traitement de qualité.

Tout d'abord, il s'agit d'isoler et d'identifier la bactérie responsable de l'infection, c'est-à-dire, réaliser le diagnostic bactériologique. Ensuite, il faut tester le ou les phages normalement actifs contre cette espèce afin de vérifier leur spécificité. Pour cela, on peut réaliser un phagogramme. Enfin, lorsqu'on dispose bien de phages spécifiques de la bactérie pathogène il est important d'adapter ces phages, c'est-à-dire, d'augmenter encore leur spécificité en réalisant un entraînement évolutif.

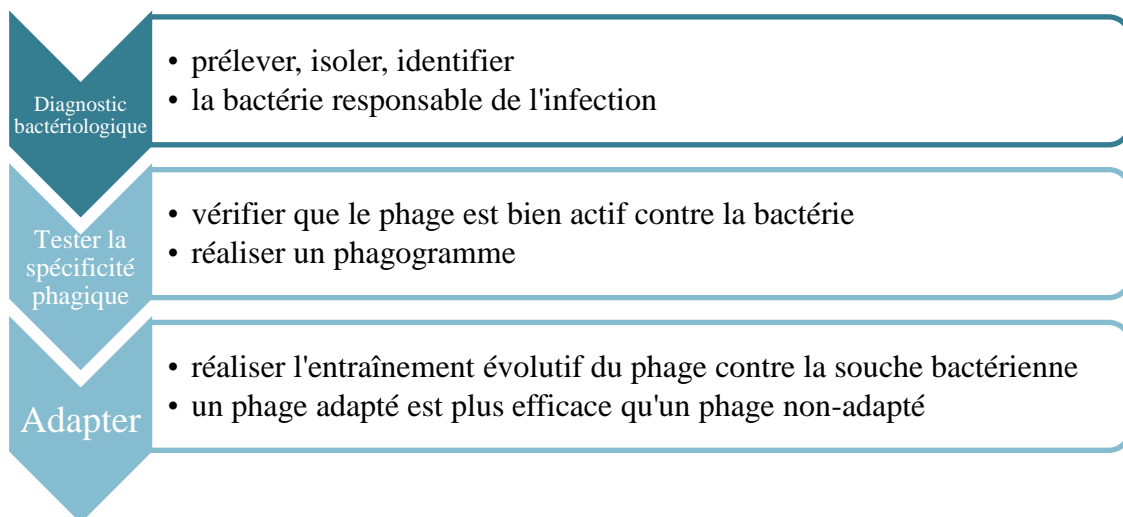


Figure 9 : précautions à prendre avant une phagothérapie.

### 1.3) Facteurs influençant la phagothérapie (29)

Plusieurs facteurs vont avoir une influence sur le comportement des bactériophages et l'efficacité de la phagothérapie (voir Figure 10). Effectivement, les données des conditions *in vitro* ne peuvent être directement transposées à la situation *in vivo* et, de plus, les données relatives à un phage particulier ne peuvent être associées à un autre phage étant donné leur étroite spécificité. Les paramètres physio-pathologiques du patient ainsi que différents facteurs inhérents aux phages et aux bactéries affectent donc la réussite du traitement.

#### 1.3.1) MOI ou ratio bactériophages / bactéries

Le terme MOI (multiplicité d'infection) représente le rapport entre le nombre de bactériophages et le nombre de bactéries cibles. Cela désigne le nombre de nouveaux virus produits par cellule au cours d'une infection.

Il apparaît que la concentration de phages dans le milieu est un paramètre important pour l'efficacité du traitement car une concentration insuffisante de phages ne permettra pas de lyser toute la population bactérienne ciblée. Il est donc primordial que les préparations thérapeutiques contiennent de fortes concentrations de phages afin que le nombre de phages soit suffisant au site de l'infection.

#### 1.3.2) Conditions environnementales

Nous l'avons vu précédemment, les phages sont généralement stables face aux conditions externes et peuvent même supporter des conditions plus extrêmes que la majorité des bactéries, comme des températures élevées (de 40 à 90°C). Cependant, les divers facteurs physico-chimiques peuvent influencer les phages. Il est donc nécessaire de les connaître et de les prendre en compte afin de garantir une bonne utilisation *in vivo* et une conservation optimale des phages.

Il est possible de conserver des phages sous forme liquide ou sèche pendant de longues périodes à un pH neutre. Le titre des phages diminue généralement lentement avec le pH. Un pH acide comme le pH gastrique peut avoir une influence sur les phages et les rendre inactifs.

Pour les phages sous forme liquide, la conservation dans des enceintes réfrigérées est conseillée car cela augmente la période de latence.

### 1.3.3) Dose et moment du traitement

Plusieurs études animales ont montré qu'il vaut mieux administrer plusieurs doses de phages plutôt qu'une seule. En outre, plus l'administration de phages est précoce, plus le nombre d'animaux guéris est important puis le nombre d'animaux guéris diminue avec le temps. Il est donc recommandé d'administrer les phages le plus tôt possible et de façon répétée.

### 1.3.4) Accessibilité des phages

Pour être efficaces, les phages doivent être au contact de leur bactérie cible. Or, certaines bactéries ne sont pas accessibles aux phages, comme les bactéries intracellulaires ou celles à l'origine d'infections parenchymateuses. De plus, les phages ne diffusent pas à travers les membranes. Il faut donc trouver un moyen de les véhiculer ou de les déposer directement au niveau du site infectieux. Pour cela, on peut utiliser différents moyens de vectorisation comme la microencapsulation qui permettrait à la fois de transporter les phages mais aussi de les protéger d'une éventuelle neutralisation.

La composition du milieu serait aussi un élément qui influencerait sur la diffusion des phages.

### 1.3.5) Autres facteurs

Plusieurs autres facteurs qui entrent en compte dans l'efficacité de la phagothérapie sont développés dans d'autres paragraphes, nous ne ferons donc que les évoquer ici.

#### *a) Spécificité*

Nous l'avons vu, la spécificité des phages est un facteur essentiel de tout traitement phagique. Le spectre étroit des phages détermine une gamme d'hôtes contre lesquels ils seront actifs. La connaissance de la bactérie responsable de l'infection et la vérification de l'activité des phages contre cette bactérie sont donc essentielles à la réussite de la phagothérapie.

Il existe des phages polyvalents qui peuvent infecter plusieurs souches d'une même espèce bactérienne. L'utilisation d'un cocktail de phages permet également d'augmenter le spectre d'activité phagique. De plus, il est conseillé que les préparations contiennent au moins trois phages différents actifs sur la souche bactérienne visée afin de garantir son efficacité (11).

#### *b) Neutralisation*

L'apport de protéines phagiques immunogènes pourrait entraîner une réponse immunitaire adaptative et être à l'origine de l'apparition d'anticorps dirigés contre ces phages, aboutissant à leur neutralisation en cas d'injection intraveineuse principalement.

Le système réticulo-endothélial, notamment le foie et la rate, élimine de façon rapide et efficace les bactériophages de la circulation sanguine par la reconnaissance de motifs protéiques spécifiques des phages (30).



c) *Résistance*

Les bactéries peuvent devenir résistantes aux phages par différents mécanismes. Cependant, ce phénomène est beaucoup moins important qu'avec les antibiotiques. Il est possible de contourner ces résistances en utilisant un cocktail de phages ou en isolant et en sélectionnant de nouveaux phages naturels, ce qui est un processus moins long et coûteux que le développement de nouveaux antibiotiques.

d) *Voie d'administration*

La voie d'administration dépend beaucoup de la localisation du foyer infectieux. L'expérience a montré que les phages pouvaient être employés *via* différentes voies d'administration. On peut les administrer par voie orale, locale, intraveineuse, intrapéritonéale, nasale.

Pour une administration topique, en cas de plaies infectées notamment, on utilise les phages en imprégnant des pansements ou des compresses de suspensions phagiques.

Pour d'autres voies locales, les phages peuvent être utilisés sous plusieurs formes galéniques comme des suppositoires, des comprimés, de la poudre sèche ou en aérosol.

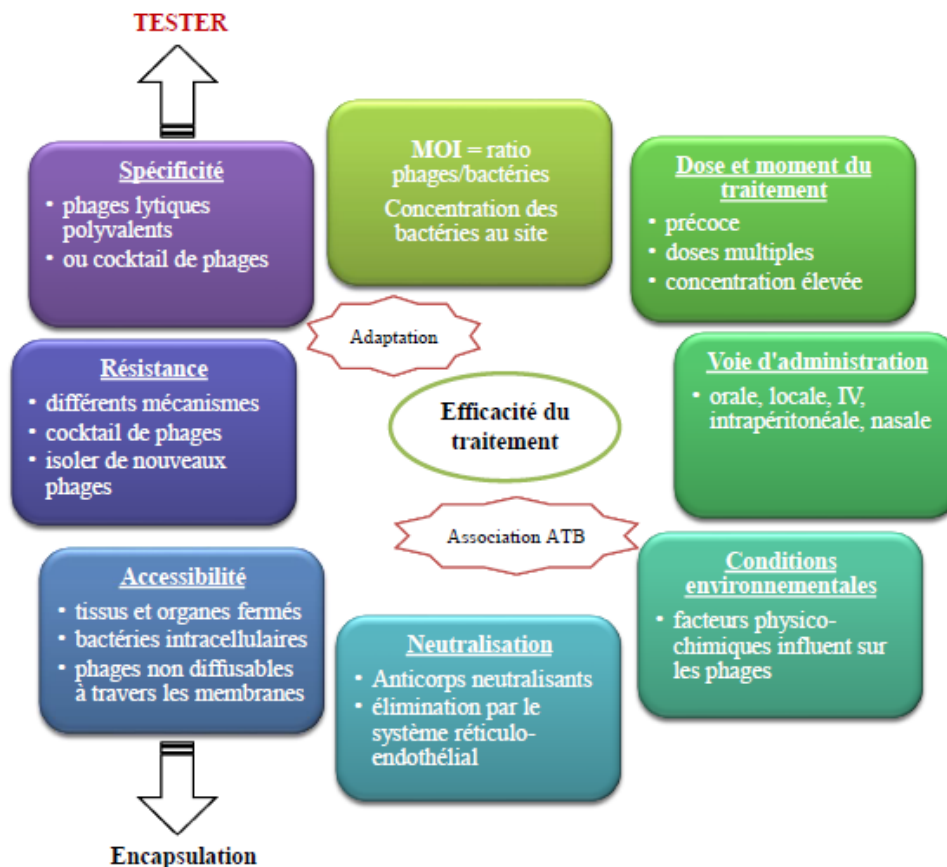


Figure 10 : schéma récapitulatif des facteurs influençant l'efficacité de la phagothérapie. D'après (2), (29)

#### 1.4) Voies d'administration

Les phages doivent être amenés au niveau du site de l'infection pour être actifs ; ils se multiplieront alors et disparaîtront avec les bactéries hôtes. Dans la pratique, de nombreuses voies d'administration ont été utilisées pour un usage interne ou externe. Les phages sont principalement utilisés sous forme liquide (suspensions buvables ou injectables) et sont administrés directement ou au sein de véhicules comme des suppositoires, des ovules, des pansements, en poudre ou en aérosol. En effet, de nombreuses voies d'administration sont possibles selon l'infection concernée : orale, locale, rectale, sous-cutanée, parentérale (intraveineuse ou intramusculaire), par nébulisation ou péritonéale (21).

Certaines voies nécessitent cependant quelques précautions :

- Les phages sont inactivés par le pH acide de l'estomac. En cas d'utilisation par voie orale on devra donc soit modifier le pH gastrique, soit protéger les phages du contact de l'estomac en utilisant des vecteurs par exemple (11).
- Certaines protéines des phages sont immunogènes. Dans la circulation sanguine, le contact des phages avec le système immunitaire peut donc être à l'origine de l'apparition d'anticorps anti-bactériophages. En cas d'administration parentérale, une inactivation des phages par ces anticorps est donc possible. Cela implique qu'en théorie on ne pourrait injecter dans la circulation sanguine un type précis de phage qu'une seule fois avant qu'il ne soit reconnu et inactivé par le système immunitaire. L'utilisation a cependant montré que les anticorps neutralisants n'apparaissent pas avant une à deux semaines, ce qui laisse le temps de débiter le traitement ou de traiter une infection aigüe (2). Cet obstacle peut être surmonté en répétant l'administration des phages ou en augmentant leur concentration. Il est aussi possible d'utiliser des phages différents actifs sur la même bactérie car les anticorps produits sont différents d'un phage à l'autre (29).

Afin d'amener les phages au contact de leurs bactéries cibles, des recherches sur différents moyens de vectorisation sont actuellement en cours.

La vectorisation est une technique qui consiste à moduler et à contrôler la distribution d'un principe actif vers une cible en l'associant à un vecteur. On peut ainsi contrôler la distribution du principe actif de façon temporelle, spatiale ou quantitative (31).

Dans certains cas, les phages peuvent constituer des vecteurs, mais, dans le cadre de leur administration, ce sont les phages qui nécessitent des vecteurs afin de moduler leur libération. Plusieurs types de vecteurs sont étudiés actuellement, comme, par exemple, l'hydroxyapatite, le chitosan ou divers biopolymères. Une application serait, en chirurgie orthopédique, l'incorporation de phages (associés ou non à des antibiotiques) dans un biopolymère qui permettrait de recouvrir des implants afin de leur procurer une activité anti-infectieuse à la fois préventive et curative.

L'encapsulation des phages dans des liposomes est un moyen qui permet de les transporter en évitant leur inactivation par l'organisme (par le pH gastrique ou les anticorps neutralisants notamment) mais qui permettrait aussi de les introduire dans les cellules ; les phages pourraient ainsi atteindre les bactéries intracellulaires (2).

L'utilisation de différentes formes galéniques est également un moyen de vectorisation. En effet, en incluant les phages dans des suppositoires, des ovules, une poudre ou un aérosol on réalise une administration locale au plus proche du foyer infectieux concerné et on évite la dégradation des phages par le pH gastrique.

### 1.5) Stratégies thérapeutiques (3), (11)

Selon le type d'infection et la situation thérapeutique du patient, deux stratégies principales de prise en charge s'offrent au thérapeute : le « prêt-à-porter » ou le « sur mesure » (voir Figure 11).

- La phagothérapie dite « **sur mesure** » correspond à une préparation contenant les phages spécifiques de la bactérie responsable de l'infection du patient, réalisée de façon extemporanée spécialement pour traiter ce patient. Cela nécessite d'avoir réalisé le diagnostic bactériologique de la souche incriminée au préalable et de disposer du phage correspondant. Cette stratégie est donc applicable dans des infections chroniques et sans pronostic vital engagé à court terme. Cette prise en charge est intéressante notamment dans les infections ostéo-articulaires chroniques, avec ou sans matériel, où de bons résultats ont déjà été obtenus lors de traitements de patients à titre compassionnel.
- La phagothérapie dite « **prêt-à-porter** » a déjà été utilisée par le passé. Elle correspond à l'utilisation de préparations commerciales de phages contenant les phages actifs sur les bactéries habituellement responsables de différents types d'infections. Cette stratégie est indiquée dans des situations assez urgentes où le pronostic vital du patient est engagé. La réalisation de ces cocktails de phages requiert une veille microbiologique afin d'adapter leur composition pour garantir une efficacité contre les souches virulentes au moment de l'infection.

L'utilisation complémentaire de ces deux stratégies est aussi possible. Après avoir réalisé des prélèvements, et dans l'attente des résultats, on peut administrer une préparation « prêt-à-porter » puis, dès que cela est possible, réaliser le traitement « sur mesure ».

Bien sûr, chaque situation est différente et chaque traitement sera adapté de façon individuelle par discussion de l'équipe soignante. Tout traitement de phagothérapie se fait au cas par cas ; la composition de la préparation thérapeutique, le mode d'administration, la posologie et la durée de traitement seront établis individuellement pour chaque patient.

Pour l'instant, il n'existe pas ou peu de recommandations prédéfinies concernant l'utilisation des phages (indications, posologie, durée de traitement...). C'est peut-être en cela que les recherches devront apporter des réponses, c'est aussi la condition nécessaire à la disponibilité de préparations commerciales de phages dans les officines.

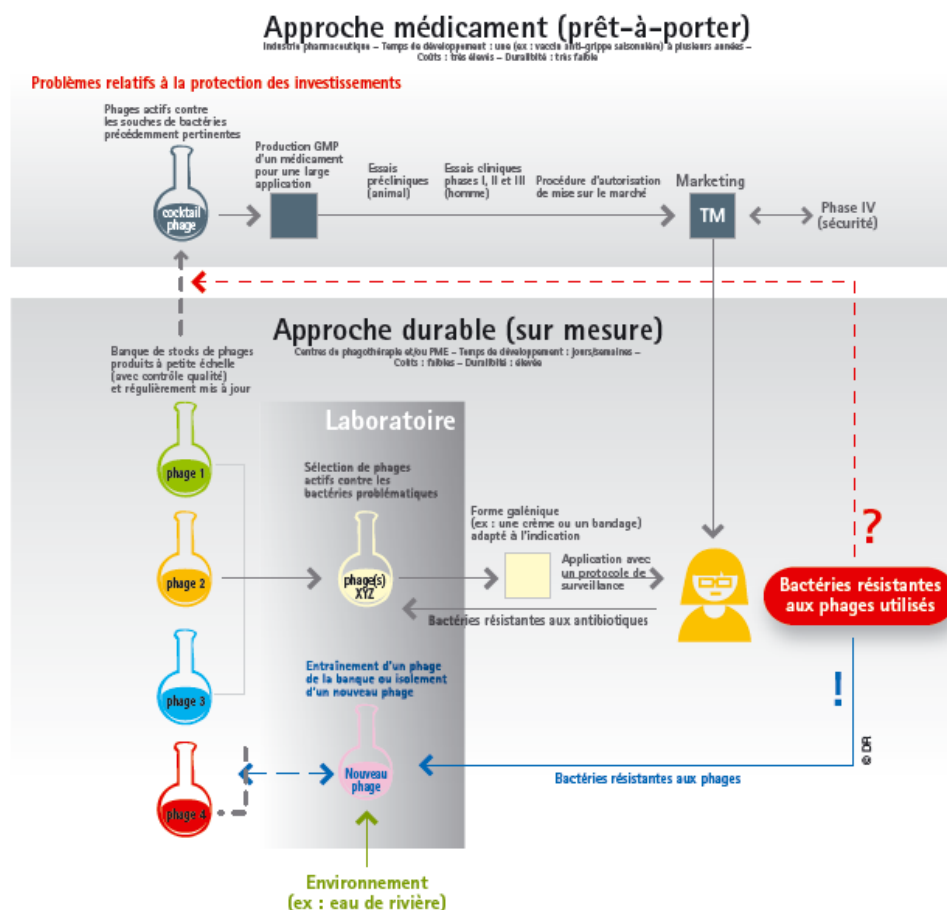


Figure 11 : étapes de fabrication des phages thérapeutiques selon les stratégies « prêt-à-porter » et « sur mesure » (32)

## 2. Réglementation, législation et utilisation des bactériophages

### 2.1) Statut actuel des bactériophages

La phagothérapie n'est aujourd'hui pas officiellement autorisée en France et en Europe (sauf en Pologne) car il n'existe aucun cadre légal ni aucune recommandation européenne spécifique concernant les bactériophages et ils ne figurent tout simplement dans aucun texte. Cette absence de législation crée un certain vide quant à l'usage des phages et empêche leur accès et leur utilisation. Il est donc difficile de définir leur statut.

Pour l'EMA et l'ANSM, les bactériophages relèvent bien de la réglementation applicable aux médicaments et doivent donc suivre les procédures qui s'y rattachent (respect des BPF, obtention d'une AMM...) comme cela est précisé dans la Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil qui institue un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (2), (32).

À la lumière des textes législatifs on peut considérer les bactériophages comme des médicaments biologiques, aussi appelés biomédicaments. Les médicaments biologiques sont définis par le Code de la Santé Publique (CSP) comme « *tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et*

*biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle. »* (Article L5121-1) (33)

Rappelons qu'on entend par médicament « *toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.* » (Article L5111-1 du CSP)

Une spécialité pharmaceutique peut, elle, être définie comme « *tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale.* » (Article L5111-2 du CSP) (34)

## **2.2) Situation et utilisation actuelle de la phagothérapie**

Actuellement en France, en l'absence de cadre légal, il existe pour les médecins quelques moyens pour avoir recours à la phagothérapie : le traitement à titre compassionnel avec des préparations de phages assimilées à des préparations magistrales et la demande d'autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATUn), possible pour des spécialités.

L'utilisation la plus ancienne de la phagothérapie est le traitement à titre compassionnel d'un patient en impasse thérapeutique, sous la responsabilité de son médecin, grâce à la Déclaration d'Helsinki de l'Association Médicale Mondiale (AMM) qui stipule que : « *Dans le cadre du traitement d'un patient, faute d'interventions avérées ou faute d'efficacité de ces interventions, le médecin, après avoir sollicité les conseils d'experts et avec le consentement éclairé du patient ou de son représentant légal, peut recourir à une intervention non avérée si, selon son appréciation professionnelle, elle offre une chance de sauver la vie, rétablir la santé ou alléger les souffrances du patient. Cette intervention devrait par la suite faire l'objet d'une recherche pour en évaluer la sécurité et l'efficacité. Dans tous les cas, les nouvelles informations doivent être enregistrées et, le cas échéant, rendues publiques.* » (Article 37) (35).

Il est également précisé dans cette déclaration que « *la Déclaration de Genève de l'AMM engage les médecins en ces termes : « La santé de mon patient prévaudra sur toutes les autres considérations » et le Code International d'Ethique Médicale déclare qu'un « médecin doit agir dans le meilleur intérêt du patient lorsqu'il le soigne » ».*

La deuxième possibilité est, pour le médecin, de réaliser une demande d'ATU nominative. Une ATUn est délivrée par l'ANSM, s'adresse à un seul patient ne pouvant participer à une recherche biomédicale et est sous la responsabilité du médecin prescripteur. L'ATUn concerne des spécialités pharmaceutiques qui ne disposent pas d'AMM et elle est destinée à traiter des maladies graves ou rares, en l'absence de traitement approprié et lorsque la mise en œuvre du traitement ne peut être différée (36).

Une ATUn ne peut être délivrée que pour des préparations de phages répondant à des standards de qualité et de production industrielle (c'est-à-dire, des spécialités pharmaceutiques). En France, en 2016, seules deux préparations phagiques (cocktails de bactériophages anti-*Escherichia coli* et anti-*Pseudomonas aeruginosa*) fabriquées par la société Pherecydes Pharma

pouvaient faire l'objet d'ATU car elles avaient été autorisées et validées dans le cadre de l'essai clinique PhagoBurn. En 2019, ces spécialités n'étaient plus disponibles mais la société devrait fournir des cocktails de phages anti-*Pseudomonas aeruginosa* et anti-*Staphylococcus aureus* d'ici fin 2019.

Pour les traitements à titre compassionnel, la seule possibilité est de se procurer des phages anti-*Pseudomonas aeruginosa* et anti-*Staphylococcus aureus* fabriqués de façon non industrielle par Pherecydes Pharma ou des phages provenant de l'Hôpital militaire de la Reine Astrid de Bruxelles en Belgique, compatibles avec un usage clinique. Ces préparations phagiques sont alors assimilées à des préparations magistrales délivrées à l'hôpital, sous la responsabilité du médecin et du pharmacien hospitalier.

En 2016, l'ANSM a créé un Comité Scientifique Spécialisé Temporaire (CSST) dont le but était d'élaborer une position quant aux situations cliniques pouvant justifier d'un accès précoce aux bactériophages et de déterminer des prérequis nécessaires pour leur mise à disposition dans le cadre d'ATU ou d'essais cliniques. Ce comité multidisciplinaire d'experts a alors défini les critères justifiant un accès précoce aux bactériophages : un pronostic vital engagé ou un pronostic fonctionnel menacé, l'impasse thérapeutique et une infection mono-microbienne (37).

En mars 2019, un deuxième CSST s'est réuni afin de faire le point sur les traitements réalisés à titre compassionnel depuis 2016 dans plusieurs hôpitaux français, les préparations de bactériophages disponibles actuellement ainsi que sur les perspectives de recherche susceptibles de faire évoluer le statut de la phagothérapie en France (38).

À l'étranger, en Pologne et en Géorgie, les phages sont étudiés et couramment utilisés depuis des décennies. Ces pays disposent de centres de recherche et de banques de phages avec lesquels ils traitent les patients. En Russie, on trouve des suspensions de phages qui sont commercialisées et disponibles dans les pharmacies. L'accès à la phagothérapie dans ces pays est à l'origine d'un tourisme médical, notamment en Géorgie, car pour de nombreux patients en impasse thérapeutique il s'agit du traitement de la dernière chance. Il existe un organisme privé, « Se soigner en Géorgie », qui aide les patients à organiser ce voyage coûteux et compliqué. En France, plusieurs associations comme Phages Sans Frontières et PHAGESPOIRS ont vu le jour afin d'informer le public et les patients, de financer des voyages vers la Géorgie et de faire connaître la phagothérapie pour permettre son retour et, qu'ainsi, les patients puissent être pris en charge dans notre pays.

### **2.3) Problématiques concernant la légalisation**

Le problème qui se pose pour la réglementation des bactériophages est que le système réglementaire actuel repose sur un modèle pharmaco-économique non adapté aux phages. En effet, ce modèle est régi par un cadre strict comportant un ensemble de procédures définies permettant le développement de molécules chimiques stables entrant dans des spécialités produites de façon industrielle et de compositions connues. Le but est bien sûr de garantir la sécurité, la qualité et l'efficacité de tous les médicaments produits et mis à disposition des patients.

Pour cela, tout médicament doit faire l'objet d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et respecter l'ensemble des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Avant son arrivée sur le

marché, chaque nouvelle molécule doit subir une étape préclinique (*in vitro* et chez l'animal) puis des essais cliniques de phase I, II et III (chez l'Homme) afin de prouver ses qualités et son innocuité et obtenir une AMM. Au total, toutes ces étapes représentent environ quinze ans de recherche. Beaucoup de procédures sont harmonisées à l'international et, au niveau européen, il est possible de déposer une demande d'AMM à l'EMA qui, si elle est accordée, sera alors valable dans toute l'Union Européenne (39).

Toutes ces années de recherche et développement représentent un coût considérable pour les laboratoires qui réalisent cette procédure. En contrepartie, ils attendent donc un certain retour sur investissement. Ce sont les dépôts de brevets et l'exclusivité de commercialisation de la spécialité, entre autres, qui permettent un certain bénéfice. Or, les phages, qui sont des entités biologiques vivantes et naturelles, ne peuvent faire l'objet de brevets (les mélanges de phages, dits « cocktails » peuvent, eux, être protégés par des brevets). Cette caractéristique risque donc de ne pas susciter un fort intérêt de la part des laboratoires pharmaceutiques à développer des préparations de phages.

Nous l'avons dit plus haut, le système actuel est inadapté aux phages, et ce pour plusieurs raisons. Cela concerne toujours la nature des phages qui sont des virus qui s'auto-amplifient et évoluent au niveau du site infectieux. Les essais et contrôles standardisés actuels ne leur sont, pour la plupart, pas applicables et les phages nécessitent donc la création de procédures qui leur seraient spécifiques.

De plus, les phages coévoluent avec les bactéries ce qui implique de devoir adapter et modifier régulièrement la composition des préparations phagiques afin de toujours avoir des phages actifs contre les bactéries cibles. Entre le moment de la fabrication de la préparation phagique et le moment de sa mise à disposition sur le marché, il est fort probable que la souche bactérienne visée aura évolué et qu'elle ne soit plus sensible au phage contenu dans la préparation. La durée des études classiques est donc bien trop longue pour permettre d'obtenir des préparations thérapeutiques efficaces à un moment donné. Il est donc nécessaire de prévoir un statut qui soit adapté aux phages, de définir un cadre réglementaire clair avec des procédures spécifiques qui prennent en compte les particularités des phages. Il semble également préférable de privilégier le développement d'une approche durable de la phagothérapie en utilisant la stratégie thérapeutique du « sur mesure » et non du « prêt-à-porter » (approche qui correspond au développement des spécialités et qui prime actuellement) (32).

Il faut également définir les paramètres qui assurent la qualité pharmaceutique des bactériophages (caractéristiques des phages, procédé de fabrication, contrôles) ainsi que les méthodes à mettre en place pour mesurer les critères pharmacologiques, la biodisponibilité et les modalités d'administration des phages. Un groupe d'experts a notamment réalisé un document visant à établir les exigences de qualité et de sécurité des produits phagiques (40). Un tableau (Annexe 2) énumère tous les risques possibles liés à la qualité et à la sécurité des phages connus des experts ainsi que les tests pouvant être effectués pour minimiser ces risques.

## **2.4) Pistes et statuts envisagés pour une future légalisation**

Nous l'avons vu, la question du statut des bactériophages se pose de plus en plus afin de permettre l'accès à la phagothérapie aux patients la nécessitant.

Une proposition a été faite pour ajouter les phages dans la Directive européenne 2001/83/CE concernant les médicaments à usage humain. Dans l'Annexe I de cette directive, partie III - médicaments particuliers, les phages seraient ajoutés aux médicaments biologiques avec les médicaments dérivés du plasma et les vaccins. Une section particulière « bactériophages » pourrait aussi être ajoutée à la suite des catégories de cette même partie.

Une autre solution serait de créer une nouvelle directive spécifique afin de réglementer la phagothérapie (32).

Il existe un statut apparu récemment dans les textes européens puis dans le CSP qui pourrait s'appliquer aux bactériophages. Il s'agit des Médicaments de Thérapie Innovante (MTI), et plus particulièrement, les MTI Préparés Ponctuellement (MTI-PP) (2).

Les MTI, définis par le Règlement (CE) n°1394/2007 du Parlement européen et du Conseil, sont des médicaments de thérapie génique, des médicaments de thérapie cellulaire somatique, des médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire ou des médicaments combinés de thérapie innovante (41).

Les MTI-PP, qui s'appliquent aux mêmes catégories, sont définis à l'alinéa 17 de l'Article L5121-1 du CSP : *« tout médicament tel que défini dans le règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil, du 13 novembre 2007, concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004, fabriqué en France selon des normes de qualité spécifiques et utilisé dans un hôpital en France, sous la responsabilité d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé. Ces médicaments font l'objet d'une autorisation de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Cette autorisation peut être assortie de conditions particulières ou de restrictions d'utilisation. Par dérogation, ces médicaments peuvent également être fabriqués, importés ou exportés dans le cadre de recherches définies à l'article L. 1121-1 du présent code. L'autorisation peut être modifiée, suspendue ou retirée. L'Agence de la biomédecine est informée des décisions prises en application du présent 17° ».*

Une préparation phagique fabriquée à l'hôpital pourrait donc correspondre à ce statut sous réserve d'ajouter les bactériophages aux catégories de MTI et de prévoir les normes de qualité spécifiques.

La réalisation d'essais cliniques représente la voie encouragée par les autorités car ils constituent le meilleur moyen d'obtenir des données fiables concernant les bénéfices et les risques des bactériophages mais aussi de traiter les patients en les incluant dans ces essais cliniques.

La préparation magistrale qui est déjà utilisée actuellement dans le traitement à titre compassionnel pourrait aussi être un statut possible, ainsi que la préparation hospitalière. Il faudrait cependant définir les Bonnes Pratiques qui s'y rapportent.

La création de centres nationaux de référence en phagothérapie semble également un élément primordial évoqué par de nombreux auteurs. Ces centres devraient posséder des banques de phages afin de permettre une production nationale pour répondre aux besoins, un laboratoire d'analyse des phages et des bactéries ainsi qu'un laboratoire de surveillance (notamment pour



le suivi de l'impact environnemental). Ils devraient aussi créer des bases de données regroupant toutes les informations nécessaires et permettant d'assurer le suivi des patients.

### **3. Autres utilisations des bactériophages et applications futures**

#### **3.1) Phagoprophylaxie**

On peut définir la prophylaxie comme l'ensemble des moyens destinés à prévenir l'apparition, la propagation ou l'aggravation des maladies (42). La prophylaxie comprend différents types de mesures qui visent à protéger un individu ou une population face à une maladie. La vaccination, le dépistage ou l'antiseptie sont différents moyens de prévention.

Les bactériophages peuvent également constituer un moyen de prophylaxie, on parle alors de phagoprophylaxie. En effet, la propriété bactéricide des phages permet de traiter mais aussi de prévenir divers types d'infections bactériennes. Félix d'Hérelle avait bien compris ce phénomène et il l'a mis en œuvre à plusieurs reprises, lors de l'épidémie de typhose aviaire qu'il traita en 1919 puis en Inde lors d'une épidémie de choléra.

La phagoprophylaxie concerne des champs d'applications variés en plein développement actuellement.

En médecine humaine tout d'abord, on pourrait prévenir des épidémies ainsi que la contamination bactérienne de patients hospitalisés (afin de diminuer les infections nosocomiales). En Géorgie, des solutions de bactériophages sont déjà utilisées en pulvérisation cutanée afin de réaliser l'asepsie préopératoire (11).

La phagoprophylaxie peut aussi être appliquée dans les élevages d'animaux, l'aquaculture et l'agriculture afin de prévenir diverses pathologies et de réduire l'usage d'antibiotiques ou de produits chimiques.

Enfin, dans l'industrie agro-alimentaire, les phages s'avèrent très intéressants car ils permettent d'éliminer de façon ciblée des bactéries potentiellement pathogènes responsables d'infections pouvant être graves pour certaines populations (notamment *Listeria monocytogenes*, des salmonelles ou *E. coli*). Des préparations phagiques sont d'ores et déjà utilisées comme nous le verrons dans le paragraphe 3.2.2) Utilisation dans l'industrie agro-alimentaire.

#### **3.2) Utilisation non-médicale des bactériophages**

##### **3.2.1) Usage vétérinaire**

Aux Etats-Unis, on trouve un produit, le Staphage Lysate (SPL)®, commercialisé par les laboratoires Delmont, indiqué dans le traitement de la dermatite du chien à *Staphylococcus intermedius* (2). Il s'agit d'une préparation de lysats bactériens obtenus grâce aux bactériophages qui a une activité immunostimulante (due à la présence de protéines issues des staphylocoques mais aussi sûrement de phages).

Nous l'avons vu précédemment, une des premières utilisations de la phagothérapie a été le traitement et la prévention d'épidémies dans des élevages de volailles. Aujourd'hui, pour réduire l'utilisation intensive des antibiotiques dans les élevages, des recherches sont en cours afin de traiter avec des phages les animaux contre différentes maladies. Cette utilisation pourrait

concerner les élevages de volailles, de porcs et de vaches mais aussi l'aquaculture. L'avantage est que l'utilisation des phages n'entraîne pas de pollution de l'environnement et qu'ils ne sont pas retrouvés dans les produits animaux, contrairement aux antibiotiques.

### 3.2.2) Utilisation dans l'industrie agro-alimentaire

Le domaine de l'industrie agro-alimentaire s'intéresse de près aux bactériophages afin d'utiliser leur spécificité pour prévenir les contaminations bactériennes des aliments. En effet, certains aliments frais comme la viande (volailles), le poisson ou les fromages peuvent être contaminés par *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie est responsable de la listériose, une maladie opportuniste entraînant une méningo-encéphalite. Chez la femme enceinte, cette infection peut conduire à un avortement.

Plusieurs sociétés ont donc mis au point et commercialisé des produits à base de bactériophages ciblant *Listeria monocytogenes*. Ces entreprises ont également développé des produits ciblant d'autres bactéries à l'origine de pathologies transmises par l'alimentation comme les salmonelles et *Escherichia coli*.

- Microeos est une entreprise néerlandaise qui produit, entre autres, sous la marque PhageGuard, plusieurs préparations de décontamination alimentaire à base de phages. PhageGuard Listex™ est la préparation spécifique contre *Listeria monocytogenes*. Sont également disponibles PhageGuard S™ contre les *Salmonella* et PhageGuard E™ contre *Escherichia coli* O157: H7 (43).
- Intralytix est une société américaine qui produit également diverses préparations phagiques. Elle propose ListShield™ contre *Listeria monocytogenes*, EcoShield™ contre *Escherichia coli* O157: H7, SalmoFresh™ contre certaines *Salmonella* et ShigaShield™ contre *Shigella* spp. La société propose en outre des préparations du même type pour prévenir la contamination des aliments des animaux de compagnie. ListShield™ est constitué d'un mélange de six bactériophages naturels spécifiquement actifs contre *Listeria monocytogenes* (44).

Ces préparations s'appliquent directement sur les aliments par pulvérisation, brumisation ou immersion. Ils n'entraînent aucune modification des caractères organoleptiques des aliments. Ces produits peuvent aussi être utilisés afin de réaliser la décontamination des surfaces et équipements en contact avec les aliments. Les préparations ciblant *Listeria monocytogenes* ont été approuvées par la FDA il y a plusieurs années et sont donc couramment utilisées. Ces produits sont utilisés en tant qu'auxiliaires technologiques, l'étiquetage n'est donc pas obligatoire.

### 3.2.3) Utilisation en agriculture

De nombreuses bactéries s'attaquent aux végétaux, ce qui représente un véritable fléau, responsable d'importantes pertes économiques. Dans l'agriculture, on cherche donc à utiliser les phages pour traiter et prévenir des maladies bactériennes qui touchent les plantes afin d'éviter d'avoir recours aux pesticides dont les résidus s'accumulent dans l'environnement. Des antibiotiques sont aussi utilisés contre les bactéries phytopathogènes mais cela pose le même problème de résistance que dans l'utilisation humaine ou animale. Pouvoir utiliser autre chose

que les produits chimiques qui ont des effets néfastes constitue donc un avantage important à l'heure où l'agriculture biologique se développe de plus en plus.

Dans ce domaine on pourra citer AgriPhage™, mis au point par la société de biotechnologie américaine OmniLytics, qui est le premier biopesticide basé sur les bactériophages. Il est utilisé aux Etats-Unis depuis 2005 après avoir reçu l'autorisation de l'EPA. La gamme de produits AgriPhage™ se décline en plusieurs préparations actives contre différentes bactéries infectant les tomates, les poivrons, les pommes, les poires et les agrumes et responsables du « chancre » ou du « feu bactérien » (45).

### 3.3) Potentialités futures des bactériophages

En plus de l'utilisation de la phagothérapie sur de nombreuses infections, d'autres pistes d'utilisations thérapeutiques ou diagnostiques des phages méritent d'être approfondies.

La spécificité des phages fait qu'ils sont capables de cibler les souches bactériennes qui leur sont spécifiques parmi une large communauté comprenant de nombreuses espèces bactériennes comme dans les microbiotes. De plus, le fait que les bactéries soient résistantes ou multi-résistantes aux antibiotiques n'empêche en rien les phages de les attaquer. Cette capacité pourrait être utilisée afin de réduire le portage bactérien dans le tube digestif des individus, c'est-à-dire, réduire le niveau de colonisation intestinale de certaines bactéries potentiellement pathogènes. Les bactéries concernées seraient notamment les entérobactéries multi-résistantes, ensemble de bactéries pouvant être responsables d'infections nosocomiales et communautaires graves. Cette décontamination des BMR par les phages diminuerait la transmission de ces bactéries, dans les établissements de soins notamment, ce qui permettrait la diminution du nombre d'infections, des mesures d'hygiène spécifiques associées et la réduction des coûts engendrés (11).

Une autre application de la spécificité phagique au niveau digestif serait la modulation du microbiote intestinal par les phages par leur action sur telle ou telle bactérie. On sait que certaines bactéries ou le déséquilibre de ce microbiote sont impliqués dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique. L'action des phages sur les populations bactériennes du microbiote pourrait donc jouer un rôle thérapeutique et participer à la prise en charge de ces pathologies (3).

Les propriétés des phages sont à l'étude dans une autre indication : le traitement de l'acné. Plusieurs équipes ont décrit et réussi à isoler différents phages actifs contre la bactérie responsable de l'acné, *Propionibacterium acnes*. Une équipe australienne a même réalisé une crème à base de phages actifs contre cette bactérie qui s'est montrée efficace *in vitro* (18).

Microeos, la firme qui a développé les différents PhageGuard™ vus plus haut, est aussi à l'origine d'une gamme de produits (sous la marque Gladskin) indiqués dans le traitement des affections cutanées inflammatoires ayant une composante infectieuse comme l'eczéma, la rosacée, l'acné et les irritations de la peau. L'entreprise a mis au point le Staphefekt™, une endolysine provenant de bactériophages. Staphefekt™ est spécifique de *Staphylococcus aureus* qu'il détruit de façon rapide. L'avantage de cette endolysine est qu'elle est même active contre les souches de *S. aureus* résistantes aux antibiotiques comme le SARM. En outre, son action

ciblée sur *S. aureus* préserve les bactéries commensales de la flore cutanée et n'entraîne pas d'effets indésirables, contrairement aux antibiotiques (46), (47).

### **Les lysines, futurs antibactériens ?**

Les lysines ou endolysines sont des enzymes dont les gènes sont portés par les bactériophages et qui sont synthétisées dans la cellule bactérienne à la fin du cycle lytique. Elles réalisent l'ouverture de la paroi bactérienne en hydrolysant le peptidoglycane afin de permettre la libération des nouveaux phages. Les lysines sont très efficaces et leur spécificité étant un peu moins forte que les phages il est possible d'utiliser une même enzyme contre presque toutes les souches d'une espèce bactérienne. L'avantage est que, contrairement aux phages, les lysines sont des protéines que l'on peut donc parfaitement caractériser, purifier et produire de façon standardisée. Le risque de l'émergence de résistance aux endolysines est actuellement peu connu mais serait très faible. Elles ne sont en tout cas pas concernées par les résistances actuelles, étant différentes des antibiotiques. Les lysines, tout comme d'autres enzymes synthétisées au cours du cycle reproductif des phages, pourraient donc être à l'origine de nouvelles classes d'antibactériens actifs contre de nombreuses espèces bactériennes (2).

En plus de leur utilisation thérapeutique, les phages pourraient être utilisés en tant que moyens de diagnostic. En mettant en contact différents types de phages connus contre une bactérie inconnue on identifie l'espèce bactérienne, la souche et par la même occasion le phage actif contre cette bactérie. En plus d'avoir identifié rapidement la bactérie recherchée, on dispose donc d'un moyen thérapeutique rapide et efficace (11).

**Partie III :**  
**Analyse d'études et projets de recherche en cours**

---

## **1. Développement d'un médicament et études cliniques**

### **1.1) Les étapes de développement d'un médicament**

Pour obtenir une AMM, un médicament doit faire l'objet de plusieurs années d'études (plus de dix ans) afin de s'assurer de son efficacité et de son innocuité. Toutes les étapes de développement du médicament sont codifiées, réglementées par les autorités de santé et encadrées par la loi. Plusieurs phases constituent le parcours de développement d'un médicament : la phase préclinique et la phase clinique (voir Figure 12).

Tout d'abord, après la recherche exploratoire, la **phase préclinique** permet d'obtenir les premières données sur le futur médicament en l'étudiant *in vitro* sur des cultures cellulaires puis *in vivo* sur différents modèles animaux. Les données récoltées concernent la pharmacologie, la pharmacocinétique et la toxicologie et permettent d'estimer les doses à utiliser chez l'Homme. À la suite de cela, l'**évaluation clinique** chez l'Homme peut alors commencer. Cette phase a pour but d'évaluer l'efficacité et la sécurité du médicament testé et de s'assurer que sa balance bénéfice/risque est positive afin de permettre sa commercialisation.

Les essais cliniques se déroulent en plusieurs phases :

- La **phase I** : la molécule est administrée à un petit groupe de volontaires sains, en général, ou malades, sous étroite surveillance. Cela permet d'évaluer la tolérance, l'activité pharmacologique et l'absence d'effets indésirables du futur médicament.
- La **phase II** (ou étude pilote) : elle est effectuée sur des volontaires malades (quelques centaines au maximum) afin d'observer la tolérance et l'efficacité du médicament, de définir la dose optimale, ainsi que les éventuels effets secondaires.
- La **phase III** (ou étude pivot) : elle est réalisée sur un grand nombre de malades (des centaines à des milliers) et peut durer plusieurs années. Cette phase consiste à évaluer l'efficacité, la sécurité, et l'intérêt thérapeutique du médicament. Les patients sont répartis en deux groupes afin de comparer le nouveau médicament à un traitement de référence ou à un placebo.
- La **phase IV** : elle correspond à la pharmacovigilance et débute après l'autorisation de mise sur le marché du médicament. Cette phase permet de suivre l'utilisation du médicament à long terme, dans les conditions d'utilisation réelles afin de détecter des effets indésirables ou un mésusage.

Toutes les données recueillies pendant les différentes phases précliniques et cliniques sont ajoutées au dossier de demande d'AMM qui est soumis aux autorités sanitaires (nationales ou européennes) afin qu'elles accordent ou non l'autorisation de mise sur le marché au médicament (48).

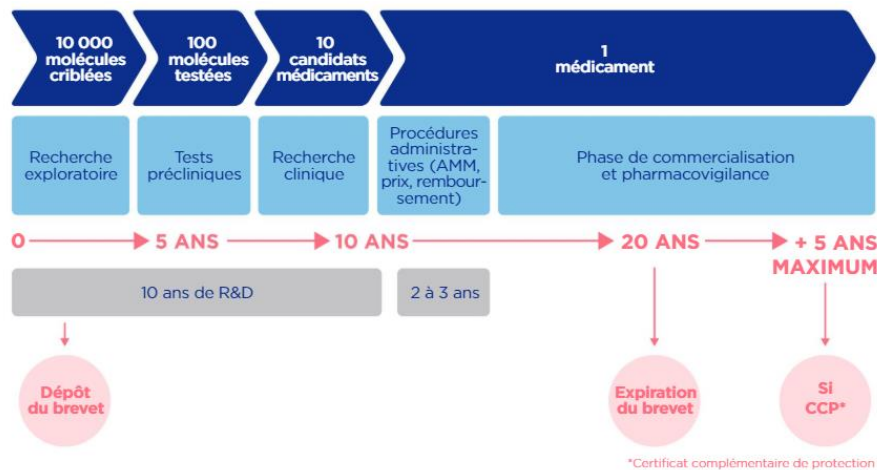


Figure 12 : les grandes étapes du développement d'un médicament

Source : <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>

## 1.2) Les études cliniques

Les études cliniques (ou essais cliniques ou thérapeutiques) se déroulent en plusieurs phases et sont menées en milieu hospitalier ou en cabinet médical sous le contrôle de médecins que l'on appelle investigateurs. Le promoteur est une personne physique ou morale à l'origine de la réalisation d'une étude.

Les essais cliniques doivent respecter un ensemble de Bonnes Pratiques Cliniques, être déclarés et autorisés par l'ANSM en France et avoir reçu un avis favorable d'un Comité consultatif de Protection des Personnes (CPP). Le respect de l'éthique est primordial et nécessite l'information des patients sur l'essai auquel ils vont participer ainsi que le recueil de leur consentement éclairé (39).

Il existe plusieurs types d'études possibles : l'étude cas-témoins, l'étude de cohorte, l'étude contrôlée randomisée en double aveugle, qui ont des caractéristiques et des niveaux de preuve différents.

Lors des essais cliniques, on utilise généralement une étude contrôlée, randomisée, en double aveugle afin d'évaluer l'efficacité d'un nouveau médicament. Plusieurs critères sont importants :

- L'étude doit être prospective, c'est-à-dire, définir à l'avance la population qui sera étudiée avec les critères d'inclusion et d'exclusion, les différents paramètres qui seront étudiés et les critères de sortie de l'essai.
- Le terme « contrôlé » signifie comparatif, l'étude comporte un groupe testant le traitement en question comparé à un groupe témoin qui reçoit un traitement de référence ou un placebo.
- Le mot « randomisé » signifie que la répartition des patients entre les deux groupes est réalisée au hasard, de façon aléatoire.

- L'expression « en double aveugle » signifie que ni le médecin, ni le patient ne savent quel traitement le patient reçoit.

Enfin, on utilise des outils statistiques afin d'exploiter les données et de pouvoir interpréter les résultats obtenus pour pouvoir fournir des conclusions fiables.

## **2. Traitement expérimental d'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa* chez les souris par un bactériophage (49)**

### **2.1) Objectif de l'étude**

Le but de cette étude expérimentale réalisée en France en 2010 était de surveiller et de quantifier l'efficacité du traitement par un bactériophage d'une infection pulmonaire aigüe à *Pseudomonas aeruginosa* chez des souris. En utilisant une souche bioluminescente de *P. aeruginosa*, il fut possible de suivre, en temps réel et dans l'espace, l'évolution de l'infection chez les animaux vivants.

### **2.2) Contexte et mise en place de l'expérience**

*Pseudomonas aeruginosa*, aussi appelé bacille pyocyanique, est un bacille Gram négatif, pathogène **opportuniste**, à l'origine de diverses infections (septicémie, infections pulmonaires, infections cutanées, otites...) chez les patients immunodéprimés ou ceux souffrants de cancer, de brûlures ou de mucoviscidose.

Plus précisément, les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* sont rares dans la population générale mais fréquentes chez les patients immunodéprimés. Elles sont même à l'origine de la principale cause de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (à la suite d'une insuffisance respiratoire causée par l'infection pulmonaire chronique) (50).

Une des caractéristiques de *P. aeruginosa* est sa capacité d'adaptation à de nombreux environnements différents. *P. aeruginosa* est aussi capable de former des biofilms afin d'être à l'abri du système immunitaire et des médicaments. De plus, cette bactérie est naturellement résistante à certains antibiotiques et de plus en plus résistante à des antibiotiques auxquels elle était initialement sensible. Il existe certainement un très grand nombre de bactériophages spécifiques de *P. aeruginosa* et un certain nombre de phages virulents infectant *P. aeruginosa* ont déjà été séquencés (plus de 40 en 2010). Plusieurs études utilisant des bactériophages contre cette bactérie ont été réalisées, reflet de l'intérêt que la phagothérapie pourrait représenter face à cette bactérie résistante (50).

Les souches de *Pseudomonas aeruginosa* utilisées dans cette étude (souches PAK) étaient des souches bioluminescentes afin de pouvoir obtenir des images de luminescence mesurée par les émissions de photons des bactéries dans les poumons des souris.

Le bactériophage utilisé, nommé PAK-P1, a été isolé d'eaux d'égout puis préparé et dilué avant d'être administré aux animaux. Le séquençage complet du génome de ce bactériophage a été réalisé et a montré qu'il s'agissait d'un nouveau bactériophage lytique de *P. aeruginosa* découvert, appartenant à la famille des *Myoviridae*.



Pour la réalisation des expériences, les souris ont été infectées par instillation intranasale par une dose de  $1 \times 10^7$  bactéries puis ont reçu deux heures après 30  $\mu\text{L}$  de bactériophages, toujours par voie intranasale. Dans les expériences préventives, les souris ont reçu 30  $\mu\text{L}$  de bactériophages 24 heures avant l'infection. Un groupe témoin de souris a été traité uniquement avec du PBS et un autre uniquement avec le bactériophage PAK-P1.

Des lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés après euthanasie des souris afin de déterminer les concentrations de cytokines murines, les quantités de bactériophages libres et les numérations bactériennes.

### 2.3) Analyse des résultats

Une expérience préliminaire a montré que le bactériophage PAK-P1 était bien actif *in vivo* car il retardait la mort des animaux fortement infectés.

Afin de déterminer la dose de phage nécessaire pour guérir complètement les souris infectées, les animaux ont été traités avec plusieurs ratios bactériophages / bactéries différents (1:10, 1:1 et 10:1). 100% des souris traitées avec un ratio bactériophages / bactéries de 10:1 ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience (12 jours), c'est donc ce ratio qui a été choisi comme dose standard.

#### ▪ Cinétique de l'infection et efficacité du bactériophage :

La vitesse à laquelle le phage est capable d'éliminer les bactéries a été évaluée en quantifiant la luminescence émise par les bactéries chez les animaux vivants pendant les premières heures de l'infection. Les souris ont reçu le phage PAK-P1 deux heures après avoir été infectées par *P. aeruginosa*.

- Entre deux et quatre heures après l'infection il n'y a pas eu de différence statistiquement significative entre les quantités de lumière émises par les souris traitées avec le phage et les souris non traitées.
- Six heures après l'infection, la quantité de lumière émise par les souris traitées avec le phage était réduite de manière statistiquement significative par rapport aux souris non traitées (voir Figure 13).
- 24 heures après l'infection, il n'y avait plus ou peu de lumière émise par les souris traitées avec le phage alors que les souris non traitées étaient mortes ou très luminescentes.

Ces résultats montrent que l'évolution initiale de l'infection (durant les quatre premières heures) est similaire chez les souris, avec ou sans phage administré, mais qu'ensuite, les quantités de bactéries sont fortement réduites et que les souris traitées avec le phage survivent à l'infection, contrairement aux souris non traitées.

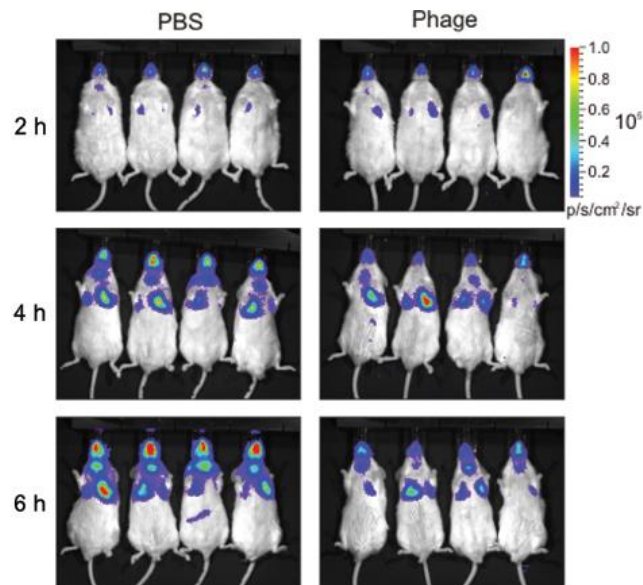


Figure 13 : images de luminescence de souris infectées par *P. aeruginosa* traitées par PBS (à gauche) ou par phage (à droite) en fonction du temps (49)

▪ Moment optimal de traitement par le bactériophage :

Les chercheurs ont ensuite cherché à déterminer le délai maximum de traitement par phage possible permettant de conserver un taux de survie des animaux de 100%. Pour cela, ils ont administré le traitement deux, quatre ou six heures après l'infection.

- À 24 heures, 100% des souris ont survécu dans le groupe traité par le phage deux heures après l'infection contre 75% des souris traitées quatre et six heures après.
- À 72 heures, il y avait toujours 100% de survie dans le groupe traité après deux heures, 75% de survie dans le groupe traité après quatre heures mais plus que 25% de survie dans le groupe traité après six heures.

Il fallait donc administrer le phage deux heures après l'infection pour obtenir un taux de survie des animaux de 100%. Cela montre bien qu'il faut administrer les phages le plus précocement possible pour garantir leur efficacité.

▪ Quantités de bactéries et de bactériophages :

Des lavages broncho-alvéolaires ont été réalisés 24 heures après l'infection afin de mesurer la charge bactérienne et les quantités de bactériophages.

Chez les souris non traitées par le phage, aucun bactériophage n'a été détecté et la quantité moyenne de bactéries était de  $1,6 \times 10^8$  bactéries par millilitre.

Chez les souris traitées par le phage, on a retrouvé  $2 \times 10^7$  bactériophages par millilitre et  $1,5 \times 10^2$  bactéries par millilitre. Chez des souris non infectées ayant reçu le phage, on a retrouvé  $3,1 \times 10^6$  bactériophages par millilitre ce qui montre bien que les phages se multiplient au contact des bactéries chez les animaux infectés et que les bactéries, elles, diminuent.

- Modulation de la réponse inflammatoire :

Les lavages broncho-alvéolaires ont également permis d'évaluer la réponse inflammatoire afin de vérifier l'hypothèse que si les quantités bactériennes sont réduites par la destruction des bactéries par les phages, la réponse inflammatoire doit aussi être plus faible. Pour cela, deux marqueurs inflammatoires ont été mesurés, l'interleukine 6 (IL-6) et le TNF- $\alpha$ .

Comme le montre la figure 14, 24 heures après l'infection, les niveaux des deux marqueurs inflammatoires ont augmenté chez les souris infectées, qu'elles soient traitées avec le phage ou non, par rapport aux groupes témoins non infectés (les barres noires sur le graphique sont les souris ayant reçu uniquement le PBS, les barres blanches sont les souris ayant reçu le PBS et le phage). Cependant, en comparaison des souris infectées et non traitées (barres hachurées), on remarque que les niveaux des deux marqueurs inflammatoires sont moins élevés chez les souris traitées par le phage (barres grises). 48 heures après l'infection, les taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  sont revenus à la normale chez les souris traitées par le phage.

Les niveaux des marqueurs ont été réduits de manière statistiquement significative ce qui montre que la réduction du nombre de bactéries par l'action du bactériophage diminue la réponse inflammatoire.

On remarque également que les taux d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  sont aussi faibles chez les deux groupes témoins ce qui montre que l'administration de bactériophages n'entraîne pas de réponse inflammatoire.

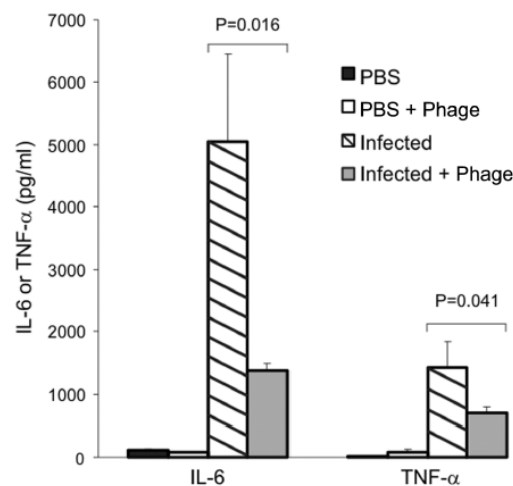


Figure 14 : taux des marqueurs inflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  24 heures après infection par *P. aeruginosa* chez les différents groupes de souris (49)

- Traitement préventif par le bactériophage :

Une autre expérience, à visée préventive, a été réalisée. Comme les bactériophages ont persisté dans les poumons au moins 24 heures, les chercheurs ont voulu vérifier si une administration prophylactique de bactériophages pouvait empêcher une infection ultérieure.

Un groupe de souris a reçu la solution de PBS et un autre groupe a été traité avec  $1 \times 10^8$  bactériophages PAK-P1. 24 heures plus tard, les deux groupes ont été infectés par  $1 \times 10^7$  bactéries.

Deux heures après l'inoculation de *P. aeruginosa*, on voit que la quantité de lumière émise par les souris ayant reçu le phage (barres noires sur la figure 15) est bien inférieure à celle émise par les souris ayant reçu la solution de PBS (barres blanches). Le suivi sur plusieurs heures montre que la charge bactérienne continue à diminuer chez les animaux traités par le phage tandis qu'elle est toujours importante dans le groupe traité au PBS.

100% des animaux traités préventivement par le phage ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience (16 jours) tandis que tous les autres animaux sont morts en deux jours.

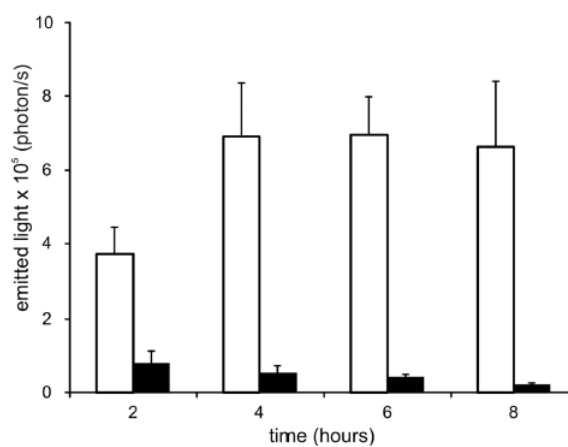


Figure 15 : évolution dans le temps de la lumière émise par les souris traitées par PBS (barres blanches) ou par le phage PAK-P1 (barres noires) après infection par *P. aeruginosa* (49)

## 2.4) Conclusion

Cette étude expérimentale réalisée sur des souris a permis de mettre en évidence le potentiel de bactériophages naturels à pouvoir traiter des infections bactériennes graves et répandues comme les infections pulmonaires. Cette propriété thérapeutique des phages est d'autant plus intéressante en sachant que ces infections sont souvent dues à des bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques comme *P. aeruginosa*.

L'utilisation de l'instillation intranasale pour administrer les bactéries comme les bactériophages a montré qu'il était possible d'utiliser les phages par cette voie naturelle et qu'ils sont efficaces pour traiter les infections des voies respiratoires de façon locale.

L'utilisation de bactéries bioluminescentes a permis d'étudier la cinétique de l'infection et d'évaluer l'efficacité du bactériophage chez des animaux vivants. Cette technologie peut aussi permettre de comparer plusieurs phages afin de déterminer lequel sera le plus efficace *in vivo*.

La mesure de la luminescence a permis de montrer la réduction de la charge bactérienne par le bactériophage ainsi que l'importance de l'administration précoce du phage pour un traitement efficace. En effet, c'est lors des premières heures que la multiplication des bactéries est la plus rapide, c'est également à ce moment-là que les bactéries sont les plus sensibles aux phages.

Enfin, un autre aspect intéressant mis en évidence par cette étude est la protection contre l'infection pulmonaire offerte par les phages lorsqu'ils ont été administrés 24 heures avant les bactéries. Les phages pourraient donc être administrés de façon préventive, notamment chez des populations à risque comme les patients immunodéprimés ou atteints de mucoviscidose, afin d'éviter la survenue d'infections pulmonaires. Pour cela, il faudrait utiliser des bactériophages spécifiques de la souche bactérienne à l'origine d'une épidémie ou des cocktails de phages ciblant les principaux pathogènes pulmonaires responsables de pneumonies.

### **3. Analyse d'un essai clinique contrôlé sur une préparation thérapeutique de bactériophages dans le traitement de l'otite chronique due à *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux antibiotiques (51)**

#### **3.1) Objectif de l'étude**

Cette étude clinique, réalisée en Angleterre et publiée en avril 2009, avait pour objectif d'évaluer l'efficacité et la sécurité d'une préparation thérapeutique de bactériophages actifs contre *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux antibiotiques dans le traitement d'otites chroniques causées par cette bactérie.

#### **3.2) Contexte et mise en place de l'essai clinique**

Les otites chroniques sont des affections courantes mais difficiles à traiter. Elles sont principalement causées par *Pseudomonas aeruginosa* ou *Staphylococcus aureus*. La bactérie concernée dans l'étude, *Pseudomonas aeruginosa*, est, comme nous l'avons dit plus haut, une bactérie résistante à de très nombreux antibiotiques. Le traitement par bactériophages présente donc un intérêt dans ce type de pathologie.

Une étude sur le traitement de l'otite chronique à *P. aeruginosa* par un mélange de bactériophages réalisée chez le chien (52) a montré des résultats prometteurs. Il s'agit d'ailleurs de la même préparation de phages et de la même procédure d'application qui a été utilisée dans cet essai clinique.

Il s'agit ici du premier essai clinique de phase I/II, contrôlé, randomisé, en double aveugle et contre un placebo mis en place conformément aux normes actuelles.

Cette étude a été réalisée au Royal National Throat, Nose and Ear Hospital, un hôpital spécialisé en oto-rhino-laryngologie, à Londres en Angleterre. Elle a été autorisée par l'Agence de Réglementation des Médicaments et des Produits de santé du Royaume-Uni et approuvée par l'Office central des comités d'éthique de la recherche.

La préparation thérapeutique, nommée Biophage-PA, contenait six bactériophages ayant chacun un titre de  $10^5$  PFU/mL. Le placebo contenait lui uniquement un diluant glycérol-PBS.

24 patients (17 hommes et 7 femmes) souffrant d'otite chronique à *P. aeruginosa* depuis plusieurs années (au moins deux ans) ont participé à l'étude. L'âge moyen des patients était de 56,7 ans.

Avant le traitement, il a été vérifié que l'infection était bien causée par *P. aeruginosa* résistant aux antibiotiques mais au moins sensible à un des six phages de la préparation.

Les patients ont été répartis de façon aléatoire en deux groupes de 12. Un groupe a reçu une dose unique de bactériophages, l'autre un placebo. Ils ont ensuite été suivis 7, 21 et 42 jours après le traitement et plusieurs paramètres ont été mesurés. Le traitement a été réalisé sur une seule oreille et dans le cas où l'otite était bilatérale le traitement a été administré dans l'oreille ayant les signes cliniques les plus importants.

Les critères d'inclusion étaient les décharges auditives de longue date résistantes aux antibiotiques et d'origine variée (chirurgie de la mastoïde, perforations, otite externe ancienne). Les principaux critères d'exclusion étaient les antécédents récents de chirurgie locale, l'utilisation actuelle d'antibiotiques, la séropositivité au VIH, les femmes en âge de procréer ainsi que l'insensibilité à l'un des phages de la préparation ou une flore auriculaire inhabituelle.

Plusieurs critères d'évaluation ont été mesurés par les patients et les médecins à l'aide d'une Echelle Visuelle Analogique (EVA) possédant une graduation allant de « pas du tout » au « pire de tout » :

- Les patients ont évalué quatre paramètres : inconfort, démangeaisons, humidité et odeur
- Les médecins ont rempli des EVA pour cinq paramètres : érythème/inflammation, ulcération/granulation/polypes, quantité de décharge, type de décharge et odeur.

Initialement et lors de chaque suivi, la numération de *P. aeruginosa* a été effectuée et le nombre de phages dans les prélèvements a été mesuré.

Concernant la sécurité, les effets indésirables ont été relevés et une audiométrie a été réalisée.

### 3.3) Analyse des résultats

Pour permettre l'analyse des résultats, les critères d'évaluation mesurés par les patients et par les médecins ont été regroupés en « scores EVA combinés ». Les moyennes des scores EVA des patients et des médecins ont chacune été comparée à une valeur initiale d'évaluation de 100% des symptômes au jour 0 de l'étude. Les jours de clinique sont les jours de suivi des patients (jour 7, 21 et 42 après l'application de la préparation de phages).

- Scores EVA des patients :

La figure 16 montre une diminution significative de la moyenne des scores combinés par rapport à la valeur initiale dans le groupe traité par les phages comparé au groupe placebo. Il y a donc eu une amélioration des paramètres évalués par les patients traités par les phages par rapport au groupe placebo.

Dans le groupe traité par les phages, il y a eu une réduction significative de trois des quatre paramètres évalués : inconfort, démangeaisons et humidité pour tous les jours de clinique par rapport à la valeur initiale d'évaluation. Aucune réduction significative n'a été observée pour les paramètres dans le groupe placebo.

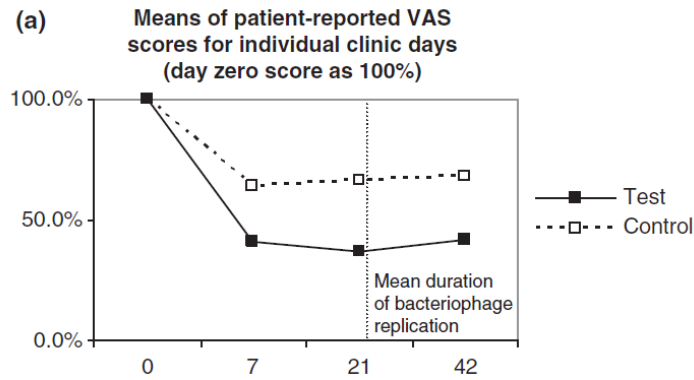


Figure 16 : moyennes des scores EVA rapportés par les patients pour chaque jour de clinique (51)

▪ Scores EVA des médecins :

La figure 17 montre également que la moyenne des scores EVA du groupe traité par les phages est inférieure à celle du groupe placebo pour tous les jours de clinique.

Dans le groupe traité par les phages, il y a eu une réduction significative de quatre des cinq paramètres évalués : érythème/inflammation, ulcération/granulation/polypes, type de décharge et odeur pour tous les jours de clinique par rapport à la valeur initiale d'évaluation. De même, aucune réduction significative n'a été observée pour les paramètres dans le groupe placebo.

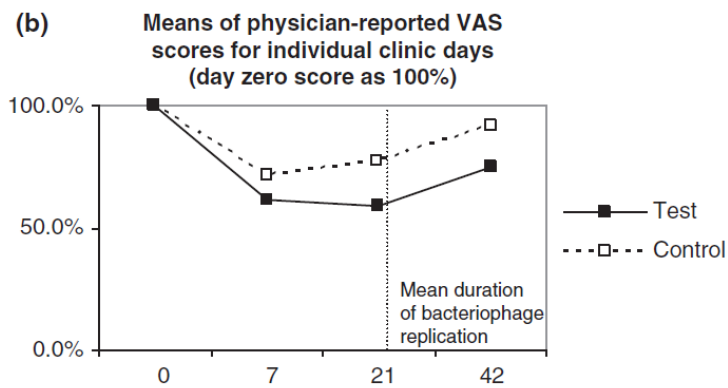


Figure 17 : moyennes des scores EVA rapportés par les médecins pour chaque jour de clinique (51)

Concernant la numération de *P. aeruginosa*, la figure 18 montre une diminution progressive au fil des jours des niveaux bactériens chez le groupe traité avec les phages par rapport au jour 0. Le changement des numérations médianes de *P. aeruginosa* était statistiquement significatif pour les jours 21 et 42. Dans le groupe placebo, il n'y a pas eu de changement significatif des numérations médianes de *P. aeruginosa* par rapport à la ligne de base (100%).

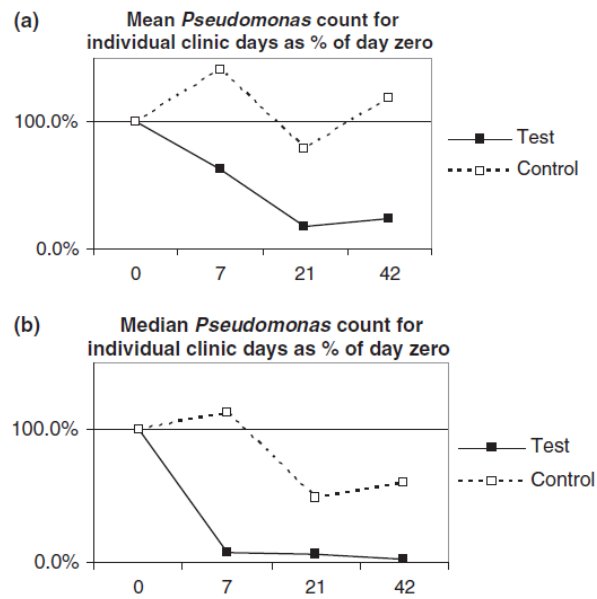


Figure 18 : moyennes (a) et médianes (b) des numérations de *P. aeruginosa* pour chaque jour de clinique (51)

Le nombre de bactériophages a aussi été suivi et leur réplification a été constatée chez les patients traités. Il y a eu une amplification du nombre de phages par rapport à la dose reçue : en moyenne, plus de 200 fois la dose administrée, et cela uniquement mesuré sur les quantités de bactériophages recueillis sur les prélèvements auriculaires.

La durée moyenne de réplification des bactériophages fut de 23 jours et la médiane de 21 jours. La clairance des phages a ensuite été observée dans les cas où la résolution de l'infection a eu lieu. Après 21 jours, il y a eu une légère augmentation des scores EVA (voir Figures 16 et 17). Cela montre qu'il pourrait donc être utile de répéter le traitement après la période de réplification des phages chez les patients pour lesquels la bactérie n'est pas totalement éliminée.

En ce qui concerne la sécurité, les effets indésirables rapportés pendant le traitement étaient tous d'intensité légère à modérée et aucun effet indésirable n'a été considéré comme lié à l'administration des phages. Ils n'ont pas non plus présenté de toxicité. Les résultats audiométriques n'ont montré aucun changement significatif chez les patients.

Les indicateurs cliniques groupés rapportés par les patients et les médecins se sont améliorés pour le groupe traité par les phages par rapport au groupe placebo. Cela traduit des améliorations cliniques significatives, comparées aux valeurs initiales au jour 0, chez les patients ayant reçu le traitement de phagothérapie. Au dernier jour de l'étude (jour 42), pour trois des douze patients traités par les phages, les niveaux de *P. aeruginosa* et de phages étaient inférieurs à la limite de détectabilité et les symptômes quasiment absents, avec des scores EVA totaux inférieurs à 10% de ceux du jour 0.

### 3.4) Conclusion

Dans cette étude clinique randomisée contre placebo, après l'administration d'une dose unique de bactériophages à un titre de  $10^5$  PFU/mL chacun, une amélioration des symptômes



et même une guérison pour trois des patients traités a été constatée. Les phages ont permis une diminution des paramètres cliniques évalués par les scores EVA ainsi qu'une baisse de la numération de *P. aeruginosa* au cours du temps par rapport au groupe placebo.

Une analyse intermédiaire réalisée durant l'étude a montré l'efficacité de ce traitement et ces résultats prometteurs devront maintenant être confirmés lors de la réalisation d'un essai clinique de phase III, prochaine étape avant de pouvoir légaliser la phagothérapie.

#### **4. Analyse de l'essai clinique PhagoBurn : efficacité et tolérance d'un cocktail de bactériophages à soigner les brûlures infectées par *Pseudomonas aeruginosa* (53)**

##### **4.1) Objectif de l'étude**

PhagoBurn est le nom donné à la première étude clinique de phase I/II réalisée de façon collaborative récemment en Europe. Il s'agit d'une étude contrôlée, randomisée, en double aveugle et multicentrique réalisée à la fois en France et en Belgique.

Les objectifs et les défis de cette étude étaient multiples.

Tout d'abord, il fallait réussir à produire un cocktail de bactériophages thérapeutiques de façon industrielle et selon les standards actuels afin d'obtenir les autorisations réglementaires nécessaires au démarrage de l'essai clinique. C'était un enjeu de taille étant donné qu'il n'existe aucune recommandation spécifique aux phages, que les spécialités phagiques ne sont plus produites depuis des dizaines d'années en France et qu'il n'existe aucun cadre législatif concernant les phages actuellement.

Une fois la préparation phagique produite et autorisée, l'objectif des auteurs était de montrer l'efficacité et la tolérance du cocktail de bactériophages anti-*Pseudomonas aeruginosa* dans la prise en charge des brûlures infectées par cette bactérie en le comparant à un traitement standard.

##### **4.2) Contexte et mise en place de l'essai clinique**

Chez les patients brûlés, les infections des brûlures sont la principale cause de septicémie et augmentent la morbi-mortalité de ces patients. De plus, l'augmentation des bactéries résistantes aux antibiotiques rend ces infections de plus en plus difficiles à traiter et fait donc à nouveau envisager la phagothérapie comme un recours crédible.

Le projet PhagoBurn a été initié en 2010 et l'étude clinique en elle-même a duré de juillet 2015 à mars 2017. Les résultats ont été publiés en octobre 2018 dans la revue *The Lancet Infectious diseases*.

L'essai a été conçu avec le soutien et le contrôle de trois agences de sécurité des médicaments : l'ANSM en France, l'Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé en Belgique et Swissmedic en Suisse afin de s'assurer du respect des Bonnes Pratiques de Fabrication et Cliniques. Il a été financé par la Commission Européenne.

Le cocktail de phages, nommé PP1131, était composé d'un mélange de douze bactériophages lytiques naturels anti-*Pseudomonas aeruginosa*. Il a été conçu et qualifié par la société Pherecydes Pharma et produit par Clean Cells. Le titre global du cocktail de bactériophages

était de  $10^9$  PFU/mL et la concentration de chaque phage était d'un douzième de ce titre. Avant l'application des phages, la solution a été diluée afin d'atteindre le titre attendu de  $10^6$  PFU/mL. Le traitement standard choisi était une crème à 1% de sulfadiazine d'argent car il s'agit du traitement de première ligne recommandé pour les brûlures infectées.

Les observations ont été réalisées pendant 21 jours au total, les traitements respectifs des patients ont été administrés quotidiennement pendant 7 jours puis il y a eu 14 jours de suivi. Le traitement était appliqué sur toutes les plaies ouvertes infectées et un traitement antibiotique adjuvant pendant les 7 jours de traitement était autorisé si besoin, par décision du médecin.

Les patients ont été recrutés dans plusieurs hôpitaux en France à l'Hôpital d'instruction des armées Percy et dans cinq autres centres spécialisés des hôpitaux de Lyon, Nantes, Metz, Toulon et Marseille ainsi qu'en Belgique à l'Hôpital militaire de la Reine Astrid à Bruxelles et dans deux centres des brûlés des hôpitaux de Liège et de Lovreval.

27 patients ont été recrutés mais seulement 25 ont finalement reçu les traitements, avec 12 patients dans le groupe PP1131 (traitement par le cocktail de phages) et 13 patients dans le groupe du traitement standard.

Les patients étaient éligibles à l'essai s'ils avaient plus de 18 ans et une brûlure cliniquement infectée. Une plaie cliniquement infectée correspondait à une infection à *Pseudomonas aeruginosa* confirmée par une culture sur écouvillon, avec ou sans signes généraux (signes cliniques ou biologiques de sepsis) et rencontrant un ou plusieurs des symptômes suivants (critères cliniques consensuels d'infection de la Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures) : inflammation, pus, cicatrisation retardée ou réouverture des plaies et débridement spontané.

Initialement, seul *P. aeruginosa* devait être isolé de la plaie. Cependant, deux nouveaux critères d'éligibilité ont été ajoutés : premièrement, le score d'évaluation de la défaillance systémique du patient ne devait pas augmenter de plus de deux points sur les 48 heures précédant l'inclusion, et deuxièmement, les plaies pouvaient être infectées par *P. aeruginosa* seul ou marginalement colonisées par d'autres espèces.

Les critères d'exclusion des patients concernaient les femmes enceintes ou allaitantes, une condition nécessitant un traitement qui pourrait interférer avec les résultats des analyses, les patients inclus dans un protocole de recherche avec intervention thérapeutique encore en cours ou ayant participé à des essais de médicaments anti-infectieux le mois précédant l'inclusion, les patients considérés comme appartenant à une population vulnérable définie par l'ICH et toute réaction au traitement standard.

Le principal critère d'évaluation de l'efficacité choisi était le temps nécessaire à une réduction durable de la charge bactérienne d'au moins deux quadrants, évalué par la méthode semi-quantitative des quatre quadrants (voir Figures 19 et 20). Cette méthode est une pratique standard validée dans les laboratoires de microbiologie et objective qui permet d'obtenir des résultats reproductibles si les manipulations sont correctement effectuées. Un prélèvement au niveau de chaque plaie infectée a été réalisé quotidiennement pendant les 7 jours de traitement avant d'êtreensemencé et analysé.

D'autres analyses ont également été réalisées afin d'évaluer la charge bactérienne ainsi que la sensibilité des souches de *P. aeruginosa* aux phages. L'évaluation de la sécurité des patients a aussi été effectuée.

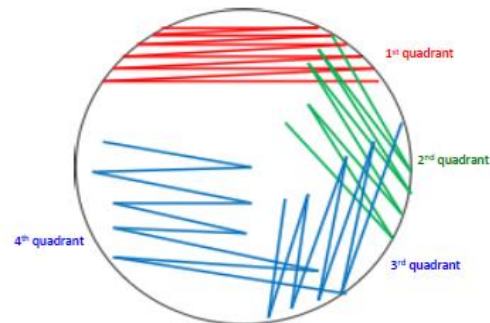


Figure 19 : représentation schématique de la méthode des quatre quadrants utilisée pour définir le critère principal d'évaluation dans l'étude PhagoBurn

Source : annexe de la publication des résultats de PhagoBurn (53)

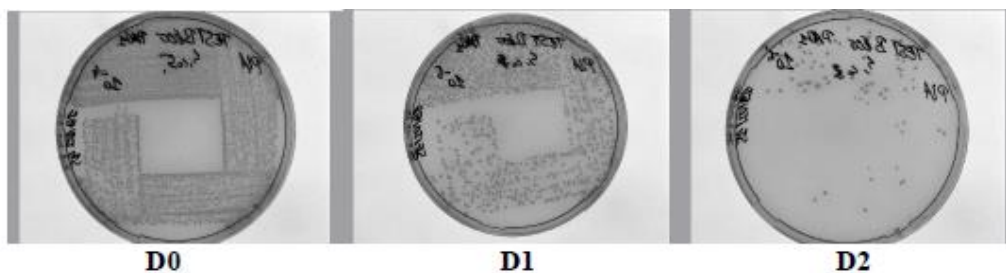


Figure 20 : exemple, après incubation et sur plusieurs jours, de résultats de la détermination semi-quantitative du nombre de colonies de *P. aeruginosa* après prélevement sur une brûlure infectée

Source : annexe de la publication des résultats de PhagoBurn (53)

### 4.3) Analyse des résultats

Les résultats de l'étude PhagoBurn font apparaître plusieurs limites mais aussi plusieurs éléments intéressants concernant la phagothérapie.

Tout d'abord, concernant le critère principal d'évaluation (temps nécessaire à la réduction de la charge bactérienne d'au moins deux quadrants), les résultats montrent que ce critère est atteint dans une médiane de 47 heures dans le groupe du traitement standard contre une médiane de 144 heures dans le groupe PP1131. Le temps médian pour obtenir une diminution durable de la charge bactérienne est donc plus long avec les bactériophages qu'avec le traitement standard.

D'autres limites sont également apparues.

Bien que l'étude ait été randomisée, les groupes de patients étaient déséquilibrés. En effet, les patients du groupe PP1131 étaient globalement moins brûlés (sévérité des brûlures définie par

le pourcentage de surface corporelle totale brûlée) et plus âgés (âge médian de 61 ans contre 37 ans) que les patients du groupe du traitement standard. Or, ces critères représentent des facteurs de risque de gravité. De plus, la charge bactérienne était plus élevée dans le groupe PP1131 que dans le groupe du traitement standard, ce qui peut également créer une différence d'efficacité du traitement.

La sensibilité initiale des souches bactériennes au cocktail de phages n'a pas été testée dans un but de simplification du protocole et de traitement plus rapide. La vérification de la sensibilité des bactéries aux phages par la réalisation de phagogrammes constitue cependant un élément primordial avant l'initiation d'une phagothérapie.

L'utilisation d'une matrice était nécessaire afin d'appliquer la solution de phages ce qui constitue une possibilité de piégeage des phages, bien que les essais précliniques *in vitro* aient montré que la matrice n'avait pas d'effet sur leur libération.

Concernant les bactériophages plus précisément, plusieurs éléments pouvant expliquer le résultat obtenu sont apparus :

- Les études auxiliaires ont révélé la présence de souches de bactéries résistantes chez les patients en échec de traitement par PP1131.
- Les études de stabilité ont montré une diminution du titre global du mélange de phages au cours du temps. Après dilution pour application, le titre du cocktail ne s'élevait donc plus qu'à  $10^2$  PFU/mL au lieu des  $10^6$  PFU/mL attendues. Préparés séparément, les phages étaient quant à eux stables à une concentration de  $10^9$  PFU/mL plus de 24 mois après leur fabrication.

Le faible titre des phages appliqués aux patients ainsi que la charge bactérienne élevée dans le groupe PP1131 aboutissent à une faible MOI au site de l'infection (rapport bactériophages/bactéries de 1:10 000 au lieu d'une MOI initialement prévue de 10:1). Cette faible MOI a pour conséquence le ralentissement de la propagation des phages et entraîne une faible diminution de la charge bactérienne.

En janvier 2017 le recrutement a été stoppé et en mars 2017 la décision a été prise d'arrêter l'étude plus tôt que prévu à cause d'une efficacité insuffisante. Plusieurs problèmes ont concouru à l'arrêt de l'étude :

- Il y a eu une surestimation initiale du nombre de mono-infections à *P. aeruginosa* chez les patients hospitalisés.
- La production du cocktail de phages a duré beaucoup plus longtemps que prévu (l'établissement du processus de fabrication a duré 25 mois au lieu de 14 mois).
- Le recrutement et les inclusions ont été suspendus de janvier à mai 2016 à cause de la découverte de l'instabilité du cocktail de phages.

Tout cela a abouti à une diminution du nombre de patients inclus dans l'étude et en a donc réduit la puissance statistique.

Malgré tout, des résultats intéressants ont aussi été obtenus.

Tout d'abord, même si cela a été moins rapide qu'avec le traitement standard, la charge bactérienne quotidienne a été réduite avec succès de plus de deux quadrants chez la moitié des patients à la fin du traitement par PP1131 (et cela indépendamment d'un traitement antibiotique systémique). C'est la première fois qu'une diminution cliniquement pertinente de la charge bactérienne est observée dans un essai clinique après 7 jours d'une application topique de phages.

Ensuite, trois des treize patients analysables du groupe PP1131 ont présenté des effets indésirables contre sept des treize patients dans le groupe du traitement standard. Il y a donc eu moins d'effets indésirables avec les phages qu'avec la sulfadiazine d'argent ; cela permet de montrer qu'ils ont un profil de sécurité favorable.

En outre, les complications infectieuses et le choc septique sont apparus deux fois plus fréquemment dans le groupe du traitement standard que dans le groupe PP1131, ce qui suppose un passage systémique des phages (la barrière cutanée étant altérée en cas de brûlure, il existe une absorption systémique des produits topiques) à l'origine d'une activité immunomodulatrice non spécifique avec une stimulation immunitaire, des effets anti-inflammatoires et une activation de la phagocytose par les phages. De faibles doses de bactériophages pourraient-elles donc entraîner une modulation de la réponse immunitaire ? Cela a déjà été évoqué mais des recherches devront confirmer cette hypothèse.

#### **4.4) Conclusion**

Même si plusieurs problèmes ont compliqué le parcours de l'étude clinique PhagoBurn (instabilité du cocktail, résistance des bactéries aux phages, titre administré insuffisant) et que le résultat du traitement par les phages a été moins concluant que le traitement standard, cette étude aura permis de montrer qu'il est possible de réaliser des études cliniques sur les bactériophages et de produire des cocktails de phages en respectant les BPF et les normes industrielles modernes.

La charge bactérienne a tout de même été réduite, la sécurité des phages a été constatée et les effets indésirables ont été moins nombreux qu'avec le traitement standard.

Il est aujourd'hui nécessaire de réaliser d'autres essais cliniques afin d'améliorer la stabilité et les formules des préparations phagiques. Il faudra également utiliser des concentrations plus importantes de phages dans des échantillons de patients plus larges et réaliser au préalable des phagogrammes.

La production, la distribution et la réglementation doivent être adaptées aux bactériophages afin de permettre la normalisation de la phagothérapie.

Enfin, la voie du traitement personnalisé doit être envisagée (avec un cadre réglementaire approprié) afin d'éviter les problèmes de stabilité des préparations et de permettre de traiter des infections polymicrobiennes. Pour cela, des phagothèques doivent être créées et les méthodes de fabrication doivent être établies afin de pouvoir réaliser les préparations phagiques à l'hôpital dès que cela sera nécessaire.

## **5. Projets de recherche sur la phagothérapie au stade préclinique**

L'essai clinique PhagoBurn fut le premier essai collaboratif européen chez l'Homme. Il a permis d'ouvrir la voie au développement industriel de bactériophages thérapeutiques afin de traiter l'être humain grâce à la coopération d'entreprises spécialisées qui ont développé et produit ces phages, de médecins de différents pays et des autorités sanitaires. Grâce à cette impulsion, plusieurs autres projets ont été initiés et sont actuellement au stade préclinique. L'objectif est de développer des phages thérapeutiques selon les standards pharmaceutiques et d'obtenir les autorisations réglementaires afin de pouvoir débiter la phase clinique de ces différents projets pour tester les bactériophages chez l'Homme.

À plus long terme, si les études cliniques sont concluantes et que les obstacles concernant la production et la réglementation des phages sont surmontés, c'est l'autorisation des bactériophages qui peut être envisagée, et, avec elle, le retour de la phagothérapie légalisée et accessible à tous les patients la nécessitant.

### **5.1) Le projet PHOSA**

Le but du projet PHOSA est de développer un traitement de phagothérapie contre les infections ostéo-articulaires et les infections de l'ulcère du pied diabétique à *Staphylococcus aureus*. Ce projet associe Pherecydes Pharma à deux autres sociétés, BioFilm Control et Vivexia, ainsi qu'à deux hôpitaux, le Centre hospitalier intercommunal de Villeneuve-Saint-Georges et les Hospices Civils de Lyon.

L'intérêt de développer la phagothérapie dans ce type d'infections est que de plus en plus de souches bactériennes qui en sont responsables deviennent résistantes aux antibiotiques et que ces infections sont souvent graves, à l'origine de séquelles importantes et d'une mortalité élevée.

La première étape de ce projet a débuté en 2014 et s'est achevée en 2017. Elle a permis de mettre au point un mélange de bactériophages efficaces contre les infections ostéo-articulaires et de l'ulcère du pied diabétique provoquées par *Staphylococcus aureus*. Après avoir identifié et caractérisé des phages actifs contre *S. aureus*, leur efficacité et leur tolérance ont été testées sur plusieurs modèles d'infections puis un procédé de production industrielle a été réalisé. Toutes ces données visent à permettre l'autorisation des préparations de phages afin de les utiliser dans les études cliniques. La phase clinique doit commencer en 2019 (54).

### **5.2) Le projet PneumoPhage**

Le projet PneumoPhage est porté par la société DTF (Diffusion Technique Française), spécialisée dans le développement de nouveaux dispositifs médicaux adaptés à la nébulisation de médicaments, et a débuté en 2015. La société DTF s'est associée à Pherecydes Pharma, afin de développer les cocktails de phages, et au Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR) du laboratoire INSERM UMR 1100 de l'Université de Tours.

L'objectif est de montrer l'intérêt d'un traitement de phagothérapie par voie inhalée dans les infections des voies respiratoires aiguës à *Pseudomonas aeruginosa* grâce à des modèles précliniques et de tester par la suite, lors d'un essai clinique, les meilleurs phages actifs contre ces infections.

Les infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* sont en effet responsables de complications graves et fréquentes dans les services de soins intensifs et de réanimation que sont les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique (55).

### **5.3) Le projet PhagUTI**

Enfin, le projet le plus récent s'appelle PhagUTI et est issu de la collaboration de l'entreprise Pherecydes Pharma et de BIOASTER, un institut d'innovation technologique en microbiologie français. L'objectif de ce projet est de montrer l'intérêt de la phagothérapie dans la prise en charge des infections urinaires complexes causées par *Escherichia coli*, notamment celles associées à un cathéter et la pyélonéphrite, et de montrer, *in vivo*, l'efficacité des phages à traiter ce genre d'infections (56).

## Conclusion

---

La Semaine mondiale pour un bon usage des antibiotiques (du 18 au 24 novembre 2019) ainsi que la Journée européenne d'information sur les antibiotiques (le 18 novembre 2019) furent l'occasion de remettre en lumière et de rappeler au public et aux professionnels de santé l'enjeu que représente l'antibiorésistance à travers le monde.

La résistance aux antibiotiques est identifiée comme une menace majeure de la santé publique mondiale par l'OMS et les Nations Unies. C'est un sujet qui doit concerner tous les pays et leurs institutions. En France, depuis 2016, une feuille de route interministérielle coordonne les différents plans d'actions mis en place. La stratégie de lutte contre l'antibiorésistance s'inscrit actuellement dans un nouveau concept, « One Health » (« Une seule santé »), qui promeut une action globale réunissant santé humaine, animale et environnement, car tout est lié (57).

En France, même si la consommation globale d'antibiotiques tend à se stabiliser et que le nombre de prescriptions a diminué depuis 2009, nos niveaux de consommation sont encore 30% au-dessus de la moyenne européenne et les impasses thérapeutiques que constituent certaines infections bactériennes aboutissent à des milliers de décès par an (57).

Deux stratégies principales doivent être associées pour lutter contre l'antibiorésistance. D'abord, prévenir les infections et limiter la transmission des bactéries et des gènes de résistance et, d'autre part, utiliser les antibiotiques à bon escient (la bonne molécule, à la bonne dose et pendant la bonne durée) (58).

Concernant la prévention, le pharmacien a un rôle primordial à jouer. En effet, son rôle de professionnel de santé de proximité lui permet de dialoguer avec son patient et de pouvoir lui rappeler les modalités de prise des traitements antibiotiques, les règles d'hygiène à adopter ainsi que l'importance des vaccinations afin de prévenir la propagation de certaines maladies infectieuses.

En outre, face au problème complexe que représente l'antibiorésistance, il est nécessaire de chercher d'autres solutions. La phagothérapie pourrait en être une.

Les bactériophages sont utilisés depuis des années en biologie moléculaire, dans l'industrie agro-alimentaire, l'agriculture ou l'élevage. Leur rôle dans la nature n'est pas encore complètement connu et ils présentent en outre des propriétés intéressantes méritant d'être explorées, comme, par exemple, la production d'endolysines, enzymes qui détruisent les bactéries.

La phagothérapie est utilisée quotidiennement dans les pays de l'Est et traite de façon efficace de nombreux patients, cherchant souvent, dans cette thérapeutique, le traitement de la dernière chance.

En France et en Europe, la phagothérapie ne fait plus partie de la Pharmacopée depuis de nombreuses années, faute d'essais cliniques réalisés et d'AMM accordées.

Heureusement, depuis quelques années, des chercheurs et des entreprises innovantes s'y intéressent à nouveau. Des préparations de phages sont produites de façon industrielle en respectant les BPF et des essais cliniques ont été réalisés ou sont en cours actuellement.



Tout cela devra permettre de répondre aux questions qui subsistent quant à la fabrication, l'efficacité ou la sécurité des bactériophages.

La législation et la réglementation, inexistantes concernant les phages actuellement, devront s'y adapter afin d'accorder à la phagothérapie le rôle qu'elle mérite dans l'arsenal thérapeutique contre les bactéries résistantes en tant qu'alternative ou complément aux antibiotiques.

Il paraît désormais important d'amorcer un changement des mentalités, tant sur l'usage des antibiotiques que sur le modèle pharmaco-économique actuel, afin de permettre le développement des bactériophages, mais aussi promouvoir la collaboration entre les différents spécialistes impliqués pour espérer ne jamais entrer dans une ère post-antibiotiques.

## Références bibliographiques

---

1. Dublanchet A, Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1 août 2008;38(8):415-20.
2. Dublanchet A. La phagothérapie : des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Lausanne: Favre; 2017. 247 p.
3. Dufour N, Debarbieux L. La phagothérapie : Une arme crédible face à l'antibiorésistance. *Med Sci (Paris)*. avr 2017;33(4):410-6.
4. Prevel R, Dufour N. Potentialités des bactériophages pour l'infectiologie moderne. *La Revue de Médecine Interne*. 1 oct 2016;37(10):657-60.
5. Luria SE, Anderson TF. The Identification and Characterization of Bacteriophages with the Electron Microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. avr 1942;28(4):127-130.1.
6. Ackermann H-W. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol*. 1 févr 2007;152(2):227-43.
7. Dufour N, Chevallereau A, Debarbieux L. Les bactériophages : comment ces virus alliés fonctionnent-ils ? *Biofutur*. févr 2016;373:31-4.
8. Le Faou A. *Virologie humaine*. Reuil-Malmaison, France: Pradel; 2012. 566 p.
9. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Internet]. [cité 1 nov 2019]. Disponible sur: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
10. A. Dublanchet, O. Patey. La phagothérapie. *La lettre de l'infectiologue*. juill 2015;(4):142-8.
11. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters*. 31 mars 2015;28(1):13-20.
12. Rolain J-M, Francois P, Hernandez D, Bittar F, Richet H, Fournous G, et al. Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biology Direct*. 2009;4(1):1.
13. Perrin JF. Transduction chez les bactéries [Internet]. *Biotechnologies et bioanalyses* [cité 29 oct 2019]. Disponible sur: [http://www.perrin33.com/microbiologie/genetique/transduction\\_phage\\_bacterie.php](http://www.perrin33.com/microbiologie/genetique/transduction_phage_bacterie.php)
14. Faruque SM. Role of Phages in the Epidemiology of Cholera. In: Nair GB, Takeda Y, éditeurs. *Cholera Outbreaks* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013 [cité 8 août 2019]. p. 165-80. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/82\\_2013\\_358](http://link.springer.com/10.1007/82_2013_358)
15. Faruque SM, Islam MJ, Ahmad QS, Faruque ASG, Sack DA, Nair GB, et al. Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics : role of host-mediated amplification of phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 26 avr 2005;102(17):6119-24

16. Faruque SM, Naser IB, Islam MJ, Faruque ASG, Ghosh AN, Nair GB, et al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 févr 2005;102(5):1702-7.
17. The Nobel Prize. Frederick Sanger - Biographical [Internet]. [cité 21 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1958/sanger/biographical/>
18. Ray M-C. *Infections : le traitement de la dernière chance*. Vergèze, France : Thierry Souccar éditions; 2018. 176 p.
19. Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*. 4 déc 1915;186(4814):1241-3.
20. Académie des sciences. Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences [Internet]. Gallica. 1917 [cité 26 juin 2019]. Disponible sur: <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k3118k>
21. Dublanchet A. Phagothérapie : des bactériophages pour traiter les infections bactériennes. *EMC - Maladies infectieuses* 2017;14(1):1-6 [Article 8-005-B-10].
22. Bruynoghe R, Maisin J. Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du staphylocoque. *C R Soc Biol*. 1921;85:1120-1.
23. Gratia A. La lyse transmissible du staphylocoque. Sa production ; ses applications thérapeutiques. *C R Soc Biol*. 1922;86:276-8.
24. Bacteriophages [Internet]. Microgen. [cité 5 nov 2019]. Disponible sur: [https://www.microgen.ru/en/products/bakteriofagi/?SHOWALL\\_1=1](https://www.microgen.ru/en/products/bakteriofagi/?SHOWALL_1=1)
25. Colomb-Cotinat M, Lacoste J, Brun-Buisson C, Jarlier V, Coignard B, Vaux S. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* [Internet]. déc 2016 [cité 26 sept 2019];5(1). Disponible sur: <http://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-016-0154-z>
26. Résistance aux antibiotiques [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 16 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/resistance-antibiotiques>
27. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. Phage-Antibiotic Synergy (PAS) :  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS ONE*. 29 août 2007;2(8):e799.
28. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. La «synergie phages-antibiotiques» : Un enjeu pour la phagothérapie. *Médecine/sciences*. mai 2008;24(5):449-51.
29. Ly-Chatain MH. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Front Microbiol* [Internet]. 18 févr 2014 [cité 4 oct 2019];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3927074/>

30. Abedon ST, Thomas-Abedon C. Phage therapy pharmacology. *Curr Pharm Biotechnol.* janv 2010;11(1):28-47.
31. Vectorisation - Acadpharm [Internet]. Académie Nationale de Pharmacie [cité 21 janv 2020]. Disponible sur: <http://dictionnaire.acadpharm.org/w/Vectorisation>
32. De Vos D, Verbeken G, Dublanche A, Jennes S, Pirnay J-P. La phagothérapie durable : une question d'évolution. *Biofutur.* févr 2016;373:44-7.
33. Code de la santé publique - Article L5121-1 [Internet]. Légifrance. [cité 15 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do?idSectionTA=LEGISCTA000006171366&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20191014>
34. Code de la santé publique - Article L5111-1 [Internet]. Légifrance. [cité 17 oct 2019]. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=AC49716B21D80BA8BDC95E4B29A3706E.tplgfr21s\\_1?idSectionTA=LEGISCTA000006171363&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20191017](https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=AC49716B21D80BA8BDC95E4B29A3706E.tplgfr21s_1?idSectionTA=LEGISCTA000006171363&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20191017)
35. Déclaration d'Helsinki de L'AMM – Principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains [Internet]. WMA - The World Medical Association. [cité 15 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.wma.net/fr/policies-post/declaration-dhelsinki-de-lamm-principes-ethiques-applicables-a-la-recherche-medicale-impliquant-des-etres-humains/>
36. Qu'est ce qu'une autorisation temporaire d'utilisation? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 17 oct 2019]. Disponible sur: [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Qu-est-ce-qu-une-autorisation-temporaire-d-utilisation/\(offset\)/0](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Qu-est-ce-qu-une-autorisation-temporaire-d-utilisation/(offset)/0)
37. Phagothérapie : L'ANSM annonce la création d'un comité scientifique spécialisé temporaire (CSST) intitulé « Phagothérapie – Retour d'expérience et perspectives » [Internet]. ANSM. [cité 15 oct 2019]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Phagotherapie-L-ANSM-annonce-la-creation-d-un-comite-scientifique-specialise-temporaire-CSST-intitule-Phagotherapie-Retour-d-experience-et-perspectives>
38. CSST Phagothérapie - Retour d'expérience et perspectives 2019 [Internet]. ANSM. [cité 15 oct 2019]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/L-ANSM/Comites-scientifiques-specialises-temporaires/Comites-scientifiques-temporaires/Comites-scientifiques-temporaires/CSST-Phagotherapie-Retour-d-experience-et-perspectives>
39. Médicament (développement du) [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 15 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/medicament-developpement>
40. Pirnay J-P, Blasdel BG, Bretaudeau L, Buckling A, Chanishvili N, Clark JR, et al. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. *Pharm Res.* 2015;32:2173-9.

41. Règlement (CE) n° 1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004 (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. Eur-Lex. [cité 15 nov 2019]. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2007/1394/oj/fra>
42. Prophylaxie : définition de prophylaxie [Internet]. CNRTL Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales. [cité 30 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.cnrtl.fr/definition/prophylaxie//0>
43. Home [Internet]. PhageGuard. [cité 30 sept 2019]. Disponible sur: <https://phageguard.com/>
44. Bacteriophage Products [Internet]. Intralytix. [cité 30 sept 2019]. Disponible sur: <http://www.intralytix.com/index.php?page=prod>
45. AgriPhage™ - Bactéricide | Sandy, UT [Internet]. [cité 30 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.agriphage.com/>
46. Staphitekt™ de Micros [Internet]. [cité 1 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.staphitekt.com/en/>
47. Technologie - Micros.com [Internet]. [cité 1 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.micros.com/content/technology.aspx>
48. Recherche et développement [Internet]. Leem Les entreprises du médicament. [cité 7 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>
49. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, et al. Bacteriophages Can Treat and Prevent Pseudomonas aeruginosa Lung Infections. *The Journal of Infectious Diseases*. avr 2010;201(7):1096-104.
50. Saussereau E, Debarbieux L. Bacteriophages in the experimental treatment of Pseudomonas aeruginosa infections in mice. *Adv Virus Res*. 2012;83:123-41.
51. Wright A, Hawkins CH, Änggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy. *Clinical Otolaryngology*. 2009;34(4):349-57.
52. Hawkins C, Harper D, Burch D, Anggård E, Soothill J. Topical treatment of Pseudomonas aeruginosa otitis of dogs with a bacteriophage mixture: a before/after clinical trial. *Vet Microbiol*. 15 déc 2010;146(3-4):309-13.
53. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by Pseudomonas aeruginosa (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*. 1 janv 2019;19(1):35-45.
54. PHOSA : projet de recherche collaboratif pour mettre au point un traitement de phagothérapie contre les infections ostéo-articulaires et celles de l'ulcère du pied diabétique [Internet]. Pherecydes Pharma. [cité 8 nov 2019]. Disponible sur: <https://fr.pherecydes-pharma.com/recherche-collaborative-phosa.html>

55. PneumoPhage : projet de recherche collaboratif pour la mise au point d'un traitement de phagothérapie efficace contre les infections des voies respiratoires [Internet]. Pherecydes Pharma. [cité 8 nov 2019]. Disponible sur: <https://fr.pherecydes-pharma.com/projet-recherche-pneumophage.html>
56. Pherecydes Pharma et BIOASTER s'associent pour explorer l'utilisation de la phagothérapie dans le traitement des infections compliquées des voies urinaires [Internet]. Pherecydes Pharma. [cité 8 nov 2019]. Disponible sur: <https://fr.pherecydes-pharma.com/projet-phaguti.html>
57. Consommation d'antibiotiques et antibiorésistance en France en 2018 [Internet]. Santé publique France. [cité 20 nov 2019]. Disponible sur: [/les-actualites/2019/consommation-d-antibiotiques-et-antibioresistance-en-france-en-2018](#)
58. Résistance aux antibiotiques [Internet]. Santé publique France. [cité 20 nov 2019]. Disponible sur: [/maladies-et-traumatismes/infections-associees-aux-soins-et-resistance-aux-antibiotiques/resistance-aux-antibiotiques](#)

## Annexes

---

Annexe 1 : « *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques* » Note de Félix d'Hérelle lue par Emile Roux, Comptes rendus de l'Académie des sciences, Septembre 1917..... 88

Annexe 2 : tableau des exigences de qualité et de sécurité pour des produits de phagothérapie durable. Reproduit et traduit d'après (40) ..... 91

**Annexe 1 : « Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques » Note de Félix d'Hérelle lue par Emile Roux, Comptes rendus de l'Académie des sciences, Septembre 1917.**

SÉANCE DU 10 SEPTEMBRE 1917.

373

nocive de l'uranium (glycosurie uranique expérimentale) et l'effet favorable de doses minimes d'uranium dans le traitement du diabète sucré chez l'homme, d'après Hughes et West.

Après avoir ainsi constaté que le potassium peut être remplacé par d'autres substances en quantités équiradioactives <sup>(1)</sup>, on pouvait se demander si les substances radioactives dans le liquide circulant pourraient être remplacées par l'émanation provenant d'une préparation de radium ou de mésothorium. En effet, en faisant circuler ladite solution saline sucrée, mais exempte de potassium (par conséquent NaCl : 0,7 pour 100; NaHCO<sub>3</sub> : 0,02 pour 100; CaCl<sub>2</sub> : 0,0075 pour 100) par les deux reins, on constate que c'est seulement le rein soumis à l'influence du mésothorium qui retient du glycose et qui en retient la même quantité qu'il en retiendrait avec 0,01 pour 100 de KCl, ou des doses équiradioactives d'uranium ou de radium.

Il est encore un autre phénomène qui doit attirer l'attention : le rein soumis à l'action radiante du mésothorium montre un gonflement très apparent, facile à vérifier en comparant son poids à celui du rein non soumis à l'action du mésothorium.

Rappelons, à ce propos, une observation de R. Siebeck <sup>(2)</sup>, d'après laquelle le rein vivant de la grenouille, plongé dans une solution de KCl isotonique au sérum sanguin, présente un gonflement considérable. Au contraire, ce gonflement fait défaut dans une solution de NaCl.

L'étude quantitative de la perméabilité des reins au glycose nous semble comporter un intérêt tout spécial au point de vue de la biologie générale. En effet, la couche épithéliale du glomérule est une membrane vivante très simple, dont la perméabilité au glycose est un réactif extrêmement sensible à toutes sortes d'influences physiologiques.

MICROBIOLOGIE. — *Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques.* Note <sup>(3)</sup> de M. F. D'HERELLE, présentée par M. Roux.

Des selles de divers sujets convalescents de dysenterie bacillaire, et dans un cas de l'urine, j'ai isolé un microbe invisible doué de propriétés anta-

<sup>(1)</sup> Voir ZWAARDEMAKER et ses collaborateurs, *Koninklijke Academie van Wetenschappen*, 28 avril, 27 mai, 30 septembre, 10 novembre 1916.

<sup>(2)</sup> R. SIEBECK, *Pflüger's Archiv*, t. 148, 1912, p. 443.

<sup>(3)</sup> Séance du 3 septembre 1917.



gonistes vis-à-vis du bacille de Shiga. Sa recherche est particulièrement aisée dans les cas d'entérite banale consécutive à une dysenterie; chez les convalescents ne présentant pas cette complication la disparition du microbe anti suit de très près celle du bacille pathogène. Malgré de nombreux examens, je n'ai jamais trouvé de microbes antagonistes, ni dans les selles de dysentériques à la période d'état, ni dans les selles de sujets normaux.

L'isolement du microbe anti-Shiga est simple : on ensemence un tube de bouillon avec quatre à cinq gouttes de selles, on place à l'étuve à 37° pendant 18 heures puis on filtre à la bougie Chamberland L<sub>2</sub>. Une petite quantité d'un filtrat actif ajoutée, soit à une culture en bouillon de bacilles de Shiga, soit à une émulsion de ces bacilles dans du bouillon ou même dans de l'eau physiologique, provoque l'arrêt de la culture, la mort des bacilles puis leur lyse qui est complète après un laps de temps variant de quelques heures à quelques jours suivant l'abondance plus ou moins grande de la culture et la quantité de filtrat ajoutée.

Le microbe invisible cultive dans la culture lysée de Shiga car une trace de ce liquide, reportée dans une nouvelle culture de Shiga, reproduit le même phénomène avec la même intensité : j'ai effectué jusqu'à ce jour, avec la première souche isolée, plus de 50 réensemencements successifs. L'expérience suivante donne d'ailleurs la preuve visible que l'action antagoniste est produite par un germe vivant : si l'on ajoute à une culture de Shiga une dilution d'une culture précédente lysée, de façon que la culture de Shiga n'en contienne qu'un millionième environ, et si, immédiatement après, on étale sur gélose inclinée une gouttelette de cette culture on obtient, après incubation, une couche de bacilles dysentériques présentant un certain nombre de cercles d'environ 1<sup>mm</sup> de diamètre, où la culture est nulle; ces points ne peuvent représenter que des colonies du microbe antagoniste : une substance chimique ne pourrait se concentrer sur des points définis. En opérant sur des quantités mesurées, j'ai pu voir qu'une culture lysée de Shiga contient de cinq à six milliards de germes filtrants par centimètre cube. Un trois-milliardième de centimètre cube d'une culture précédente en Shiga, c'est-à-dire un seul germe, introduite dans un tube de bouillon, empêche la culture du Shiga même ensemencé largement; la même quantité ajoutée à 10<sup>cm<sup>3</sup></sup> d'une culture de Shiga la stérilise et la lyse en cinq ou six jours.

Les diverses souches du microbe anti que j'ai isolées n'étaient primitivement actives que contre le bacille de Shiga; par culture en symbiose avec les bacilles dysentériques type Hiss ou Flexner j'ai pu, après quelques

passages, les rendre antagonistes pour ces bacilles. Je n'ai obtenu aucun résultat en opérant sur d'autres microbes : bacilles typhiques et paratyphiques, staphylocoques, etc. L'apparition d'une action antagoniste contre le bacille de Flexner ou celui de Hiss s'accompagne d'une diminution puis d'une perte du pouvoir contre le Shiga, ce pouvoir reparait d'ailleurs avec son intensité primitive après quelques cultures en symbiose; la spécificité de l'action antagoniste n'est donc pas inhérente à la nature même du microbe invisible, mais acquise dans l'organisme du malade par la culture en symbiose avec le bacille pathogène.

En l'absence de bacilles dysentériques le microbe anti ne cultive dans aucun milieu, il n'attaque pas les bacilles dysentériques tués par la chaleur; par contre il cultive parfaitement dans une émulsion en eau physiologique de bacilles lavés : il résulte de ces faits que le microbe antidysentérique est un bactériophage obligatoire.

Le microbe anti-Shiga n'exerce aucune action pathogène sur les animaux d'expérience. Les cultures lysées de Shiga sous l'action du microbe invisible, qui sont en réalité des cultures du microbe anti, jouissent de la propriété d'immuniser le lapin contre une dose de bacilles de Shiga tuant les témoins en cinq jours.

J'ai recherché si l'on pouvait mettre en évidence un microbe anti chez les convalescents de fièvre typhoïde : dans deux cas, une fois dans l'urine, l'autre fois dans les selles, j'ai réussi à isoler un microbe filtrant doué de propriétés lytiques nettes vis-à-vis du bacille paratyphique A, mais toutefois moins marquées que chez le microbe anti-Shiga. Ces propriétés se sont atténuées dans les cultures suivantes.

En résumé, chez certains convalescents de dysenterie, j'ai constaté que la disparition du bacille dysentérique coïncidait avec l'apparition d'un microbe invisible doué de propriétés antagonistes vis-à-vis du bacille pathogène. Ce microbe, véritable microbe d'immunité, est un bactériophage obligatoire; son parasitisme est strictement spécifique, mais s'il est limité à une espèce à un moment donné, il peut s'exercer tour à tour sur divers germes par accoutumance. Il semble donc que dans la dysenterie bacillaire, à côté d'une immunité antitonique homologue, émanant directement de l'organisme du sujet atteint, il existe une immunité antimicrobienne hétérologue produite par un microorganisme antagoniste. Il est probable que ce phénomène n'est pas spécial à la dysenterie, mais qu'il est d'un ordre plus général car j'ai pu constater des faits semblables, quoique moins accentués, dans deux cas de fièvre paratyphoïde.

## **Annexe 2 : tableau des exigences de qualité et de sécurité pour des produits de phagothérapie durable. Reproduit et traduit d'après (40)**

### **A. Environnement de production**

Lorsque les activités de production comprennent le traitement de produits phagiques intermédiaires, en vrac ou finis exposés à l'environnement, celui-ci doit avoir lieu dans un environnement avec une qualité de l'air et une propreté spécifiées, afin de minimiser le risque de contamination. L'efficacité de ces mesures doit être validée et contrôlée. Lorsque les produits intermédiaires, en vrac ou finis sont exposés à l'environnement pendant le traitement, sans processus d'inactivation microbienne subséquent, une *qualité de l'air* avec un nombre de particules et un nombre de colonies microbiennes équivalentes à celles du grade A tel que défini dans l'actuel Guide européen des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), l'annexe 1 et la Directive 2003/94/CE sont requises dans un environnement de fond au moins équivalent à celui de la norme BPF grade D en termes de particules et de numérations microbiennes. Le niveau de biosécurité (BSL) est déterminé par la bactérie hôte utilisée dans les processus de production (*par exemple*, BSL-2 pour *Pseudomonas aeruginosa*).

### **B. Procédés de production, équipements et matériaux**

Tout l'équipement et tout le matériel doivent être conçus et entretenus de manière à répondre à l'usage auquel ils sont destinés et doivent minimiser les risques pour les destinataires et le personnel. Tous les équipements et dispositifs techniques critiques doivent être identifiés et validés, régulièrement inspectés et entretenus à titre préventif conformément aux instructions du fabricant. Lorsque l'équipement ou des matériaux affectent des paramètres de traitement ou de stockage critiques (par exemple, température, pression, comptage de particules, niveaux de contamination microbienne), ils doivent être identifiés et faire l'objet d'une surveillance, d'alerte, d'alarmes et de mesures correctives appropriées, selon le cas, pour détecter les dysfonctionnements et les défauts et garantir le maintien du respect des paramètres critiques limites acceptables en tout temps. Tous les équipements dotés d'une fonction de mesure critique doivent être étalonnés par rapport à un étalon traçable, le cas échéant. La maintenance, l'entretien, le nettoyage, la désinfection et l'assainissement de tous les équipements critiques doivent être effectués régulièrement et enregistrés en conséquence.

Les processus de production doivent être décrits en détail (équipement, matériaux, milieu de culture, additifs, conditions de culture, étapes de purification, etc.) dans les procédures opératoires standard (SOP) et doivent être validés (les procédures publiées dans des revues pertinentes à comité de lecture peuvent être envisagées « validées »).

Les SOP doivent détailler les spécifications de tous les matériaux et réactifs critiques. En particulier, les spécifications pour les milieux de culture, les additifs (par exemple, les solutions) et les matériaux d'emballage doivent être définies. Les réactifs et matériels critiques doivent satisfaire aux exigences et spécifications documentées et, le cas échéant, aux exigences de la directive 93/42/CEE du Conseil du 14 juin 1993 concernant les dispositifs médicaux et de la directive 98/79/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 octobre 1998 sur les dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*. Si possible, des milieux de culture et des additifs exempts de composants d'origine animale doivent être utilisés (la Note d'orientation sur la minimisation du risque de transmission d'agents de l'encéphalopathie spongiforme animale par les médicaments à

usage humain et vétérinaire (EMA/410/01) dans sa version actuelle doit être appliquée). Si aucun média exempt de produits d'origine animale n'est utilisé, une certification exempte d'encéphalopathie spongiforme animale transmissible (EST) doit être obtenue pour tous les composants contenant des produits d'origine animale.

Les méthodes analytiques peuvent être validées selon : a) le Guide sur la validation des méthodes bioanalytiques (EMA/CHMP/EWP/192217/2009) ou b) le document CPMP/ICH/381/95 « ICH dossier Q2 (RI) Validation des procédures analytiques : Texte et méthodologie ».

Des systèmes de banques de bactéries et de phages doivent être mis en place. Ces systèmes de banques sont généralement constitués de lots de semences mères et de lots de semences de travail. La génération et la caractérisation des banques doivent être effectuées conformément aux principes de la directive Q5D du CPMP/ICH. Les phages et les bactéries stockés en banque doivent être caractérisés pour les marqueurs phénotypiques et génotypiques pertinents, de manière à garantir l'identité, la viabilité (activité des phages) et la pureté des organismes utilisés pour la production. Les centres de ressources biologiques pourraient servir de dépôts pour les semences mères de bactériophages et les bactéries hôtes.

**C. Spécifications de l'Assurance de la Qualité et du Contrôle de la Qualité (AQ/CQ)**

**1. Bactérie hôte utilisée dans la production (suspensions de stock)**

Les hôtes bactériens utilisés dans le processus de production - à l'exception de la sélection, de l'adaptation et de l'efficacité du placage (EOP) et de la détermination de la gamme d'hôtes - doivent être aussi sûrs (ou moins pathogènes) que possible.

<i>Produits / caractéristiques</i>	<i>Test de contrôle</i>	<i>Limites d'acceptation</i>	<i>Procédures de test recommandées</i>
Origine	Document du pedigree / histoire / niveau de pathogénicité	Origine connue	Examen de la littérature scientifique, des livres de laboratoire, des lettres...
Identification	Identification au niveau des espèces et des souches	Identification des espèces et des souches	- techniques de microbiologie de pointe - techniques de typage hautement discriminantes (moléculaires/génomiques) (par exemple MLST, AFLP, PFGE, Rep-PCR...)

Le plus souvent, il ne sera pas possible de trouver ou de générer rapidement une bactérie hôte appropriée exempte de prophages ou d'éléments ressemblant à des phages, mais il convient néanmoins de s'efforcer d'utiliser des souches non lysogènes, contenant aussi peu de phages ou d'autres éléments d'échange génétique analogues à des phages possible	<ul style="list-style-type: none"> <li>- induction de phages</li> <li>- recherche dans le génome de l'hôte de phages ou d'éléments analogues aux phages</li> </ul>	Le moins possible de phages tempérés, de séquences complètes de prophage ou d'éléments analogues aux phages produits spontanément (ou par induction)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- méthode d'induction <i>in vitro</i> (mitomycine C ou induction UV)</li> <li>- procédures de pointe pour le séquençage et l'analyse (bio-informatique) de l'ADN</li> </ul>
Eviter les souches mutatrices en tant que bactéries hôtes	Dépistage des souches mutatrices en cas de doute	Aucune souche mutatrice	Tests de pointe (par exemple, tests de diffusion sur disque de fosfomycine et de rifampicine)
Conservation/stockage validés (cryoconservation, lyophilisation...)	Surveiller les conditions de stockage (par ex, température)	Variable selon la méthode de conservation	Variable (par ex, sondes de température, étiquettes d'indicateur de température...)
<b>2. Bactériophages (lots de semences mères)</b>			
Origine	Documenter le pedigree / l'historique des bactériophages (par exemple la source d'isolement)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- origine connue</li> <li>- phages naturels ou naturellement évolués</li> </ul>	Examen de la littérature scientifique, des livres de laboratoire, des lettres...
Identification	<ul style="list-style-type: none"> <li>- identification au niveau de la famille (sous-famille), du genre et de l'espèce de la souche</li> <li>- morphologie et biologie</li> </ul>	Identification, morphologie et biologie correspondantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- procédures d'analyse et de séquençage de l'ADN ou de l'ARN à la pointe de la technologie</li> <li>- techniques de génotypage hautement discriminantes (AFLP, fRFLP)</li> <li>- classification de pointe selon l'ICTV</li> </ul>

			<ul style="list-style-type: none"> <li>- microscopie électronique de pointe (facultatif)</li> <li>- courbe de croissance en une étape</li> </ul>
Ne contient pas de déterminants génétiques potentiellement dommageables (par exemple, conférant une toxicité, une virulence, une lysogénie ou une résistance aux antibiotiques)	Analyse du génome pour les déterminants génétiques potentiellement dommageables	Absence de déterminants génétiques potentiellement dommageables	- procédures de pointe en matière de séquençage d'ADN ou d'ARN et d'analyse génomique (bio-informatique)
Non transducteur (facultatif)	Recherche de transduction généralisée	Ne contient pas d'ADN aléatoire d'hôte dans une partie de la progéniture des particules phagiques	Essai de transduction
Efficacité <i>in vitro</i>	<p>Détermination de la gamme d'hôtes sur un panel de souches d'espèces cibles (de référence)</p> <p>Stabilité de la lyse (facultatif)</p> <p>Efficacité du placage (EOP) dans des conditions similaires à une éventuelle application clinique (facultatif)</p> <p>Détermination de la fréquence d'émergence de bactéries résistantes aux phages</p>	<p>Large gamme d'hôtes (si possible)</p> <p>Seuil variable selon les espèces (par exemple, &gt; 75% pour <i>Staphylococcus aureus</i>)</p> <p>Lyse stable en bouillon pendant 24 à 48 h</p> <p>Valeur seuil EOP</p> <p>Basse fréquence d'émergence de résistance</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Titration des bactériophages contre les bactéries cibles selon la méthode de recouvrement à la gélose douce</li> <li>- Test ponctuel</li> <li>Méthode Appelmans</li> <li>Détermination EOP</li> <li>Méthode décrite par Adams</li> </ul>
Amélioration/adaptation/formation (si nécessaire)	Optimisation de la gamme d'hôtes	Gamme d'hôtes élargie et stable	- Titration des bactériophages contre les bactéries cibles selon la

			méthode de recouvrement à la gélose molle - Test ponctuel
Conservation/stockage validés (cryoconservation, lyophilisation...)	Surveiller les conditions de stockage (par ex, température)	Variable selon la méthode de conservation	Variable (par ex, sondes de température, étiquettes d'indicateur de température...)
<b>3. Bactériophages (lots de semences de travail/substances actives)</b>			
Détermination quantitative de la substance active (bactériophages)	Titration des bactériophages	Variable. Typiquement $\log(8) - \log(10)$ PFU/mL	Méthode de recouvrement en gélose molle
Identification de la substance active	Empreinte génomique	Empreinte génomique correspondante (l'écart maximal dépend de la méthode)	Techniques de génotypage de pointe (AFLP, fRFLP)
Contamination microbienne	Stérilité (lorsqu'il n'y a pas de sentiment d'urgence)	Stérile (absence de micro-organismes)	Méthode de filtration membranaire basée sur la Pharmacopée Européenne (PE)
	Absence de pathogènes (quand il y a un sentiment d'urgence)	Aseptique (absence d'agents pathogènes)	Méthodes de microbiologie clinique de pointe
Toxicité	Quantification des endotoxines bactériennes ou des LPS	Dépend de la posologie, de la méthode et de la voie d'administration. La limite maximale pour les applications intraveineuses de produits pharmaceutiques et biologiques est fixée à 5 unités d'endotoxines par kg de poids corporel par heure (PE).	Dosage du lysat d'amibocytes de limule (LAL) selon la méthode PE (par exemple, méthode cinétique-QCL)
Contamination de l'ADN bactérien	Dépister de l'ADN bactérien de l'hôte potentiellement dommageable	Absence de déterminants génétiques potentiellement dommageables dont on sait qu'ils sont présents dans la bactérie hôte	Méthodes pour la quantification de l'ADN bactérien en général (par exemple, PicoGreen) ou pour la quantification de

			séquences d'ADN connues (par exemple, la qPCR)
Acidité ou basicité de la solution aqueuse	Mesure du pH	Variable (généralement 6,5 – 7,5)	Test de pH (méthode PE)
Pureté	Clarté de la solution phagique	Absence de particules visibles	Méthode PE, directive CPMP-ICH
Conservation/stockage validés (refroidissement, cryoconservation, lyophilisation...)	Surveiller/enregistrer/démontrer les conditions de stockage (température)	Variable (par ex, 2 à 8°C)	Variable (par ex, sondes de température, étiquettes d'indicateur de température...)
<b>4. Produits finis</b>			
<p>Les produits en vrac peuvent être dilués (en règle générale pour <math>\log(5) - \log(7)</math> PFU/mL), combinés ou ajoutés à un support (hydrogel, pommade, crème, pansement...) avant l'utilisation clinique. Les solutions de dilution, les supports et les matériaux d'emballage doivent respecter les exigences et spécifications documentées et, le cas échéant, les exigences de la directive 93/42/CEE du Conseil du 14 juin 1993 relative aux dispositifs médicaux. Les transporteurs doivent être choisis de manière à permettre l'activité de phage requise pendant la période d'application prévue (stabilité).</p> <p>Les informations suivantes doivent figurer sur l'étiquette ou dans la documentation d'accompagnement : (a) la description (définition) et, le cas échéant, les dimensions du produit bactériophage ; (b) la date de production du produit bactériophage ; (c) les recommandations de stockage ; (d) les instructions pour ouvrir le récipient, l'emballage et toute manipulation/reconstitution requise ; (e) les dates d'expiration (y compris après ouverture/manipulation) ; (f) des instructions pour la notification des réactions indésirables et/ou des événements indésirables graves ; (g) la présence de résidus potentiellement nocifs (par exemple antibiotiques, oxyde d'éthylène) ; (h) les contre-indications ; (i) comment se débarrasser des bactériophages non utilisés (périmés).</p>			
Stockage validé (chambre froide...)	Surveiller/enregistrer/démontrer les conditions de stockage (température)	Variable (par ex, 2 à 8°C)	Variable (par ex, sondes de température, étiquettes d'indicateur de température...)
<b>D. Durée de conservation des suspensions de stock de phages, des solutions de travail et des produits finis (aux conditions de stockage recommandées)</b>			
Stabilité	- Détermination quantitative périodique des substances actives (bactériophages) ou des produits de dégradation	La durée de conservation est la période de temps pendant laquelle le produit reste stérile et	- Méthode de superposition sur gélose molle



	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Détermination périodique de la stérilité</li> <li>- Mesures périodiques du pH</li> </ul>	où l'activité et le pH restent dans les limites spécifiées	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Directive CPMP-ICH, Q5C, Q1A</li> <li>- Méthode de filtration sur membrane (méthode PE)</li> <li>- Test de pH (méthode PE)</li> </ul>
<b>E. Surveillance</b>			
L'utilisation clinique des produits de thérapie par phages doit être étudiée et rapportée, y compris les événements indésirables et les réactions associés à l'utilisation de ces produits. Un système de rapport centralisé (accessible au public) est justifié.			

## Serment De Galien

---

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

## La phagothérapie : une thérapeutique d'espoir face à l'antibiorésistance ?

---

La phagothérapie utilise les bactériophages (ou phages), virus infectant spécifiquement et uniquement leurs bactéries hôtes, afin de traiter ou prévenir les infections bactériennes. Prédateurs naturels des bactéries, les phages sont présents au sein de nombreux microécosystèmes dans lesquels ils jouent un rôle fondamental, encore partiellement connu. En plus d'être bactéricides, ils présentent d'autres propriétés intéressantes qui pourraient faire l'objet d'applications futures. Utilisés depuis de nombreuses années en biologie moléculaire, les phages sont aujourd'hui utilisés dans l'industrie agro-alimentaire et l'agriculture. En médecine humaine, cependant, la phagothérapie n'est pour l'instant pas autorisée. Abandonnée progressivement après la Seconde Guerre mondiale à la suite de la découverte des antibiotiques, la phagothérapie a continué à être utilisée uniquement dans les pays de l'ex-Union Soviétique. L'antibiorésistance, la pénurie de nouveaux antibiotiques et l'augmentation du nombre de patients en impasse thérapeutique ont fait redécouvrir la phagothérapie comme alternative ou complément aux antibiotiques. De nombreuses publications sont disponibles sur ce sujet, malheureusement, la phagothérapie n'a jamais fait l'objet d'études cliniques répondant aux critères actuels qui permettraient de l'autoriser. La nature des phages pose aussi des problèmes concernant leur fabrication à une échelle industrielle. Des chercheurs et des entreprises s'intéressent à nouveau à cette thérapeutique et plusieurs essais cliniques ont été mis en place ces dernières années afin de recueillir des informations fiables sur la phagothérapie. L'enjeu de ces essais est de répondre à de nombreuses questions sur la fabrication, les contrôles, la qualité pharmaceutique, l'efficacité, la sécurité ou les modes d'administration des phages afin de permettre enfin l'accès aux patients à cette thérapeutique d'espoir.

---

Mots-clés : bactériophages, phagothérapie, thérapie phagique, bactéries, infections, antibiotiques, antibiorésistance.

## Phage therapy : a hope therapy against antibiotic resistance ?

---

Phage therapy uses bacteriophages (or phages), viruses that specifically infect and only their host bacteria, to treat or prevent bacterial infections. Natural predators of bacteria, phages are present in many microecosystems in which they play a fundamental role, still partially known. In addition to being bactericidal, they have other interesting properties that could be the object of future applications. Used for many years in molecular biology, phages are now used in the agri-food industry and agriculture. In human medicine, however, phage therapy is currently not allowed. Gradually abandoned after the Second World War following the discovery of antibiotics, phage therapy continued to be used only in the countries of the former Soviet Union. Antibiotic resistance, the lack of new antibiotics and the increase in the number of patients in therapeutic stalemate have rediscovered phage therapy as an alternative or supplement to antibiotics. Many publications are available on this subject, unfortunately, phage therapy has never been the subject of clinical studies meeting the current criteria that would allow it. The nature of phages also raises problems concerning their manufacture on an industrial scale. Researchers and companies are once again interested in this therapy and several clinical trials have been set up in recent years to gather reliable information on phage therapy. The challenge of these trials is to answer many questions about the manufacturing, the controls, the pharmaceutical quality, the efficiency, the safety or the modes of administration of phages to finally allow the access to the patients to this hope therapy.

---

Keywords : bacteriophages, phage therapy, bacteria, infections, antibiotics, antibiotic resistance.

