



**HAL**  
open science

# Place de la phagothérapie dans le traitement des infections humaines bactériennes : intérêts, enjeux et limites

Jean-Rocques Courtault

## ► To cite this version:

Jean-Rocques Courtault. Place de la phagothérapie dans le traitement des infections humaines bactériennes : intérêts, enjeux et limites. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01020724

**HAL Id: dumas-01020724**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01020724v1>**

Submitted on 15 Jul 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux  
U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES  
Année 2014 N°54

Thèse pour l'obtention du  
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR en PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement  
Par COURTAULT Jean Rocques  
Né le 10 novembre 1987 à Evreux  
Le 05 juin 2014 à Bordeaux

Titre de la Thèse :  
Place de la phagothérapie dans le traitement des infections  
bactériennes humaines : intérêts, enjeux et limites

Directrice de thèse  
Dr Véronique MICHEL

Membres du jury :

M. MULLER Bernard	Professeur des Universités	Président
Mme MICHEL Véronique	Maitre de Conférences des Universités	Juge
Mme DUBOIS Véronique	Professeur des Universités – PH	Juge
Mme PERRIPLANDE Joëlle	Praticien attaché	Juge
M. DAUCHY Frédéric-Antoine	Praticien hospitalier	Juge



## *Remerciements*

Mes premières pensées vont à ma famille, à mon amie Manon et à sa famille. Leur soutien, leur patience et leur dévouement ont été indispensables à la réalisation de ce travail.

Je tiens à remercier le jury et toutes les personnes qui se sont intéressées à cette thèse. En particulier, je remercie le professeur Véronique Michel pour sa disponibilité, ses observations et le temps qu'elle m'a accordé. Je remercie également le professeur Véronique Dubois pour son aide en virologie. J'espère sincèrement que ce travail aura suscité autant d'intérêts pour vous qu'il en a eu pour moi.

Un grand merci à Monsieur Stéphane André pour son aide ô combien précieuse.

J'ai également une pensée affective pour toutes les personnes -mes ami(e)s- qui ont fait de mes années de faculté une magnifique et enrichissante expérience. J'ose espérer que le chemin de nos vies se recroisera le plus souvent possible.

Enfin, une pensée pleine d'émotions pour toutes celles et ceux avec qui j'aurais aimé partager ces instants.

## Sommaire

I.	Introduction	14
II.	Présentation de la phagothérapie	16
1.	Définition	16
a.	Bactériophage	16
b.	Phagothérapie	16
c.	Phagoprophylaxie	17
2.	Place des virus dans le monde vivant	17
a.	Les bactériophages sont-ils des organismes vivants ?	17
b.	Classification des virus dans le monde vivant	18
3.	Historique de la phagothérapie : de la découverte à nos jours	21
a.	Découverte des bactériophages	21
a.1	Premières observations	21
a.2	Découverte des bactériophages	23
b.	Premiers essais cliniques	24
c.	Extension mondiale	26
d.	Premières productions commerciales de bactériophages	28
e.	Phagoprophylaxie	30
f.	La phagothérapie : source de polémique	31
g.	George Eliava et l'Institut de Bactériophagie	34
h.	L'apparition des antibiotiques	35
i.	L'évolution d'après-guerre de la phagothérapie	36
i.1	Dans les pays de l'Est	36
i.2	Dans les pays de l'Ouest	36
III.	Les phages en tant que « mangeurs de bactéries »	38
1.	Morphologie des bactériophages	38
a.	Dimension des virus et bactériophages	38
b.	Observation des bactériophages	38
c.	Structure générale des virus et des bactériophages	39
d.	Diversité de détection des bactériophages	46

2. Classification des bactériophages	48
a. Phages à ADN bicaténaire, non enveloppés	49
a.1 Ordre des Caudovirales	49
a.2 Familles non placées dans un ordre	53
b. Phages à ADN bicaténaire, enveloppés	54
c. Phages à ADN monocaténaire, non enveloppés	55
d. Phages à ARN bicaténaire	56
e. Phages à ARN monocaténaire	56
3. Ecologie et intérêt environnemental des bactériophages	58
a. Importance numérique des populations bactériennes et phagiques	58
b. Reproduction et intérêt environnemental des phages	59
b.1 Recyclage des nutriments et influence sur le climat	60
b.2 Dynamique des populations phagiques et bactériennes	60
b.3 Evolution de l'interaction bactérie-phage	62
4. Réplication des phages	62
a. Etape d'absorption et de pénétration	63
b. Cycle productif	64
b.1 réplication du génome des virus à ADN	64
b.2 Réplication du génome d'un phage à ARN	67
c. Cycle lysogénique	68
d. Conversion lysogénique	72
5. Transduction	73
a. Transduction généralisée	74
b. Transduction localisée	77
6. Spécificité phages-bactéries	77
a. Avantage	78
b. Inconvénients	78
7. Méthode d'obtention de phages à destinée thérapeutique	79
a. Propagation	79
b. Purification	80
c. Numération	80
d. Contrôle	82

IV.	Application de la phagothérapie en médecine humaine	85
1.	La consommation des antibiotiques	85
a.	Méthodologie	85
b.	La consommation d'antibiotiques en France	86
b.1	Consommation générale des antibiotiques en France	86
b.2	Evolution de la consommation d'antibiotiques dans le secteur de la ville	89
b.3	consommation d'antibiotiques à l'hôpital	93
c.	La consommation d'antibiotiques en Europe	95
d.	Conséquences	97
2.	La résistance à l'antibiothérapie et les infections nosocomiales	98
a.	Les infections nosocomiales	99
a.1	Définition	99
a.2	Epidémiologie	99
a.3	Mécanismes et origines des germes des infections nosocomiales	100
a.4	Les infections nosocomiales les plus fréquentes	101
b.	Bactéries multirésistantes (BMR) et infections nosocomiales	104
3.	Application thérapeutique de la phagothérapie	107
a.	Protocole thérapeutique et patients	108
b.	Méthode d'évaluation de l'efficacité de la thérapie phagique	110
c.	Evaluation générale des résultats de la thérapie phagique	112
d.	Evaluation détaillée de la phagothérapie	119
e.	Discussion	130
4.	Sécurité de la thérapie phagique	136
a.	Effets de la thérapie phagique sur les marqueurs inflammatoires	136
b.	Effets indésirables de la thérapie phagique	138
b.1	Principaux effets indésirables	139
b.2	Effets sur la formule sanguine	141
b.3	Effets sur le pancréas	144
b.4	Effets sur la glycémie	145
b.5	Effet sur la fonction hépatique	148
b.6	Effets sur la fonction rénale	149

b.7 Autres effets observés	150
c. Discussion	151
5. Pharmacologie de la thérapie phagique	153
a. Pharmacocinétique	153
b. Pharmacodynamie	160
b.1 Effets directs	160
b.2 Effets indirects	165
6. Antibiothérapie et phagothérapie	172
7. Formes pharmaceutiques	175
8. Patients candidats à la phagothérapie	178
9. Phagoprophylaxie	178
a. Utilisation en agro-alimentaire	179
b. Décontamination alimentaire	180
c. Désinfection des surfaces inertes	181
d. Prévention des infections dans le domaine médical	182
e. Avantages et limites dans le domaine médical	182
e.1 Avantages	182
e.2 Limites	183
10. Administration de cocktails phagiques	183
a. Avantages potentiels	183
b. Limites des cocktails	185
V. Limites potentielles de la phagothérapie	188
1. Cadre réglementaire	188
a. Le bactériophage en tant que médicament	188
b. Le statut de la phagothérapie	189
b.1 Absence d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)	189
b.2 Procédures possibles sans AMM	189
b.3 Evolution réglementaire possible	191
b.4 réglementation en agro-alimentaire	192
2. Limites industrielles et publiques	192
a. Limites industrielles	192
b. Peu de démarches publiques	193



c. Evolution récente	194
3. Résistance bactérienne	196
a. Mécanismes mis en jeu	196
a.1 Inhibition de l'adsorption phagique	196
a.2 Facteurs intracellulaires et infections abortives	196
a.3 Déstabilisation du génome phagique	197
a.4 Intégration d'un phage tempéré	199
b. Conséquences	200
4. Limites pharmacologiques	201
a. Traitement ciblé	201
b. Seuil bactérien	201
c. Le phénomène de translocation	202
d. Infections à bactéries intracellulaires	203
5. Limites immunologiques à la phagothérapie	204
a. Réponse immunitaire innée	204
a.1 Macrophages	204
a.2 Autres cellules du système immunitaire inné	205
b. Réponse immunitaire adaptative	205
b.1 Réponse immunitaire à médiation humorale	205
b.2 Réponse immunitaire à médiation cellulaire	211
c. Conséquences	211
VI. Conclusion	213

## Liste des figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique hypothétique du monde vivant	19
Figure 2 : Arbre protéomique reliant les bactériophages	20
Figure 3 : Première publication décrivant une observation indirecte d'un bactériophage	22
Figure 4 : Exemple de la diversité génomique des bactériophages	40
Figure 5 : Symétrie hélicoïdale de capsid	41
Figure 6 : Symétrie cubique de la capsid	42
Figure 7 : Structure générale d'un phage caudé de type 4	43
Figure 8 : La protéine portale du bactériophage	46
Figure 9 : Morphologie des principales familles de bactériophages	48
Figure 10 : Résumé des principales caractéristiques des familles de bactériophages	57
Figure 11 : Comparaison de la biomasse (a) et de l'abondance (b) des virus avec celles des procaryotes et eucaryotes dans les océans	59
Figure 12 : Schéma d'un cycle productif du bactériophage T4	66
Figure 13 : Schéma de l'intégration de l'ADN phagique au chromosome bactérien	69
Figure 14 : Schéma d'un cycle d'infection lytique couplé à l'état de lysogénie	71
Figure 15 : Schéma de la transduction généralisée	76
Figure 16 : Boîte de Pétri avec des plages claires	83
Figure 17 : Evolution de la consommation d'antibiotiques en France	87
Figure 18 : Evolution du nombre d'antibiotiques commercialisés en France	89
Figure 19 : Evolution de la consommation des antibiotiques en ville	90
Figure 20 : Part relative des prescriptions d'antibiotiques en ville selon les prescripteurs	92
Figure 21 : Evolution de la consommation d'antibiotiques à l'hôpital	94
Figure 22 : Comparaison des consommations d'antibiotiques dans le secteur de la ville dans plusieurs pays européens	96

Figure 23 : Comparaison des consommations d'antibiotiques dans le secteur hospitalier dans plusieurs pays européens	97
Figure 24 : Part relative des micro-organismes isolés d'infections nosocomiales en France	102
Figure 25 : Part relative des sites infectieux d'infections nosocomiales	103
Figure 26 : Caractéristiques de résistance aux anti-infectieux de certains micro-organismes isolés d'infection nosocomiale et prévalence des infections nosocomiales associées	105
Figure 27 : Evaluation générale des résultats de la thérapie phagique	114
Figure 28 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique en fonction des principales préparations phagiques utilisées	115
Figure 29 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique en fonction de la voie d'administration des préparations	117
Figure 30 : Durée cumulée du traitement phagique	118
Figure 31 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique en fonction du type d'infection des patients	120
Figure 32 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez les patients ayant une infection orthopédique	122
Figure 33 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients ayant une infection des tissus mous	124
Figure 34 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients masculins ayant une infection génitale ou urinaire	126
Figure 35 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patientes ayant une infection génitale ou urinaires	127
Figure 36 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients ayant une infection de l'arbre respiratoire	129
Figure 37 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients ayant une infection cutanée	130
Figure 38 : Influence de la thérapie phagique sur les marqueurs de l'inflammation	137
Figure 39: Impact de la thérapie phagique sur les marqueurs hématologiques	142

Figure 40 : Impact de la thérapie phagique sur les marqueurs biochimiques	146
Figure 41 : Comparaison des étapes de pharmacocinétique des phages avec celles des substances médicamenteuses	155
Figure 42: Schéma représentant la traversée d'un biofilm par un bactériophage	162
Figure 43 : Les différents effets des phages et enzybiotiques sur les bactéries	164
Figure 44 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques » (PAS) avec le phage $\phi$ MFP sur <i>Escherichia coli</i> MFP	173
Figure 45 : Le phénomène de « synergie phages-antibiotiques » (PAS) dans l'environnement (A) et en phagothérapie (B)	175
Figure 46 : Photo du PhagoBioDerm™	177
Figure 47: Schéma représentant le système CRISPR/Cas	199
Figure 48 : La neutralisation phagique dans le sérum de patients durant la thérapie phagique suite à une administration orale ou locale	208
Figure 49: La neutralisation phagique dans le sérum de patients suite à une administration intrarectale	209

## *Liste des abréviations*

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNase : désoxyribonucléase

ALAT : alanine transaminases

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANSM : agence nationale de sécurité du médicament

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ASAT : aspartate transaminases

BLSE : bêta-lactamases à spectre étendu

BMR : bactéries multirésistantes

CMR : committee on medical research

CNAMTS : caisse nationale d'assurance maladie des travailleurs salariés

C3G : céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération

CAS : centre d'analyse stratégique

CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CSP : code de la santé publique

DDJ : doses définies journalières

DDJ/1000H/J : doses définies journalières pour mille habitants et par jour

DDJ/1000JH : doses définies journalières pour mille journées d'hospitalisation

DMS : sulfure de diméthyle

DOM : départements d'outre-mer

EARSS : European antimicrobial resistance surveillance network

EIBMV : Eliana institue of bacteriophage, microbiology and virology

EMA : agence Européenne du médicament

ENP : enquête nationale de prévalence

EPA : environmental protection agency

EPS : substances polymériques extracellulaires

ESAC : European surveillance of antimicrobial consumption

FDA : food and drug administration

GRAS : generally recognised as safe

HCASE : haut niveau de production de céphalosporinases

Hfr : haute fréquence de recombinaison

ICTV : International committee on taxonomy of viruses

IET : institute of immunology and experimental therapy

IN : infections nosocomiales

ISO : infections du site opératoire

JAMA : journal of the American medical association

LPS : lipopolysaccharides

mL : millilitre

NRC : national research council

OMS : organisation mondiale de la santé

PAL : phosphatases alcalines

PAR *Pseudomonas aeruginosa* résistant

PAS : synergie phages-antibiotiques

PFU : plaque formant unité

PTU : phage therapy unit

RAISIN : réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales

SARM : *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline

SASM : *Staphylococcus aureus* sensibles à la méticilline

Stx : Shiga-like toxine

TA : toxine-antitoxine

TIA : toxi-infections alimentaires

YOPI : young, old, pregnant, immunodepressed

$\gamma$ -GT : gamma glutamyl transpeptidases

## I. Introduction

Le développement des infections bactériennes multirésistantes, dont les infections nosocomiales, est un véritable enjeu de santé publique et nécessite la mise au point de nouvelles thérapies. L'élaboration de nouveaux médicaments et de nouveaux protocoles d'application nécessitent des travaux importants de recherche innovante et fondamentale, ce qui requiert du temps et des moyens. Or, à l'heure actuelle, aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'est attendue à court terme. Dans la quête de modalités thérapeutiques alternatives, les bactériophages pourraient s'avérer intéressants et méritent d'être étudiés. L'objectif est de savoir quelle pourrait être la place de cette thérapie dans le traitement des infections bactériennes humaines ? En d'autres termes, quels sont les intérêts potentiels et les limites probables de la phagothérapie ?

L'idée d'utiliser les prédateurs naturels des bactéries est venue de l'un de ses découvreurs, Felix d'Hérelle, qui l'a également mise en application en médecine humaine. Il a fallu, pour se faire, mettre au point les préparations phagiques, c'est à dire isoler un phage dirigé contre la bactérie pathogène, le propager, purifier la préparation et contrôler son activité. Pour diverses raisons, la médecine occidentale a délaissé ce traitement antibactérien au profit des antibiotiques. En revanche, la phagothérapie a été largement exploitée dans l'ex-empire soviétique.

Les progrès scientifiques ont permis de mettre en évidence les caractéristiques de ces virus. Ainsi, les structures des phages, leurs cycles de réplication, leur écologie et leurs intérêts environnementaux ont pu être déterminés. Une classification des bactériophages a pu être établie en prenant en compte différents critères. Cette classification est régulièrement remise à jour, en fonction des nouvelles découvertes.

Ces connaissances sont indispensables en vue d'une éventuelle application thérapeutique des bactériophages. Les possibilités offertes par la phagothérapie ont été largement étudiées par l'Institut de Thérapie Expérimental Ludwik Hirszfeld. En particulier, l'efficacité des bactériophages dans le traitement de diverses infections bactériennes, l'influence de la voie



d'administration des phages, l'intérêt de l'association phages-antibiotiques et les effets indésirables de la phagothérapie sont analysés sur 157 patients. Les conclusions apportées sont pour le moins intéressantes. La phagoprophylaxie, prévention des maladies infectieuses bactériennes par les bactériophages, suscite également un réel intérêt. Les domaines d'application sont nombreux et certains projets voient déjà le jour.

Toutefois, certains obstacles doivent encore être franchis pour permettre l'utilisation thérapeutique des bactériophages. Les principales limites sont de nature administrative et industrielle. Elles portent notamment sur le statut réglementaire des phages et les droits de propriétés intellectuelles. De plus, certains aspects techniques et scientifiques suscitent des interrogations auxquelles il est nécessaire de répondre pour développer et optimiser les techniques. En particulier, l'évolution de la résistance bactérienne aux bactériophages et le rôle du système immunitaire, qui pourraient impacter et limiter l'efficacité des phages en médecine humaine.

## II. Présentation de la phagothérapie

### 1. Définition

#### a. Bactériophage

Le terme « bactériophage » a été créé et proposé par Félix d'Hérelle (Cf. partie II. 3.a.2), pour désigner un nouveau virus qu'il avait découvert et qui était capable selon lui de « manger » les bactéries (d'après sa publication « Princeps » de 1917). Ce terme est formé des mots grecs baktêria (bâton, à cause de la forme allongée des premières bactéries observées) et phagos (mangeur) ; il signifie donc littéralement « mangeur de bactéries ». Toutefois, d'Hérelle a lui-même nuancé quelques années plus tard la signification du mot qu'il avait inventé (en 1921, dans son premier livre publié « Le bactériophage : son rôle dans l'immunité »). En effet, il précise que le suffixe « phage » est utilisé non pas dans le sens strict de « manger » mais plutôt dans celui de « se développer au dépens de ».

Les bactériophages sont des virus et ont ainsi le mode classique de répllication de ces entités (Cf. partie III. 4). Cependant, ils forment un groupe particulier de virus, car ils n'utilisent que les constituants des cellules procaryotes bactériennes pour se multiplier. La bactérie qui est infectée par un bactériophage est appelée « bactérie hôte ».

Les bactériophages sont donc des virus qui possèdent la particularité d'infecter les bactéries (cellules procaryotes) et qui ont pour certains d'entre eux la capacité de les détruire, tout en étant inoffensifs pour les cellules humaines, animales et végétales (cellules eucaryotes).

#### b. Phagothérapie

La phagothérapie est un mot apparu en 1926 dans un ouvrage de d'Hérelle « Le bactériophage et son comportement » construit à partir de « phagos » et « therapeia » (cure). On peut toutefois signaler que le terme phagothérapie avait été préalablement utilisé dans un tout autre sens : en 1912, Fernand Boivin l'utilise dans sa thèse en tant que traitement qui modifie la façon de se nourrir. Bien que supplanté par le sens de d'Hérelle, on trouve encore quelques fois l'usage de ce mot avec cette acceptation.

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages (parfois simplement appelés phages) dans le but de traiter et de guérir des infections bactériennes. La phagothérapie est donc un traitement spécifique de maladies bactériennes par des phages. Elle met à profit les propriétés destructrices, lytiques et spécifiques de tel ou tel phage vis à vis d'une bactérie infectante.

Formellement, il serait plus exact d'utiliser le terme de « bactériophagothérapie ». Bien qu'existant, ce terme reste néanmoins très peu utilisé du fait de sa longueur.

Enfin, dans certains écrits en français l'expression « thérapie phagique » (à l'instar de « phage therapy » des Anglo-saxons) peut être employée en lieu et place de phagothérapie.

### **c. Phagoprophylaxie**

Le mot phagoprophylaxie est formé par le préfixe grec « pro » (qui peut signifier avant, devant mais aussi favorable à, pour ou à la place de) et par le suffixe « phulaxis » (protection). La prophylaxie désigne toute méthode destinée à protéger un individu, ou une collectivité, d'une maladie. La phagoprophylaxie est donc, par analogie à l'antibioprophylaxie (qui était également qualifiée d'antibiothérapie de « couverture ») l'utilisation des bactériophages pour prévenir les maladies bactériennes.

## **2. Place des virus dans le monde vivant**

### **a. Les bactériophages sont-ils des êtres vivants ?**

Les bactériophages en tant que virus pouvaient être considérés, selon le point de vue adopté, comme des agrégats de substances chimiques, exceptionnellement complexes mais inertes, ou comme des microorganismes vivants extrêmement simples. Définir les bactériophages comme de la matière vivante ou non vivante a longtemps été sujet à controverse. C'est probablement ce qui a poussé le biologiste français André Lwoff (1902-1994), en 1953, à définir « un virus est un virus ».

Actuellement, il est établi que les virus, et donc les bactériophages, sont des entités infectieuses non vivantes, qui ne devraient pas être considérées comme des microorganismes.

Les bactériophages sont définis par un ensemble de propriétés particulières, fonctionnelles et structurales. Ce sont des entités (ou objets biologiques particuliers) subcellulaires douées de continuité génétique par réplication de leur matériel génétique. Par contre, il n'y a pas de scissiparité comme chez les cellules procaryotes, ni de mitose comme chez les cellules eucaryotes. Le biologiste français François Jacob (1920-2013) insiste aussi sur cette caractéristique des virus : « placés en suspension dans un milieu de culture, ils ne peuvent ni métaboliser, ni produire ou utiliser de l'énergie, ni croître, ni se multiplier, toutes fonctions communes aux êtres vivants » (extrait de « Qu'est-ce que la vie », conférence donnée le 1<sup>er</sup> janvier 2000 dans le cadre de « L'université de tous les savoirs »). La multiplication des bactériophages dépend obligatoirement des cellules vivantes procaryotes : ce sont donc des parasites intracellulaires obligatoires. Les bactériophages détournent le métabolisme cellulaire à leur profit et perturbent l'information génétique des cellules infectées. Ce sont des agents infectieux, capables de diffuser de cellules en cellules, tout en se multipliant chez un organisme hôte.

A la différence des bactéries, ils ne se multiplient pas sur des milieux inertes de type bactériologique (comme la gélose). Leur isolement passe nécessairement par l'inoculation à un système biologique vivant que l'on dit permissif afin d'assurer leur réplication. La permissivité d'un système biologique dépend de la présence des récepteurs spécifiques et de cofacteurs cellulaires, capables d'aider l'expression du génome viral et la fabrication de particules virales (au contraire des systèmes non permissifs qui, après pénétration du virus, sont incapables d'assurer entièrement le programme des synthèses virales : on parle alors de cycle abortif).

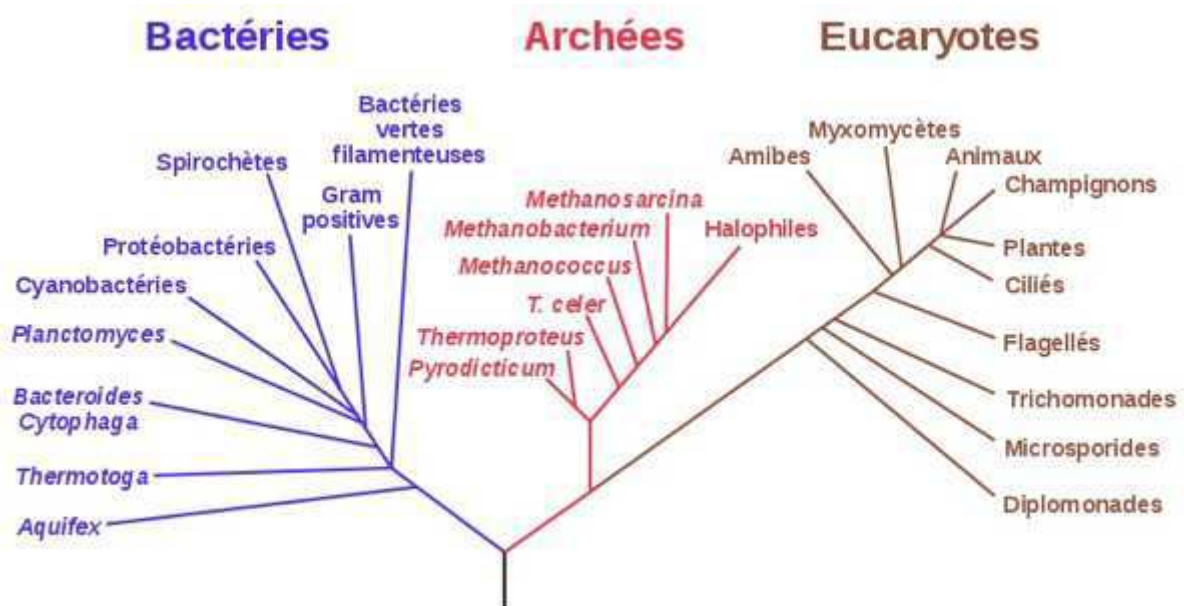
Enfin, les bactériophages ont une grande capacité évolutive, avec un taux très élevé de mutation de leur matériel génétique et de réassortiment de gènes.

## **b. Classification des virus dans le monde vivant**

La classification des virus n'est pas aujourd'hui intégrée à celle reliant les trois domaines des êtres vivants. En effet, contrairement aux Archées, Bactéries et Eucaryotes qui descendent d'un ancêtre commun (figure 1), l'origine des virus reste énigmatique et sujet à controverse. Il semblerait même qu'elle puisse être polyphylétique (un taxon polyphylétique étant un taxon défini par une ressemblance qui n'a pas été héritée d'un ancêtre commun).

Cependant, la découverte du Mimivirus relance le débat. En effet, ce virus présente 7 gènes communs aux Archées, aux Bactéries et aux Eucaryotes. Il devient alors possible de réaliser un arbre phylogénétique des êtres vivants incluant le Mimivirus et donc l'ensemble des virus. Le Mimivirus apparaîtrait alors sur une quatrième branche proche de l'origine des Eucaryotes et distincte des Archées, des Bactéries et des Eucaryotes.

Figure 1 : Arbre phylogénétique hypothétique du monde vivant



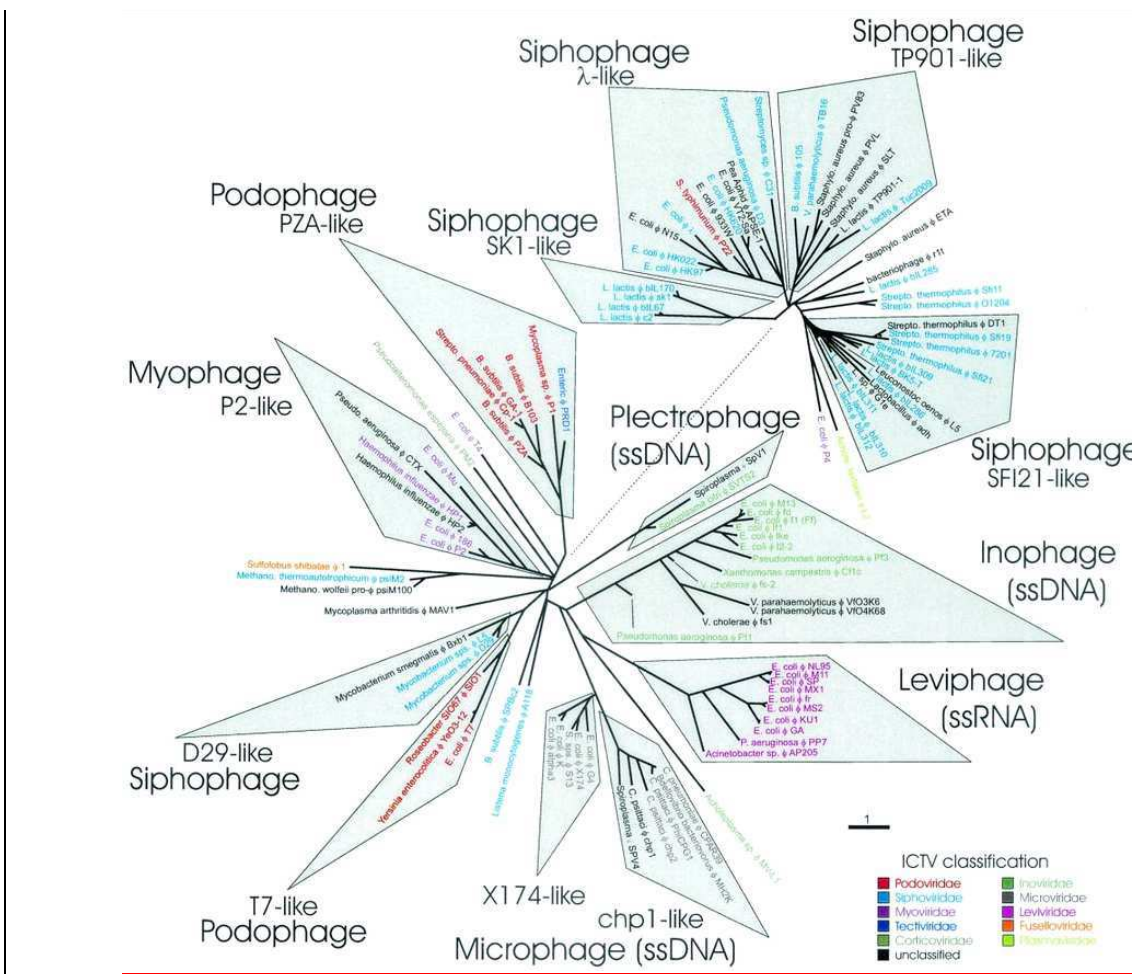
Source : « Towards a natural system of organisms : Proposal for the domain Archaea, Bacteria and Eucarya » extrait des Comptes rendus de l'Académie américaine des sciences, volume 87 N°12, 1<sup>er</sup> juin 1990, Carl Woese et al.

L'arbre phylogénétique est un arbre schématique qui montre les relations de parentés entre des groupes d'êtres vivants. Chacun des nœuds de l'arbre représente l'ancêtre commun de ses descendants. Le nom qu'il porte est celui du clade formé des différents groupes frères qui le composent. L'arbre est basé sur des séquences de l'ARN ribosomique 16S. Il montre l'histoire évolutive des trois domaines du vivant : en rouge les Archées, en marron les Eucaryotes, en bleu les Bactéries. On constate que les virus ne sont pas reliés aux trois domaines des êtres vivants.

De plus, on ne connaît pas les liens polyphylétiques entre les différentes familles de bactériophages. Au sein d'un groupe réunissant les virus ayant une même symétrie de capsid, il est probable que les virus aient plusieurs origines et que ce trait phénotypique ne soit qu'une convergence.

Un arbre protéomique des bactériophages (arbre construit à partir de l'ensemble des protéines constituant les différents organismes) a été construit à partir des génomes complets de 105 virus, soit 3981 protéines potentielles (figure 2). Il semblerait que l'ajout de nouveaux génomes ne modifie pas la répartition des groupes de virus mise en place par l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Cf partie III. 2). Cependant, près de 20% de ces nouveaux génomes ne correspondent pas à un branchement déjà connu, ce qui laisse penser qu'il reste de nombreuses familles virales à caractériser.

Figure 2 : Arbre protéomique reliant les bactériophages



Source : « The phage proteomic tree : a genome based taxonomy for phages » extrait du Journal of Bacteriology, volume 184 N°16 4529-4535, Robert Edwards et Forest Rohwer, 2002.

L'arbre protéomique des phages est basé sur les similarités de la séquence génomique complète de 105 phages. Il place ainsi les phages étudiés à côté de leurs parents les plus proches. De plus, les phages sont placés dans des taxons, ce qui permet de prédire plusieurs aspects de la biologie phagique et de déterminer des marqueurs génétiques qui peuvent être utilisés pour le monitoring de la biodiversité phagique.

### 3. Historique de la phagothérapie : de la découverte à nos jours

#### a. Découverte des bactériophages

##### a. 1 Premières observations

La découverte des bactériophages a été précédée par certaines observations.

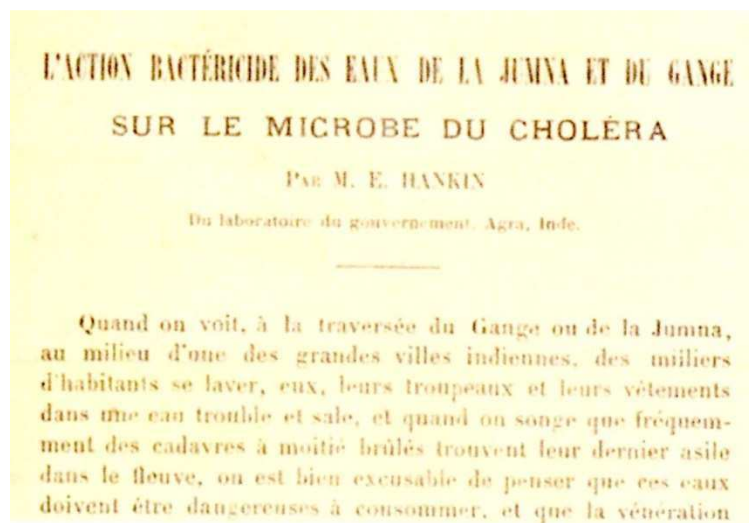
En 1896, le bactériologiste anglais Ernest Hanbery Hankin s'est employé à énumérer le nombre d'unités de bactérie *Vibrio cholerae* par millimètre cube d'eau ( $\text{mm}^3$ ), prélevée dans le Gange en Inde. Pour se faire, des échantillons ont été prélevés en deux points distincts : l'un à l'entrée et l'autre à la sortie de la ville d'Agra. Il a pu constater une exceptionnelle diminution du nombre d'unités de *Vibrio cholerae* : 100 000 unités par  $\text{mm}^3$  d'eau dans les échantillons prélevés à l'entrée de la ville contre 90 unités par  $\text{mm}^3$  d'eau dans les échantillons prélevés à la sortie de la ville. Cette épuration naturelle du Gange n'a pas pu être expliquée à l'époque. Elle fut qualifiée de « phénomène d'Hankin » (figure 3).

D'autres observations similaires ont été décrites dans différentes régions du monde.

Ainsi, à la fin du 19<sup>e</sup> siècle (1898) Nikolay Fyodorovich Gamaleya (médecin et scientifique ukrainien membre, plus tard, de l'Académie d'URSS) a publié un article dans le « Russian Archives of the Pathological and clinical Medicine » dans lequel il a décrit l'obtention d'une eau distillée au sein de laquelle le bacille du charbon, la bactérie *Bacillus anthracis*, a été lysée. Cette préparation était ensuite capable de lyser d'autres colonies de *Bacillus anthracis*. Il a attribué ce phénomène à l'action de ferments (enzymes). Bien qu'il soit impossible d'affirmer avec certitude qu'il s'agisse effectivement d'une bactériolyse phagique, les Russes ont l'habitude d'associer leur savant à la découverte du bactériophage.



Figure 3 : Première publication décrivant une observation indirecte d'un bactériophage



Source : « L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du choléra » extrait des Annales de l'Institut Pasteur, volume 10 (511-523), Ernest Hanbery Hankin, 1896.

Dans cet article, l'auteur décrit une activité antibactérienne, d'origine inconnue, dans les fleuves du Gange et de la Jumna en Inde. Il suspecte alors que ce phénomène limite la propagation diffuse du Choléra. Son travail sera reconnu plus tard comme faisant partie des premières observations de l'activité des bactériophages.

Des années plus tard (1906-1909), au cours d'un voyage au Mexique, Felix d'Hérelle a rencontré un entomologiste qui a attiré son attention sur une violente épidémie qui touchait les sauterelles. A partir de celles-ci, Felix d'Hérelle a isolé la bactérie *Enterobacter aerogenes* (*Coccobacillus aeridiorum*).

Felix d'Hérelle a conduit ensuite une série d'expériences, en Tunisie puis en Guyane, avec l'intention d'isoler un agent infectieux qui permettrait de lutter contre les invasions de sauterelles. Au cours de ces expériences, il a pu observer l'apparition de « taches vierges » ou « plages claires » (qui sont des zones de lyse) au sein de la croissance bactérienne. Il présuma que ces « taches » étaient dues à un virus, qui serait, selon lui, à l'origine des épidémies au sein de la population de sauterelles. Il a isolé le virus en question et a tenté de l'utiliser contre les sauterelles, sans aucun succès. Par la suite, il a utilisé de nouveau la bactérie hôte, *Enterobacter aerogenes*, pour lutter contre les invasions de sauterelles, sans prendre davantage en considération les « taches vierges » observées.



## a. 2 Découverte des bactériophages

Il est aujourd'hui admis que la découverte du bactériophage appartient conjointement à deux microbiologistes : l'un anglais, Frederick Twort (1915) et l'autre franco-canadien, Felix d'Hérelle (1917). Cette découverte est le fruit d'observations *in vitro* de phénomènes inhabituels que l'on a cherché à expliquer.

L'histoire prend un nouveau tournant suite à l'article « La lyse bactérienne transmissible » de Frederick Twort publié dans le journal anglais « The Lancet » en 1915. Il s'agit en réalité de la toute première publication sur les bactériophages. Dans cet article, Frederick Twort a décrit une colonie de staphylocoques partiellement détruite qui, une fois filtrée etensemencée sur d'autres colonies de différents staphylocoques provoque systématiquement une zone de lyse bactérienne au sein de la colonie. Cependant, Frederick Twort n'est pas parvenu à expliquer le phénomène décrit. L'Anglais a fait plusieurs hypothèses, dont celle d'un éventuel « ultra-microscopic virus ». De plus, il n'a pas poursuivi davantage ses recherches et a encore moins envisagé une éventuelle application thérapeutique à sa découverte.

Felix d'Hérelle, en lisant l'article de Frederick Twort dans « The Lancet », s'est souvenu de l'observation des « taches vierges » et a émis l'hypothèse que l'agent filtré serait un virus, invisible avec les techniques de l'époque, qui envahit et détruit les bactéries.

Cette découverte des bactériophages par Felix d'Hérelle est fréquemment associée à son travail sur l'épidémie de diarrhées hémorragiques sévères qui a frappé les troupes françaises postées à Maisons-Laffitte en juillet-août 1915. Felix d'Hérelle était alors chargé de déterminer l'origine de cette épidémie. Lors de cette étude, il a prélevé des échantillons de selles de patients ne déclarant pas la pathologie (patients non symptomatiques) qu'il a filtré pour éliminer les bactéries, puis les a mis en contact et incubés avec des bactéries du Genre *Shigella*, isolées à partir de patients malades. La préparation a ensuite étéensemencée sur de l'agar dans le but d'observer la culture des bactéries. Sur ces cultures, d'Hérelle observa de nouveau l'apparition de zones de lyse bactérienne, qu'il appela « taches vierges » puis « plaques ». Felix d'Hérelle a présenté ces observations à l'Académie des Sciences en 1917 et a proposé l'existence de virus capables de détruire les bactéries qu'il a nommé « bactériophages ».

Felix d'Hérelle a démontré, avec beaucoup d'assurance, que le phénomène observé n'était pas dû à l'action d'enzymes mais bien à un virus. Cependant, il pense à cet époque qu'il s'agit d'un seul et unique virus, tout en précisant n'avoir jamais isolé deux bactériophages

identiques. Il le nomme *Bacteriophagum intestinale* (un seul genre et une seule espèce) et affirme que ce virus, dont l'expression, le spectre et la virulence sont variables d'un isolat à l'autre, est capable d'acquérir une spécificité au contact de telle ou telle espèce bactérienne.

## **b. Premiers essais cliniques**

Introduite comme méthode thérapeutique deux années seulement après la découverte du phénomène de lyse des bactéries *in vitro*, le traitement des maladies infectieuses par les phages a connu ses premiers succès il y a plus de quatre-vingt-dix ans.

Le grand mérite de Felix d'Hérelle est d'avoir proposé l'utilisation des bactériophages pour traiter les maladies bactériennes humaines et animales. En effet, dès le 09 décembre 1918, d'Hérelle, après avoir constaté que « la pathogénie et la pathologie de la dysenterie bacillaire sont dominées par deux facteurs agissant en sens contraire : le bacille dysentérique, agent pathogène, et le microbe filtrant bactériophage, agent d'immunité » a affirmé « logique de proposer comme traitement de la dysenterie bacillaire l'administration, dès l'apparition des premiers symptômes, de cultures actives du microbe bactériophage » (« Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire », Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris, volume 167 (970-972), 1918). Felix d'Hérelle a clairement proposé un traitement curatif par le bactériophage et a imaginé alors, sans encore la nommer, la bactériophagothérapie, qu'il appellera plus simplement phagothérapie quelques années plus tard. Cette idée lui a valu 8 nominations au Prix Nobel à partir de 1925, sans récompenses malgré tout. Il est tout de même remarquable qu'en deux années seulement, Felix d'Hérelle ait pu décrire les principales caractéristiques de cette nouvelle entité, développé le moyen de l'isoler, de la purifier et d'en faire l'un des principaux agents de guérison de certaines maladies.

Felix D'Hérelle a utilisé les phages pour traiter une diarrhée dysentérique au sein de l'hôpital des Enfants-Malades de Paris, en 1919, sous la surveillance du chef de service pédiatrique, le Professeur Victor-Henri Hutinel. Ceci est probablement le premier essai thérapeutique des bactériophages. Pour cela, d'Hérelle a mis au point une préparation à ingérer contenant des bactériophages. Avant la première administration à un patient, la préparation a été ingérée par plusieurs internes, Hutinel et d'Hérelle lui-même dans le but de vérifier sa sécurité d'emploi.

Quelques jours plus tard, devant l'innocuité apparente de la préparation de phages, une dose unique a été administrée à un patient, alors âgé de 12 ans, ce qui a suffi à une régression rapide des symptômes et une guérison totale du patient. Ce premier succès a été confirmé peu après par 3 cas similaires : patients ayant une dysenterie bactérienne traités par une dose unique de bactériophages ingérés et guérison observée dans les 24 heures suivant l'administration. Cependant, les résultats de ces essais n'ont pas été publiés immédiatement mais deux années plus tard dans le premier livre de Felix d'Hérelle « le bactériophage : son rôle dans l'immunité » (Edition Masson et compagnie, 1921).

La première publication mentionnant l'utilisation des phages dans le traitement de pathologies humaines a été l'œuvre de Richard Bruynoghe et Joseph Maisin, médecins belges, en 1921 (« Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du staphylocoque »). Ils ont utilisé les phages par injection autour et à l'intérieur de lésions chirurgicales infectées par staphylocoques. Ils remarquèrent une régression de l'infection dans les 24 à 48 heures suivant l'administration.

Dès lors de nombreux travaux ont été entrepris, ce qui a permis un nombre important et croissant de publications. Comme par exemple, les travaux du chercheur japonais Tamezo Kabeshima qui, tout en contestant la nature même du bactériophage, fit la démonstration de l'éradication du bacille de Shiga dans la bile des lapins par injection intraveineuse d'un « bactériolysat du bacille de Shiga » (« Thérapie expérimentale des porteurs de germes », 1920).

Les expéditions de d'Hérelle et ses collaborateurs en Chine, au Laos, en Inde, au Vietnam et en Afrique entre 1916 et 1930 ont permis d'entreprendre de nombreux essais cliniques. Encouragés par les premiers résultats, ils ont poursuivi leurs études sur l'utilisation thérapeutique des phages : Felix d'Hérelle a notamment utilisé différentes préparations pour traiter des milliers de patients atteints par le choléra et/ou la peste bubonique, en Inde notamment.

Les premières publications et les diverses expéditions menées ont permis de faire connaître la phagothérapie et une extension mondiale de cette thérapeutique.

### c. Extension mondiale

Le phénomène de d'Hérelle a été diffusé dès 1921 dans la littérature scientifique américaine (Journal of Experimental Medicine) par un article du microbiologiste Belge André Gratia qui travaillait alors dans les laboratoires du The Rockefeller Institute for Medical Research (« Studies on the d'Hérelle phenomenon »).

Le même auteur a aussi dévoilé en 1922 des résultats sur le traitement d'une cinquantaine de cas d'affections staphylococciques dans des hôpitaux de Bruxelles. Il avait observé des effets incontestablement positifs. Dans les années qui ont suivi, les publications ont été de plus en plus nombreuses : on en dénombrait environ 150 par an. Elles se sont appliquées à préciser les caractéristiques du bactériophage tout autant qu'à évaluer les possibilités thérapeutiques.

Dès lors, de nombreux essais thérapeutiques, souvent soutenus par d'Hérelle lui-même, ont été entrepris afin de traiter diverses pathologies : fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, infections urinaires hautes ou basses, suppurations staphylococciques et streptococciques chirurgicales ou cutanées... Par ailleurs, plusieurs thèses de médecine ont été soutenues dans différentes facultés françaises puis étrangères.

Toutefois, les premiers résultats ont parfois été décevants. Au Brésil, da Costa Cruz a échoué dans sa première tentative pour soigner des malades atteints de dysenterie bacillaire. Mais ses essais ultérieurs, éclairés par les suggestions de Felix d'Hérelle, ont obtenu d'excellents résultats. En 1924, da Costa Cruz a d'ailleurs présenté la phagothérapie comme le traitement de routine de la dysenterie bacillaire à Rio de Janeiro et dans plusieurs provinces du Brésil (« Le traitement des dysenteries bacillaires par le bactériophage »). Il en va de même pour la plupart des protocoles : après des échecs initiaux, des guérisons ont été rapportées de manière quasi prodigieuse. Plusieurs hypothèses, différentes selon les protocoles, peuvent être avancées pour expliquer ces échecs initiaux : sélection de phages inadéquates ou peu virulents, titre phagique des préparations utilisées insuffisant, phénomènes de résistance bactérienne...

Un second livre de d'Hérelle, paru en 1926 (« Le bactériophage et son comportement »), a fait l'inventaire des possibilités thérapeutiques décrites à cette époque. Les références sont très nombreuses, près de sept cents, ce qui montre à quel point la thérapie phagique avait pris une expansion considérable. L'auteur insistait quant à lui sur la nécessité d'un respect strict des protocoles de préparation et d'administration des bactériophages. Il a également souligné qu'il fallait utiliser un phage virulent, capable de dissoudre en quelques heures, dans un tube à

essai, une culture entière de la bactérie pathogène issue du foyer infectieux : « je ne saurais trop insister qu'il est absolument indispensable que le bactériophage employé soit au maximum de virulence pour la bactérie sur laquelle on veut agir ; [...] Utiliser, tant du point de vue prophylactique que thérapeutique, des bactériophages de virulence moyenne et même simplement forte, c'est décider d'avance que l'on veut courir à l'échec » (« Le bactériophage et son comportement », 1926).

Felix d'Hérelle, alors responsable du service sanitaire, maritime et quarantenaire en Egypte, a observé quatre cas de bubons pesteux. Il a réussi à isoler le germe pathogène par ponction des bubons. Puis, il a obtenu des bactériophages dirigés contre ce germe (Cf. partie III. 7). Il a ensuite injecté le bactériophage actif dans les bubons. Une publication parue dans la « Presse Médicale » en 1925, a été le point de départ de la renommée mondiale de la phagothérapie. Après lecture de cet article, l'institut Haffkine de Bombay a demandé à d'Hérelle le bactériophage qui avait permis la guérison de la peste. En Inde, les résultats escomptés ont d'emblée été décevants *in vitro*. De sa propre initiative, d'Hérelle a décidé de se rendre sur place pour remédier au plus vite au problème. Il a ainsi pu préparer une quantité suffisante de suspension phagique active. Le gouvernement des Indes a souhaité conduire une vaste enquête, nommée « Bacteriophage inquiry ». L'objectif était d'évaluer les potentialités des bactériophages dans la prophylaxie et le traitement de la peste et du choléra. Cette étude s'est rapidement focalisée sur le cholera uniquement et est devenue la « Cholera Study ». De nombreux essais ont été conduits par plusieurs médecins et biologistes locaux (dont Morisson, Lahiri et Asheshov). Les estimations de l'époque ont fait état d'une diminution de la mortalité due au choléra à 10% en Inde. D'Hérelle a décrit dans son livre « Bacteriophage and the phenomenon of recovery » publié en 1935, l'épidémie de choléra qui a sévi dans la région de Punjab à partir de 1927. Le protocole qui a été mis en place était l'administration de 2 mL de préparation phagique diluée dans 20 ml d'eau. En cas de vomissements, de petites doses, de l'ordre d'une cuillère à café, d'une préparation de 5 ml de préparation phagique diluée dans 100 ml d'eau, étaient alors administrées lentement et de manière répétée. Cependant, le titre en phages de la préparation initiale n'était pas renseigné. Le groupe contrôle était composé de 118 patients traités par médecine locale à base d'extraits de plantes. Le groupe traité par phagothérapie était composé de 73 patients, car d'Hérelle était confronté à la réticence des populations envers ces mesures thérapeutiques. Les patients traités par phages étaient, presque exclusivement, dans des états cliniques très préoccupants, ce qui les incitait à accepter la phagothérapie en dernier recours. Parmi les 118 patients du groupe contrôle, d'Hérelle a

constaté 74 décès, soit une mortalité de 62,7%. Dans le groupe traité par phages, la mortalité était quasiment d'un dixième car il y a eu 5 décès sur les 73 patients, soit une mortalité de 6,8%. Ces chiffres, bien que très significatifs à première vue, sont à relativiser du fait des zones d'ombre dans le protocole : comparabilité des populations traitées par phages et contrôles, préparation phagique utilisée, durée du protocole...

D'autres études prometteuses ont été menées dans les années ayant précédé la Seconde Guerre mondiale. La phagothérapie semblait pouvoir être généralisée à un grand nombre d'infections jusque-là souvent mortelles. C'est ainsi qu'est apparue la commercialisation de préparations à usage thérapeutique.

#### **d. Premières productions commerciales de bactériophages**

Les résultats de la phagothérapie, souvent rapportés dans la presse scientifique et même les quotidiens et revues « grand public », ont éveillé l'attention de plusieurs entreprises pharmaceutiques. Parallèlement, divers instituts se sont mis en place dans un objectif d'amélioration de Santé Publique. Le principal germe concerné par ces productions commerciales était le staphylocoque. De nombreuses maladies infectieuses cutanées, intestinales, génitales, respiratoires étaient ciblées par ces productions.

Ainsi, l'institut Oswaldo Cruz à Rio de Janeiro au Brésil, a entrepris la production de bactériophages antidysentériques à partir de 1924, pour lutter contre la dysenterie dans les pays d'Amérique latine. En une année, l'institut a produit 10 000 fioles de phages, qui étaient envoyées aux hôpitaux du Brésil.

Selon les historiens médicaux roumains Kazhal et Iftimovich (1968), suite à des travaux menés par Felix d'Hérelle et George Eliava sur le traitement et la prophylaxie du choléra, l'institut de vaccination à Tbilissi a produit, en 1931, la première préparation phagique commerciale anticholéra. Cette préparation a permis le contrôle des épidémies qui menaçaient le sud-est de l'URSS.

L'Europe n'a pas été en reste. En effet, une entreprise pharmaceutique allemande, la société Antipol, commercialisait l'Enterofagos pour traiter les troubles intestinaux. En Suisse, à Vevey, une petite firme pharmaceutique du nom de Saphal a vu le jour. Elle appartenait à Harmann Glausser et commercialisait des spécialités, « Coliphagine », « Intestiphagine », « Pyophagine » et « Staphagine », utilisables par voie orale, en injectables, en pommades et

spray jusque dans les années 1960. La phagothérapie avait été introduite dans ce pays par un ancien collègue de d'Hérelle, Paul Hauduroy, professeur à l'université de Lausanne.

En France, les laboratoires Robert & Carrière ont proposé à d'Hérelle d'installer en 1928 le Laboratoire du Bactériophage à Paris. Felix d'Hérelle était le conseiller scientifique tandis que la firme se réservait l'exclusivité de la commercialisation pour la France. Le laboratoire a mis en place 5 préparations phagiques contre différentes infections bactériennes : Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage et Bacté-staphy-phage. Ces cinq spécialités étaient, pendant les années 30, parmi les dix meilleures ventes de l'entreprise. Elles ont ensuite été commercialisées par la société qui allait devenir la firme L'Oréal.

La production industrielle de phages a également été entreprise aux Etats Unis. Ainsi dans les années 1940 la société Eli Lilly basée à Indianapolis a produit 7 préparations phagiques destinées à traiter les infections humaines provoquées notamment par *Escherichia coli*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* ainsi que d'autres pathogènes. Ces préparations existaient sous deux formes : un bouillon de culture (stérile du point de vue bactérien) contenant les phages dirigés contre la bactérie cible ou une préparation équivalente sous forme de gelée soluble dans l'eau. Ces préparations étaient destinées au traitement de diverses pathologies : abcès, blessures suppurantes, vaginites, infections chroniques et aiguës de l'arbre respiratoire supérieur et infections mastoïdiennes. Cependant, l'efficacité des préparations phagiques a été controversée (Eaton et Bayne-Jones en 1934 et Krueger et Scribner en 1941). Ceci pourrait être dû à l'absence de phages actifs, à un titre phagique trop faible ou l'utilisation d'une gamme phagique de spectre trop étroit, comme cela a été montré sur des préparations phagiques antistaphylocoques commercialisées (Rakieten en 1932). De plus, certaines suspensions commerciales étaient, involontairement, dépourvues de phages actifs car les stabilisants utilisés par les fabricants avaient détruits les phages (et les opérations de contrôle suivant la fabrication n'étaient pas réalisées). Les firmes Parke-Davis et Abbott ont aussi mis au point des préparations phagiques à usage thérapeutique.

Ainsi, bien avant 1939, la phagothérapie était répandue et installée dans le monde entier. Toutefois, alors que les demandes de traitements augmentaient, la production avait des difficultés à fournir des bactériophages en quantité et surtout de qualité suffisantes. Les problèmes rencontrés étaient nombreux et en particulier l'inconstance des résultats obtenus. Devant la qualité médiocre des spécialités proposées à la vente, beaucoup de médecins

isolaient leurs propres phages à partir de bactéries isolées de leur patient. La recherche indépendante était encore parfois d'actualité devant la mortalité de certaines maladies infectieuses, comme la typhoïde.

Une nouvelle perspective allait néanmoins s'offrir à la phagothérapie : l'éclatement imminent de la Seconde Guerre mondiale. Les leçons tirées de la précédente guerre en matière de santé par les médecins militaires montraient que les pathologies infectieuses avaient été une cause de mortalité et d'invalidité importante dans les troupes engagées dans le conflit. L'Allemagne et les Etats-Unis ont donc réexaminé très officiellement les potentialités thérapeutiques des bactériophages. Les Américains se sont engagés dans la recherche en prenant en compte les travaux de René Dubos (biologiste français travaillant à Harvard) menés sur des animaux. Ce chercheur, et d'autres scientifiques (comme Morton, Engley et Schade), ont travaillé pour le compte de la défense des Etats-Unis. A la demande du gouvernement, des travaux tenus secrets ont été commandés en 1942 par le Committee on Medical Research (CMR) du National Research Council (NRC). Des rapports remis en 1943 et en 1944 ont proposé l'administration à grande échelle, préventive ou thérapeutique, de comprimés de bactériophages lyophilisés dirigés contre la dysenterie. Les Allemands, quant à eux, se sont engagés, dès le début du conflit, dans la production à grande échelle de préparations phagiques destinées à traiter la dysenterie bactérienne.

Il y a peu de données concernant l'utilisation et l'intérêt de cette pratique pendant le conflit. On sait simplement que l'analyse de suspensions phagiques saisis sur des prisonniers allemands n'a pas donné une impression très positive.

#### **e. Phagoprophylaxie**

Dans l'industrie alimentaire ou en médecine, certains scientifiques ont imaginé éliminer certaines bactéries pathogènes de l'environnement pour prévenir les contaminations voire certaines épidémies. Felix d'Hérelle a imaginé très tôt que le bactériophage est non seulement l'agent naturel de la guérison mais qu'il protège également l'individu contre l'infection. Il a formulé cette hypothèse suite à l'observation que la guérison était précédée de quelques heures par l'apparition du phage spécifique de la bactérie pathogène et que les porteurs du phage ne contractaient pas la maladie à laquelle ils étaient exposés. Il a appliqué



expérimentalement la phagoprophylaxie dès 1919 lors d'une épidémie qui sévissait en France parmi une population de poules. Il a fait ingérer aux animaux non malades de l'eau contenant des phages actifs contre la bactérie responsable de l'épidémie. Il a ensuite observé que les animaux protégés ne contractaient pas la maladie. « L'étude montre que l'histoire d'une épidémie enregistre en dernière analyse les péripéties de la lutte entre deux agents, la bactérie pathogène et l'ultramicrobe bactériophage, et que ce dernier est transmissible d'individu en individu : l'immunité est contagieuse au même titre que la maladie elle-même. Le début de l'épidémie est marqué par la diffusion d'une bactérie dont la virulence s'exalte progressivement par passages par individus sensibles, l'épidémie se répand ; l'ultramicrobe bactériophage exalte à son tour sa virulence pour la bactérie pathogène, se répand également ; l'épidémie cesse quand tous les individus sensibles sont contaminés par le bactériophage virulent » (« Sur le rôle du microbe bactériophage dans la typhose aviaire », 1919). Des années plus tard, d'Hérelle a utilisé cette même méthode en Inde pour lutter contre les épidémies de choléra. Il versait, en cachette des populations locales, des phages dans les puits d'eau qui servaient à l'alimentation humaine.

#### **f. La phagothérapie : source de polémique**

L'histoire de la phagothérapie n'est pas un long fleuve tranquille. En effet, plusieurs points suscitaient un grand nombre d'interrogations. En particulier, la nature réelle des bactériophages et leurs mécanismes d'action, le comportement *in vivo* des phages suite à leur administration, la variabilité des résultats thérapeutiques, le développement non standardisé du marché des suspensions phagiques étaient les principales sources de polémique.

En émettant l'hypothèse que les phénomènes de l'immunité et de la guérison étaient liés à la présence d'un « virus » invisible (et non pas aux anticorps, qui avaient été découverts par Jules Bordet), la théorie sur laquelle reposait la phagothérapie était à la fois provocatrice et hors des théories officielles. Ceci a valu de nombreux détracteurs et de nombreuses critiques à l'encontre de la phagothérapie. De plus, beaucoup d'éléments contribuaient à une méconnaissance de la nature réelle du principe lytique. En particulier, la virologie était encore une science balbutiante et le microscope électronique n'existait pas encore.

Dès le début de l'année 1920, Tamezo Kabeshima a rejeté, comme de nombreux chercheurs par la suite, la théorie virale pour expliquer le phénomène lytique observé. Pour cela, il a tenté de démontrer la nature chimique du bactériolysat, qu'il a appelé ferment (« Sur le ferment

d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature dudit « microbe filtrant bactériophage » de d'Hérelle », 1920).

A la fin de l'année 1920, Jules Bordet (immunologiste et microbiologiste belge, lauréat du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1919 pour ses travaux sur les mécanismes de l'immunité) et Michael Ciuca (scientifique roumain, chercheur et enseignant dans le domaine de la bactériologie) se sont intéressés à la découverte de d'Hérelle. Ils ont profité d'un des voyages de d'Hérelle en Indochine pour se procurer et analyser des tubes supposés contenir des bactériophages isolés par d'Hérelle. Cet épisode fut le point de départ d'une polémique qui opposa d'Hérelle aux savants de l'Institut Pasteur de Bruxelles et a duré une décennie. Deux notes de Bordet et Ciuca (« Exsudats leucocytaires et autolyse microbienne » ; « le bactériophage de d'Hérelle, sa production et son interprétation » en 1920) ont contesté la nature particulière (virale) du phénomène de d'Hérelle. Par la suite les théories virale et enzymatique du principe lytique avaient leurs défenseurs, ce qui n'a pas empêché, comme on l'a vu précédemment, que plusieurs essais thérapeutiques soient entrepris.

Les personnalités scientifiques les plus éminentes de l'époque se sont acharnées à vouloir que la phagothérapie soit la résultante d'un principe chimique ou enzymatique. La conception infectieuse du phénomène, dont d'Hérelle avait fait l'hypothèse, était sans doute trop audacieuse dans le contexte scientifique du moment. Face à des autorités éminentes comme l'Institut Pasteur de Bruxelles en Europe, ou l'Institut Rockefeller aux Etats-Unis, qui travaillaient en étroite collaboration, les tenants de la nature virale du phénomène peinaient à se faire entendre.

D'autres arguments négatifs à l'encontre de la phagothérapie trouvaient leur fondement dans les échecs de travaux entrepris et publiés. D'Hérelle, lui-même, a combattu ces arguments et rappelé les conditions indispensables pour éviter ces échecs : en priorité, l'utilisation de phages réellement actifs contre la bactérie responsable de l'infection à traiter. Les produits commercialisés par de nombreuses firmes dans le monde ne respectaient pas cette condition essentielle. Devant des conséquences aussi variables, le doute s'est installé. Aux Etats-Unis, le Council on Pharmacy and Chemistry, sorte d'Agence du Médicament aux Etats-Unis de l'American Medical Association, a demandé à Monroe Eaton (microbiologiste américain) et Stanhope Baynes-Jones (médecin et bactériologiste américain), puis Albert Krueger et Eunice Jane Scribner (professeurs américains de Bactériologie) d'analyser les nombreux travaux déjà publiés. Deux rapports ont été publiés en 1934 puis en 1941 dans le journal médical JAMA

(Journal of the American Medical Association). Les conclusions de ces rapports mettaient en avant que :

- La théorie virale de d'Hérelle n'est pas prouvée et l'hypothèse la plus vraisemblable est celle d'une protéine de haut poids moléculaire formée à partir d'un précurseur de la bactérie, soit la théorie chimique.
- L'action du bactériophage *in vivo* est beaucoup moins efficace (à cause du sang et d'autres liquides de l'organisme) et joue un rôle négligeable dans l'application clinique du phage.
- Les résultats favorables rapportés peuvent être le fait d'une action stimulante sur le système immunitaire et d'effets non spécifiques des lysats.
- Enfin, les résultats rapportés dans les diverses maladies sont pour la plupart insuffisants (exception faite des infections locales à staphylocoque) pour assurer que la phagothérapie ait sa place dans l'arsenal thérapeutique de l'époque. Mais un lysat correctement préparé peut servir de vaccin dans certaines pathologies, permettre d'augmenter les défenses locales ou servir d'agent pour induire un choc protéinique non spécifique.

Ces publications ont eu des répercussions importantes à l'époque, dont certaines sont encore percevables aujourd'hui.

Ce n'est qu'en 1939 avec les travaux d'Emory Ellis (biochimiste américain) et Max Delbrück (biophysicien germano-américain considéré comme un des fondateurs de la biologie moléculaire) sur la croissance en une seule étape des phages que la théorie virale a définitivement supplanté les autres théories. Ellis et Delbrück ont fait l'hypothèse que la croissance des bactériophages peut être divisée en trois périodes distinctes : adsorption, croissance (ou répliation) dans la cellule bactérienne et lyse avec libération des phages. Ils ont démontré que la croissance des phages est discontinue et s'effectue en une seule étape (« one-step ») et que des phases de brusque multiplication alternent avec des phases stationnaires. Plus encore, la microscopie électronique allait permettre de voir pour la première fois ce principe (Cf. III.1.b). Il est alors devenu irréfutable que le bactériophage est une particule dont les caractéristiques sont proches de celles des autres virus.

### **g. George Eliava et l'Institut Eliava de Bactériophagie**

Si Frederick Twort et Felix d'Hérelle sont incontestablement les deux principaux protagonistes de la découverte des bactériophages, de nombreux scientifiques ont réalisé un travail remarquable et indispensable dans l'histoire de la phagothérapie. Bien que peu connu, George Eliava est un de ces hommes. Ce scientifique, né le 13 janvier 1892 à Sachkhere en Géorgie, a intégré l'université Novorossiysk d'Odessa en 1909. Il a été renvoyé l'année suivante avec l'interdiction d'intégrer quelque université russe, à cause de son appartenance au mouvement étudiant révolutionnaire. Avec le soutien de ses parents, il a pu rejoindre l'université de Genève, où il a étudié la bactériologie de 1912 à 1914. Le début de la première guerre mondiale l'a empêché de poursuivre son cursus en Suisse. C'est de nouveau grâce à l'influence de ses parents qu'il a pu rejoindre l'université de médecine de Moscou où il a terminé ses études en 1916. Cette même année, il a été nommé à la tête du laboratoire Caucasiens de bactériologie du front à Trabzon avant d'intégrer au début de l'année 1917 le laboratoire de bactériologie de Tbilissi. Au cours des années 1920, il a travaillé à l'Institut Pasteur de Paris à trois reprises : de 1919 à 1921, puis de 1925 à 1927 et enfin en 1931. Ceci lui a permis de côtoyer des bactériologistes de renom (tels que Emile Roux, Charles Nicolle, Albert Calmette ou encore Gaston Ramon). C'est d'ailleurs au cours de son premier séjour à Paris, qu'il a fait la rencontre de Felix D'Hérelle (au début des années 1920). Il a été fasciné par l'idée de d'Hérelle d'utiliser les bactériophages à des fins thérapeutiques. En 1923, Eliava a fondé l'Institut de Bactériologie (actuellement Institut Eliava de Bactériophagie, Microbiologie et Virologie, EIBMV) dont il a été le premier directeur. En parallèle à ces activités administratives, Eliava a enseigné à l'Université d'Etat de Tbilissi de 1927 à 1937 et a successivement été à la tête du département d'hygiène puis de microbiologie. En 1934, il a établi le centre anti peste à Tbilissi (actuellement Centre National de Contrôle des Maladies).

L'implication d'Eliava dans la découverte et l'application de la phagothérapie est considérable. Il a découvert, avec d'Hérelle la lyse phagique, et ils ont étudié ensemble la réponse immunitaire à la phagothérapie dès 1921. Son travail a permis de montrer que la quinine, déjà connue dans la Chine antique pour ses propriétés antimalariques, affectait également spécifiquement les bactériophages (action destructrice des sels de quinine sur le bactériophage de d'Hérelle). Eliava a également été l'un des premiers à émettre l'hypothèse que les bactériophages pourraient modifier la nature des bactéries hôtes.

Plus tard, il s'est intéressé à l'absorption des bactériophages par les leucocytes (1930) et la perméabilité du placenta aux bactériophages (1931). Au cours des années 1933 et 1934, Eliava a invité d'Hérelle en Géorgie, ils ont travaillé ensemble pendant 18 mois. Suite à ce séjour, d'Hérelle avait l'intention de s'installer à Tbilissi mais ce projet n'a pas pu se réaliser. En effet, en 1937 Eliava et sa femme (Amelia Levitskaya, chanteuse d'opéra) ont été arrêtés, car considérés comme « ennemis du peuple » du fait de leur opposition intellectuelle à Laurent Beria, chef de la police secrète de Joseph Staline, et exécutés. Selon une autre version, Beria considérait Eliava comme un rival potentiel pour la séduction d'une femme, Tinatian Jikia, alors bibliothécaire à l'Institut de Bactériophagie. D'Hérelle, fortement éprouvé par la perte de son ami, n'est jamais retourné en Géorgie.

Eliava n'est pas à l'origine d'un grand nombre de publications. Malgré cela, son travail a été d'une importance considérable dans l'avancée des connaissances sur le bactériophage et la phagothérapie.

L'institut a survécu à l'exécution d'Eliava et est devenu par la suite une des plus importantes installations mondiales destinées à la fabrication de bactériophages. Il a compté jusqu'à 120 scientifiques et techniciens et préparait, à cette époque, plusieurs tonnes par jour de préparations phagiques dirigées contre une douzaine de bactéries pathogènes dont des staphylocoques, *Pseudomonas*, *Proteus* et plusieurs bactéries entériques.

La plupart des études menées dans l'empire Soviétique utilisait des phages développés et produits à l'EIBMV (Eliana Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology).

## **h. L'apparition des antibiotiques**

Le début de la deuxième moitié du XX<sup>e</sup> siècle a vu avec enthousiasme le développement des antibiotiques. Forts de nombreux succès initiaux, les premiers échecs et accidents médicaux n'ont pas affaibli cet enthousiasme. D'autant plus que les recherches menées permettaient une extension des indications. Dans le même temps, l'intérêt déclinait pour la phagothérapie, qui conservait chez certains l'image d'une approche thérapeutique à l'efficacité limitée, voire non démontrée ou encore totalement inefficace. Mais la phagothérapie n'a pas complètement disparu : elle était encore envisagée en ultime recours lors de l'échec des traitements consensuels en vigueur. La phagothérapie se trouvait alors dans une situation délicate qui ne pouvait que ternir son image et confirmer sa « probable inefficacité ».

Avec les années, un nombre de moins en moins important de médecins avait l'expérience suffisante pour traiter à l'aide de la phagothérapie. Des préparations standards, composées d'un mélange de plusieurs bactériophages pour avoir le spectre le plus large possible, étaient commercialisées mais elles ne devaient pas être administrées sans tests préalables (pour éviter une inefficacité thérapeutique). Ceci est encore plus vrai pour les bactériophages que pour les antibiotiques. La phagothérapie rend chaque cas traité particulier.

## **i. L'évolution d'après-guerre de la phagothérapie**

### *i.1 Dans les pays de l'Est*

L'URSS et l'ensemble du bloc soviétique dans son sillage ont poursuivi leurs travaux sur la phagothérapie. Ainsi, les plans quinquennaux mis en place par Staline, dès 1940, ont donné une place importante à la phagothérapie. Il s'agissait d'évaluer l'efficacité de cette thérapeutique et de développer de nouvelles formes galéniques : des comprimés gastro-résistants pour les infections intestinales, des poudres et compresses imprégnées de phages pour les plaies cutanées... Entre les années 1950 et 1960, toujours dans le cadre des plans quinquennaux, les scientifiques ont étudié les intérêts potentiels de l'association entre antibiotiques et phages.

Les recherches sur les phages ont continué à fleurir à l'Est. En guise d'exemple, on peut citer une étude colossale menée, à partir de 1961, sur plus de trente mille sujets pour évaluer le rôle prophylactique des phages. Les conclusions ont mis en valeur les bénéfices de la phagothérapie (Chanishvili et al., 2001 ; Sulakvelidze et al., 2001).

Le contexte historique explique que l'intégralité des travaux entrepris dans les Pays de l'Est n'a pas eu le moindre écho dans les pays Occidentaux.

A l'heure actuelle, seules la Russie, la Géorgie et la Pologne utilisent encore les bactériophages à des fins thérapeutiques.

### *i.2 Dans les pays de l'Ouest*

Jugée moins pratique (fabrication, conditionnement et utilisation) et moins efficace que l'antibiothérapie, la phagothérapie a été petit à petit délaissée par les pays occidentaux. Par conséquent, les laboratoires se sont rapidement focalisés sur l'antibiothérapie, tandis que

quelques laboratoires indépendants, bientôt marginaux, ont continué à préparer des suspensions phagiques. Cette production s'est prolongé jusque dans les années soixante-dix. En France, des préparations de bactériophages sont demeurées inscrites au VIDAL jusqu'en 1974 avant d'en être effacées, malgré la contestation de quelques rares scientifiques. Les publications sont naturellement devenues moins fréquentes et l'engouement initial s'est peu à peu éteint.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a réévalué l'efficacité des bactériophages dans la lutte contre le choléra, puis l'a comparé à celle des antibiotiques. Les conclusions de ce travail ont porté un coup de grâce à la phagothérapie. En effet, elles mettaient en évidence une diminution de la mortalité, due au choléra, plus importante avec les antibiotiques (taux de mortalité compris entre 10% et 15%) qu'avec les bactériophages (taux de mortalité compris entre 22% et 45%) (Politzer, 1959).

Cependant, les bactériophages, délaissés en médecine, ont connu un nouvel essor avec le développement de la biologie moléculaire. Un groupe de scientifiques créé en 1941 aux Etats-Unis par Max Delbrück et le microbiologiste Salvador Luria, le « Cold Spring Harbor Laboratory Phage Group », s'est intéressé aux mécanismes d'action des phages vis à vis des bactéries. Ces études ont permis de mettre en lumière le fonctionnement des phages et la mécanique des infections virales. Mieux encore, elles ont offert aux phages une seconde chance de briller en science en les utilisant en génétique et en biologie moléculaire. Leurs nouvelles attributions ont permis, entre autres, de confirmer que l'ADN est le support de l'information génétique (Hershey et Chase, 1952), de découvrir les enzymes de restriction (Arber, 1966) ou de mettre au point la technique de séquençage de l'ADN (Sanger et al., 1977).

### III. Les phages en tant que « mangeurs de bactéries »

#### 1. Morphologie des bactériophages

##### a. Dimension des virus et bactériophages

Les « êtres » de très petite taille sont appelés micro-organismes parce qu'ils sont microscopiques (invisibles à l'œil nu). Ils ne peuvent donc être observés qu'à l'aide d'un microscope. Les micro-organismes regroupent les protozoaires, les levures, les champignons microscopiques et les bactéries (pathogènes ou non). Bien que les virus soient des entités de très petite taille, l'ICTV précise qu'ils ne devraient pas être considérés comme des micro-organismes.

Les virus, et par conséquent les bactériophages, ont une taille comprise entre 20 et 600 nanomètres. Pour rappel et en guise de comparaison, la taille des bactéries est de l'ordre du micron et une cellule humaine ordinaire a un diamètre de 10 à 20 micromètres.

##### b. Observation des bactériophages

Les bactériophages ne sont observables qu'au microscope électronique. En effet, les microscopes optiques ont un pouvoir séparateur maximum de 0,2 micromètre (ils ne permettent donc pas d'observer au-delà du micromètre).

Le premier prototype de microscope électronique a été construit en 1931 par les ingénieurs allemands Ernst Ruska et Max Knoll. Plus tard, en 1939, les premiers microscopes électroniques sont fabriqués en série et c'est en 1940 qu'Helmut Ruska a observé le premier bactériophage d'*Escherichia coli*.

##### c. Structure générale des virus et des bactériophages

Les caractéristiques très générales qui suivent s'appliquent aux virus et donc aux bactériophages. La structure des virus varie selon les familles de virus considérées. Les virus contiennent les éléments suivants :



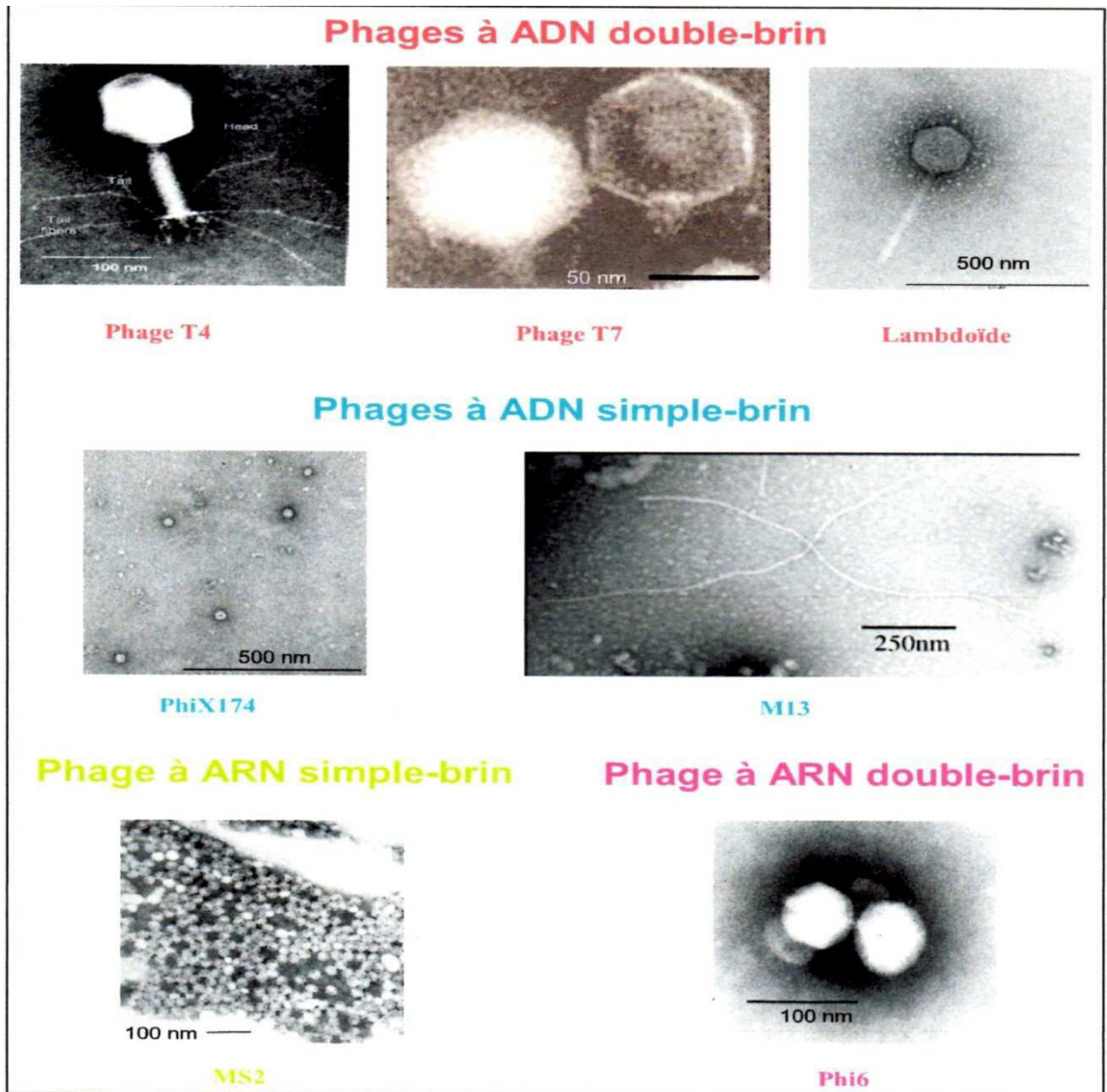
- Le génome : un virus comporte toujours un génome qui est de l'ADN ou de l'ARN. Il peut être monocaténaire (simple brin), bicaténaire (double brin) voire partiellement bicaténaire (figure 4). Le génome, contenant l'information génétique du virus, est comprimé. Le nombre de bases étant réduit, elles codent pour un nombre réduit de protéines structurales, nécessaires à la constitution du virus, ou non structurales, à activité enzymatique permettant notamment la réplication virale. L'acide nucléique du bactériophage est très fortement replié à l'intérieur de la capsid. Plus de 95% des phages connus ont pour matériel génétique de l'ADN double brin.

La structure nucléoprotéique définie par l'acide nucléique et les protéines internes, porte le nom de nucléoïde.

- La capsid (40 à 60 nm) : c'est une boîte protéique qui entoure l'acide nucléique et résiste aux enzymes protéolytiques. Elle est constituée par l'assemblage, par répétition, d'une ou quelques molécules protéiques appelées unités de structure (U.S). Ce polymère de nature protéique permet de protéger le génome, en particulier des nucléases, et sert à l'attachement du virus à la cellule hôte et à son entrée (pour les virus nus). Les unités de structure ont un arrangement symétrique. Les deux principaux types de symétrie sont :

La symétrie hélicoïdale (figure 5) où les unités de structures sont assemblées en « manchon » autour de l'acide nucléique. Si le manchon est rigide, le virus a une forme tubulaire. Si le manchon est flexible, la structure est enroulée sur elle-même et le virus a une forme sphérique.

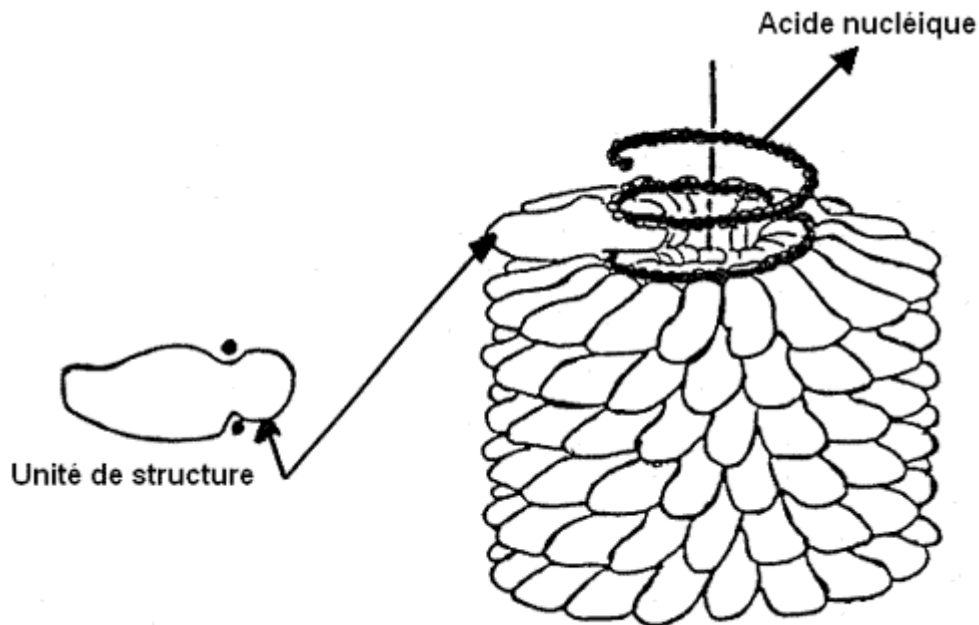
Figure 4 : Exemple de la diversité génomique des bactériophages



Source : Photos prises par Ariane Bize d'Avezac à l'Institut Pasteur (2010).

Ces photos prises par microscope électronique montrent la grande diversité génomique des phages. Le matériel génétique peut être de l'ADN double brin (phage T4, phage T7, phage lambdaïde), de l'ADN simple brin (phage PhiX174), de l'ARN simple brin (phage MS2) ou de l'ARN double brin (phage Phi6).

Figure 5 : Symétrie hélicoïdale de la capside



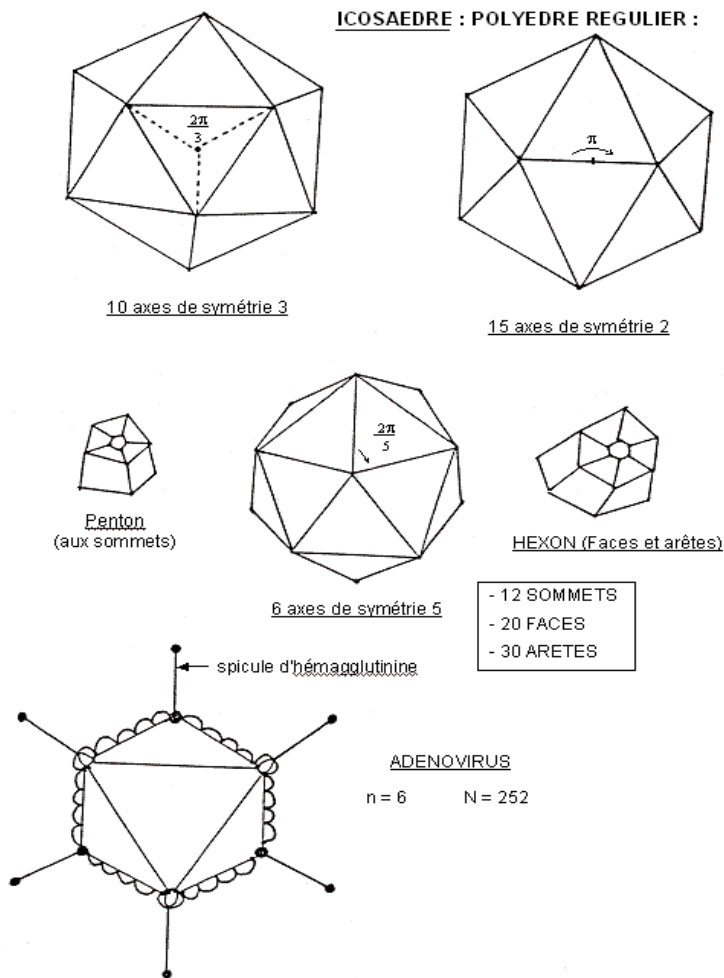
Source : Site internet : [www.microbes-edu.org](http://www.microbes-edu.org)

Le virus de la mosaïque du tabac a une morphologie de bâtonnet allongé et rigide. Il s'agit d'un cylindre creux de 300 nanomètres de long et de 18 nanomètres de diamètre, délimitant un canal central de 4 nanomètres de diamètre. L'acide nucléique est un ARN linéaire monocaténaire, qui s'enroule dans l'espace avec une forme de spirale. La capside est constituée de 2200 unités de structures protéiques toutes identiques. Chaque sous-unité est une protéine unique (formée de 158 acides aminés, de masse 17500 daltons) et résistante, notamment à l'action des aminopeptidases.

La symétrie cubique (figure 6) où les unités de structure sont édifiées en un icosaèdre (polyèdre à 20 faces qui sont des triangles équilatéraux et 12 sommets)

Les capsides hélicoïdales et cubiques présentent l'avantage d'une grande stabilité structurelle. C'est probablement la raison de leur sélection naturelle

Figure 6 : Symétrie cubique de la capsid

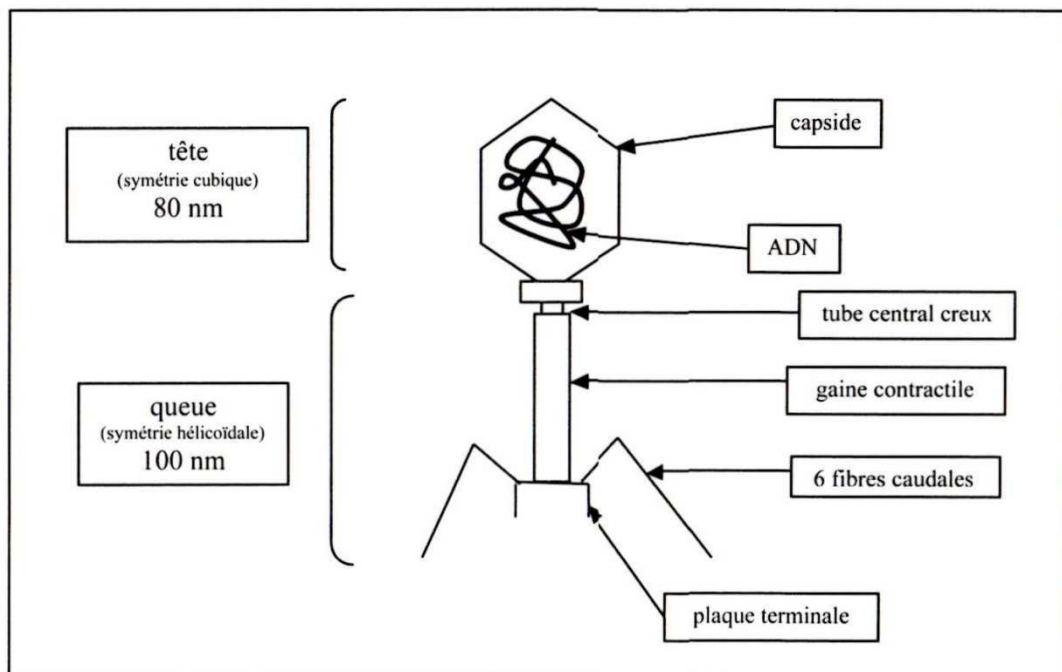


Source : Site internet : [www.microbes-edu.org](http://www.microbes-edu.org)

La caractéristique essentielle des virus à symétrie cubique est que les unités de structure protéique se groupent en unités morphologiques, appelées capsomères, qui peuvent être constituées de : 2 unités de structure (bimère), 3 unités de structure (trimère), 5 unités de structure (penton) ou 6 unités de structure (hexon). Les considérations théoriques et les observations cristallographiques ont permis d'admettre que les capsomères des capsides des virus d'apparence « sphérique » au microscope électronique devaient se faire selon une structure symétrique. Parmi les polyèdres réguliers capables d'assurer une symétrie cubique, l'icosaèdre a été sélectionné naturellement pour la constitution des capsides virales à symétrie cubique. Le nombre de capsomères total (N) est donné par la formule :  $N = 10(T-1) + 12$ . Dans cette formule T est le nombre de triangulation, qui correspond au nombre de triangles divisant chaque face de l'icosaèdre. En conséquence, chaque capsid icosaédrique (sauf exceptions) est constituée de 12 pentons et d'un nombre variable d'hexons, en fonction du nombre de triangulation.

Certains virus (les Poxvirus par exemple) ont une symétrie complexe qui ne répond pas aux descriptions précédentes. En ce qui concerne les bactériophages, ceux de la série T paire présentent une symétrie particulière dite mixte ou binaire. Ces virus possèdent une capsidite en deux parties : une tête à symétrie cubique formée de 152 capsomères contenant le génome (ADN) et une queue de symétrie hélicoïdale reliée à la tête par le collier (figure 7). La queue est constituée d'une gaine protéique contractile délimitant un canal central creux. Elle est terminée par une plaque basale, elle-même porteuse de spicules et de six fibres caudales.

Figure 7 : Structure générale d'un phage caudé de type T4



Source : « Des virus pour combattre les infections », Dr Alain Dublanche, édition Favre, 2012.

Les phages caudés ont une symétrie binaire : la tête (qui correspond à la capsidite des virus à symétrie mixte) a une symétrie icosaédrique et abrite le génome ; la queue, rigide, a une symétrie hélicoïdale. C'est un tube creux entouré d'une gaine contractile et terminé par des fibres. Ces dernières sont responsables de la fixation à la bactérie, ce qui déclenche la contraction de la gaine et fait pénétrer le tube dans le cytoplasme. Le génome du virus peut alors être injecté dans la bactérie. Le phage T4 appartient à la famille des *Myoviridae* et à l'ordre des *Caudovirales*.

La queue (de 24 à 700 nm de long et 4 à 12 nm de diamètre) est un tube régulièrement strié, composé d'un empilement d'anneaux ayant une disposition hélicoïdale autour d'un axe creux. Elle constitue l'organe d'injection de l'acide nucléique dans la cellule infectée.

- La nucléocapside ou core: c'est une unité fonctionnelle formée du nucléoïde et de la capsid. Les virus limités à leur nucléocapside sont dits nus.
- L'enveloppe ou le péplos : chez les virus enveloppés dont certains bactériophages, la nucléocapside est entourée d'une enveloppe (ou péplos) qui correspond à l'élément le plus externe. La présence ou l'absence d'enveloppe règle en grande partie le mode de transmission des maladies virales : tous les virus humains ou animaux à capsid tubulaire ont un péplos, mais seuls certains virus à capsid icosaédrique en sont pourvus. L'enveloppe est une structure souple d'origine cellulaire, issue des membranes cellulaires (plasmiques, nucléaires, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi) de la cellule hôte. En effet les virus à péplos terminent leur multiplication dans la cellule par bourgeonnement. L'enveloppe est donc de nature glucido-lipidique. Des glycoprotéines virales peuvent s'insérer dans la bicouche lipidique. Il est à noter que les virus enveloppés sont particulièrement fragiles. En effet, le péplos a la fragilité des membranes cellulaires dont il dérive. Un virus, quel qu'il soit, doit être entier pour être infectant. Or, dans le milieu extérieur et dans le tube digestif, les virus enveloppés vont voir leur enveloppe se dégrader rapidement et perdre ainsi leur pouvoir infectant. Dans ces mêmes milieux, les virus nus (sans enveloppe) vont résister beaucoup plus longtemps. Dans le milieu extérieur, les virus à péplos sont inactivés par deux facteurs : la température (même ordinaire) et la dessiccation. Dans le tube digestif, le péplos est rapidement dégradé par les enzymes digestives.

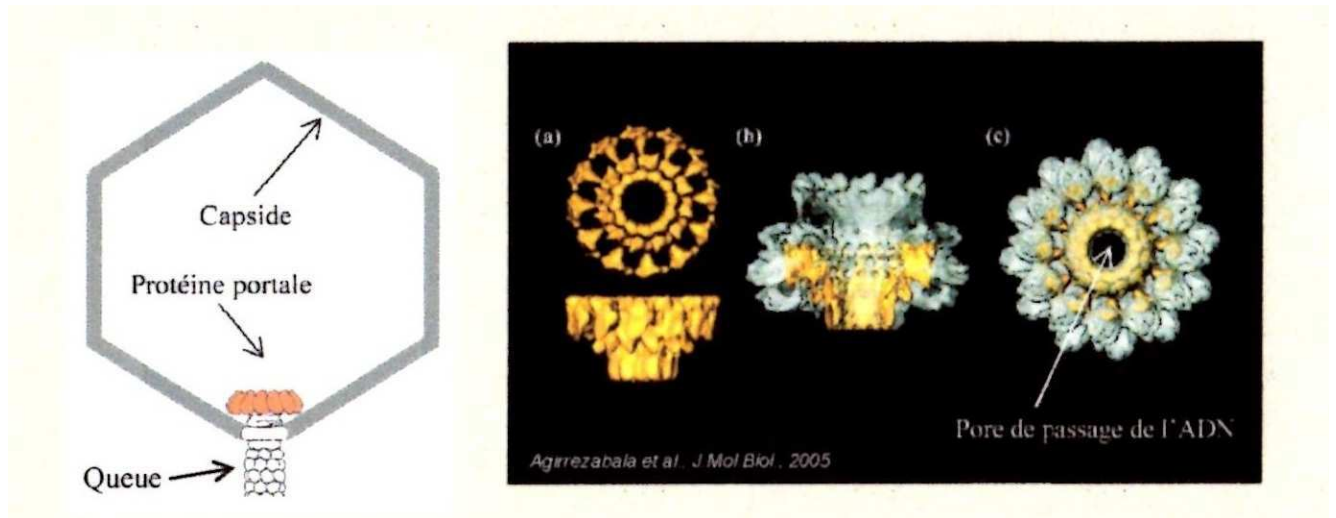
Certains virus enveloppés ont une matrice, qui correspond à une structure protéique virale qui est immédiatement présente sous l'enveloppe. Cette matrice a un rôle stabilisateur de l'enveloppe.

- Les projections de surface : elles sont appelées spicules ou fibres voire boutons. Ces formations sont constituées de protéines chez les virus nus et de glycoprotéines chez les virus enveloppés. Elles font saillie sur la capsidite ou l'enveloppe de nombreux virus et sont impliquées dans l'attachement aux récepteurs des cellules cibles.

La quantité d'ADN restant dans le bactériophage dépend de la pression exercée. La pression externe exercée pour que l'intégralité du matériel génétique persiste à l'intérieur du bactériophage est d'environ 50 bar. Ceci est rendu possible par le fait que la capsidite est semi-perméable. Ainsi la pression osmotique s'exerce sur l'acide nucléique au travers de la capsidite.

Lors de l'infection d'une bactérie cible, un phage virulent va détourner la machinerie cellulaire de la bactérie et ses activités métaboliques : il y a réplication de l'acide nucléique viral et synthèse des protéines structurales et d'assemblage. Lors de la phase d'assemblage, l'encapsidation de l'acide nucléique phagique synthétisé est nécessaire. Le moteur d'entrée de l'ADN viral dans le bactériophage est la protéine portale, qui se trouve à l'interface de la capsidite et de la queue (figure 8). Cette protéine utilise l'énergie chimique fournie par la bactérie ce qui permet d'encapsider quelques  $\mu\text{m}$  d'ADN (génome entier) en quelques minutes. C'est l'un des moteurs moléculaires les plus puissants qui aient été étudiés.

Figure 8 : La protéine portale du bactériophage



Source : « Les bactériophages ou comment les bactéries tombent malades », Marta de Frutos, Université de Paris-Sud et « Maturation of phage T5 involves structural modification of both shell and inner core components », Agirrezabala et al., *Journal of Molecular Biology*, 2005

La protéine portale se trouve à l'interface de la capside et de la queue. Elle fonctionne en collaboration avec d'autres protéines et utilise l'énergie fournie par la bactérie pour permettre le transfert de l'ADN dans la capside. Le passage de l'acide nucléique est rendu possible par la présence d'un pore.

#### **d. Diversité et détection des bactériophages**

Les bactériophages sont très nombreux dans la biosphère. Mais sont-ils aussi diversifiés qu'ils sont nombreux ?

Pour pouvoir estimer la diversité des bactériophages et établir une taxonomie par la suite, il faut pouvoir les détecter de la façon la plus exhaustive possible, puis éventuellement les isoler et les cultiver pour les caractériser précisément.

Pour déceler un phage donné, on a la possibilité d'introduire son hôte dans l'échantillon à tester et d'attendre de voir si un phénomène de lyse se produit. L'hôte doit par conséquent être connu et cultivable. Or, la majorité des bactéries de l'environnement sont non cultivables, ce qui limite fortement cette première approche. De plus, cette technique est restrictive puisqu'elle ne vise que les virus parasitant l'hôte mis en culture. Il existe d'autres méthodes ne nécessitant pas forcément la culture de l'hôte potentiel, comme par exemple la microscopie électronique, la cytométrie de flux, l'utilisation d'anticorps spécifiques, ou encore la génomique. Les prélèvements peuvent être concentrés de façon aspécifique (précipitation,

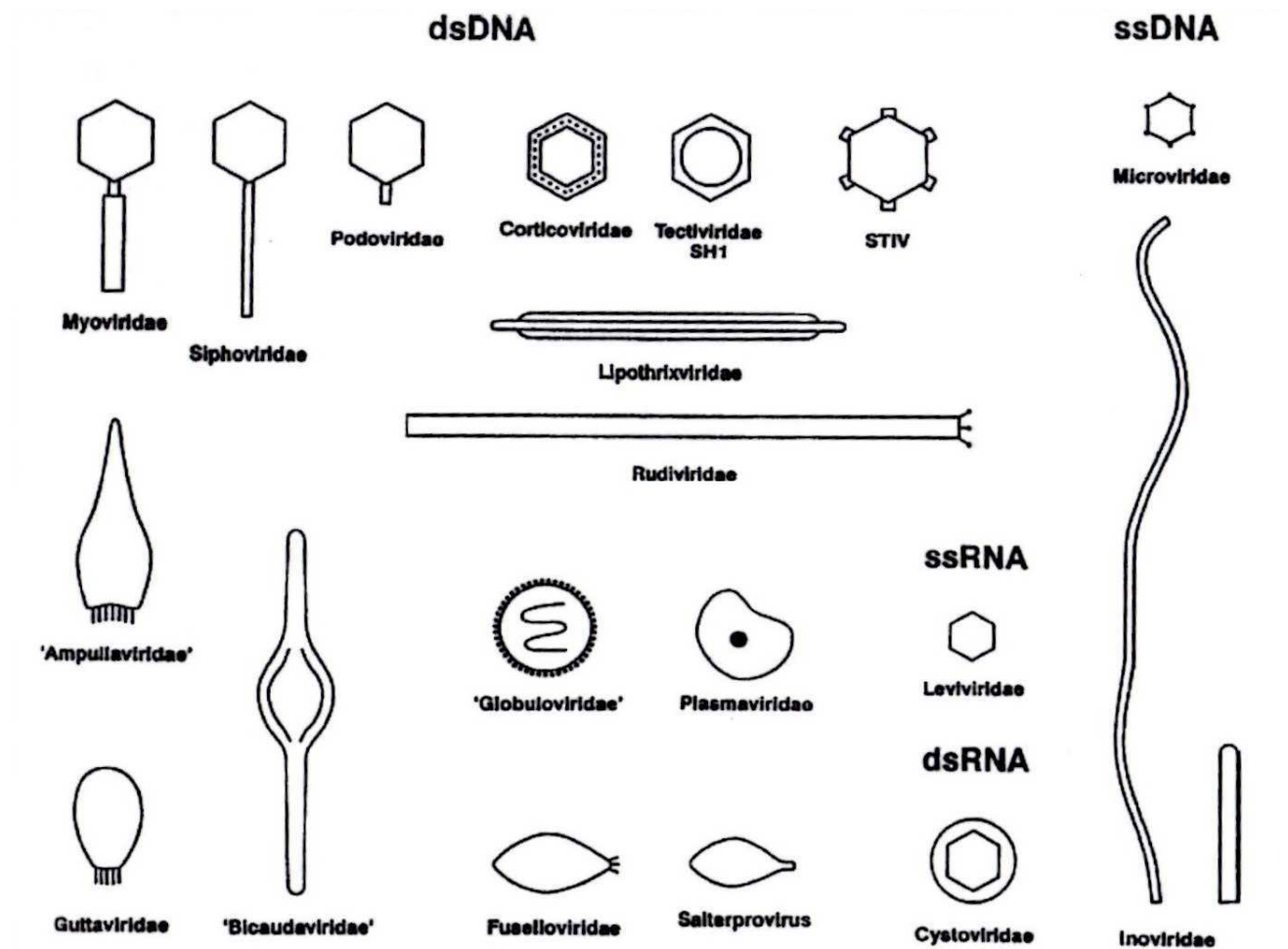


centrifugation, filtration) ou bien spécifique avec une amplification sur un (ou plusieurs) hôte(s) potentiel(s).

La génomique est la méthode la plus exhaustive pour détecter les virus. Il n'existe pas de séquence, équivalente à l'ARN ribosomique, utilisé pour différencier les bactéries et tous les organismes dits « vivants », qui soit conservée chez l'ensemble des virus et permette de les détecter systématiquement. Toutefois, on retrouve des séquences spécifiques des différents groupes de virus. On recherche donc les traces de ces séquences qu'on amplifie séparément. Cela permet de remonter aux groupes de virus présents dans les échantillons analysés. Le polymorphisme de ces séquences est ensuite utilisé pour mesurer la diversité à l'intérieur de ces groupes. Cependant, cette méthode ne permet pas de découvrir de nouveaux groupes de virus, puisqu'il faut avoir d'avance une séquence qui les caractérise. C'est pourquoi il a été proposé d'étudier les métagénomiques viraux (la métagénomique est un procédé méthodologique qui vise à étudier le contenu génétique d'un échantillon environnemental par séquençage direct de l'ADN des organismes microbiens). Les données obtenues sont quantitatives, et permettent d'estimer le nombre de génotypes et leur abondance relative dans un environnement. Les résultats obtenus sont surprenants : près de 5000 génotypes viraux différents dans 200 litres d'eau marine, jusqu'à 1 million par kilo de sédiment marin et entre 160 et 1200 dans l'intestin humain (Mya Breitbart et Forest Rohwer, 2005).

Sur le plan morphologique, les bactériophages ont une diversité très importante. En effet, on dénombre, parmi les bactériophages connus, 20 groupes morphologiques (figure 9). Le schéma suivant résume les différences connues à ce jour.

Figure 9 : Morphologie des principales familles de bactériophages



Source : « 5500 phages examined in the electron microscope » Ackermann, Archive of Virology, 2007.

Cette illustration présente les principales familles de bactériophages selon la nature de leur génome (ssDNA : ADN simple brin ; dsDNA : ADN double brin ; ssRNA : ARN simple brin ; dsRNA : ARN double brin), leur capside et leur enveloppe. Les trois principales familles de phages sont les *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae*.

## 2. Classification des bactériophages

Le comité responsable de la nomenclature et de la taxonomie de l'ensemble des virus à l'échelle internationale s'appelle l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Les virus sont classés hiérarchiquement en ordre (3), famille (56), sous-famille (9), genre (223) et espèces (1550). Une espèce virale est définie comme « une classe de virus de type polythétique (une espèce polythétique est une espèce définie par un certain nombre de critères, dont aucun n'est nécessaire ou suffisant par lui-même. Chaque virus de l'espèce doit posséder un certain nombre minimal de caractéristiques sans qu'aucune propriété particulière ne soit obligatoirement présente chez tous les membres de l'espèce et ne puisse donc servir de critère suffisant pour son identification) constituant une lignée répliquative et occupant une niche écologique particulière » (définition approuvée par l'ICTV en 1991).

La classification des virus, et donc celle des bactériophages, s'appuie sur des critères physico-chimiques : la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN, simple ou double brin), la présence ou l'absence d'une enveloppe (péplos), la symétrie et les particularités de la capsid (hélicoïdale, icosaédrique ou complexe).

### a. Phages à ADN bicaténaire, non enveloppés

#### a.1 *Ordre des Caudovirales*

Parmi les 5500 phages décrits, plus de 95% d'entre eux ont une structure binaire et appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*. Les principaux phages qui présentent un intérêt thérapeutique, pour leur caractère lytique, sont classés dans cet ordre.

Ce sont des phages à symétrie binaire, infectant les bactéries du domaine des *Bacteria* et du domaine des *Archaea*.

- Famille des *Myoviridae* : ce sont des phages à queue longue et contractile, infectant les bactéries du domaine des *Bacteria* et du domaine des *Archaea*. Elle comporte de nombreux genres :

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
« <i>T4-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage T4</i>	<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Aeromonas</i> spp., Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
« <i>P1-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage P1</i>	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Acetobacter</i> spp., Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
« <i>P2-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage P2</i>	<i>Aeromonas</i> spp., Entérobactéries, <i>Haemophilus</i> spp., <i>Pasteurella</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rhizobium</i> spp.
« <i>SP01-like viruses</i> »	<i>Bacillus phage SP01</i>	<i>Bacillus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp.
« <i>Mu-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage Mu</i>	Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
« $\phi$ H-like viruses »	<i>Halobacterium phage <math>\phi</math>H</i>	<i>Halobacterium</i> spp.
« <i>PBS1-like viruses</i> »	<i>Bacillus phage PBS1</i>	<i>Bacillus</i> spp.

De nombreuses espèces sont non classées dans un genre et elles peuvent infecter les *Acinetobacter* spp., les *Actinomyces* spp., les *Aeromonas* spp., les *Alcaligenes* spp., les *Bacillus* spp., les espèces du phylum des *Cyanobacterias*, des bactéries corynéformes, les entérobactéries, les *Lactobacillus* spp., les *Listeria* spp., les spp., les *Pseudomonas* spp., les *Rhizobium* spp., les *Xanthomonas* spp., les *Vibrio* spp.

- Famille des *Siphoviridae* : Ce sont des phages à queue longue et non contractile, infectant les bactéries du domaine des *Bacteria* et du domaine des *Archaea*. Elle comporte les genres suivants :

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
« <i>λ-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage λ</i>	<i>Rhizobium</i> spp.
« <i>T1-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage T1</i>	Entérobactéries
« <i>T5-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage T5</i>	Entérobactéries, <i>Vibrio</i> spp.
« <i>L5-like viruses</i> »	<i>Mycobacterium phage L5</i>	<i>Mycobacterium</i> spp.
« <i>c2-like viruses</i> »	<i>Lactococcus phage c2</i>	<i>Lactococcus</i> spp.
« <i>ψM1-like viruses</i> »	<i>Methanobacterium phage ψM1</i>	<i>Methanobacterium</i> spp., <i>Methanobrevibacter</i> spp.
« <i>φC31-like viruses</i> »	<i>Streptomyces bacteriophage</i> <i>φC31</i>	<i>Streptomyces</i> spp.
« <i>N15-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage N15</i>	Entérobactéries

De nombreuses espèces sont non classées dans un genre et elles peuvent infecter les *Acinetobacter* spp., les *Actinomyces* spp., les *Agrobacterium* spp., les *Bacillus* spp., les *Burkholderia* spp., les *Clostridium* spp., des bactéries corynéformes, les espèces du phylum des *Cyanobacteries*, les entérobactéries, les *Lactobacillus* spp., les *Lactococcus* spp., les *Leuconostoc* spp., les *Listeria* spp., les *Micrococcus* spp., les *Mycobacterium* spp., les *Pasteurella* spp., les *Pseudomonas* spp., les *Rhizobium* spp., les *Staphylococcus* spp., les *Streptococcus* spp., les *Vibrio* spp.

- Famille des *Podoviridae* : Ce sont des phages à queue courte et non contractile, infectant les bactéries du domaine des *Bacteria*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
« <i>T7-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage T7</i>	<i>Caulobacter</i> spp., Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Rhizobium</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
« <i>φ259-like viruses</i> »	<i>Bacillus phage φ29</i>	<i>Bacillus</i> spp., <i>Kurthia</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.
« <i>P22-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage P22</i>	<i>Aeromonas</i> spp., <i>Azotobacter</i> spp., Entérobactéries, <i>Hyphomicrobium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp.
« <i>N4-like viruses</i> »	<i>Enterobacteria phage N4</i>	Entérobactéries

De nombreuses espèces sont non classées dans un genre et elles peuvent infecter les *Acinetobacter* spp., les *Bacillus* spp., les *Brucella* spp., les *Clostridium* spp., des bactéries corynéformes, les espèces du phylum des *Cyanobacteria*, les entérobactéries, les *Lactococcus* spp., les espèces de la classe des *Mollicutes*, les *Mycobacterium* spp., les *Pasteurella* spp., les *Pseudomonas* spp., les *Rhizobium* spp., les *Roseobacter* spp., les *Streptococcus* spp., les *Synechococcus* spp., les *Vibrio* spp., les *Xanthomonas* spp.

a. 2 Familles non placées dans un ordre

- Famille des *Corticoviridae* : Ce sont des phages à symétrie cubique, infectant les bactéries du domaine des *Bacteria*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Corticovirus</i>	<i>Pseudoalteromonas phage PM2</i>	<i>Alteromonas</i> spp., <i>Pseudoalteromonas</i> spp.

- Famille des *Rudiviridae* : Ce sont des phages à ADN bicaténaire, non enveloppés, en forme de bâtonnets, infectant les bactéries du domaine des *Archaea*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Rudivirus</i>	<i>Sulfolobus islandicus rod-shaped virus 2</i>	<i>Sulfolobus</i> spp.

- Famille des *Tectiviridae* : Ce sont des phages à symétrie cubique, infectant les bactéries du domaine des *Bacteria*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Tectivirus</i>	<i>Enterobacteria phage PRD1</i>	<i>Bacillus</i> spp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Vibrio</i> spp., Entérobactéries

## b. Phages à ADN bicaténaire, enveloppés

- Famille des *Plasmaviridae* : Ce sont des phages polymorphes, ne possédant pas de capsid. Ils sont constitués uniquement d'une enveloppe et d'une nucléoprotéine, infectant des bactéries de l'ordre des *Mycoplasmatales*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Plasmavirus</i>	<i>Acholeplasma phage L2</i>	<i>Acholeplasma</i> spp.

- Famille des *Guttaviridae* : Ce sont des phages en forme de gouttelette, infectant les bactéries du domaine des *Archaea*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Guttavirus</i>	<i>Sulfolobus newzealandicus</i> <i>droplet-shaped virus</i>	<i>Sulfolobus</i> spp.

- Famille des *Fuselloviridae* : ce sont des phages en forme de citron, infectant les bactéries du domaine des *Archaea*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Fuselloviridae</i>	<i>Sulfolobus spindle-shaped</i> <i>virus 1</i>	<i>Sulfolobus</i> spp.



- Famille des *Lipothrixviridae* : Ce sont des phages filamenteux ou en forme de bâtonnets, infectant les bactéries du domaine des *Archaea*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Alphalipothrixvirus</i>	<i>Thermoproteus tenax virus 1</i>	<i>Thermoproteus</i> spp.
<i>Betalipothrixvirus</i>	<i>Sulfolobus islandicus filamentous virus</i>	<i>Desulfurolobus</i> spp., <i>Sulfolobus</i> spp., <i>Thermoproteus</i> spp.
<i>Gammalipothrixvirus</i>	<i>Acidianus filamentous virus 1</i>	<i>Acidianus</i> spp.

- Genre non classés dans une famille : Genre *Salterprovirus* : espèce type : *His1 virus* : ce sont des phages en forme de citron présentant des fibres attachées à un pôle de la particule virale. Ils infectent les bactéries du domaine des *Archaea* et ont comme principaux hôtes les *Haloarcula* spp.

### c. Phages à ADN monocaténaire, non enveloppés

- Famille des *Inoviridae* : Ce sont des phages filamenteux ou en forme de bâtonnets, à symétrie hélicoïdale. Ils infectent les bactéries du domaine des *Bacteria*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Inovirus</i>	<i>Enterobacteria phage M13</i>	Entérobactéries, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Xanthomonas</i> spp.
<i>Plectovirus</i>	<i>Acholeplasma phage MV-L51</i>	<i>Acholeplasma</i> spp., <i>Spiroplasma</i> spp.

- Famille des *Microviridae* : Ce sont des phages cubiques, possédant de grands capsomères et infectant les bactéries du domaine des *Bacteria*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Microvirus</i>	<i>Enterobacteria phage φX174</i>	Entérobactéries
<i>Spiromicrovirus</i>	<i>Spiroplasma phage 4</i>	<i>Spiroplasma</i> spp.
<i>Bdellomicrovirus</i>	<i>Bdellovibrio phage MAC 1</i>	<i>Bdellovibrio</i> spp.
<i>Chlamydiamicrovirus</i>	<i>Chlamydia phage 1</i>	<i>Chlamydia</i> spp., <i>Chlamydophila</i> spp.

#### d. Phages à ARN bicaténaire

- Famille des *Cystoviridae* : Ce sont des phages enveloppés, sphériques, à génome fragmenté. Ils infectent les bactéries du domaine des *Bacteria*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Cystovirus</i>	<i>Pseudomonas phage φ6</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.

#### e. Phages à ARN monocaténaire

Ce ne sont pas des phages lytiques, ils n'ont pas d'intérêt en phagothérapie. Par contre, ces phages filamenteux ont une propriété particulière (découverte en 1985) : il s'agit de la présentation phagique appelée « phage display », c'est à dire la présentation de peptides à leur surface. Ces phages sont de ce fait devenus un outil de laboratoire important, ainsi qu'un moyen diagnostique ou thérapeutique.

- Famille des *Leviviridae* : Ce sont des phages à ARN monocaténaire de polarité positive, non enveloppés, sphériques et à symétrie cubique. Ils infectent les bactéries du domaine des *Bacteria*.

Genre	Espèce type	Principaux hôtes
<i>Levivirus</i>	<i>Enterobacteria phage MS2</i>	Entérobactéries
<i>Allolevivirus</i>	<i>Enterobacteria phage Q<math>\beta</math></i>	Entérobactéries

Le professeur de microbiologie médicale Hans-Wolfgang Ackermann a proposé un tableau des principaux éléments caractérisant les familles de bactériophages (figure 10).

Figure 10 : Résumé des principales caractéristiques des familles de bactériophages

Symétrie	Ac. nucléique	Famille	Genre	Nombres	Particularités
				4950	
Binaire	DNA, ds, L	<i>Myoviridae</i>	6	1243	Queue contractile
		<i>Siphoviridae</i>	6	3011	Queue longue et non contractile
		<i>Podoviridae</i>	3	696	Queue courte
Cubique	DNA, ss, C	<i>Microviridae</i>	4	40	
	ds, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	3?	Capside complexe, lipidique
	ds, L	<i>Tectiviridae</i>	1	18	Vésicule interne (lipo-protéine)
	RNA, ss, L	<i>Leviviridae</i>	2	39	
	ds, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	1	Enveloppe lipidique
Helicoïdal	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	57	Filamenteux ou allongés
	ds, L	<i>Lipothrixviridae</i>	1	6?	Enveloppe lipidique
	ds, L	<i>Rudiviridae</i>	1	2	Ressemble au TMV
Complexe	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	6	Enveloppe lipidique, pas de capsid
	ds, C, T	<i>Fuselloviridae</i>	1	8?	Fusiforme, pas de capsid

Source : « Le matin des bactériophages », Ackermann, Virologie, 35-43, 2001.

Hans-Wolfgang Ackermann a proposé un tableau récapitulatif des principales familles de bactériophages. Il y présente la symétrie (binaire, cubique, hélicoïdale ou complexe), l'acide nucléique (DNA : ADN ; RNA : ARN ; Ds : double brin ; L : Linéaire ; ss : simple brin ; C : circulaire ; S : segmenté ; T : superenroulé), le nombre de genres et de phages (estimé) et la particularité morphologique de chaque famille. Les trois principales familles de bactériophages (en gris) sont les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae*.

### 3. Ecologie et intérêt environnemental des bactériophages

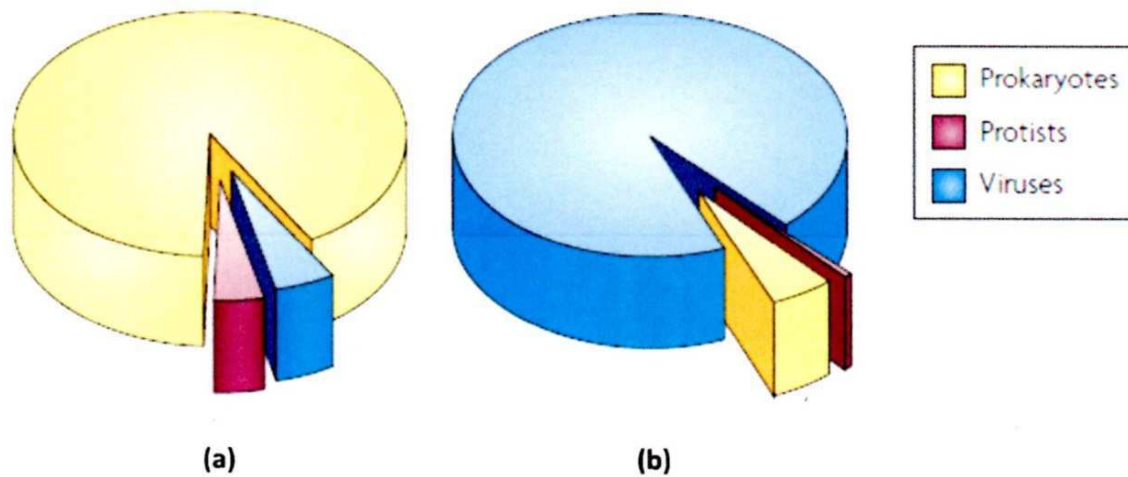
#### a. Importance numérique des populations bactériennes et phagiques

Les bactéries et virus sont des organismes ubiquitaires que l'on peut retrouver dans tous les biotopes terrestres (figure 11). On estime à environ  $10^{30}$  le nombre de cellules bactériennes sur Terre, avec la répartition suivante :  $4 \cdot 10^7$  bactéries par gramme de sol ;  $1 \cdot 10^6$  bactéries par millilitre d'eau douce et 10 fois plus de cellules bactériennes que de cellules humaines dans le corps humain.

Par ailleurs, il y aurait 10 fois plus de virus que de bactéries partout où celles-ci sont présentes : dans la nature (sols, eaux douces, eaux salées), sur le revêtement cutanéomuqueux des êtres vivants, dans leur système oro-digestif. Soit une estimation à  $10^{31}$  virus avec la répartition suivante : entre  $10^4$  et  $10^8$  virus par millilitre d'eau marine, entre  $10^8$  et  $10^{10}$  virus par millilitre de sédiment et environ  $10^8$  virus par gramme de sol. La majorité des virus sont considérés comme étant des bactériophages, puisque les bactéries sont les proies les plus courantes et que l'abondance des virus est étroitement liée à celle des bactéries. Les phages sont de très loin l'entité biologique la plus abondante sur Terre (Beitbart, 2012). Il est fascinant de se représenter tous ces phages : chaque phage mesurant en moyenne 100 nm de long, mis bout à bout, tous ces phages constitueraient une chaîne d'une longueur d'environ 10 à 100 millions d'années lumières (ou encore 100 à 1000 fois le diamètre de notre galaxie) ; un phage pèse en moyenne  $10^{-16}$  gramme, l'ensemble des bactériophages de la planète représenterait donc une masse de  $10^{15}$  grammes soit  $10^9$  tonnes.

De par leur distribution, leur nombre et la biomasse qu'ils représentent, bactéries et bactériophages méritent donc toute notre attention.

Figure 11 : Comparaison de la biomasse (a) et de l'abondance (b) des virus avec celles des procaryotes et eucaryotes dans les océans



Source : « Marine viruses-major players in the global ecosystem », Suttle, Nature Reviews Microbiology, 801-812, 2007

Les virus sont de loin les entités biologiques les plus abondantes sur Terre. Les phages représentent la très grande majorité de cette abondance. Ils devancent les procaryotes (bactéries et cyanobactéries) et les protistes (qui sont les eucaryotes, autres que les animaux, champignons et plantes) (b). Toutefois, en raison de leur faible masse, ils ne correspondent qu'à environ 5% de la biomasse, ce qui les place loin derrière les procaryotes (a).

### **b. Reproduction et intérêt environnemental des phages**

Dans la nature, les phages sont des acteurs de vastes et nombreux écosystèmes dont l'étude est relativement récente (l'écologie microbienne dans son ensemble est une science jeune qui a moins de 20 ans).

Tous les phages participent à un vaste écosystème dans une relation dynamique avec les autres micro-organismes. En particulier, les phages virulents permettent de réguler et de renouveler la biomasse bactérienne : les phages lytiques seraient, dans certains environnements, responsables de 50% de la mortalité bactérienne (en l'absence d'autres prédateurs des bactéries, comme les microflagellés). Les phages tempérés seraient quant à eux, et dans une certaine mesure, des acteurs du transfert génétique entre bactéries par transduction. Ce dernier rôle influence directement la virulence bactérienne, le développement de phénomènes de résistance ou encore la formation de toxines.

L'homme et l'animal ont été, lors de la découverte des phages, l'un des premiers systèmes étudiés. La présence de phages a été montrée au niveau du tube digestif, du sang, de l'urine et de diverses muqueuses (comme celle de la cavité buccale). Cependant, la nature, la fréquence et le rôle des phages ne sont que très partiellement connus. Les phages endogènes pourraient avoir un rôle potentiel dans la protection de certaines maladies infectieuses au même titre que l'immunité.

### *b.1 Recyclage des nutriments et influence sur le climat*

La lyse des bactéries par les bactériophages est un phénomène important. En effet, dans les systèmes aquatiques, les bactériophages seraient responsables de 10 à 50% de la mortalité des bactéries. Compte tenu de l'importance numérique des populations bactériennes, cette prédation a un effet primordial sur les communautés microscopiques et macroscopiques.

La lyse phagique induit la dispersion de débris cellulaires dans le milieu marin, ce qui participe à la circulation des nutriments dans la chaîne alimentaire. Cela a également un impact sur la géochimie locale de par les propriétés chimiques et physiques des éléments dispersés. Par exemple, la lyse par les bactériophages conduit à la libération de sulfure de diméthyle (DMS). Ce composé a une influence significative sur le climat terrestre. En plus de ses propriétés odorantes (il est responsable de l'odeur caractéristique de l'air marin), il exerce un effet refroidissant sur le climat. Une fois oxydées dans l'atmosphère, les molécules de DMS forment un brouillard d'aérosols et participent à la formation des nuages. Ceux-ci diminuent la dose de radiation solaire reçue au niveau des surfaces terrestres et océaniques et limitent ainsi le réchauffement de la planète.

### *b.2 Dynamique des populations phagiques et bactériennes*

La lyse des bactéries par les bactériophages impacte fortement les populations bactériennes. Ceci est d'autant plus vrai quand les bactériophages sont présents en nombre important.

La concentration en virus, et donc en bactériophages, d'un milieu est un paramètre dynamique, fonction de leur taux de forme active et de leur taux de multiplication. Dans les écosystèmes aquatiques, le turn-over des virus serait extrêmement rapide, entre une heure et quelques jours. Les ultra-violets participent à la dégradation des virus, mais tous n'y sont pas sensibles de la même façon. En effet, il a été observé que certaines cellules hôtes ont une

machinerie permettant de réparer les lésions de leur génome dues aux ultra-violets, mais également de réparer les lésions des génomes des virus infectants. La conséquence de ce phénomène est que les virus survivent davantage aux radiations dans les zones éclairées que dans les zones plus sombres.

La croissance des virus dépend de la densité des bactéries. L'hôte doit être à une concentration minimale pour qu'une rencontre ait lieu, car les virus se déplacent de façon passive (plus l'hôte est présent dans l'environnement, plus la probabilité d'une rencontre avec le virus est grande). Or dans la nature, la plupart des espèces bactériennes ont moins de nutriments qu'en laboratoire et atteignent donc des densités moins importantes. L'état physiologique dans lequel se trouvent les bactéries conditionne également la réussite de l'infection. *In vivo*, les bactéries seraient fréquemment en phase stationnaire. Or, il a été observé, *in vitro*, que les bactéries en phase stationnaire produiraient moins de virus. Les virus tempérés ont la possibilité d'infecter les bactéries qu'ils rencontrent, et de rester à l'état de dormance en attendant un changement de l'environnement qui permette leur multiplication.

Les virus les plus abondants dans les systèmes aquatiques ne représenteraient que 3 à 5% de la population virale totale. Les autres populations virales sont encore moins fréquentes et estimées à moins de 0,01%.

Les dynamiques des populations virales et bactériennes sont étroitement liées. On considère que les bactériophages infectent préférentiellement les bactéries les plus abondantes, parce qu'elles dominent en nombre dans la population bactérienne totale et que la probabilité d'une rencontre bactérie-phage est de ce fait plus grande. La lyse de la population hôte dominante par un virus libère une niche qu'un nouvel hôte peut coloniser. Un virus jusqu'à présent faiblement représenté peut alors devenir abondant. Inversement, un virus alors dominant peut diminuer drastiquement. C'est la théorie « killing the winner » formulée par Thingstad et Lignell en 1997. Elle suggère qu'une grande partie de la diversité bactérienne serait générée et maintenue par la pression de sélection imposée par la présence des bactériophages.

En résumé, les bactériophages, par le phénomène de lyse, modifient la dynamique des populations bactériennes en libérant de nombreux nutriments dans l'environnement et en induisant de forts goulets d'étranglements. Il s'agit d'un facteur extrinsèque à l'espèce qui vient diminuer l'effectif de la population d'origine. A partir de là, il y a formation d'une nouvelle population par les survivants de l'ancienne population. Les bactériophages contribuent ainsi à la génération et au maintien d'une importante diversité d'espèces.

### *b.3 Evolution de l'interaction bactérie-phage*

La forte pression de sélection imposée par les bactériophages sur les bactéries favorise l'émergence de la résistance bactérienne. Les bactéries, par leurs pouvoirs d'adaptation, peuvent devenir résistantes à un ou plusieurs phages qui les infectent. Elles sont ainsi naturellement sélectionnées.

*A contrario*, Les bactériophages, qui échappent aux mécanismes de résistance des bactéries cibles, peuvent les infecter et se multiplier. Ils seront donc, de la même manière, naturellement sélectionnés.

La coexistence des bactéries et des bactériophages repose donc sur le principe d'une évolution conjointe, dite coévolution antagoniste. Dans le cas du système bactérie/phage lytique, le parasite dépend de la rencontre avec son hôte. L'interaction permet au phage lytique de se multiplier aux dépens de la bactérie cible, et d'entraîner (généralement) la mort de l'hôte. Dans le même temps, l'hôte évolue ce qui lui permet de devenir résistant et d'échapper au parasite.

## **4. Réplication des phages**

Un contact entre un bactériophage et une bactérie peut mener à trois types de réactions :

- La bactérie résiste à l'infection phagique. Ce phénomène peut s'expliquer par l'absence de récepteurs qui permettent la fixation et la pénétration du phage, ou de son acide nucléique, dans la bactérie ou par la présence d'enzymes de restriction au sein de la bactérie qui dégradent l'acide nucléique phagique.
- Le phage, ou son acide nucléique seulement, pénètre à l'intérieur de la bactérie et se multiplie au sein de la cellule bactérienne. Le cycle est alors qualifié de productif et le phage est dit virulent. En fonction des bactériophages, le cycle productif peut mener ou non à la lyse de la cellule bactérienne.
- Le phage, ou son acide nucléique seulement, pénètre à l'intérieur de la bactérie et l'acide nucléique phagique s'intègre au matériel génétique de la bactérie. L'acide



nucléique du bactériophage va alors persister à l'état latent sous forme de prophage (virus dont le matériel génétique est intégré au génome de l'hôte). Le cycle est qualifié de lysogénique dans ce cas et le bactériophage de tempéré.

#### **a. Etape d'adsorption et de pénétration**

L'étape d'adsorption et l'étape de pénétration sont communes aux cycles productif et lysogénique. Il s'agit d'une étape dite préliminaire.

La rencontre d'un bactériophage et d'une bactérie se fait au hasard. La probabilité d'une telle rencontre dépend donc du nombre respectif de bactériophages et de bactéries dans le milieu.

La rencontre faite, le phage va reconnaître et se fixer à un récepteur spécifique de la bactérie. Ce récepteur peut être situé au niveau de la paroi bactérienne (lipo-polysaccharides -LPS-, protéines, acides téichoïques). Il peut également être situé au niveau de la membrane cellulaire (pour les bactéries de la classe des *Mollicutes* qui sont dépourvus de paroi), au niveau des flagelles ou au niveau des pili communs ou sexuels. Lorsque les phages se fixent sur des récepteurs situés au niveau des pili sexuels, ils sont qualifiés d'anti-males. Il s'agit de bactériophages appartenant à la famille des *Leviviridae*.

Les phages de l'ordre des *Caudovirales* se fixent par l'intermédiaire d'une fibre de la queue qui reconnaît un récepteur de la paroi de la bactérie. Très rapidement, les autres fibres de la queue se fixent alors au récepteur, ce qui permet au phage de se lier fortement à la bactérie et de mettre en contact sa plaque terminale avec la paroi de la bactérie.

De la même manière que pour les médicaments, il faut une étroite sélectivité entre le phage et le récepteur bactérien pour que l'adsorption soit possible. C'est pourquoi, une bactérie n'est sensible qu'à un nombre restreint de bactériophages et qu'un bactériophage est capable d'infecter un nombre, généralement, restreint de bactéries. Il existe cependant des exceptions : le phage PRD1 (*Enterobacteria phage PRD1*, famille des *Tectiviridae*), par exemple, peut infecter des bactéries appartenant aux familles *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacillaceae* et *Vibrionaceae*.

La pénétration est variable selon les phages. Certains bactériophages pénètrent intégralement à l'intérieur de la bactérie et libèrent leur matériel génétique une fois la capsid dégradée. D'autres bactériophages transfèrent seulement leur matériel génétique à l'intérieur de bactérie, c'est par exemple le cas des *Myoviridae*. Chez ces phages, le lysozyme de la plaque terminale

permet de lyser le peptidoglycane, constituant fondamental des parois bactériennes. Le contact entre la plaque terminale et la paroi bactérienne entraîne la contraction des anneaux protéiques de la gaine contractile ce qui conduit à une pénétration du canal central du bactériophage dans la bactérie. Le canal central creux permet au matériel génétique (en l'occurrence l'ADN double brin chez les *Myoviridae*), initialement présent dans la tête du phage, de passer dans le cytoplasme de la bactérie. Le phage, dépourvu de son matériel génétique, ne joue plus aucun rôle. Il peut soit rester fixé à la bactérie soit s'en détacher.

## **b. Cycle productif**

L'infection d'une bactérie par un bactériophage va entraîner un détournement de la machinerie cellulaire de la bactérie et de ses activités métaboliques au profit du virus.

### *b.1 Réplication du génome d'un phage à ADN*

Pour étudier la réplication du génome des virus à ADN, on peut utiliser le modèle du phage T4 (*Enterobacteria phage T4*) qui possède un ADN bicaténaire dans lequel l'hydroxyméthylcytosine remplace la cytosine. La réplication de l'ADN et la synthèse des constituants viraux s'effectuent en 4 phases qui correspondent aux fonctions hyper-précoces, aux fonctions précoces, à la réplication de l'ADN phagique et aux fonctions tardives. Puis vient la phase d'assemblage (figure 12).

- Fonctions hyper-précoces :

Dans la première étape, une petite partie de l'ADN phagique est transcrit par la transcriptase bactérienne ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ ), puis un ARN messager (ARNm) est traduit en une sous-unité  $\sigma'$ . Cette sous-unité remplace la sous-unité  $\sigma$  de la transcriptase bactérienne. La transcriptase bactérienne ainsi modifiée ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma'$ ) a la capacité de transcrire environ 20% de l'ADN phagique.

- Fonctions précoces :

La phase précoce conduit d'une part à la synthèse d'une désoxyribonucléase, enzyme capable de cliver l'ADN de la bactérie. D'autre part, elle permet la synthèse d'hydroxyméthylcytosine qui remplace la cytosine dans l'ADN phagique. Celui-ci échappe de ce fait à l'action des enzymes de restriction de la bactérie et de la désoxyribonucléase phagique.

- Réplication de l'ADN phagique :

Cette étape fait intervenir une enzyme : une ADN polymérase ADN dépendante virale.

- Fonctions tardives :

Il y a synthèse d'une sous-unité  $\sigma''$  qui remplace la sous-unité  $\sigma'$  (codée par le phage) de la transcriptase bactérienne (précédemment modifiée). La transcriptase ( $\alpha_2\beta\beta'\sigma''$ ) ainsi modifiée peut transcrire environ 80% du génome phagique. C'est au cours de cette phase tardive que se font les synthèses du lysozyme, des protéines structurales et des protéines d'assemblage.

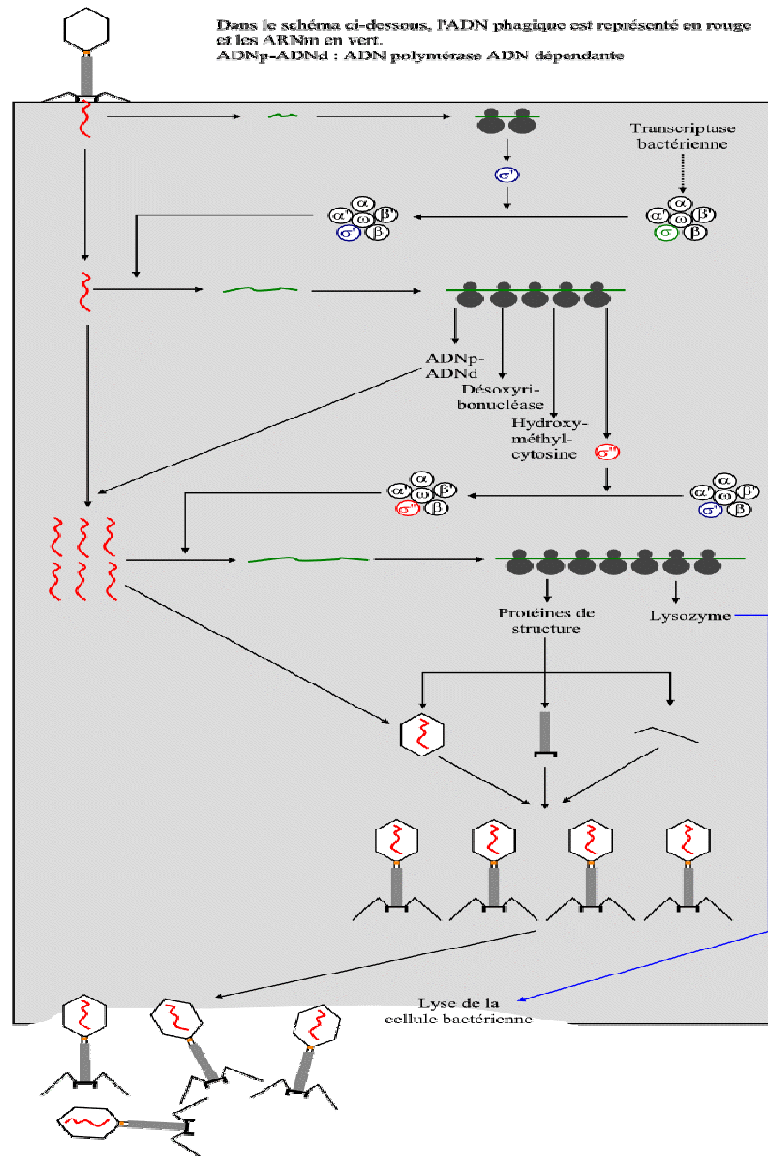
- Phase d'assemblage :

Elle a lieu après la synthèse des protéines lors de la phase tardive. L'assemblage est un phénomène complexe qui fait intervenir trois « chaînes de montage » spécialisées : une pour la tête, une pour les fibres et la dernière pour la queue. L'encapsidation de l'ADN se déroule à la fin de l'assemblage des capsomères de la tête.

Les virions néoformés s'accumulent dans le cytoplasme de la bactérie. Ils sont libérés par l'action du lysozyme phagique qui permet la lyse de la cellule bactérienne. Le cycle productif du phage T4 est donc un cycle lytique. La durée de ce cycle est de 25 minutes.

Toutefois, tous les cycles productifs ne sont pas des cycles lytiques. Par exemple, les phages filamenteux à ADN (comme ceux classés dans la famille des *Inoviridae*) sont libérés par extrusion à travers l'enveloppe des bactéries. Les bactéries continuent donc à se diviser tout en produisant des phages. C'est un phénomène d'infection chronique.

Figure 12 : Schéma d'un cycle productif du bactériophage T4



Source : « Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale » Jean Paul Euzéby, site internet créé en 2006.

Ce schéma met en évidence les différentes étapes d'un cycle lytique du phage T4. Tout d'abord, il y a adsorption du phage et passage de son matériel génétique dans la bactérie. Puis, la production d'ARN messagers précoces permet la synthèse de la sous-unité  $\sigma'$  modifiant la transcriptase bactérienne et le métabolisme de la bactérie. Ceci est à l'origine de la synthèse d'une polymérase (qui permet de répliquer l'ADN phagique), d'une désoxyribonucléase, d'hydroxyméthylcytosine et de la sous-unité  $\sigma''$  modifiant de nouveau la transcriptase. Cette-dernière permet la transcription de l'acide nucléique du phage et de la synthèse d'ARN messagers tardifs. Il y a alors synthèse des protéines de la capside, des protéines catalytiques d'assemblage et du lysozyme. Les phages sont enfin constitués, avant d'être libérés (200 à 1000 par bactérie) par l'action du lysozyme.

## b.2 Réplication du génome d'un phage à ARN

Pour étudier la réplication du génome des phages à ARN, on peut utiliser le modèle du phage MS2 (*Enterobacteria phage MS2*, de la famille des *Leviviridae*). Ce phage est un virus à ARN monocaténaire de polarité positive (l'ARN se comporte comme un ARN messager). Il est à symétrie cubique, non enveloppé et dépourvu de queue. Sa capsid est composée de 32 capsomères.

La pénétration de l'ARN phagique dans le cytoplasme bactérien n'est pas encore totalement élucidée. On sait pour l'heure que l'adsorption se fait au niveau des pili sexuels. L'ARN phagique comporte 4 gènes :

- Un premier gène code pour la synthèse de la protéine de la capsid.
- Un second gène code pour la protéine permettant la reconnaissance et l'attachement du phage au récepteur de la bactérie.
- Un troisième gène code pour une ARN polymérase ARN dépendante (ou réplisase). Elle est synthétisée de manière très importante dès les premières minutes de l'infection. Cette réplisase permet la formation d'ARN bicaténaires (qui sont des intermédiaires de réplication comparables à ceux qui se forment lors de la réplication des *Picornaviridae*) ce qui conduit à la formation de nombreuses copies d'ARN à polarité positives qui pourront soit donner de nouveaux intermédiaires de réplication, soit se comporter comme des ARNm et permettre la synthèse de protéines virales.
- Un quatrième gène code pour une protéine responsable de la lyse bactérienne. Ceci permet la libération des virions néoformés.

Le cycle dure une vingtaine de minutes.

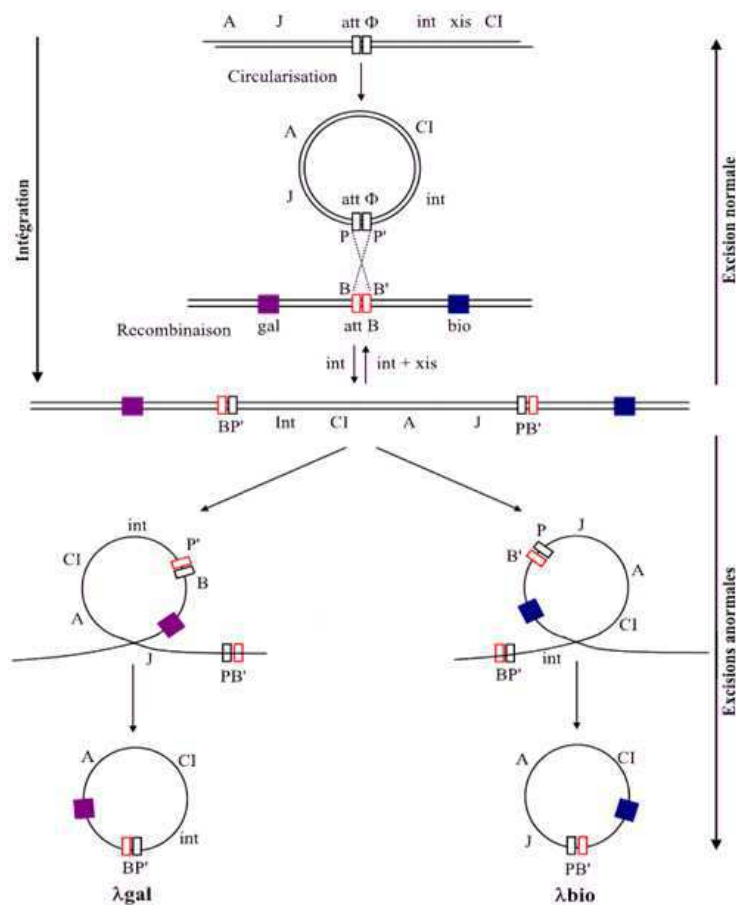
### c. Cycle lysogénique

Certains bactériophages, appartenant tous à l'Ordre des *Caudovirales*, sont des phages tempérés. Ces phages vont intégrer leur matériel génétique au chromosome bactérien sous la forme d'un prophage, incapable de se répliquer de manière autonome. La réplication du prophage est donc liée à celui de l'ADN de la bactérie. Ainsi, s'établit entre la bactérie et le phage (son matériel génétique tout du moins) une relation de longue durée qui peut être réversible dans certains cas. La bactérie est dite lysogène et le cycle de réplication phagique est appelé cycle lysogénique.

La lysogénie a été découverte lors de l'étude du phage  $\lambda$  (*Enterobacteria phage  $\lambda$*  de la Famille des *Siphoviridae*) qui infecte *Escherichia coli*. Ce phage est constitué d'une tête et d'une queue non contractile. Son matériel génétique est de l'ADN bicaténaire, linéaire et ayant, à ses extrémités, des brins monocaténaire de 12 nucléotides dont les séquences en base sont complémentaires, ce qui permet des appariements. Ces séquences monocaténaire sont qualifiées de bouts collants.

Comme précédemment, l'étape préliminaire de l'adsorption permet la pénétration du matériel génétique du phage dans le cytoplasme bactérien. L'ADN phagique va ensuite se circulariser, grâce à ses séquences terminales monocaténaire cohésives, ceci permet à l'ADN phagique de s'intégrer au chromosome bactérien. Cette étape fait intervenir une enzyme, l'intégrase, qui est codée par le gène phagique *int*, et des sites d'attachelements présents à la fois sur l'ADN phagique et sur le chromosome bactérien. Le site d'attachelement bactérien est situé entre les opérons galactose et biotine (figure 13). Toutefois, certains phages, comme le phage P2 (*Enterobacteria Phage P2*, de la famille des *Myoviridae*) qui infecte *Escherichia coli* ou le phage P22 (*Enterobacteria Phage P22*, de la famille des *Podoviridae*) qui infecte des salmonelles, peuvent avoir différents sites d'intégration au niveau du chromosome bactérien. Le phage Mu-1 (*Enterobacteria Phage Mu-1*, de la famille des *Myoviridae*) peut, quant à lui, s'intégrer totalement au hasard sur le chromosome bactérien.

Figure 13 : Schéma de l'intégration de l'ADN phagique au chromosome bactérien



Source : « Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale » Jean Paul Euzéby, site internet créée en 2006.

A est un gène impliqué dans la maturation ; J est un des gènes codant pour une protéine structurale de la queue ; CI est l'un des gènes de régulation.

L'intégration de l'ADN phagique dans le génome de l'hôte se réalise par recombinaison site-spécifique, entre un site att Φ (site d'attachement) présent sur l'ADN phagique et le site att B (site d'attachement) situé sur le chromosome de la bactérie. Le site att B est situé entre les gènes *gal* (gène codant la galactosidase, enzyme de dégradation de galactosides) et *bio* (gène codant pour la voie de biosynthèse de la biotine). L'intégration dans le chromosome nécessite l'intervention d'une intégrase codée par le gène *int* du phage. Sous certaines conditions, le prophage pourra s'exciser et s'engager dans cycle lytique. Cette excision nécessite l'intégrase produite par le phage et également l'excisase codée par le gène *xis* du phage. L'excision reconstitue les sites att B et att Φ.

Il existe des excisions anormales. Dans ce cas, une partie du chromosome bactérien est intégrée au génome phagique (le gène *gal* à gauche et le gène *bio* à droite). Inversement, une partie du génome phagique initial persiste au niveau du chromosome bactérien (le gène J à gauche et le gène *int* à droite).

Lorsque l'ADN phagique est intégré au chromosome bactérien, il perd ses capacités de répllication autonome. Le prophage se réplique donc en même temps que le génome bactérien lors de la division cellulaire et est transmis aux cellules filles.

La lysogénie présente deux caractéristiques principales :

- Une absence d'expression des gènes phagiques impliqués dans le cycle productif
- Une protection vis-à-vis d'une infection par un phage homologue

Ces deux caractéristiques sont liées à la présence d'un répresseur, protéine codée par le génome du bactériophage, qui se fixe sur les opérateurs viraux. Il a pour rôle d'empêcher la plupart des fonctions virales. Ainsi, seules quelques fonctions précoces sont conservées et peuvent s'exprimer dans la bactérie lysogène.

Mais le répresseur peut être réprimé, ce qui permet alors l'expression du prophage et le déclenchement d'un cycle productif, comparable à celui décrit précédemment (avec le phage T4). Le passage d'un cycle lysogénique à un cycle productif est appelé l'induction (figure 14). Cette induction peut être soit spontanée, ce qui est rare, soit induite. Selon les bactériophages et les bactéries, l'induction a une fréquence allant de  $10^{-2}$  (toutes les 100 divisions bactériennes) à  $10^{-6}$ . La fréquence de l'induction est augmentée par l'exposition à des rayons X, des rayons UV, de l'ypérite, de l'éthylène-imine, des peroxydes organiques... Ces facteurs permettent en effet d'inactiver le répresseur ce qui conduit à une expression totale du génome phagique.

Le gène xis phagique code pour une enzyme, l'excisase, qui, associée à l'intégrase, inverse son processus et permet l'excision (figure 13). L'ADN phagique est alors libéré du chromosome bactérien et le cycle productif peut avoir lieu.

Le prophage apparaît donc comme étant un génome réprimé potentiellement létal qui se maintient au niveau du chromosome bactérien et peut être transmis à la descendance.

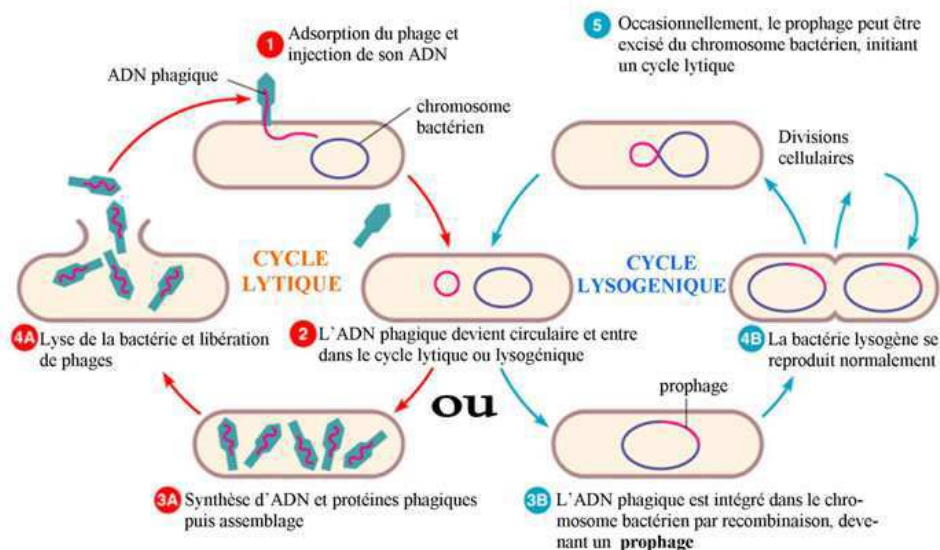
Enfin il existe un mode particulier d'induction, appelé induction zygotique. Elle intervient lors de la conjugaison d'une bactérie Hfr (Haute fréquence de recombinaison ; souche ayant un plasmide, facteur F, intégré au chromosome bactérien, qui être transmis avec une partie du chromosome) lysogène et d'une bactérie F<sup>-</sup> (bactérie réceptrice dépourvue du facteur F) non lysogène. Le zygote est le résultat de la sexualité bactérienne et contient du matériel génétique de deux cellules qui conjuguent. La bactérie Hfr (« mâle ») est donneuse de son matériel génétique, la bactérie F<sup>-</sup> (« femelle ») est receveuse. Dans ces conditions, le prophage de la



bactérie Hfr pénètre dans la bactérie F<sup>-</sup> qui est dépourvue de répresseurs. Le prophage va alors s'exciser et déclencher un cycle productif (induction). Les bactéries F<sup>-</sup> sont lysées et on n'obtient donc pas de transconjugants.

L'expérience inverse, l'utilisation d'une bactérie F- lysogène, qui a un prophage intégré dans son chromosome et une bactérie Hfr non lysogène, ne conduit pas à la lyse bactérienne. Le phénomène est donc asymétrique. Dans le premier croisement, le prophage change d'environnement cytoplasmique : du cytoplasme d'une bactérie lysogène, il passe dans le cytoplasme d'une bactérie non lysogène, où l'absence de répresseurs permet au phage de s'exprimer selon un cycle lytique. Dans l'expérience inverse, l'environnement cytoplasmique du phage n'est pas modifié, ce qui explique que le phénomène d'induction ne survient pas.

Figure 14 : Schéma d'un cycle d'infection lytique couplé à l'état de lysogénie



Source : site internet [www.microbiologie-medicale.fr](http://www.microbiologie-medicale.fr)

La partie bleue (1, 2, 3A, 4A) correspond au cycle lysogénique tandis que la partie rouge (3B, 4B, 5) correspond au cycle lytique. L'ADN phagique s'intègre au niveau du chromosome bactérien et persiste à l'état de prophage. Il n'exprime pas ses fonctions dans la bactérie mais il y a synthèse, de façon continue, d'un répresseur spécifique, cytoplasmique, qui réprime l'expression du génome phagique. Sous l'effet de certains agents (rayons UV, rayons X...), l'expression du gène répresseur peut se trouver inactivée, ce qui provoque l'induction (passage d'un cycle lysogénique à un cycle lytique). Les gènes phagiques s'expriment alors et le cycle de multiplication du phage reprend, produisant des particules infectieuses, libérées par la lyse de la bactérie.

#### d. Conversion lysogénique

La conversion lysogénique est un phénomène au cours duquel le prophage exprime des fonctions précoces qui sont susceptibles de modifier les propriétés de la bactérie hôte.

Ainsi, les gènes responsables du pouvoir pathogène de certaines bactéries sont par portés des prophages intégrés au chromosome bactérien. Le premier exemple de conversion lysogénique a été mis en évidence chez la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*. Une souche de bacilles diphtériques ne produit la toxine diphtérique que si elle héberge, à l'état de prophage, le phage tempéré  $\beta$  (*Coryneforms phage  $\beta$* , de la famille des *Siphoviridae*). Lorsque la souche perd son prophage, elle perd sa capacité à produire la toxine. Il y a donc une dépendance directe entre le caractère lysogénique et toxicogène de la bactérie *Corynebacterium diphtheriae*.

Il existe d'autres toxines qui sont codées par des prophages intégrés au chromosome bactérien : la toxine érythrogyne de *Streptococcus pyogenes* (souche responsable de la scarlatine), la staphylokinase et l'entérotoxine A de *Staphylococcus aureus*, les toxines Stx (Shiga-like toxine ou vérotoxine) des souches d'*Escherichia coli* ou encore les neurotoxines C et D de *Clostridium botulinum*.

La conversion lysogénique peut également conduire à des modifications antigéniques de surface de certaines souches bactériennes. Ainsi, chez les salmonelles, le groupe E1 est caractérisé par des sérovars O:3,10. Un sérovar ou sérotype désigne l'ensemble des caractéristiques antigéniques de certains micro-organismes permettant de différencier des souches appartenant à une même espèce ; les polysaccharides O sont situés au niveau de la paroi. Dans ce groupe E1, la spécificité antigénique O:10 peut devenir O:15 lorsque la salmonelle est lysogène pour le phage  $\epsilon$ 15. Une salmonelle possédant la spécificité O:15 peut acquérir la spécificité O:34 lorsqu'elle héberge le phage tempéré  $\epsilon$ 34 (O:3,15  $\rightarrow$  O:3,15,34, ancien groupe E3). Les antigènes somatiques (O) jouent un rôle dans le pouvoir pathogène du germe. Ils représentent l'endotoxine qui est libérée dans le milieu extérieur lors de la lyse des bactéries. Toute modification des antigènes somatiques a donc des répercussions sur la pathogénicité des bactéries. De plus, les antigènes O provoquent dans un organisme l'apparition d'anticorps anti-O, spécifiques des bactéries qui ont déterminé leur formation. Le sérotypage, basé sur la caractérisation des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H), permet le classement des sous-espèces de *Salmonella* en sérotypes. Les bactéries donnent avec les sérums anti-O une agglutination. Ainsi, les facteurs O:15 ou O:15,34 se substituent au facteur O:10 qui n'est plus agglutinable.

## 5. Transduction

La transduction est un transfert de matériel génétique, ADN chromosomique ou extra-chromosomique, par des bactériophages dits transducteurs. En règle générale, la transduction se fait essentiellement avec des bactéries de même espèce ou d'espèces apparentées ; ceci s'explique par la nécessité d'une étroite spécificité entre le bactériophage transducteur et la bactérie. Cependant, avec certains phages, la transduction peut avoir lieu avec des souches bactériennes appartenant à des espèces phylogénétiquement très éloignées. C'est par exemple le cas pour le phage PRD1 (appartenant au genre *Tectivirus*) qui infecte les Entérobactéries, les *Bacillus* spp., les *Pseudomonas* spp. et les *Vibrio* spp.

Le phénomène de transduction a été découvert en 1951 par Zinder et Lederberg chez *Salmonella thyphimurium* (les résultats furent publiés en 1952). Une culture de la souche LT-2 de *Salmonella thyphimurium* (souche auxotrophe pour l'histidine, c'est à dire incapable de synthétiser ce composé organique nécessaire à son développement) et une culture de la souche LT-22 (souche auxotrophe pour le tryptophane) sont chacune placées dans une branche d'un tube en U. Ces branches sont séparées à la base par une membrane en verre fritté qui exclut un contact entre les deux souches bactériennes. On observe l'apparition de souches prototrophes (organismes capables de proliférer dans un milieu de base, ou milieu minimum, sans nécessiter la présence de facteurs de croissance particulier : ils synthétisent eux même les substances nécessaires à leur prolifération) avec une fréquence de  $10^{-5}$ . Ces souches prototrophes appartiennent uniquement à la souche LT-22 de *Salmonella thyphimurium*.

La fréquence élevée d'apparition de souches prototrophes exclut l'hypothèse d'une mutation de la souche LT-22 de *Salmonella thyphimurium*. De plus, la présence d'une membrane en verre fritté exclut l'hypothèse d'une conjugaison des souches LT-2 et LT-22 de *Salmonella thyphimurium*. Enfin, le fait que l'addition d'une ADNase ou désoxyribonucléase (enzyme catalysant l'hydrolyse des liaisons phosphodiester des acides désoxyribonucléiques) dans le milieu n'empêche pas l'apparition de souches prototrophes exclut l'hypothèse d'une transformation. La seule explication possible est l'existence d'un transfert de matériel génétique sous une forme suffisamment petite, pour passer au travers du verre fritté, et protégée, pour ne pas subir l'action de l'ADNase. Cette explication a été étayée par l'identification du phage P22 qui permet le transfert de matériel génétique entre les souches

LT-2 et LT-22. Lorsque des anticorps neutralisants dirigés contre le phage P22 sont ajoutés dans le milieu, la transduction n'a plus lieu, ce qui confirme l'hypothèse précédente.

Plus tard, le phénomène de transduction a été observé chez de nombreuses bactéries à Gram négatif et positif.

Il existe deux types de transduction : la transduction généralisée et la transduction localisée, dont les mécanismes reposent sur les deux types de réplifications précédents (cycle productif et cycle lysogénique).

#### **a. Transduction généralisée**

La transduction généralisée, ou non spécifique, peut concerner tout fragment d'ADN qu'il soit chromosomique ou extra-chromosomique, pourvu que la taille du fragment soit compatible avec son encapsidation.

La transduction généralisée fait intervenir des phages virulents.

Lors d'un cycle productif, un gène de l'ADN phagique code pour une désoxyribonucléase qui détruit le chromosome bactérien. Au moment de la morphogénèse, un fragment d'ADN bactérien peut être encapsidé, par erreur, en lieu et place de l'ADN phagique. Pour que cela puisse avoir lieu, la taille du fragment du chromosome bactérien doit être comparable à la taille de l'ADN phagique. En particulier, le fragment de l'ADN bactérien doit correspondre à environ 1% du chromosome bactérien entier.

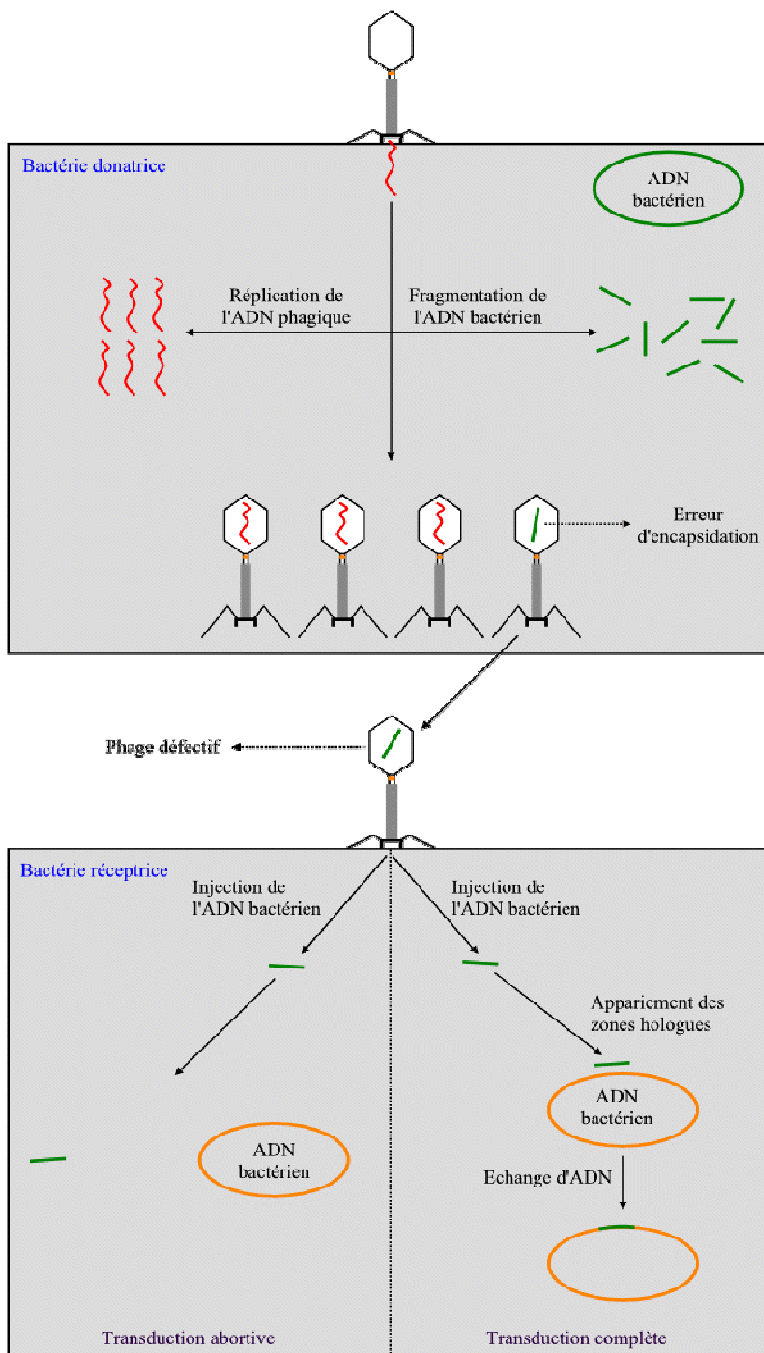
Le phage ayant incorporé le fragment d'ADN bactérien ne peut plus se répliquer : il est dit défectif. Il peut cependant transférer le fragment d'ADN à une bactérie réceptrice. Les étapes d'adsorption et de pénétration de l'ADN ne sont pas modifiées chez le phage défectif. Le transfert du matériel génétique à une bactérie réceptrice offre deux possibilités (figure 15) :

- Le fragment d'ADN va s'intégrer par recombinaison homologue au matériel génétique de la bactérie réceptrice. Ainsi, toute la descendance de la bactérie réceptrice porte l'ADN transféré. La transduction est dite complète.

- Le fragment d'ADN ne s'intègre pas au matériel génétique de la bactérie réceptrice mais reste libre. Les gènes transmis sont fonctionnels et peuvent être exprimés mais ils ne seront pas répliqués. Lors de la multiplication bactérienne, seule une des deux cellules filles acquiert le fragment d'ADN transféré. Au cours des divisions successives, le fragment d'ADN sera peu à peu dilué. La transduction est dite abortive.

La transduction généralisée permet d'expliquer l'expérience de Zinder et Lederberg. La souche LT-22 de *Salmonella thyphimurium* est lysogénisée par le phage P22. Ce phage peut occasionnellement s'exciser et déclencher un cycle productif. Il y a alors formation de virions qui sont libérés dans le milieu extérieur par lyse de la cellule bactérienne. Ces virions passent au travers de la membrane en verre fritté, ce qui leur permet d'infecter la souche LT-2. Le phage P22 se multiplie selon un cycle productif avec la souche LT-2. Certains virions néoformés incorporent par erreur, lors de la morphogénèse, un fragment de chromosome bactérien qui comprend le gène codant pour l'utilisation du tryptophane (virions défectifs). Ils passent la membrane en verre fritté et intègrent le gène dans la souche LT-22 de *Salmonella thyphimurium*, qui devient alors prototrophe.

Figure 15 : Schéma de la transduction généralisée



Source : « Abrégé de Bactériologie Générale et Médicale » Jean Paul Euzéby, site internet créée en 2006.

Lors de la première étape, l'ADN bactérien est détruit par une désoxyribonucléase codée par le phage infectant, au cours d'un cycle productif. Lors de l'encapsidation de l'ADN phagique, un fragment d'ADN bactérien peut être encapsidé par erreur, de temps en temps, en lieu et place de l'ADN phagique néosynthétisé (la taille du fragment d'ADN bactérien doit être proche de celle de l'ADN phagique). Ainsi, la population phagique néoformée obtenue (le lysat phagique) est constituée pour l'essentiel de phages descendants identiques à leur parent (rouge) et de rares phages ayant incorporé de l'ADN bactérien (vert). Ces derniers sont infectieux mais défectifs : la capsid est « normale », les étapes d'adsorption puis d'entrée de l'ADN ne sont pas modifiées mais le génome entrant ne code plus un cycle phagique.

Dans un second temps, le phage défectif transporte et injecte l'ADN de la souche donneuse. Il peut alors se produire une recombinaison homologe avec l'ADN de la bactérie receveuse. La bactérie acquiert ainsi un (ou des) gène(s) de la bactérie donneuse et toute sa

descendance également. La transduction est dite complète (à droite). Enfin, le fragment d'ADN peut rester libre : l'ADN n'est pas répliqué mais les gènes transmis sont fonctionnels et peuvent être exprimés. Aux cours des divisions successives, ce fragment est peu à peu dilué. La transduction est dite abortive (à gauche).

## **b. Transduction localisée**

La transduction localisée fait intervenir des phages tempérés. Elle correspond à une excision anormale du prophage. En effet, lorsque le répresseur est réprimé, le passage d'un cycle lysogénique à un cycle productif s'opère. Il y a alors normalement excision de l'ADN phagique dans son intégralité. Il peut arriver que cette étape d'excision soit défectueuse : il y a alors excision d'une molécule d'ADN hybride composée d'un fragment d'ADN phagique et d'un fragment d'ADN bactérien qui est adjacent à la zone d'intégration du prophage (d'où le nom de transduction localisée). Cette excision défectueuse a une fréquence de l'ordre de  $10^{-6}$ .

Dans le cas du bactériophage  $\lambda$  cité précédemment (partie III. 4 b.2), la transduction est spécifique et seuls les gènes gal et bio peuvent être transférés. Le phage transducteur  $\lambda_{gal}$  est un phage défectif, incapable d'initier un cycle productif. Par contre, le phage transducteur  $\lambda_{bio}$  peut accomplir un cycle productif mais est incapable de donner un cycle lysogénique.

Lorsque le phage possède plusieurs sites d'intégration possibles (Enterobacteria Phage P2, Enterobacteria Phage P22...), la transduction localisée devient non spécifique.

Enfin, avec le phage Mu-1, qui peut s'intégrer totalement au hasard dans le chromosome bactérien, de nombreux gènes bactériens peuvent être transférés. La transduction localisée a alors des allures de transduction généralisée.

## **6. Spécificité phages-bactéries**

Une des propriétés importantes des phages est leur étroite sélectivité d'espèces. Ceci signifie qu'ils n'attaquent qu'une espèce bactérienne précise, et souvent même, uniquement quelques représentants d'une espèce donnée. D'autre part, il existe pour la plupart des espèces bactériennes plusieurs bactériophages susceptibles de les infecter.

Cette sélectivité est due au fait que pour infecter une bactérie, le phage doit reconnaître des structures situées à la surface de la bactérie qui lui permettent de s'y accrocher. Quand on se place du point de vue de la phagothérapie, cette particularité est à la fois un avantage et un inconvénient par rapport à une antibiothérapie.



### **a. Avantage**

L'avantage de cette sélectivité est la reconnaissance et la destruction d'une espèce bactérienne généralement unique : l'espèce bactérienne pathogène. Les antibiotiques, notamment ceux à large spectre, détruisent (lorsqu'ils sont bactéricides) sans discernement de nombreuses espèces bactériennes, y compris celles nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. La conséquence est la possibilité d'effets indésirables plus ou moins graves. En guise d'exemples, rappelons le risque de diarrhées (fréquent avec l'amoxicilline), préjudiciable chez les patients faibles et alités. L'administration d'antibiotiques à large spectre peut permettre à certaines bactéries commensales de la flore digestive, résistantes aux antibiotiques, de se développer de manière importante, et pour certaines d'exprimer leur virulence (comme *Clostridium difficile*).

### **b. Inconvénients**

Tout d'abord, la souche bactérienne, initialement cible d'un bactériophage, peut subir une mutation qui entraîne une modification de sa structure de surface, affectant la fixation de ce bactériophage. Celui-ci devient alors inefficace. On obtient alors une bactérie devenue résistante à l'action du phage, comme cela est possible avec les antibiotiques. Il est possible de minimiser cet inconvénient par l'administration conjointe de bactériophages ayant des cibles différentes au niveau de la surface bactérienne. Ainsi, comme pour toute mutation, les fréquences respectives des mutations potentielles s'additionnent et le risque de voir apparaître un mutant résistant à tous les bactériophages administrés est infime. Cette solution avait d'ailleurs été imaginée très tôt par Felix d'Hérelle.

L'autre inconvénient de cette sélectivité est que pour les bactériophages ayant un spectre très étroit, il est nécessaire d'isoler au préalable la bactérie responsable de l'infection pathogène. En effet, seule la connaissance précise de la bactérie permet de déterminer et de propager le ou les phages qui l'infecteront. La qualité du prélèvement, tout comme le rôle du laboratoire de bactériologie est donc primordial. L'utilisation d'antibiotiques à large spectre peut, dans de nombreux cas, permettre de s'affranchir d'une qualité parfaite de l'analyse initiale. De plus, un traitement probabiliste peut être entrepris, avec d'autant plus de chance de réussite que l'expérience du praticien est étendue et que le spectre de l'antibiotique est large. La phagothérapie n'offre pas ou peu ces possibilités. Toutefois, l'existence de diagnostics rapides et de suspensions phagiques ayant une activité proche de 100% sur une espèce donnée (par



exemple, l'existence de préparations phagiques actives sur pratiquement 100% des souches de *Staphylococcus aureus*) permettraient un gain de temps de précieux pour la mise en route d'un traitement. De plus, une stratégie complémentaire peut être envisagée, par l'utilisation de préparations adaptées à l'écologie d'un hôpital.

Enfin, les infections à germes multiples (notamment anaérobies) peuvent constituer une dernière limite aux traitements phagiques. L'existence de cocktails phagiques, ou suspensions polyvalentes, adaptés aux germes en cause peut limiter ce risque.

## 7. Méthode d'obtention de phages à destinée thérapeutique

Comme cela a été mentionné précédemment (partie III. 3), les bactériophages sont présents partout où il y a des bactéries. Mais c'est dans les eaux usées, les égouts, que l'on trouve le plus facilement les bactériophages dirigés contre une bactérie pathogène. Lorsque les prélèvements (échantillons d'eau d'un fleuve ou d'une rivière qui traverse une zone habitée) sont réalisés, il suffit ensuite de suivre les principales étapes suivantes :

### a. Propagation

- Il faut tout d'abord centrifuger les échantillons d'eau sale et laisser décanter (dissocier dans un mélange les phases solide et liquide qui ont été séparées par centrifugation) pour éliminer les débris. Les phages, de très petite taille, restent au-dessus, dans le surnageant. Puis, une filtration du surnageant, à l'aide d'un filtre de 0.2  $\mu\text{m}$ , permet d'éliminer les bactéries de la préparation. Le filtrat contient en suspension un nombre important de phages différents et éventuellement un ou plusieurs phage(s) candidat(s).
- Ensuite, les bactériophages de la préparation sont mis en contact avec la bactérie pathogène isolée à partir du patient. Pour cela, on mélange la bactérie dispersée dans un milieu liquide avec la préparation précédente : on obtient un bouillon.

- Il faut laisser incuber pendant plusieurs heures, généralement sous agitation douce et à 35°C. Si la préparation contient un ou plusieurs phage(s) lytique(s) pour la bactérie pathogène, seul(s) ce(s) phage(s) se propage(nt) en grand nombre. En effet, chaque phage ayant reconnu une bactérie cible a procédé à plusieurs cycles dont chacun a produit environ 100 phages identiques en une heure. En théorie, on obtiendrait 10 000 phages au bout de 2 heures, puis 1 000 000 au bout de 3 heures et ainsi de suite... En pratique, on arrive à des limites infranchissables du fait de l'élimination complète de la bactérie au sein du bouillon. Cette croissance exponentielle exceptionnelle dépasse largement celle des bactéries. Bien qu'ayant une excellente faculté de reproduction, les bactéries donnent tout au plus quelques centaines de descendants dans le même temps. Le processus peut donc s'arrêter en quelques heures, à partir du moment où il n'y a plus de bactéries en nombre suffisant.
- Au terme d'un temps convenu, il faut stopper ce développement et détruire les éventuelles bactéries pathogènes résiduelles à l'aide du chloroforme, qui ne dénature pas les phages.
- Une nouvelle centrifugation suivie d'une filtration sont nécessaires pour éliminer les débris bactériens.

A la fin de ces étapes préliminaires, la suspension contient un nombre inconnu de bactériophages et peut-être même un mélange de plusieurs espèces de bactériophages (en proportion variable), susceptibles de lyser la même bactérie. On peut s'en assurer en déposant une goutte de la préparation sur un tapis de la bactérie, identique à celui qui permet d'effectuer un antibiogramme. Il est d'ailleurs possible de réaliser les deux tests simultanément, dans la même boîte de Pétri. La présence d'une zone de lyse bactérienne témoigne de l'activité phagique de la préparation.

## **b. Purification**

L'objectif est d'isoler chacune des différentes éventuelles variétés de phages.

Elle se fait à partir du principe suivant : à une plage de lyse correspond un clone phagique. (Un clone est le produit d'une multiplication à l'identique de bactériophages issus d'un même

ancêtre). Pour les bactériophages, comme pour un isolement bactérien, à partir d'une colonie on obtient la purification d'un phage par clonage. Pour cela, il suffit :

- Tout d'abord de diluer un certain nombre de fois la préparation obtenue précédemment (de dix en dix) de manière à ce qu'au final, on obtienne une dispersion des phages pour qu'ils soient isolés.
- Puis d'étaler les dilutions sur une gélose en boîte de Pétri. Deux techniques sont envisageables : l'isolement direct et la double couche. En microbiologie, l'isolement se fait grâce à la rapidité des effets observables que provoque la multiplication des micro-organismes (ou des entités) étudiés, bactérie ou virus.

Dans la technique de l'isolement direct, les bactéries pathogènes sont déposées à la surface de la gélose. Dans un deuxième temps, on isole chaque bactériophage au-dessus du « tapis bactérien ». En dix-huit à vingt-quatre heures d'incubation, les bactéries se sont multipliées et des colonies se sont formées sur la gélose, sauf à l'endroit où avait été déposé le bactériophage. Puisque le bactériophage lyse les bactéries qu'il rencontre, à certains endroits il n'y a pas de colonies bactériennes mais une tâche claire ou vierge qui correspond à une colonie de bactériophages.

Une variante de cet isolement, s'appelle la méthode de la « double couche ». Un peu plus délicate et technique, elle consiste à mélanger en des proportions définies, la bactérie pathogène et le bactériophage dans un peu de gélose liquide que l'on coule à la surface de la gélose.

- Il faut ensuite choisir un (ou plusieurs) phage(s) isolé(s). Les plages d'aspects différents correspondent généralement à des phages différents. Une fois prélevé, le phage doit être propagé sur une suspension fraîche de la bactérie, comme lors de l'étape de propagation.
- Enfin, il faut recommencer autant de fois que nécessaire cette étape afin de s'assurer d'un clonage parfait. Comme en bactériologie, deux ou trois opérations suffisent. Cette opération cyclique permet de s'assurer qu'un nombre maximal de phages est produit à chaque cycle. (L'importance de cette étape était soulignée par Felix d'Hérelle et de nombreux phagothérapeutes).

### c. Numération

Après l'isolement et la purification, il convient de connaître le nombre de phages actifs contenus dans la suspension. Il s'agit de s'assurer lors de cette étape que celle-ci a un pouvoir suffisant, qui est conditionné par un titre important. Le titre, nombre de particules phagiques lytiques par unité de volume, est généralement exprimé en PFU (Plaque Formant Unité) par millilitre (mL). De tout temps, il a été recommandé de n'utiliser que des suspensions ayant un titre au moins égal à  $10^5$  PFU par mL. Mais des titres supérieurs, de  $10^7$  à  $10^9$ , peuvent être obtenus et sont préférables.

C'est par une observation de la lyse *in vitro* que le nombre de particules phagiques lytiques présentes dans un milieu liquide sont comptabilisées. La technique n'est pas très différente de celle utilisée pour compter les bactéries. Pour ces dernières, il suffit de compter macroscopiquement les colonies présentes à la surface d'une gélose. Pour les phages, on compte le nombre de plages claires sur un tapis de culture bactérienne. Dans l'un et l'autre cas, la population de micro-organismes (ou entités pour les phages) dont on veut compter les membres doit être dispersée.

### d. Contrôle

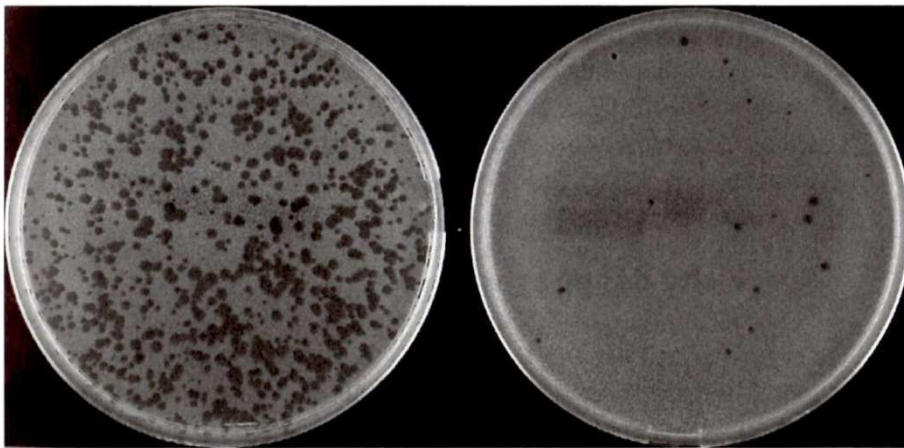
Les suspensions commerciales ou de caractéristiques inconnues doivent faire l'objet de quelques contrôles, préalables à l'administration. En particulier, l'activité de cette suspension, pour s'assurer de la sensibilité de la bactérie cible aux phages de la suspension, et le titre de la suspension sont nécessaires.

- Bactériophagogramme : il permet d'étudier la sensibilité d'une bactérie aux phages. Dans le but de préparer un mélange phagique, pour traiter une infection mixte à plusieurs bactéries d'espèces différentes par exemple, chaque phage peut être testé avant d'être introduit dans le cocktail phagique. Dans le cas d'une infection à une souche bactérienne donnée, la bactériophagogramme permet de sélectionner le ou les phages les plus actifs contre la bactérie en question. La bactérie, qui a été isolée chez le patient, estensemencée sur une gélose de boîte de Pétri. Les phages de la phagothèque peuvent alors être testés : il suffit de déposer une goutte (5 microlitres) de chaque suspension phagique (en lieu et place des disques de papier buvard de

l'antibiogramme). Après incubation de dix-huit à vingt-quatre heures, la présence ou non et l'importance de la plage claire témoignent de l'activité lytique du dépôt et de son importance (figure 16).

Si on teste de cette façon une préparation multiphagique commerciale, on peut déterminer de façon globale la ou les spécificité(s) de ce cocktail, voire le spectre d'hôtes. Il est néanmoins impossible de déterminer quels sont les phages actifs contre la bactérie dans le mélange (un seul phage à la concentration de  $10^5$  PFU/mL fera une plage claire dans le tapis bactérien, même si la bactérie est résistante aux autres phages du mélange).

Figure 16 : Boîte de Pétri avec des plages claires



Source : « Des virus pour combattre les infections », Dr Alain Dublanche, Edition Favre, 93, 2009

Dans ces deux boîtes de Pétri un même bactériophage a été testé. On remarque un titre phagique plus élevé dans la boîte de Pétri de gauche que dans celle de droite, observable par un nombre nettement plus important de plages claires à gauche qu'à droite. Les plages claires apparaissent en foncé (gris noir) sur cette photo.

- Lysotopie : c'est un test phénotypique (test de résistance qui mesure la capacité de la bactérie à se développer en présence de bactériophages) qui permet de montrer l'identité ou la différence entre des souches bactériennes de même espèce. Elle consiste à déterminer la sensibilité des bactéries à un ensemble de dix à vingt bactériophages, appelés gamme ou panel de phages, convenablement choisis pour discriminer la bactérie. Si les profils de sensibilité de deux souches bactériennes de même espèce sont différents, alors on peut en conclure que les deux bactéries

appartiennent à des clones différents. Au contraire, si les profils de sensibilité sont identiques, alors les bactéries sont issues d'un même clone. La lysotypie a l'avantage d'être une méthode relativement simple. Elle peut toutefois être remplacée par une méthode de génotypage : le ribotypage (technique d'identification de bactéries basée sur l'analyse de l'ADN. Elle fait correspondre à chaque espèce ou souche bactérienne une empreinte génétique appelée ribotype). Celui-ci est plus long à réaliser, plus coûteux et réservé à des laboratoires spécialisés. De nombreuses autres techniques de typage moléculaire remplacent la lysotypie dans les laboratoires et permettent de détecter la présence de clones responsables d'épidémies. Toutefois, les lysotypes ne sont pas abandonnés aujourd'hui (notamment dans les centres nationaux de référence comme celui du staphylocoque à Lyon ou de *Salmonella* à l'Institut Pasteur de Paris). L'intérêt de la lysotypie, notamment à l'hôpital, est de déceler une chaîne infectieuse pour ensuite mettre en œuvre les moyens suffisants pour stopper son développement. Elle permet de savoir si une souche bactérienne isolée chez un patient provient de la même source que d'autres souches appartenant à la même espèce et isolées chez d'autres patients ou dans l'environnement.

## **IV. Application de la phagothérapie en médecine humaine**

L'histoire et les applications thérapeutiques de la phagothérapie ont un lien étroit avec celles des antibiotiques. Il paraît donc important de connaître la situation actuelle de l'antibiothérapie, en France notamment et plus largement en Europe.

### **1. La consommation des antibiotiques**

La consommation des antibiotiques fait l'objet de nombreuses études, en particulier ces dernières années.

#### **a. Méthodologie**

Les données permettant d'étudier la consommation nationale d'antibiotiques proviennent de deux sources. D'une part, les déclarations de vente dont dispose l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) qui permettent de mesurer la totalité de la consommation française. Ces déclarations, prévues par l'article L 5121-17 et suivants du Code de la Santé Publique (CSP), présentent un caractère obligatoire pour les titulaires d'autorisation de mise sur le marché (AMM) et portent sur la totalité des spécialités commercialisées en France, qu'elles soient ou non remboursables aux assurés sociaux.

D'autre part, des données complémentaires portant sur la consommation en ville, traitées par l'ANSM en collaboration avec la Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS), qui permettent de connaître et d'analyser de façon plus détaillée les caractéristiques de la consommation de la population affiliée au régime général. Ces données correspondent au dénombrement d'antibiotiques, effectué par le régime général, ventilés selon quatre critères : âge, sexe, lieu de résidence et spécialité du prescripteur.

Les données de l'ANSM couvrent l'ensemble de la population française (France métropolitaine + départements d'outre-mer DOM) et celles de la CNAMTS l'ensemble de la population affiliée au régime général (France métropolitaine + DOM, y compris les sections locales mutualistes). En ce qui concerne les spécialités pharmaceutiques retenues, les champs

se recouvrent presque entièrement puisqu'il n'existe que deux antibiotiques non remboursables aux assurés sociaux avec un faible niveau de ventes.

Les données utilisées sont converties en nombre de Doses Définies Journalières (DDJ). La DDJ, établie par le « Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology » de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), constitue une posologie de référence pour un adulte de soixante-dix kilos dans l'indication principale de chaque molécule. Cette dose n'est pas nécessairement le reflet de la posologie recommandée par l'AMM, ni de la posologie effective : elle constitue un étalon de mesure. Chaque présentation d'antibiotiques peut donc être convertie en nombre de DDJ et si l'on connaît le nombre de total de boîtes vendues, la consommation au cours d'une année peut être calculée (que ce soit par molécule, par famille ou par classe d'antibiotiques). L'utilisation des DDJ élimine les difficultés de mesure liées à l'hétérogénéité des tailles de conditionnement et de dosages des médicaments commercialisés.

Pour pouvoir comparer la consommation d'antibiotiques entre différents pays, et le cas échéant estimer une consommation moyenne internationale, le nombre de DDJ est divisé par le nombre total d'habitants (enfants y compris). Par convention, les résultats sont présentés pour mille habitants et par jour : DDJ/1000H/J.

Enfin, la consommation hospitalière est rapportée à un second dénominateur pour tenir compte des variations de l'activité des établissements. Il s'agit du nombre de journées d'hospitalisation (Doses Définies Journalières pour mille journées d'hospitalisation : DDJ/1000JH).

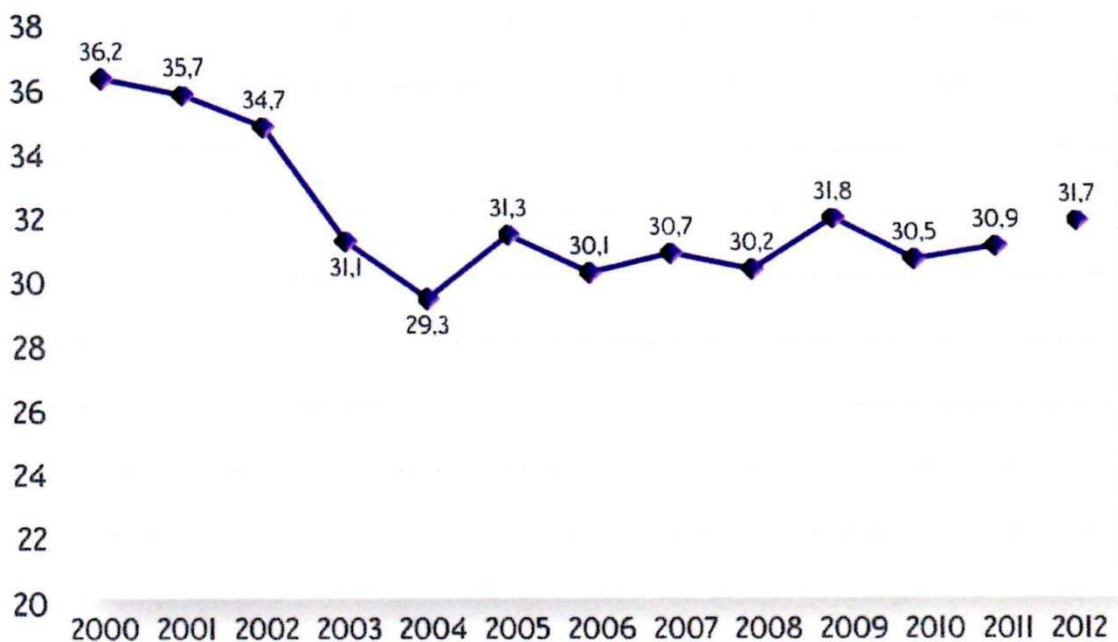
## **b. La consommation d'antibiotiques en France**

### *b.1 Consommation générale des antibiotiques en France*

Comme nous l'indique le schéma suivant, la consommation totale d'antibiotiques a diminué de 12,5% entre 2000 et 2012 et de 9% depuis 10 ans (figure 17). Cette évolution résulte de la baisse de toutes les prescriptions médicales, en ville comme à l'hôpital. Cependant, une nouvelle tendance à la hausse se dessine : + 3% lors des 5 dernières années.



Figure 17 : Evolution de la consommation d'antibiotiques en France



Source : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », Point d'information du 17/06/2013 (disponible sur : [www.anism.sante.fr](http://www.anism.sante.fr)).

La consommation est présentée en nombre de Doses Définies Journalières pour 1000 Habitants et par Jour : DDJ/1000H/J. On remarque une nette diminution entre l'année 2000 (36,2 DDJ/1000H/J) et 2004 (29,3 DDJ/1000H/J), qui constitue la plus faible consommation d'antibiotiques de cette décennie. Un regain de la consommation s'est produit en 2005 (31,3 DDJ/1000H/J). Il s'ensuit trois années de moindre consommation (de 2006 à 2008), qui se stabilise aux alentours de 30 DDJ/1000H/J. Enfin, une nouvelle tendance à la hausse se dessine depuis 2008 : la consommation d'antibiotiques passant de 30,2 DDJ/1000H/J (2008) à 31,7 DDJ/1000H/J (2012).

Au début des années 2000, le Conseil de l'Union européenne s'est préoccupé du problème de la consommation d'antibiotiques en adoptant une résolution (1999) puis une recommandation (2001). Ces documents invitaient les états membres à définir des stratégies pour enrayer le développement de la résistance aux antibiotiques et à renforcer la collecte d'informations sur leur prescription et leur utilisation. De plus, deux programmes européens, spécifiquement dédiés au suivi de la résistance aux antimicrobiens (EARSS) et au suivi des consommations (ESAC) ont été lancés et ont bénéficié d'un financement communautaire. En France, un plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques a été mis en place dès 2001. De nombreuses actions ont été entreprises, notamment par l'assurance maladie dont les premières

campagnes auprès du public ont significativement contribué à la baisse du niveau de consommation en ville. A l'hôpital, avant même la signature d'un accord tripartite entre le Ministère de la Santé, les organismes d'assurance maladie et les fédérations de professionnels hospitaliers, des actions ont été menées au sein des établissements afin de réduire les consommations et d'optimiser les prescriptions.

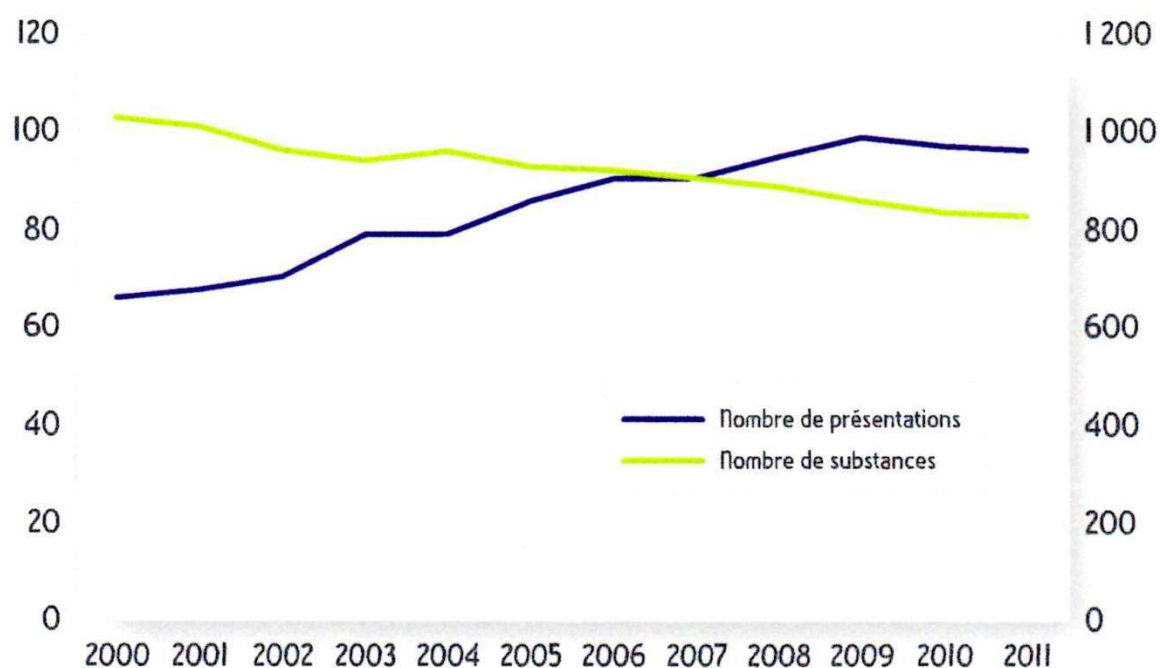
Les évolutions de ces dernières années conduisent néanmoins à se demander si cette dynamique ne s'est pas essoufflée. Les premiers résultats de 2012 montrent que la consommation se situe aujourd'hui à un niveau légèrement supérieur à celui atteint en 2005.

Entre 2000 et 2012, le nombre de substances antibiotiques (à usage systémique, seules ou en association) a diminué de 18% en France, passant de 103 à 84 (figure 18). Ce solde négatif s'explique par l'arrêt de la commercialisation de 28 molécules alors que seules 9 nouvelles molécules (ou association de molécules) ont été commercialisées. Aucune classe d'antibiotiques, exception faite des macrolides, n'a échappé à un retrait d'au moins une substance active par le laboratoire qui la commercialisait.

Cette évolution confirme que l'innovation thérapeutique est aujourd'hui beaucoup trop modeste pour assurer le renouvellement du marché. Compte tenu du niveau de résistance de certaines bactéries aux antibiotiques disponibles, l'appauvrissement progressif de la quantité d'antibiotiques potentiellement efficaces concourt à l'utilisation « d'antibiotiques de réserve ». Il s'agit là d'un problème très spécifique aux antibiotiques, dont la résolution est cruciale pour éviter les situations d'impasse thérapeutique auxquelles sont déjà confrontés certains prescripteurs. Dans ce contexte, un plan baptisé « COMBACTE » (Combating Bacterial Resistance in Europe) résultant d'un partenariat privé-public et bénéficiant d'un financement européen vient d'être créé pour renforcer la recherche sur de nouvelles molécules et encourager la réalisation de nouveaux essais cliniques.

Enfin, en volume et en DDJ, les antibiotiques sont plus largement utilisés dans le secteur de la ville que dans le secteur hospitalier : 125 millions de boîtes vendues et une consommation de 28,7 DDJ/1000H en ville contre 18,5 millions de boîtes vendues et une consommation de 2,1 DDJ/1000H à l'hôpital.

Figure 18 : Evolution du nombre d'antibiotiques commercialisés en France



Source : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », Point d'information du 17/06/2013 (disponible sur : [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr)).

On remarque sur cette figure une diminution constante du nombre de substances antibiotiques commercialisées en France (en vert), passant de 103 en 2000 à 84 (2011). Parallèlement, il y a une nette progression du nombre de présentations des antibiotiques (en bleu) : de 640 en 2000 à 980 en 2011.

### *b.2 Evolution de la consommation d'antibiotiques dans le secteur de la ville*

La consommation des antibiotiques délivrés en ville a diminué entre 2000 et 2012 mais l'essentiel des résultats a été obtenu au cours des 5 premières années (2000 à 2004). Le mouvement de baisse a donc largement coïncidé avec la mise en place du premier plan « antibiotiques » et le lancement de la première campagne nationale de l'assurance maladie. Depuis 2005, on note une évolution irrégulière avec une légère tendance à la hausse. Les premiers résultats exploités de l'année 2012 semblent confirmer cette tendance à la hausse (figure 19).

Figure 19 : Evolution de la consommation des antibiotiques en ville



Source : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », Point d'information du 17/06/2013 (disponible sur : [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr)).

La consommation est présentée en nombre de Doses Définies Journalières pour 1000 Habitants et par Jour : DDJ/1000H/J. La diminution de la consommation d'antibiotiques a été très significative au cours des 5 premières années de la décennie : de 33,4 DDJ/1000H/J en 2000 à 27,1 DDJ/1000H/J en 2004. Puis une nouvelle tendance à la hausse s'est dessinée en 2005 (28,9 DDJ/1000H/J). Elle est depuis confirmée par une période de stagnation, voire de légère progression de la consommation d'antibiotiques (29,4 DDJ/1000H/J en 2012).

La progression enregistrée en 2012 est d'autant plus inquiétante qu'on ne peut pas l'attribuer à une plus forte incidence des pathologies hivernales et des syndromes grippaux. En effet les données du réseau Sentinelle montrent que l'incidence n'a quasiment pas varié entre 2011 et 2012 (Données du réseau Sentinelle sur <http://www.sentiweb.fr>). Il faut également relever que les maladies virales constituent toujours le premier motif de prescription des antibiotiques, confirmant une part beaucoup trop importante des consommations non justifiées (les données des baromètres de prescription IMS Health indiquent que les maladies virales -bronchites, rhinopharyngites, ou syndromes grippaux- représentaient 28% des motifs de prescription lors de la période mars 2011-février 2012).

D'autre part, il faut prendre en compte que le vieillissement de la population française constitue un facteur d'accroissement de la consommation d'antibiotiques. En effet, les personnes âgées de plus de 64 ans consomment davantage que le reste de la population (On peut estimer que l'augmentation progressive de la part des personnes de 65 ans et plus dans la population accroît, chaque année, toutes choses étant égales par ailleurs, la consommation de 0,013 DDJ/1000H/J, source ANSM). Ce facteur n'est toutefois pas spécifique à la France car il concerne également d'autres pays européens qui ont réussi à maintenir un niveau modéré de prescription d'antibiotiques.

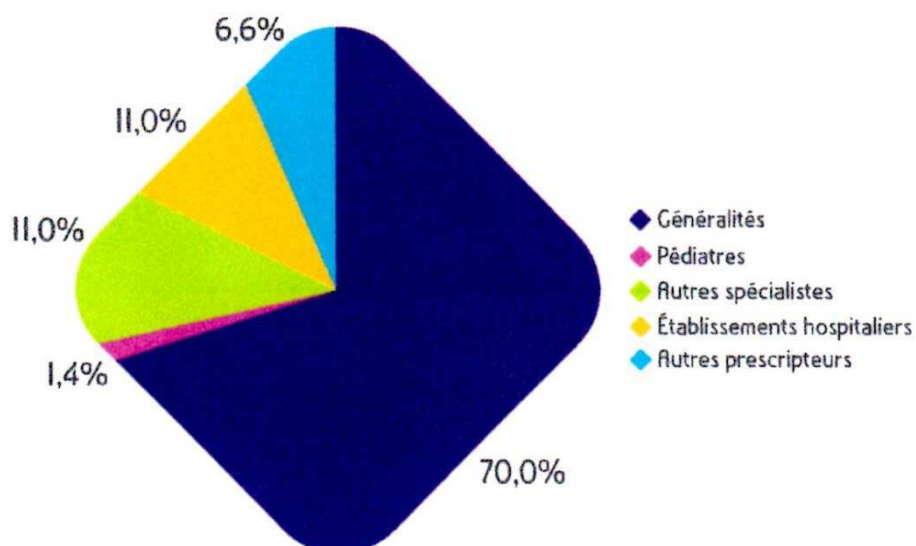
La décomposition de la consommation par classe d'antibiotiques montre que les pénicillines sont les antibiotiques les plus largement utilisés en 2012 (57,6%) : les pénicillines à large spectre représentent 31,9% de la consommation d'antibiotiques et l'association de l'amoxicilline à l'acide clavulanique représente presque un quart des antibiotiques prescrits en ville (24%). Les Beta-lactamines dans leur ensemble représentent les 2/3 de la consommation ambulatoire. Les macrolides constituent, quant à eux, la seconde classe d'antibiotiques la plus consommée (13,4%).

Sur un plan qualitatif, la consommation en antibiotiques a diminué au cours de la période 2000 à 2012 chez toutes les classes à l'exception de deux : l'amoxicilline en association et les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (Source ANSM). En effet, la comparaison de la consommation en 2000 et 2012 montre que la part des associations de pénicillines, c'est à dire l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique pour l'essentiel, a fortement progressé, passant de 13,9% à 24%. Une telle progression est d'autant plus préoccupante que l'amoxicilline associée à l'acide clavulanique est l'un des antibiotiques les plus générateurs de résistance. La consommation des céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération a également augmenté dans une proportion importante (passant de 4,8% à 6,6% de la consommation). A l'inverse, les céphalosporines de 1<sup>ère</sup> génération ne sont presque plus utilisées et l'utilisation des céphalosporines de 2<sup>ème</sup> génération a fortement diminué. De même, la consommation des macrolides (de 18% à 13,4%) et celle des quinolones ont baissé.

L'analyse des prescriptions d'antibiotiques en ville révèle certaines informations. Les prescriptions sont très largement réalisées par des médecins généralistes (70%) (figure 20). Viennent ensuite les spécialistes (hors pédiatres, à hauteur de 12%) et les établissements hospitaliers (11%). La part des prescriptions d'antibiotiques d'origine hospitalière augmente

chaque année, ce qui explique, dans une large mesure, le recul des prescriptions des généralistes (de 71,7% en 2011 à 70% en 2012).

Figure 20 : Part relative des prescriptions d'antibiotiques en ville selon les prescripteurs



Source : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », Point d'information du 17/06/2013 (disponible sur : [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr)).

70% des prescriptions d'antibiotiques en ville ont été réalisées par un médecin généraliste. 11% des prescriptions sont respectivement réalisées par des spécialistes et par des établissements hospitaliers. La part des pédiatres est faible (1,4%), mais les modalités de calcul retenues conduisent à la sous-évaluer. A noter que les « autres prescripteurs » regroupent essentiellement les dentistes.

Enfin, la consommation d'antibiotiques varie selon l'âge des patients, avec une augmentation de la consommation quasiment linéaire avec l'âge. Elle dépend également du sexe, puisqu'on remarque une consommation majoritaire chez les patients de sexe féminin (57%). Pour finir, il existe des disparités régionales dans la consommation d'antibiotiques : les régions du nord de la France sont celles où la consommation est la plus élevée tandis que les régions Pays de la Loire et Rhône-Alpes se caractérisent par un niveau de consommation plus modéré.

### *b.3 Consommation d'antibiotiques à l'hôpital*

Si, en valeur absolue, la consommation d'antibiotiques est beaucoup plus importante en ville qu'à l'hôpital, en valeur relative le rapport s'inverse. Ainsi, comme le montre la figure ci-dessous (figure 21), plus de 400 patients hospitalisés sur 1000 ont reçu un jour en 2011 une dose d'antibiotique, alors qu'en ville ce taux journalier est inférieur à 30 sur 1000. L'exposition aux antibiotiques dans le milieu hospitalier est donc majeure.

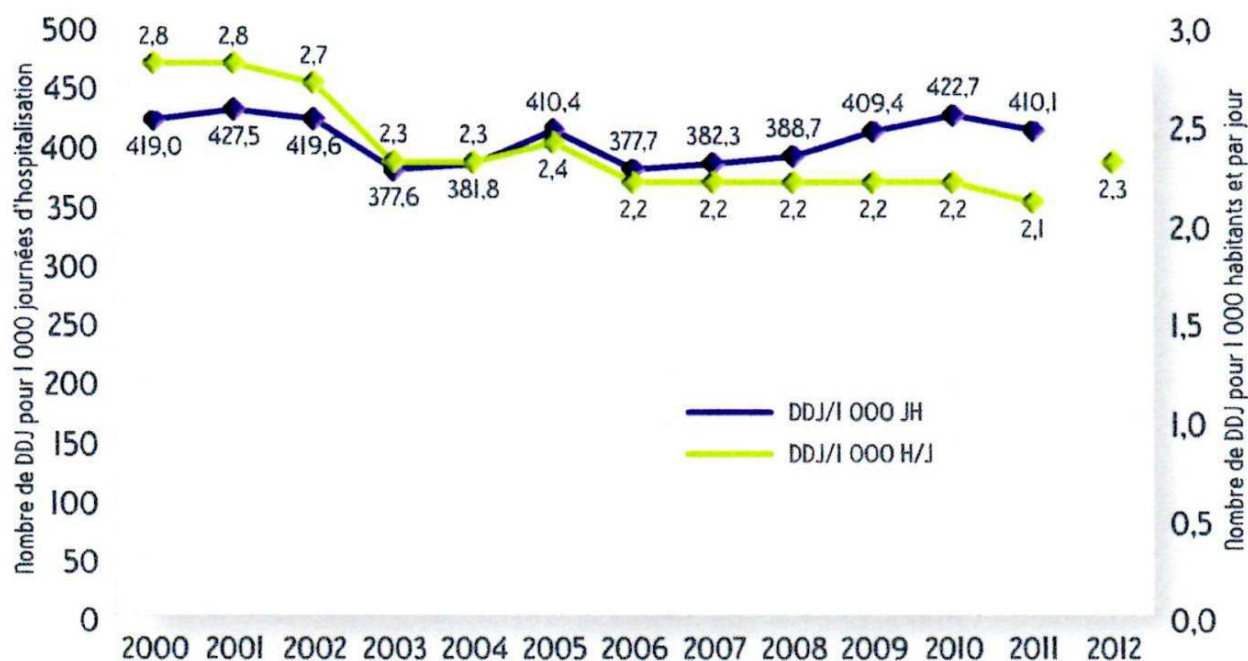
Une baisse de la consommation d'antibiotiques peut être observée au début de la période étudiée, de 2000 à 2003-2004. Puis l'évolution de la consommation donne lieu à deux interprétations différentes selon l'indicateur choisi. La DDJ/1000JH est un indicateur directement relié à l'activité hospitalière, et de ce fait peut être jugé plus pertinent que la DDJ/1000H/J. Si on se réfère à cet indicateur, on peut observer une légère diminution de la consommation hospitalière d'antibiotiques en 2011, qui fait suite à 4 années successive de hausse.

D'un point de vue qualitatif, sur l'ensemble de la période étudiée, la consommation d'antibiotiques a diminué dans toutes les classes à l'exception de trois : les carbapénèmes (doublement de la consommation), les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération et l'association de la pipéracilline au tazobactam (source ANSM). Les premiers résultats de 2012 font apparaître quelques évolutions positives comme la légère diminution de la consommation de carbapénèmes. Ceci est encourageant, car l'usage important des carbapénèmes est à l'origine de l'apparition de nouvelles souches résistantes. En revanche, la progression de la consommation des céphalosporines semble se confirmer.

A l'hôpital, comme en ville, les pénicillines constituent la classe d'antibiotiques la plus utilisée (55,9%). Cependant, c'est en association avec l'acide clavulanique qu'elle est le plus employée (32,7% pour les associations de pénicillines contre 18,5% pour les pénicillines à large spectre). Les quinolones représentent la seconde classe la plus utilisée à l'hôpital (12%) devant les céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (7,7%).



Figure 21 : Evolution de la consommation d'antibiotiques à l'hôpital



Source : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », Point d'information du 17/06/2013 (disponible sur : [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr)).

Deux indicateurs permettent de s'intéresser à la consommation d'antibiotiques en milieu hospitalier. Tout d'abord, la DDJ/ 1000JH (en bleu) qui montre une certaine stagnation de la consommation d'antibiotiques sur la période 2000-2012. Si on prend en compte les dernières années, la consommation en antibiotiques a diminué en 2011, après 4 années successives de hausse consécutives. D'autre part, la DDJ/1000H/J (en vert) qui montre une légère diminution, surtout acquise entre 2000 et 2003, sur la période considérée. L'année 2012 semble cependant dessiner une légère augmentation de la consommation. La divergence entre ces deux indicateurs s'explique par le fait que le nombre de journées d'hospitalisation décroît d'une année sur l'autre, alors que la population française augmente. Ces évolutions contraires conduisent à ce que la consommation paraisse stable quand on la rapporte à toute la population (DDJ/1000H/J), mais en augmentation lorsqu'on la rapporte au nombre de journées d'hospitalisation (DDJ/1000JH).



### **c. La consommation d'antibiotiques en Europe**

En ce qui concerne le secteur ambulatoire, la consommation moyenne au sein des pays de l'Union européenne est de 20 DDJ/1000H/J en 2010 et la consommation médiane est de 18,3 DDJ/1000H/J. La consommation nationale française (29,4 DDJ/1000H/J) reste donc très au-dessus de la moyenne européenne et place la France dans les pays à forte consommation d'antibiotiques (figure 22). La baisse de 25% que le 3<sup>e</sup> plan « Antibiotiques » objecte conduirait la consommation française au niveau de la moyenne européenne.

La consommation en Europe peut être schématiquement divisée en 3 zones : les pays du Nord, faibles consommateurs d'antibiotiques, les pays de l'Est, consommateurs modérés, et les pays du bassin méditerranéen, forts consommateurs. Toutefois, ces écarts tendent à se réduire au fil des années, même s'ils demeurent importants.

Les données concernant la consommation des antibiotiques à l'hôpital sont moins nombreuses qu'en ambulatoire. Parmi les pays qui ont répondu en 2010, la France se classe au 4<sup>e</sup> rang des pays consommateurs derrière la Lettonie, la Finlande et la Lituanie (figure 23). Toutefois, plusieurs pays apparaissant comme d'importants consommateurs en 2009 (Grèce, Roumanie) n'ont pas fourni de statistiques en 2011. Dans un tel contexte, la place exacte de la consommation nationale hospitalière d'antibiotiques ne peut être établie avec précision à l'échelle européenne.

Figure 22 : Comparaison des consommations d'antibiotiques dans le secteur de la ville dans plusieurs pays européens

Pays	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Allemagne	13,6	12,8	12,7	13,9	13,0	14,6	13,6	14,5	14,5	14,9	14,5		
Autriche	12,3	11,8	11,8	12,5	12,5	14,5	14,3	14,7	15,1	15,9	14,9		
Belgique	25,3	23,7	23,8	23,8	22,7	24,3	24,2	25,4	27,7	27,5	28,4		
Bulgarie	20,2	22,7	17,3	15,5	16,4	18,0	18,1	19,8	20,6	18,6	18,2		
Danemark	12,3	12,8	13,2	13,5	14,1	14,6	15,2	16,1	16,0	16	16,5		
Espagne	19,0	18,0	18,0	18,9	18,5	19,3	18,7	19,9	19,7	19,7	20,3		
<b>France</b>	<b>33,4</b>	<b>33,0</b>	<b>32,0</b>	<b>28,9</b>	<b>27,1</b>	<b>28,9</b>	<b>27,9</b>	<b>28,6</b>	<b>28,0</b>	<b>29,6</b>	<b>28,2</b>	<b>28,7</b>	<b>29,4</b>
Grèce	31,7	31,8	32,8	33,6	33,0	34,7	41,1	43,2	45,2	38,6	39,4		
Hongrie	18,5	18,6	17,1	19,1	18,2	19,5	17,2	15,5	15,2	16,0	15,7		
Italie	24,0	25,5	24,3	25,6	24,8	26,2	26,7	27,6	28,5	28,7	27,4		
Luxembourg	27,1	27,6	27,6	28,6	24,9	26,3	25,1	27,2	27,0	28,2	28,6		
Norvège	n.d.	15,6	15,7	15,6	15,7	16,8	14,8	15,5	15,5	15,2	15,8		
Pays-Bas	9,8	9,9	9,8	9,8	9,7	10,5	10,8	11,0	11,2	11,4	11,2		
Pologne	22,6	24,8	21,4	n.d.	19,1	19,6	n.d.	22,2	20,7	23,6	21,0		
Portugal	24,9	24,5	26,5	25,1	23,8	24,5	22,7	22,1	22,6	22,9	22,4		
République tchèque	n.d.	n.d.	13,9	16,7	15,8	17,3	15,9	16,8	17,4	18,4	17,9		
Royaume-Uni	14,3	14,8	14,8	15,1	15,0	15,4	15,3	16,5	16,9	17,3	18,6		
Slovénie	19,0	17,4	16,3	17,0	16,7	16,3	14,7	16,0	15,0	14,4	14,4		
Suède	15,5	15,8	15,2	14,7	14,5	14,9	15,3	15,5	14,6	13,9	14,2		

Source : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », Point d'information du 17/06/2013 (disponible sur : [www.ansm.fr](http://www.ansm.fr)). Données issues de l'European Centre for Disease Prevention and Control Surveillance of antimicrobial consumption in Europe (2010) et l'ANSM.

La consommation en antibiotiques est appréciée en Dose Définie Journalière pour 1000 Habitants et par Jour (DDJ/1000H/J). En 2010, la France (28,2 DDJ/1000H/J) occupait le 4<sup>e</sup> rang de la consommation d'antibiotiques en Europe, derrière la Grèce (39,4 DDJ/1000H/J), le Luxembourg (28,6 DDJ/1000H/J) et la Belgique (28,4 DDJ/1000H/J). Il faut toutefois souligner que les données grecques intègrent des consommations qui ne sont habituellement pas comptabilisées dans le secteur ambulatoire (cliniques privées et maisons de retraite médicalisées).

Figure 23 : Comparaison des consommations d'antibiotiques dans le secteur hospitalier dans plusieurs pays européens

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Belgique	2,2	2,2	2,2	2,3	2,1	1,9		1,9	1,7		2,0		
Danemark	1,4	1,4	1,5	1,5	1,6	1,6	1,7	1,8	1,7	1,8	1,8		
Finlande	3,8	3,9	3,9	3,6	3,4	3,5	3,5	3,2	3,3	3,2	2,8		
<b>France</b>	<b>2,8</b>	<b>2,8</b>	<b>2,7</b>	<b>2,3</b>	<b>2,3</b>	<b>2,4</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,2</b>	<b>2,1</b>	<b>2,3</b>
Grèce	2,3	2,2	2,2	2,3						3,3			
Italie						0,2		1,5	2,3		2,1		
Lettonie			6,2		4,7	3,9	3,2	3,5	3,0	2,2	3,0		
Lituanie											2,4		
Luxembourg	2,2	2,1	2,4	2,4	2	2,1	2,1	2,2	2,2		2,1		
Pays-Bas	0,6	0,6	0,7								1,1		
Roumanie										2,6			
Suède	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,5	1,4	1,5	1,5	1,5		

Source : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », Point d'information du 17/06/2013 (disponible sur : [www.ansm.fr](http://www.ansm.fr)). Données issues de l'European Centre for Disease Prevention and Control Surveillance of antimicrobial consumption in Europe (2010) et l'ANSM.

La consommation en antibiotiques est appréciée en Dose Définie Journalière pour 1000 Habitants et par Jour (DDJ/1000H/J). 11 pays sur les 29 qui participent au projet ESAC ont pu transmettre leur résultat 2010 en ce qui concerne le secteur hospitalier. Les résultats disponibles sont plus difficiles à interpréter car les problèmes de champ couvert par les statistiques hospitalières se posent avec plus d'acuité que dans le secteur ambulatoire. En 2010, la France occupait la 4<sup>e</sup> place, avec une consommation de 2,2 DDJ/1000H/J.

#### **d. Conséquences**

L'efficacité remarquable des antibiotiques s'est accompagnée de leur utilisation massive et répétée en santé humaine et animale (recours intensif des antibiotiques dans l'élevage animal industriel pour accroître les rendements). Ce phénomène a généré une pression de sélection sur les bactéries, qui ont développé des systèmes de défense contre ces antibiotiques. On parle de pression de sélection conduisant à l'apparition de résistances. De plus, la mauvaise utilisation des antibiotiques, passant par des traitements trop courts ou trop longs, parfois mal dosés, ne fait qu'accroître ce phénomène.

Ponctuelles au départ, ces résistances sont devenues massives et préoccupantes. Ceci est lié au grand pouvoir d'adaptation des bactéries qui se manifeste par leur capacité à acquérir de

nouvelles propriétés (par mutation du chromosome bactérien ou par transfert d'information génétique). Certaines souches sont ainsi devenues multi-résistantes, c'est à dire résistantes à plusieurs antibiotiques. D'autres sont même toto-résistantes, c'est à dire résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Ce dernier cas est, heureusement, encore rare, mais le phénomène est en augmentation. Il place les médecins dans une situation d'impasse thérapeutique : dans ce type de situation, ils ne disposent plus d'aucune solution pour lutter contre l'infection.

Enfin, si la majorité des cas de résistance aux antibiotiques est retrouvée à l'hôpital, il n'en reste pas moins que des résistances surviennent aussi en ville au détour d'antibiothérapies « apparemment anodines ».

## **2. La résistance à l'antibiothérapie et les infections nosocomiales**

La résistance aux antibiotiques est aujourd'hui un phénomène planétaire et l'émergence des bactéries multirésistantes (BMR) est préoccupante, dans les établissements de soins mais aussi en ambulatoire, où ces bactéries émigrent rapidement et deviennent ainsi une source importante de risque infectieux grave.

La résistance bactérienne est la capacité des bactéries à résister aux effets des antibiotiques ou des biocides qui sont censés les tuer ou les contrôler. L'évolution vers la résistance des bactéries aux antibiotiques caractérise la fin du XXe siècle. Très rapidement, chaque apparition et utilisation d'un nouvel antibiotique s'accompagne de l'apparition de bactéries résistantes. Ainsi, l'émergence des BMR est étroitement liée à la consommation des antibiotiques, en médecine familiale comme dans les établissements de santé. Les bactéries, résistantes (dont les BMR) ou non, se transmettent très facilement par manuportage ou via l'environnement contaminé.

Les bactéries sont dites multirésistantes aux antibiotiques lorsque du fait de l'accumulation de résistances acquises à plusieurs familles d'antibiotiques, elles ne sont plus sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique (résistance à plus de 3 familles différentes). La multirésistance est une étape vers l'impasse thérapeutique. Elle concerne les bactéries des infections communautaires (ex : pneumocoque, bacille de la tuberculose) et les bactéries des infections nosocomiales.

## **a. Les infections nosocomiales**

### *a.1 Définition*

En France, le Conseil supérieur d'hygiène publique a donné une définition précise des infections nosocomiales (IN). Il s'agit d'une « infection qui était absente à l'admission à l'hôpital. Ce critère est applicable à toutes les infections. Lorsque la situation précise à l'admission, un délai d'au moins 48 heures après l'admission (ou un délai supérieur à la période d'incubation lorsque celle-ci est connue) est communément accepté pour séparer une infection d'acquisition communautaire d'une infection nosocomiale. Pour les infections de plaies opératoires (ou infections de site opératoire ISO), on accepte comme nosocomiale les infections survenues dans les 30 jours suivants l'intervention ou, s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant, dans l'année qui suit l'intervention ».

### *a.2 Epidémiologie*

L'enquête nationale de prévalence (ENP) des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé de 2012 est la cinquième de ce type réalisée en France depuis 1990 par le Réseau d'alerte d'investigation et de surveillance des infections nosocomiales (Raisin). Au total 1938 établissements de santé, représentant 376 012 lits d'hospitalisation en France, ont participé à cette enquête. En nombre de lits, la participation des établissements publics était proche de l'exhaustivité : les 848 établissements de soins publics représentaient 96,8% des lits d'hospitalisation publique français. Elle était plus faible pour les établissements de soins privés d'intérêt collectif (83,4%) et les établissements de soins privés à but lucratif (74,8%). L'enquête a inclus au total 300 330 patients. Au jour de l'enquête, la prévalence de patients infectés était de 5,1% avec une prévalence des infections nosocomiales de 5,3% (dont 3,9% d'infections nosocomiales acquises dans l'établissement, 1,2% d'infections nosocomiales importées d'un autre établissement et 0,2% d'infections nosocomiales d'origine indéterminée). En d'autres termes, le jour de l'enquête, 15 180 des 300 330 patients avaient une ou plusieurs infections et 16 024 infections nosocomiales ont été recensées. Ce chiffre s'explique par la possibilité de poly-infection des patients. Sur l'ensemble des établissements de santé ayant participé aux deux enquêtes de 2006 et 2012, la prévalence brute des patients infectés est restée pratiquement stable (+0,5% en accroissement relatif), alors que la prévalence des patients présentant au moins une infection nosocomiale acquise dans l'établissement de santé a légèrement diminué (de 4,1% en 2006 à 3,9% en

2012, soit pratiquement 5% de diminution relative). Cependant, la prévalence des patients infectés présentant au moins une infection importée est passée de 0,9% à 1,2% (25% d'augmentation). Par ailleurs, les enquêteurs pouvaient indiquer que l'origine de l'infection était indéterminée, possibilité qui ne leur était pas offerte en 2006. En 2012, 691 patients (0,2%) présentaient une infection mentionnée comme d'origine indéterminée, alors que seulement 9 patients avaient une infection d'origine non documentée en 2006.

Les patients infectés sont relativement plus nombreux dans les CHU (Centres Hospitaliers Universitaires), dans les centres de réanimation et dans les centres de lutte contre le cancer. Les sujets âgés, de sexe masculin, atteints d'une maladie sévère et/ou immunodéprimés, opérés ou exposés à un dispositif invasif (sonde urinaire, cathéter vasculaire ou intubation/trachéotomie) sont également plus touchés que les autres. Il existe également des variations régionales importantes, avec une prévalence brute des patients infectés allant de 3,3% en Corse à 6,2% en Auvergne.

A l'échelle mondiale, l'OMS estime que 1,4 millions de personnes souffrent à tout moment d'une infection contractée à l'hôpital (chiffre de 2008). Les prévalences maximales sont rapportées en Méditerranée orientale (11,8%), en Asie du Sud-Est (10%) et en Pacifique occidental (9%). Les infections nosocomiales représentent donc un problème de santé publique planétaire.

### *a.3 Mécanismes et origines des germes des infections nosocomiales*

Les patients peuvent s'infecter par des germes endogènes, dont ils sont porteurs (commensaux, saprophytes et parfois pathogènes). Ils contaminent le plus souvent le patient lors de soins, comme par exemple la pose d'une sonde urinaire, une intubation trachéale ou dans le cas d'une infection sur site opératoire.

Les patients peuvent également s'infecter par des germes exogènes présents dans l'environnement hospitalier. Ces germes peuvent contaminer le patient par des routes inanimées (eau, air, aliment) ou animées (patients, personnels).



#### a. 4 Les infections nosocomiales les plus fréquentes

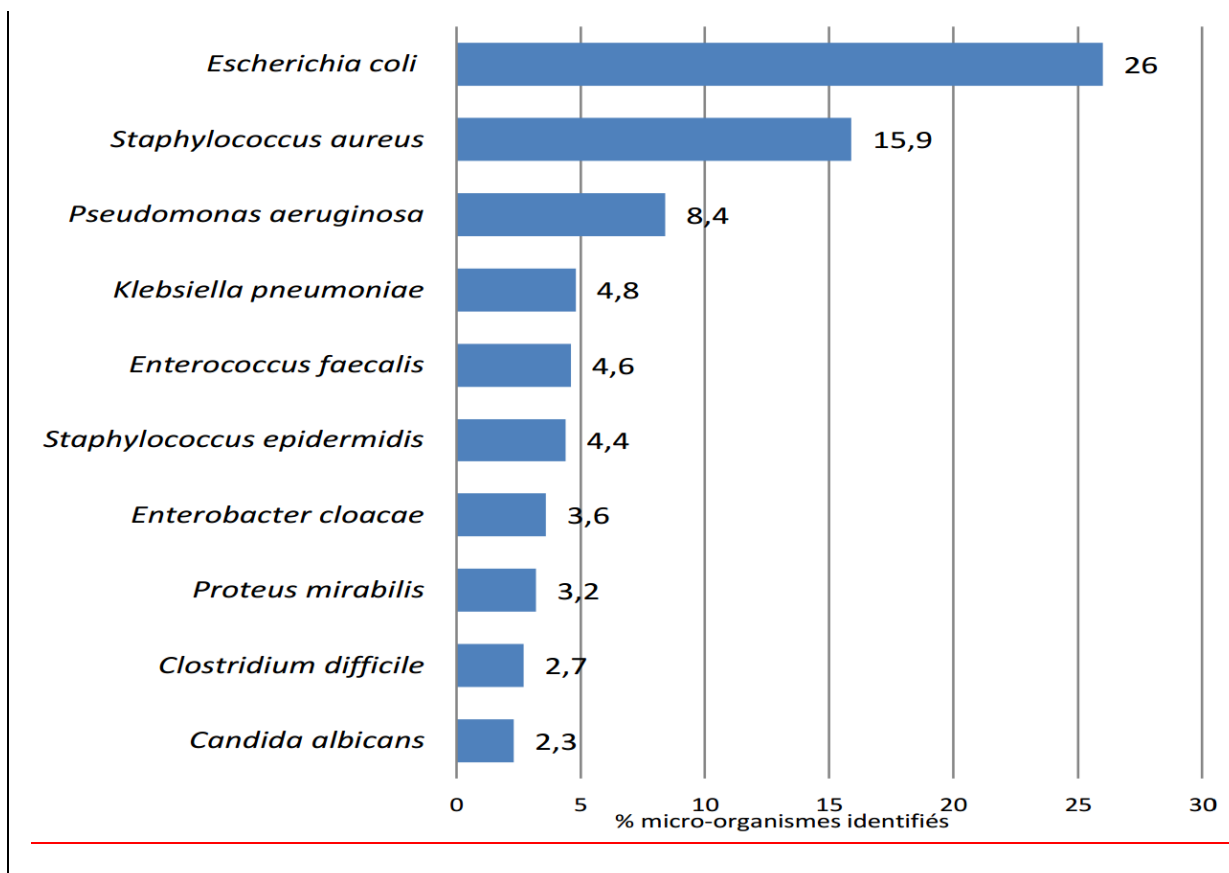
L'enquête nationale de prévalence de 2012 montre qu'en France trois bactéries sont responsables de plus de la moitié des infections nosocomiales. Les trois micro-organismes les plus fréquemment retrouvés sont : *Escherichia coli* (26%), *Staphylococcus aureus* (15,9%, dont 38,1% résistants à la pénicilline) et *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%). Si on s'intéresse aux entérobactéries dans leur ensemble, elles représentent environ 40% des infections nosocomiales (figure 24).

D'une manière générale, les principaux micro-organismes isolés d'infections nosocomiales étaient similaires à ceux décrits lors de l'ENP de 2006 et sont stables d'une enquête à l'autre. La prévalence des infections à *Clostridium difficile* a cependant doublé en France depuis 2006, restant toutefois assez faible. Cette évolution peut être liée à l'amélioration des techniques diagnostiques ou à la sensibilisation des établissements de santé suite à l'épidémie liée au clone 027 en 2006 et 2007. L'augmentation de la prévalence des infections digestives (toutes étiologies confondues, y compris indéterminées) entre 2006 et 2012 est en faveur d'une telle augmentation, qui reste malgré tout modérée.

Cette même enquête met en évidence les principaux sites des infections nosocomiales. Les infections urinaires (29,9%) sont les plus fréquentes, devant les pneumonies (16,7%), les infections du site opératoire (ISO) (13,5%) et les bactériémies/septicémies (10,1%). Ces quatre localisations d'IN représentent 70,2% des sites infectieux documentés (figure 25). Les infections de la peau et des tissus mous représentent 7% des sites infectieux.

La distribution des sites infectieux a aussi évolué de 2006 à 2012. Les infections urinaires restent ainsi les plus fréquentes quoiqu'en diminution. Les pneumonies restent au second rang mais sont en augmentation. Par ailleurs, les infections du site opératoire ou de la peau et des tissus mous sont toutes les deux en diminution. Enfin, la prévalence des bactériémies/septicémies augmente.

Figure 24 : Part relative des micro-organismes isolés d'infections nosocomiales en France

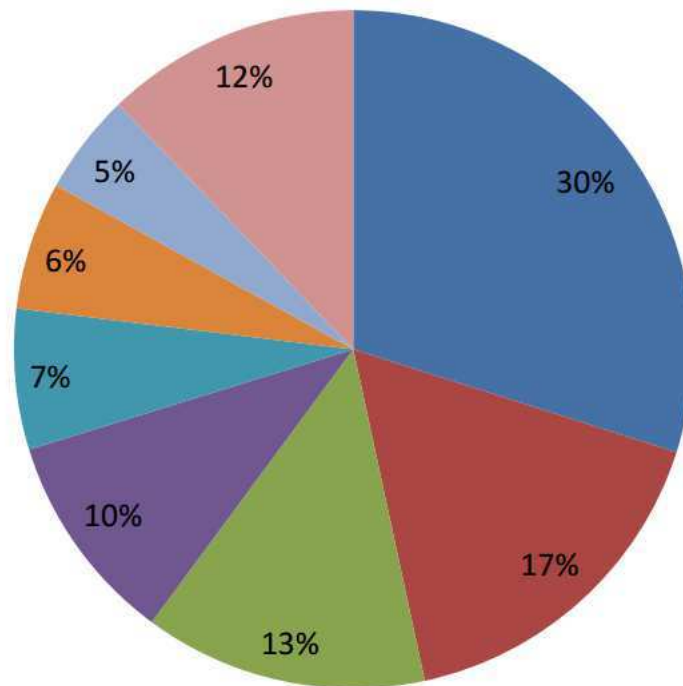


Source : Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, menée par le Réseau d'Alerte d'Investigations et de Surveillance des Infections Nosocomiales (Raisin), l'Institut nationale de Veille Sanitaire (InVS), et le Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, mai-juin 2012.

Les trois principaux micro-organismes responsables des infections nosocomiales représentent 50,3% des cas, avec *Escherichia coli* (26%), *Staphylococcus aureus* (15,9%) et *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%). A noter que les dix micro-organismes les plus fréquemment rapportés représentent 75,9% des cas d'infections nosocomiales.



Figure 25 : Part relative des sites infectieux d'infections nosocomiales



■ Infection urinaire	■ Pneumopathie
■ Infection du site opératoire	■ Bactériémie / septicémie
■ Infection peau / tissus mous	■ Infection respiratoire autre
■ Infection du tractus gastro-intestinal	■ Autres infections

Source : Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, menée par le Réseau d'Alerte d'Investigations et de Surveillance des Infections Nosocomiales (Raisin), l'Institut nationale de Veille Sanitaire (InVS), et le Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, mai-juin 2012.

Les principaux sites infectieux sont : les infections urinaires (30%), les pneumopathies (17%), les infections du site opératoire (13%), les septicémies (10%), les infections de la peau et des tissus mous (7%), les infections respiratoires hautes (6%), les infections du tractus gastro-intestinal (5%). Enfin l'ensemble des autres infections retrouvées représentent 12%.

## b. Bactéries multirésistantes (BMR) et infections nosocomiales

Les BMR représentent 20 à 30 % des infections nosocomiales.

L'utilisation massive des antibiotiques à l'hôpital détermine une pression de sélection formidable favorisant l'émergence des BMR. Chez les patients, cette pression de sélection amène une réduction des flores commensale et saprophyte en faveur des BMR, soit en portage soit directement impliquées dans des processus pathogènes. Dans l'environnement, la pression de sélection exercée par les antibiotiques et antiseptiques renforce l'émergence des bactéries les plus résistantes.

Ces réservoirs de BMR, environnementaux et humains, conjugués aux nombreux facteurs de risque de transmission croisée de pathogènes en milieu hospitalier (densité de population, fréquence des soins, mobilité des malades au sein de la structure...) favorisent l'implication des BMR dans les infections nosocomiales.

Parmi les BMR impliquées dans les infections nosocomiales, on trouve notamment : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), les entérocoques (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), *Pseudomonas aeruginosa* résistant (PAR) à la ceftazidime et aux carbapénèmes, les entérobactéries (notamment *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) résistantes aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération par haut niveau de production de céphalosporinase (HCASE) ou par sécrétion d'une bêta-lactamase à spectre étendu (BLSE) et *Acinetobacter baumannii* multirésistant. Les données de résistance sont disponibles pour la très grande majorité (87,4%) des 9450 souches concernées (Tableau 26).

Figure 26 : Caractéristiques de résistance aux anti-infectieux de certains micro-organismes isolés d'infection nosocomiale et prévalence des infections nosocomiales associées

Micro-organisme	Isolés (N)	Testés		IN associées %	Patients infectés	
		N	%		N	%
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	1 997	1 802	90,2			
Méticilline-R		687	38,1	0,2	672	0,2
Méticilline-R et Vancomycine-IR		27	1,5	<0,1	27	<0,1
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	577	510	88,4			
Ampicilline-R - Vancomycine-S		38	7,5	<0,1	37	
Vancomycine-R		3	0,6	<0,1	3	<0,1
<b><i>Enterococcus faecium</i></b>	130	122	93,8			
Ampicilline-R - Vancomycine-S		66	54,1	<0,1	66	
Vancomycine-R		5	4,1	<0,1	5	<0,1
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	1 053	940	89,3			
Ceftazidime-R		188	20,0	0,1	184	0,1
Carba-R		194	20,6	0,1	190	0,1
<b><i>Acinetobacter baumannii</i></b>	74	60	81,1			
Ceftazidime-R et Carba-S		21	35,0	<0,1	21	<0,1
Ceftazidime-S et Carba-R		1	1,7	<0,1	1	<0,1
Ceftazidime-R et Carba-R		7	11,7	<0,1	7	<0,1
<b>Entérobactéries</b>	5 709	4 904	85,9			
C3-R		1 126	23,0	0,4	1 053	0,4
C3-R et BLSE		665	13,6	0,2	626	0,2
Carba-R		74	1,5	<0,1	73	<0,1
<b><i>Escherichia coli</i></b>	3 265	2 817	86,3			
C3-R		497	17,6	0,2	483	0,2
C3-R et BLSE		309	11,0	0,1	302	0,1
Carba-R		40	1,4	<0,1	39	<0,1
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	599	528	88,1			
C3-R		199	37,7	0,1	191	0,1
C3-R et BLSE		167	31,6	0,1	161	0,1
Carba-R		12	2,3	<0,1	12	<0,1

Source : Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, menée par le Réseau d'Alerte d'Investigations et de Surveillance des Infections Nosocomiales (Raisin), l'Institut nationale de Veille Sanitaire (InVS), et le Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, mai-juin 2012.

S'agissant de *Staphylococcus aureus*, 684 souches (38,1%) sont résistantes à la méticilline, pour une prévalence des patients infectés de 0,2%. Il y a 27 souches (1,5%) qui sont résistantes à la méticilline et qui présentent une sensibilité diminuée aux glycopeptides. Par contre, le recueil des données ne distingue pas les souches intermédiaires ou résistantes aux glycopeptides. Il est très probable que ces 27 souches correspondent à des *Staphylococcus aureus* de résistance intermédiaire aux glycopeptides (GISA).

Les proportions de résistance aux glycopeptides sont de 0,6% parmi les 510 souches testées d'*Enterococcus faecalis* et de 4,1% parmi les 122 souches testées d'*Enterococcus faecium*. Les prévalences de patients infectés à *Enterococcus faecalis* ou *Enterococcus faecium* résistants aux glycopeptides sont inférieures à 0,1%.

Parmi les 940 souches de *Pseudomonas aeruginosa* testées, respectivement 20% et 20,6% sont résistantes à la ceftazidime ou aux carbapénèmes, pour des prévalences de patients infectés de 0,1%.

En ce qui concerne les 2817 souches d'*Escherichia coli* testées, 17,6% sont résistantes aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (C3G), pour une prévalence de patients infectés de 0,2%. La production d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) est rapportée pour 11% des *Escherichia coli* testées, soit 62,2% des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux C3G. Enfin, la résistance d'*Escherichia coli* aux carbapénèmes concerne 1,4% des souches testées, pour une prévalence de patients infectés inférieure à 0,1%. L'enquête ne recueille pas le mécanisme de résistance associé.

Ces proportions de résistance sont plus élevées pour *Klebsiella pneumoniae* : 37,7% des 528 souches sont résistantes aux C3G, 31,6% produisent une BLSE soit 83,9% des souches résistantes aux C3G et 2,3% sont résistantes aux carbapénèmes. Les prévalences des patients infectés par des *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux C3G ou productrices de BLSE sont de 0,1% et inférieure à 0,1% pour les souches résistantes aux carbapénèmes.

Les données de l'ENP de 2012 indiquent que 38,1% des *Staphylococcus aureus* isolés sont résistants à la méticilline, pour une prévalence de 0,2%. La proportion de SARM a diminué de 28% entre 2006 (52,9%) et 2012 (38,1%). En termes de prévalence, les chiffres sont respectivement de 0,4% et de 0,2%. Cette évolution est cohérente avec celles rapportées par ailleurs. En effet, le réseau BMR-Raisin a mesuré une diminution de 36% de l'incidence des SARM entre 2006 et 2011, passant de 0,59 cas pour 1000 journées d'hospitalisation à 0,38 cas pour 1000 journées d'hospitalisation. Par contre, la prévalence des infections à staphylocoques sensibles à la méticilline (SASM) est restée très stable. Cette diminution de la prévalence des infections à SARM a donc pour corollaire la diminution globale des infections à *Staphylococcus aureus*.

Concernant les entérobactéries, la résistance aux céphalosporines de 3<sup>e</sup> génération (C3G) chez *Escherichia coli* est de 17,6% en 2012 ; 11% des souches sont productrices d'une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE). Pour *Klebsiella pneumoniae*, ces pourcentages sont respectivement de 37,7% et de 31,6%. Les données montrent une nette augmentation de la résistance aux C3G pour *Escherichia coli* (9,8% en 2006 à 17,6% en 2012, soit +79%) et pour *Klebsiella pneumoniae* (17,2% en 2006 à 37,7, soit + 119%). Il n'est, en revanche, pas possible d'analyser l'évolution des BLSE car elles n'étaient pas documentées lors de l'ENP de 2006. En 2012, les proportions de souches productrices de BLSE parmi celles résistantes aux C3G sont toutefois élevées : 62% pour *Escherichia coli* et 84% pour *Klebsiella pneumoniae*. L'évolution observée via l'ENP est cohérente avec celle observée par le réseau BMR-Raisin, qui rapporte une augmentation de 130% des entérobactéries productrices de BLSE entre 2006 et 2011. Enfin, l'accroissement des souches résistantes aux C3G s'accompagne d'une

augmentation des infections à *Klebsiella pneumoniae*, mais pas à *Escherichia coli* (ce qui est cohérent avec leur épidémiologie).

La résistance aux carbapénèmes des entérobactéries reste faible en 2012 : 1,4% des souches d'*Escherichia coli* isolées d'infections nosocomiales et 2,3% des souches de *Klebsiella pneumoniae*.

Enfin, la proportion de résistance aux glycopeptides chez les entérocoques est, en 2012, de 4,1% pour *Enterococcus faecium* et de 0,6% pour *Enterococcus faecalis*. Les données montrent une diminution des pourcentages de résistance de 52,3% pour *Enterococcus faecium* (8,6% en 2006 contre 4,1% en 2012) et une diminution de 73,9% pour *Enterococcus faecalis* (2,3% en 2006 contre 0,6% en 2012). Les données du réseau EARS-Net mettent en évidence des évolutions comparables avec 56% de diminution pour *Enterococcus faecium* et des pourcentages de résistance très faible pour *Enterococcus faecalis* (de l'ordre de 0,1%).

Globalement, et ce quel que soit le couple bactérie-antibiotique étudié, les tendances produites par l'analyse des données des ENP de 2006 et 2012 sont donc très cohérentes avec celles issues d'autres sources de données.

### 3. Application thérapeutique de la phagothérapie

De nombreuses études sont actuellement menées sur les possibilités thérapeutiques qu'offre la phagothérapie. Elles s'intéressent pour la plupart à l'efficacité de un ou plusieurs phages (ou cocktail de phages) contre une souche bactérienne donnée. Ces études sont indispensables pour acquérir les connaissances suffisantes et nécessaires à l'établissement éventuel de protocoles thérapeutiques. Cependant, elles ne permettent pas d'avoir une vue d'ensemble des possibilités de la phagothérapie, ni de répondre à certaines questions essentielles : la phagothérapie peut-elle être utilisée efficacement contre tous types d'infection ? Les phages peuvent-ils être administrés par différentes voies ? Le cas échéant, quelles voies semblent être les plus efficaces ? La phagothérapie est-elle une approche thérapeutique dénuée de risques ? Quelle est l'influence des bactériophages sur différents marqueurs biologiques ?

Une étude très complète menée par l'Institut de Thérapie Expérimentale Immunologique (IET : Institute of Immunology and Experimental Therapy) Ludwik Hirszfeld, au laboratoire

bactériophage, à Wroclaw (Pologne), entre 2008 et 2012, permet d'obtenir des réponses à la plupart des questions posées (« Clinical aspect of phage therapy » extrait de « Advances in Virus Research », Volume 83, Ryszard Miedzybrodzki et al., 2012).

Cette étude regroupe 157 participants (ce qui correspond à une population de phase II d'essai clinique) qui sont, pour la plupart, dans une situation d'impasse thérapeutique. Elle évalue sur cette même population l'efficacité de la phagothérapie sur différentes infections bactériennes (dont certaines nous intéressent particulièrement, notamment les infections à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), la durée moyenne du traitement phagique, les différentes voies d'administration utilisées et leur efficacité respective, la tolérance clinique et l'impact des phages sur certains marqueurs biologiques. Enfin, elle permet d'envisager la phagothérapie comme un recours possible aux infections bactériennes résistantes aux antibiotiques.

Une analyse plus précise de cette étude est présentée ci-dessous.

Les figures 27 à 37 sont issues de cette étude (« Clinical aspect of phage therapy » extrait de « Advances in Virus Research », Volume 83, Ryszard Miedzybrodzki et al., 2012).

#### **a. Protocole thérapeutique et patients**

Cent cinquante-sept patients, dont 68 femmes et 89 hommes, ont été admis à l'unité de thérapie phagique (PTU : Phage Therapy Unit) entre janvier 2008 et décembre 2010 pour diverses infections résistantes aux traitements antibiotiques. Plusieurs cas de figure étaient possibles :

- Une infection causée par une bactérie multirésistante.
- Une infection persistante malgré un traitement par des antibiotiques adaptés, lorsque de l'avis de spécialiste, l'antibiothérapie était inefficace ou ne permettait l'évolution escomptée.
- L'impossibilité d'utiliser l'antibiotique de choix, de par une contre-indication absolue.

Seuls les patients âgés de plus de 18 ans qui ont signé un consentement écrit pouvaient recevoir le traitement phagique. Un prérequis indispensable au traitement était la sensibilité de la bactérie, isolée depuis le site de l'infection, à au moins un phage de la collection de l'Institut de Thérapie Immunologique et Expérimental. Les patients exclus du protocole de

thérapie phagique étaient les patients allergiques à un ou plusieurs composants de la préparation, les patients ayant des allergies à des protéines animales ou alimentaires, les femmes enceintes et allaitantes, les patients ayant des syndromes de malabsorption et les insuffisants hépatiques sévères. Au total, 157 patients ont été inclus et 447 patients ont été exclus du protocole de thérapie phagique, au cours de la période janvier 2008 à décembre 2010.

Les patients inclus dans l'étude souffraient de diverses infections : infections génitales et urinaires, infections des tissus mous, infections orthopédiques et infections de l'arbre respiratoire. Les agents en cause de l'infection étaient là encore différents. En majorité, il y avait une monoinfection à *Staphylococcus aureus* (76 patients, dont 7 infections par SARM), puis des infections à *Enterococcus faecalis* (17 patients) et *Escherichia coli* (15 patients) et enfin des infections à *Pseudomonas aeruginosa* (13 patients). Des polyinfections, définies par la présence d'au moins deux bactéries pathogènes avant le début de la thérapie phagique ou par l'apparition de nouveaux pathogènes entre les cycles d'administration de phages, étaient également traitées. Parmi ces polyinfections, on retrouvait notamment une co-infection par *Enterococcus faecalis* et *Escherichia coli* (9 patients).

Les préparations phagiques dirigés contre *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Salmonella* et *Stenotrophomonas* (obtenues selon les méthodes et standards mentionnés dans la partie III.8) ont été administrées par voie topique, orale, intrarectale, intravaginale ou par inhalation d'aérosols. Chez certains patients, des combinaisons associant voie orale et topique ou voie intrarectale et topique ont été utilisées.

La voie topique inclut des préparations phagiques, administrées deux fois par jour en gargarisme, en gouttes auriculaires, en gouttes ophtalmiques, en bain de siège, en irrigation (vaginale, d'un abcès, d'une fistule) ou par des compresses humidifiées de préparations phagiques.

Par voie orale, l'administration de 10 à 20 mL de préparations phagiques trois fois par jour se fait au moins 30 minutes avant les repas. Dix millilitres d'une suspension orale de carbonate sodique de dihydroxyaluminium, titrée à 68 mg/mL, sont administrés environ 20 minutes avant la préparation phagique, en vue de protéger les virions de l'inactivation par les sucs gastriques.



Par voie rectale, les préparations phagiques sont administrées à une posologie de 10 à 20 mL deux fois par jour.

La durée maximale cumulée du traitement phagique est de 12 semaines. Cependant, le traitement peut être prolongé de 12 semaines supplémentaires en cas d'infection persistante malgré une bonne réponse au traitement. L'interruption du traitement par phages est possible en cas de raisons le justifiant (par exemple, si une nouvelle préparation phagique, plus adaptée et efficace, est nécessaire). Si ces interruptions durent plus de 4 semaines, le traitement phagique est alors divisé en cycles. Dans le cas d'une infection récidivante, une nouvelle thérapie phagique peut être menée, à condition de respecter un arrêt de minimum 4 mois.

Le traitement peut être interrompu dans plusieurs autres cas : si le patient revient sur son consentement, si un effet indésirable sérieux imputable à la thérapie phagique apparaît, si, de l'avis du patient et/ou du praticien, la thérapie phagique n'a pas une efficacité suffisante ou si la poursuite du traitement fait craindre au praticien un risque pour la santé de son patient.

La détermination de la sensibilité de la souche bactérienne isolée sur le site de l'infection aux phages de la collection de l'IJET est menée par la technique d'Adam (1959) (méthode de la double couche). Pour chaque patient, seules des préparations contenant des phages lytiques dirigés contre la souche bactérienne isolée sont utilisées. Cette propriété des phages est préalablement vérifiée par l'observation de plages claires (plages de lyse) lorsqu'ils sont ensemencés sur les colonies bactériennes en question. Parmi les phages actifs de la collection, celui présentant la meilleure activité est sélectionné pour le traitement. Les préparations phagiques administrées contiennent seulement une lignée virale.

Dans le cas d'une co-infection à deux souches bactériennes, il est alors possible de préparer des phages dirigés contre chacune des deux souches isolées. Le patient prend alors alternativement les préparations monophagiques. Enfin, l'administration concomitante d'antibiotiques dirigés contre la bactérie pathogène, ainsi que d'autres traitements liés aux pathologies du patient, est autorisée.

## **b. Méthode d'évaluation de l'efficacité de la thérapie phagique**

L'efficacité de la thérapie phagique est évaluée par le praticien en s'appuyant sur les résultats des tests de contrôle microbiologique, notamment les cultures bactériennes, sur des dosages de contrôle, sur l'estimation de l'intensité des symptômes infectieux et d'après les avis des



spécialistes médicaux. Les résultats de la thérapie phagique sont classés selon sept principales catégories :

- A : L'éradication du pathogène (confirmée par les résultats des cultures bactériennes) et/ou le rétablissement du patient (confirmé par la guérison de la plaie ou la disparition totale des symptômes infectieux).
- B : De bons résultats cliniques : une disparition presque totale des symptômes infectieux confirmée par les résultats des tests laboratoires et associée à une amélioration de la condition générale du patient à la fin de la thérapie phagique.
- C : L'amélioration clinique : une réduction de l'intensité d'une partie des symptômes de l'infection, à un niveau jamais atteint avant le traitement, à la fin de la thérapie phagique ou à la fin d'un cycle de traitement.
- D : L'amélioration cliniquement discutable : une réduction de l'intensité d'une partie des symptômes de l'infection est observée mais est très modérée (une intensité similaire pouvait être atteinte avant la thérapie phagique ou entre les cycles de thérapie phagique), si bien que l'impact de la phagothérapie ne peut être clairement établi.
- E : L'amélioration clinique transitoire : une réduction de l'intensité de certains symptômes de l'infection observée seulement durant l'administration des préparations phagiques mais qui ne dure pas à la fin du traitement.
- F : L'absence de réponse au traitement phagique.
- G : La détérioration clinique : une exacerbation des symptômes de l'infection à la fin de la thérapie phagique.

En résumé, les catégories A à C peuvent être considérées comme une réponse satisfaisante à la thérapie phagique et les catégories D à G comme une réponse insuffisante à la thérapie phagique (dans la partie IV.3.e cette répartition des catégories en « réponse satisfaisante » et « réponse insuffisante » est discutée, notamment pour la catégorie E). Dans les cas où la thérapie est menée par cycles, l'évaluation des effets cliniques du traitement est faite à l'issue de chaque cycle thérapeutique. Des échantillons sont prélevés au moins une fois avant chaque cycle, chez tous les patients, pour effectuer des tests bactériologiques. Des échantillons contrôles de culture bactérienne et de lysotypie sont systématiquement réalisés lorsque des signes de surinfection sont observés ou que les résultats de la thérapie ne sont pas satisfaisants

du point de vue du praticien. Là encore ces échantillons sont prélevés entre les cycles de thérapie phagique ou à la fin du traitement.

La durée cumulée du traitement est calculée en additionnant le nombre de jours durant lesquels les phages sont administrés au patient, indépendamment de la dose du traitement ainsi que de la voie d'administration. Pour évaluer l'influence de la voie d'administration sur l'efficacité de la thérapie phagique, les traitements par application vaginale et par inhalation sont analysés séparément des autres administrations par voie topique.

Les changements de concentration sérique de protéine C-réactive, de la vitesse de sédimentation érythrocytaire et du nombre de globules blancs sont évalués à deux périodes de la thérapie phagique : tôt après le début du traitement (entre les jours 5 à 8) et plus tard (entre les jours 9 à 32 du traitement). Les paramètres hématologiques et biochimiques sont étudiés à quatre périodes de la thérapie : entre 3 et 6 jours, puis entre 7 et 20 jours, entre 21 et 48 jours et enfin entre 49 et 84 jours de thérapie cumulée. La moyenne des résultats obtenus durant ces périodes d'analyse est ensuite calculée. Les résultats des tests réalisés juste avant la thérapie phagique servent de valeurs témoins.

### **c. Evaluation générale des résultats de la thérapie phagique**

L'analyse de l'efficacité du traitement phagique se base sur 153 patients. L'observation clinique n'a pas été possible chez 4 patients (sur les 157 patients de départ) puisque le protocole de thérapie phagique a dû être interrompu. Les caractéristiques détaillées de l'efficacité de la thérapie phagique sont données par le tableau suivant (figure 27).

L'analyse de cette figure montre qu'une bonne réponse au traitement phagique est observée chez 61 patients, soit 39,9%. En particulier, l'éradication du germe pathogène ou le rétablissement du patient est obtenu chez 28 patients, soit 18,3%. Cependant, une réponse insuffisante au traitement est rapportée chez 98 patients, soit 60,1%.

Il n'y a pas de différence significative en ce qui concerne l'efficacité de la thérapie phagique entre les femmes et les hommes (données non rapportées dans le tableau). De plus, la comparaison des résultats obtenus entre les patients ayant une monoinfection (123 patients) et ceux ayant une polyinfection (30 patients), ne révèle pas de différence significative d'efficacité de la thérapie phagique, que ce soit en termes de pourcentage de bonnes réponses

au traitement, ou de taux d'éradication du germe pathogène ou encore de rétablissement du patient.

L'efficacité de la thérapie phagique a également été comparée entre les patients diabétiques (12 patients) et non diabétiques (141 patient). Là encore, aucune différence significative n'a été montrée entre ces deux groupes, que ce soit en termes de pourcentage de bonnes réponses au traitement (respectivement 50% chez les patients diabétiques et 39,1% chez les patients non diabétiques) ou d'éradication du germe pathogène et/ou rétablissement du patient (respectivement 16,7% et 18,4%). (Ces données ne figurent pas dans le tableau).

Les préparations phagiques qui ont été les plus administrées sont celles ayant des phages dirigés sélectivement contre *Staphylococcus* (51,6%), *Enterococcus* (11,1%), *Escherichia coli* (11,1%) et *Pseudomonas* (9,8%). L'efficacité de la thérapie phagique varie considérablement selon le type de préparation (figure 28). Le plus important pourcentage de bonnes réponses au traitement (64,7%), ainsi que le plus haut taux d'éradication du germe pathogène et/ou rétablissement du patient (47,1%) sont obtenus avec les phages dirigés contre *Enterococcus*. Leur efficacité thérapeutique est significativement plus élevée que celle des phages dirigés contre *Staphylococcus* (36,7% de bonnes réponses à la thérapie phagique,  $p = 0,035$ ) et que celle des phages dirigés contre *Pseudomonas* (20% de bonnes réponses,  $p = 0,029$ ).

Figure 27 : Evaluation générale des résultats de la thérapie phagique

Category of response to treatment <sup>a</sup>	General evaluation <sup>b</sup> (n = 153)		Type of infection				Use of antibacterials			
			Monoinfection (n = 123)		Polyinfection <sup>c</sup> (n = 30)		No antibacterials (n = 109)		Antibacterial <sup>d</sup> used during PT (n = 44)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	28	18.3	22	17.9	6	20.0	22	20.2	6	13.6
B - good clinical result	13	8.5	11	8.9	2	6.7	7	6.4	6	13.6
C - clinical improvement	20	13.1	14	11.4	6	20.0	15	13.8	5	11.4
D - questionable clinical improvement	10	6.5	8	6.5	2	6.7	8	7.3	2	4.6
E - transient clinical improvement	33	21.6	27	22.0	6	20.0	22	20.2	11	25.0
F - no response to treatment	39	25.5	32	26.0	7	23.3	28	25.7	11	25.0
G - clinical deterioration	10	6.5	9	7.3	1	3.3	7	6.4	3	6.8
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>61</b>	<b>39.9</b>	<b>47</b>	<b>38.2</b>	<b>14</b>	<b>46.7</b>	<b>44</b>	<b>40.4</b>	<b>17</b>	<b>38.6</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>92</b>	<b>60.1</b>	<b>76</b>	<b>61.8</b>	<b>16</b>	<b>53.3</b>	<b>65</b>	<b>59.6</b>	<b>27</b>	<b>61.4</b>

L'évaluation générale de la phagothérapie montre une réponse satisfaisante chez 61 patients, avec une éradication du pathogène/rétablissement complet du patient chez 28 sujets, de bons résultats cliniques chez 13 sujets et une amélioration clinique chez 20 patients. Au contraire, une réponse insuffisante est observée chez 92 patients : 10 patients ont une amélioration clinique discutable, 33 patients présentent une amélioration clinique transitoire, 39 patients n'ont pas de réponse au traitement et 10 patients voient leur état clinique se détériorer.

Il n'y a pas de différences significatives entre les patients ayant une mono-infection (123 patients) et ceux ayant une polyinfection (30 patients) en ce qui concerne les bonnes réponses au traitement phagique (respectivement 38,2% et 46,7% de bonnes réponses) et les réponses insuffisantes (respectivement 61,8% et 53,3% de réponses insuffisantes). A noter que les patients polyinfectés sont définis par la présence d'au moins deux bactéries pathogènes différentes avant le début de la thérapie phagique, ou par l'apparition d'un nouveau pathogène entre deux cycles de thérapie phagique. De manière plus détaillée, aucune des sept catégories (de A à G) ne révèle des modifications statistiquement significatives.

Enfin, parmi les 109 patients traités seulement par phages, il y a 40,4% de bonnes réponses au traitement (44 patients) et 59,6% de réponses inadéquates (65 patients). Lorsque la phagothérapie est associée à d'autres antibactériens (antiseptiques et/ou antibiotiques) (44 patients), une bonne réponse est observée dans 38,6% des cas (17 patients) et une réponse inadéquate dans 61,4% (27 patients). En conclusion, l'administration conjointe d'antibactérien n'impacte pas (n'augmente notamment pas) l'efficacité du traitement phagique. De même, aucune des sept catégories ne montre des différences statistiquement significatives entre les patients traités uniquement par phages et ceux traités par phages et antibactériens.

Figure 28 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique en fonction des principales préparations phagiques utilisées

Category of response to treatment	Staphylococcal phage preparations (n = 79)		Enterococcal phage preparations (n = 17)		<i>E. coli</i> phage preparations (n = 17)		<i>Pseudomonas</i> phage preparations (n = 15)	
	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	12	15.2	8	47.1	2	11.8	1	6.7
B - good clinical result	7	8.9	2	11.8	1	5.9	1	6.7
C - clinical improvement	10	12.7	1	5.9	3	17.6	1	6.7
D - questionable clinical improvement	6	7.6	0	0.0	0	0.0	1	6.7
E - transient clinical improvement	18	22.8	0	0.0	6	35.3	6	40.0
F - no response to treatment	20	25.3	6	35.3	5	29.4	2	13.3
G - clinical deterioration	6	7.6	0	0.0	0	0.0	3	20.0
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>29</b>	<b>36.7</b>	<b>11</b>	<b>64.7</b>	<b>6</b>	<b>35.3</b>	<b>3</b>	<b>20.0</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>50</b>	<b>63.3</b>	<b>6</b>	<b>35.3</b>	<b>11</b>	<b>64.7</b>	<b>12</b>	<b>80.0</b>

Des préparations phagiques dirigées contre les Entérocoques ont été utilisées chez 17 patients, avec de bonnes réponses pour 11 d’entre eux et des réponses insuffisantes chez 6 patients. En particulier, on retrouve une éradication du pathogène et/ou rétablissement complet chez 8 patients, de bons résultats cliniques chez 2 patients, une amélioration clinique chez un patient et une absence de réponse à la phagothérapie chez 6 patients. Ces préparations ont été les plus efficaces. Les préparations phagiques dirigées contre *Escherichia coli* (11 patients) ont amené des réponses satisfaisantes chez 6 patients avec en particulier une éradication du pathogène et/ou un rétablissement pour 2 d’entre eux. Les réponses insuffisantes (11 patients) comportent des améliorations cliniques transitoires (6 patients) et des absences de réponse au traitement (5 patients). Les chiffres rapportés pour les préparations dirigées contre les staphylocoques (79 patients) sont proches. De bonnes réponses à la phagothérapie ont été observées chez 29 patients avec notamment une éradication du pathogène et/ou rétablissement chez 12 patients, de bons résultats cliniques chez 7 patients et une amélioration clinique chez 10 patients. Les réponses non satisfaisantes (50 patients) mettent en évidence une amélioration clinique transitoire chez 18 sujets, une absence de réponse à la phagothérapie chez 20 sujets et une détérioration clinique chez 6 sujets. Enfin, les moins bons résultats reviennent aux préparations phagiques dirigées contre *Pseudomonas* (15 patients). En effet, il y a seulement 3 patients qui présentent de bonnes réponses à la phagothérapie, dont une éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient. Les réponses insuffisantes (12 patients) sont principalement représentées par des améliorations cliniques transitoires (6 patients). Mais, il faut également souligner une absence de réponse au traitement chez 2 patients et une détérioration clinique chez 3 patients.

Une question importante est de savoir si la voie d’administration des préparations influence l’efficacité du traitement. Le tableau suivant (figure 29) présente les résultats obtenus avec les différentes voies d’administration, ainsi qu’avec l’association de plusieurs de ces voies (si au moins 3 patients ont reçu le traitement avec cette association).

Le plus important pourcentage de bonnes réponses au traitement a été trouvé chez les patients recevant le traitement par voie orale (72,2% de bonnes réponses), tandis que le taux le plus élevé d'éradication du germe pathogène et/ou rétablissement du patient a été observé chez les patients recevant le traitement par voie intrarectale (44%). La différence d'efficacité de la thérapie entre les patients recevant le traitement par voie orale et ceux recevant le traitement par voie topique (28,6% de bonnes réponses) est statistiquement significative ( $p = 0,012$ ). De plus, l'administration intrarectale des préparations phagiques et l'association d'administration par voie orale et topique sont significativement plus efficaces que la voie topique seule (respectivement  $p = 0,026$  et  $p = 0,0312$ ).

Chez 44 patients du protocole (28,8%), la thérapie phagique a été utilisée en association à d'autres agents antibactériens, que ce soit simultanément ou entre les cycles d'administration phagique. Les agents utilisés regroupent des antibiotiques (41 patients), des désinfectants (9 patients) et/ou des produits à base de plantes utilisées lors de certaines infections (4 patients). Ces agents peuvent être utilisés séparément ou en association. Dans la majorité des cas, ils sont administrés en continuité de l'antibiothérapie, débutée avant la thérapie phagique, ou pendant la thérapie phagique à cause de l'aggravation des symptômes de l'infection (25 cas). Chez d'autres sujets, ils ont été administrés suite à l'apparition d'une nouvelle infection non relative à la thérapie phagique (7 patients), pour pallier au manque de phage lytique dirigé contre un ou plusieurs germes pathogènes chez des patients ayant une polyinfection (5 patients), lors d'une surinfection développée au cours de la thérapie phagique (5 patients), ou lors de l'aggravation des symptômes de l'infection entre les cycles de thérapie phagique (2 patients). La comparaison de l'efficacité de la thérapie phagique chez les patients traités uniquement par phages et ceux recevant une association phage/agent antibactérien ne montre pas de différences significatives. En effet, on retrouve 40,9% de bonnes réponses au traitement chez les patients traités par phages et 38,6% chez ceux recevant l'association phages/agents antibactériens. Le taux d'éradication du pathogène est même plus élevé chez les patients traités par phages seuls que chez les patients traités par l'association phages/agents antibactériens (13,6%). Cependant, la différence entre les deux groupes n'est pas statistiquement significative. En apparence donc, l'utilisation d'agents antibactériens par les patients durant la thérapie phagique n'a pas influencé le résultat de la thérapie.



Figure 29 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique en fonction de la voie d'administration des préparations

Category of response to treatment	Topical (n = 70)		Oral (n = 11)		Oral/ topical <sup>b</sup> (n = 22)		Rectal (n = 18)		Rectal/ topical <sup>b</sup> (n = 14)		Vaginal (n = 6)		Inhalations of aerosol (n = 3)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	9	12.9	3	27.3	4	18.2	8	44.4	3	21.4	1	16.7	0	0.0
B - good clinical result	5	7.1	4	36.4	1	4.5	1	5.6	1	7.1	0	0.0	1	33.3
C - clinical improvement	6	8.6	1	9.1	7	31.8	1	5.6	1	7.1	2	33.3	0	0.0
D - questionable clinical improvement	5	7.1	0	0.0	2	9.1	0	0.0	2	14.3	0	0.0	1	33.3
E - transient clinical improvement	19	27.1	1	9.1	4	18.2	2	11.1	2	14.3	1	16.7	0	0.0
F - no response to treatment	18	25.7	2	18.2	4	18.2	6	33.3	5	35.7	2	33.3	0	0.0
G - clinical deterioration	8	11.4	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	33.3
<b>Good response (total A-C):</b>	<b>20</b>	<b>28.6</b>	<b>8</b>	<b>72.7</b>	<b>12</b>	<b>54.5</b>	<b>10</b>	<b>55.6</b>	<b>5</b>	<b>35.7</b>	<b>3</b>	<b>50.0</b>	<b>1</b>	<b>33.3</b>
<b>Inadequate response (total D-G):</b>	<b>50</b>	<b>71.4</b>	<b>3</b>	<b>27.3</b>	<b>10</b>	<b>45.5</b>	<b>8</b>	<b>44.4</b>	<b>9</b>	<b>64.3</b>	<b>3</b>	<b>50.0</b>	<b>2</b>	<b>66.7</b>

Le tableau présente les voies d'administration de la phagothérapie, ou leurs associations, utilisées chez au moins 3 patients. Dans le cas d'associations, les voies d'administration peuvent être utilisées de manière concomitante ou consécutive. La voie orale seule (11 patients) permet d'obtenir le meilleur pourcentage de bonnes réponses au traitement phagique (8 patients soit 72,7%), avec en particulier 3 patients chez qui une éradication du pathogène et/ou rétablissement a été possible et 4 patients pour lesquels de bons résultats cliniques ont été obtenus. La voie rectale seule (18 patients) permet également d'obtenir de bonnes réponses (10 patients, soit 55,6%), avec notamment 8 cas d'éradication du pathogène et/ou rétablissement complet. Les cas de réponses insuffisantes (8 patients soit 44,4%) sont principalement représentés par des absences de réponse au traitement (6 patients). L'association des voies orales et topiques (22 patients) est génératrice de bonnes réponses chez 12 patients (54,5%) : une éradication du pathogène et/ou rétablissement complet chez 4 patients et une amélioration clinique chez 7 patients. Les 10 patients pour lesquels la réponse au traitement a été insuffisante regroupent des améliorations cliniques transitoires (4 patients), des améliorations cliniques discutables (2 patients) et une absence de réponse à la phagothérapie (4 patients). La voie vaginale (6 patients) présente autant de bonnes réponses au traitement que de réponses inadéquates. L'association des voies rectales et topiques (14 patients) entraîne des résultats contrastés : 35,7% de bonnes réponses, dont 21,4% d'éradication du pathogène et/ou rétablissement complet, mais 64,3% de réponses inadéquates, dont 35,7% d'absence de réponse au traitement.

La voie topique a été largement utilisée (70 patients) mais n'a pas montré une grande efficacité : 28,6% de bonnes réponses (20 patients) contre 71,4% de réponses inadéquates (50 patients). En particulier, une éradication du pathogène et/ou rétablissement complet a été observée chez 9 patients, mais les améliorations cliniques transitoires (19 patients), les absences de réponse au traitement (18 patients) et surtout les détériorations cliniques (8 patients) ont été fréquentes.

La voie pulmonaire est difficile à juger parce que l'inhalation d'aérosols a été utilisée chez 3 patients seulement. A noter, un bon résultat clinique mais, a *contrario*, une détérioration de l'état clinique d'un patient.

Une autre question importante est de savoir s'il existe une corrélation entre la durée de la thérapie phagique et son efficacité. L'analyse se base sur 149 patients, chez qui la date de la dernière administration de phages est connue. La durée cumulée du traitement (somme des jours où le traitement a été administré) varie considérablement selon les résultats de la thérapie phagique, l'apparition d'effets indésirables et la voie d'administration employée. La durée cumulative moyenne du traitement est de 55 jours. La durée minimale du traitement est de 3 jours et la durée maximale est de 328 jours. D'après les données obtenues, il n'y a pas de corrélation significative entre la durée du traitement et son efficacité (figure 30).

Figure 30 : Durée cumulée du traitement phagique

Category of the response to treatment	No. of patients	Median (days)	Minimum (days)	Maximum (days)
A - pathogen eradication and/or recovery	27	43.0	6	165
B - good clinical result	13	71.0	21	165
C - clinical improvement	19	87.0	12	209
D - questionable clinical improvement	10	68.5	14	161
E - transient clinical improvement	33	63.0	16	328
F - no response to treatment	37	46.0	4	144
G - clinical deterioration	10	34.5	3	89
Total:	149	55.0	3	328

L'éradication du pathogène et/ou le rétablissement complet, obtenue chez 27 patients, s'opère en moyenne plus rapidement que les bons résultats cliniques (catégorie B) et l'amélioration clinique (catégorie C) (respectivement 43 jours en moyenne, contre 71 jours et 87 jours). De la même manière, le nombre minimum de jours pour obtenir ces réponses est plus court dans le cas d'éradication du pathogène (6 jours) que dans le cas d'un bon résultat clinique (21 jours) ou de l'amélioration clinique (12 jours). Parallèlement, et de manière assez prévisible, l'absence de réponse au traitement et la détérioration clinique sont les plus rapides des réponses insuffisantes (respectivement 46 jours et 34,5 jours en moyenne). Les améliorations cliniques discutables et transitoires sont des réponses plus lentes à se mettre en place et relativement proches en durées moyennes (68,5 jours et 63 jours en moyenne). Enfin, la durée globale moyenne du protocole phagique est de 55 jours. La durée minimale du traitement est de 3 jours (elle correspond à une détérioration clinique) et la durée maximale est de 328 jours (elle correspond à une amélioration clinique transitoire).



Il n'y a pas de différences significatives en ce qui concerne les durées cumulées de traitement des six types d'infections traitées (infections génitales et urinaires de l'homme, infections génitales et urinaires de la femme, infections des tissus mous, infections cutanées, infections orthopédiques et infections respiratoires) présentées dans la figure 31 (Partie IV.III d). Les durées moyennes des traitements cumulés vont de 43,5 jours à 66 jours.

#### **d. Evaluation détaillée de la phagothérapie**

Une analyse comparative des résultats obtenus chez 152 patients est réalisée en fonction du type d'infection contractée. Les infections sont réparties en 6 catégories (figure 31) : infections génitales et urinaires de l'homme (29 patients), infections génitales et urinaires de la femme (22 patientes), infections des tissus mous (30 patients), infections cutanées (10 patients), infections orthopédiques (37 patients) et infections respiratoires (24 patients). Un patient souffrant de bactériémie récurrente à *Enterococcus faecalis* est exclu (car il n'entre dans aucune des six catégories du tableau). Il est traité par des phages dirigés contre Entérocoques par voie orale et par antibiotiques. Une bonne réponse au traitement est obtenue.

Une bonne réponse à la thérapie phagique a été obtenue chez 48,3% des hommes ayant une infection génitale ou urinaire, 45,9% des patients ayant une infection orthopédique, 36,7% des patients ayant une infection des tissus mous, 36,4% des femmes ayant une infection génitale ou urinaire, 30% des patients ayant une infection cutanée et 29,2% des patients avec une infection de l'arbre respiratoire. Cependant, les différences d'efficacité des traitements phagiques en fonction du type d'infections ne sont pas statistiquement significatives.

Le plus haut taux d'éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient est obtenu chez les hommes ayant une infection génitale ou urinaire (37,9%). Cette valeur est très largement supérieure au taux d'éradication du pathogène et/ou rétablissement des patients ayant une infection de l'arbre respiratoire ou une infection cutanée (respectivement 8,3% et 0%). La différence est cette fois statistiquement significative (respectivement  $p = 0,01$  et  $p = 0,021$ ).

Figure 31 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique en fonction du type d'infection des patients

Category of response to treatment	Genital and urinary tract infections in men <sup>a</sup> (n = 29)		Genital and urinary tract infections in women <sup>b</sup> (n = 22)		Soft tissue infections <sup>c</sup> (n = 30)		Skin infections <sup>d</sup> (n = 10)		Orthopedic infections <sup>e</sup> (n = 37)		Respiratory tract infections <sup>f</sup> (n = 24)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	11	37.9	3	13.6	5	16.7	0	0.0	7	18.9	2	8.3
B - good clinical result	2	6.9	0	0.0	2	6.7	2	20.0	3	8.1	3	12.5
C - clinical improvement	1	3.4	5	22.7	4	13.3	1	10.0	7	18.9	2	8.3
D - questionable clinical improvement	2	6.9	0	0.0	2	6.7	0	0.0	3	8.1	3	12.5
E - transient clinical improvement	5	17.2	4	18.2	8	26.7	5	50.0	8	21.6	3	12.5
F - no response to treatment	8	27.6	10	45.5	6	20.0	1	10.0	7	18.9	7	29.2
G - clinical deterioration	0	0.0	0	0.0	3	10.0	1	10.0	2	5.4	4	16.7
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>14</b>	<b>48.3</b>	<b>8</b>	<b>36.4</b>	<b>11</b>	<b>36.7</b>	<b>3</b>	<b>30.0</b>	<b>17</b>	<b>45.9</b>	<b>7</b>	<b>29.2</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>15</b>	<b>51.7</b>	<b>14</b>	<b>63.6</b>	<b>19</b>	<b>63.3</b>	<b>7</b>	<b>70.0</b>	<b>20</b>	<b>54.1</b>	<b>17</b>	<b>70.8</b>

Les hommes atteints d'infections génitales et urinaires (29 patients) regroupent 13 cas de prostatite bactérienne chronique, 10 cas d'infections urinaires et 6 cas de prostatite chronique associée à une infection urinaire. Cette catégorie répond de manière positive au traitement dans 48,3% des cas, dont 37,9% d'éradication du pathogène et/ou rétablissement complet. Les réponses inadéquates (51,7%) sont majoritairement une absence de réponse au traitement (27,6%) et une amélioration clinique transitoire (17,2%).

Les femmes atteintes d'infections génitales et urinaires (22 patientes) regroupent 14 cas d'infection urinaire, 3 cas d'infection vaginale et 5 cas d'infection urinaire associée à une infection vaginale. Les bonnes réponses au traitement (8 patientes) sont matérialisées par 3 cas d'éradication du pathogène et 5 cas d'amélioration clinique. Les réponses inadéquates (63,6%) sont constituées par 4 patientes ayant une amélioration clinique transitoire et 10 patientes ne répondant pas au traitement.

Les infections des tissus mous (30 cas) regroupent des infections post-opératoires (6 patients), des ulcères de la jambe (8 cas), des abcès et phlegmon (5 cas) et des infections des tissus profonds (11 cas). Les bonnes réponses au traitement (36,7%) se manifestent principalement par une éradication du pathogène (5 patients) et une amélioration clinique (4 patients). Les réponses insuffisantes (19 patients) sont liées à une amélioration clinique transitoire (8 patients), à une absence de réponse au traitement (6 patients) et à une détérioration clinique (3 patients).

Les infections cutanées (10 patients) regroupent des infections auriculaires externes (3 patients), des infections locales (3 patients), une dermatite atopique compliquée par une infection staphylococcique (1 patient), un cas d'acné, un cas d'eczéma surinfecté et un cas de furonculose. De bons résultats cliniques sont obtenus chez 3 patients seulement. Cependant, les réponses inadéquates sont majoritairement représentées par des améliorations cliniques transitoires (5 patients). A noter, une absence de réponse au traitement chez un patient et une détérioration clinique chez un autre patient.

Les infections orthopédiques (37 patients) regroupent les infections des prothèses articulaires (8 patients), les ostéomyélites (21 patients), les infections articulaires (5 patients), l'association d'ostéomyélite et d'infection articulaire (2 patient) et une discite (1 patient). Les réponses favorables au traitement sont obtenus chez 17 patients dont 7 cas d'éradication du pathogène et/ou rétablissement complet. Les réponses inadéquates (20 patients) sont dominées par les améliorations cliniques

transitoires (8 patients) et l'absence de réponse au traitement (7 patients). Il faut souligner 2 cas de détérioration clinique lors du traitement.

Enfin, les infections respiratoires (24 patients) regroupent des infections de l'arbre respiratoire supérieur (17 patients), des infections de l'arbre respiratoire inférieur (4 patients) et 3 cas d'infections mixtes. Les réponses au traitement sont moyennes dans l'ensemble : 7 cas d'amélioration clinique et 17 cas de réponses défavorables dont 7 cas d'absence de réponse au traitement et 4 cas de détérioration clinique.

Une analyse séparée a été menée pour chacune des six types d'infections décrites dans le tableau précédent. Il s'agit d'évaluer l'influence de la voie d'administration des préparations et du type de phages utilisés sur l'efficacité de la thérapie phagique.

Le groupe de patients atteints d'infection orthopédique est composé de 37 sujets (figure 32). Dans ce groupe, la fréquence de bonnes réponses au traitement est significativement plus importante chez les patients ayant reçu le traitement par voie orale (4 patients soit 100%) ou par l'association voie orale/voie topique (6 patients soit 75%) que chez ceux recevant le traitement uniquement par voie topique (7 patients soit 28% ; respectivement  $p = 0,026$  et  $p = 0,014$ ). Par contre, il n'y a pas de différences significatives en ce qui concerne le taux d'éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient entre les trois voies d'administration.

La majorité des patients atteints d'infection orthopédique a reçu un traitement par phages dirigés contre *Staphylococcus* (34 patients). Une bonne réponse au traitement a été obtenue chez 16 patients (47,1%). Les autres types de préparations phagiques utilisées ont été efficaces chez 33,3% des patients (3 patients).

Figure 32 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez les patients ayant une infection orthopédique

Category of response to treatment	Way of administration of the phage preparation						Type of phage preparations applied			
	Topical <sup>a</sup> (n = 25)		Oral/topical <sup>a</sup> (n = 8)		Oral (n = 4)		Staphylococcal (n = 34)		Other <sup>b</sup> (n = 3)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	3	12.0	2	25.0	2	50.0	7	20.6	0	0.0
B - good clinical result	1	4.0	0	0.0	2	50.0	3	8.8	0	0.0
C - clinical improvement	3	12.0	4	50.0	0	0.0	6	17.6	1	33.3
D - questionable clinical improvement	3	12.0	0	0.0	0	0.0	3	8.8	0	0.0
E - transient clinical improvement	6	24.0	2	25.0	0	0.0	6	17.6	2	66.7
F - no response to treatment	7	28.0	0	0.0	0	0.0	7	20.6	0	0.0
G - clinical deterioration	2	8.0	0	0.0	0	0.0	2	5.9	0	0.0
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>7</b>	<b>28.0</b>	<b>6</b>	<b>75.0</b>	<b>4</b>	<b>100.0</b>	<b>16</b>	<b>47.1</b>	<b>1</b>	<b>33.3</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>18</b>	<b>72.0</b>	<b>2</b>	<b>25.0</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	<b>18</b>	<b>52.9</b>	<b>2</b>	<b>66.7</b>

La voie topique a été la plus largement utilisée (25 patients). Elle comporte l'application de compresses imprégnées de phages et/ou des irrigations (notamment fistulaires). Les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants chez 18 patients. En particulier, 7 patients n'ont pas répondu au traitement et 2 patients ont vu leur état clinique se détériorer. Parmi les bonnes réponses au traitement (7 patients), il y a 3 cas d'éradication du pathogène et/ou rétablissement complet.

L'association des voies orales et topiques (8 patients) entraîne des réponses satisfaisantes chez 6 patients dont 2 cas d'éradication du pathogène. Il faut également remarquer que les 2 réponses insuffisantes sont des cas d'amélioration clinique transitoire ; aucune absence de réponse au traitement ou détérioration clinique ne sont rapportées.

La voie orale seule (4 patients seulement) est, a priori, la plus efficace : 100% de bonnes réponses, dont 50% d'éradication de pathogène et/ou rétablissement complet. Cependant, le nombre de patients, très faible, ne permet pas de tirer de conclusion solide.

Les préparations phagiques dirigées contre les staphylocoques (34 patients) entraînent des bonnes réponses chez 16 patients, dont une éradication du pathogène et/ou rétablissement complet chez 7 d'entre eux. Parmi les réponses inadéquates (18 patients), on retrouve principalement une absence de réponse au traitement (7 patients) et une amélioration clinique transitoire (6 patients). Il faut également souligner que les 2 patients qui ont vu leur état clinique se détériorer utilisent des préparations dirigées contre *Staphylococcus*.

Enfin, d'autres préparations phagiques ont été administrées (3 patients) : 2 sont dirigées contre *Pseudomonas* et 1 est dirigée contre *Enterobacter*. Les résultats mettent en évidence un cas d'amélioration clinique et deux cas d'amélioration clinique transitoire.

Des résultats intéressants sont obtenus en comparant la thérapie phagique entre deux groupes de patients ayant une infection orthopédique. Le premier groupe inclut les patients ayant reçu le traitement phagique par voie orale seule ou par voie orale et topique (12 patients). Le second groupe est composé des patients ayant reçu le traitement uniquement par voie topique (25 patients). Les deux groupes sont statistiquement comparables ( $p > 0,05$ ) du point de vue du sexe (respectivement 25% et 24% de femmes dans les groupes 1 et 2), de l'âge moyen (respectivement 61 et 53 ans), du temps cumulé de traitement (respectivement 53 et 70 jours), de l'utilisation d'agents antimicrobiens (respectivement 25% et 24%) et du pourcentage de mono-infections à *Staphylococcus aureus* (respectivement 91,7% et 92%). La durée moyenne de l'infection est respectivement de 18 et 36 mois, mais cette différence n'est pas significative du point de vue statistique. Les auteurs ont observé une fréquence significativement supérieure de bonnes réponses au traitement chez les patients du groupe 1 (83,3%) que chez ceux du groupe 2 (28%) ( $p = 0,005$ ). Il y a également une différence significative lorsque les patients sont traités uniquement par phages ( $p = 0,006$ ). Dans ce cas, une bonne réponse au traitement a été obtenue chez 58,3% des patients du groupe 1 (8 patients) et chez seulement 20% des patients du groupe 2 (19 patients).

Ceci permet de mettre en évidence que, dans le cadre d'infections orthopédiques, l'activité des phages est supérieure après une administration orale que par voie locale. On peut également supposer que les phages administrés par voie orale sont absorbés (transloqués) et distribués jusqu'au site de l'infection.

Le groupe de patients ayant une infection des tissus mous comporte 30 sujets (figure 33). La voie d'administration topique, qui a été la plus utilisée, a donné de bons résultats chez 9 patients (soit 34,6% de bonnes réponses) et une éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient chez 4 patients (15,4%). L'association des voies orale et topique a été utilisée chez seulement 3 patients (dont 1 éradication du pathogène) et celle des voies rectale et topique chez 1 patient dont l'état clinique s'est amélioré. De plus, les phages dirigés contre *Staphylococcus* se sont avérés plus efficaces que ceux dirigés contre *Pseudomonas* : respectivement 35,7% de bonnes réponses (5 patients sur 14 traités) contre 0% (0 patients sur 8).

Figure 33 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients ayant une infection des tissus mous

Category of response to treatment	Way of administration of the phage preparation						Type of phage preparations applied					
	Topical <sup>a</sup> (n = 26)		Oral/topical <sup>a</sup> (n = 3)		Rectal/topical <sup>a</sup> (n = 1)		Staphylococcal (n = 14)		Pseudomonas (n = 8)		Other <sup>b</sup> (n = 8)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	4	15.4	1	33.3	0	0.0	3	21.4	0	0.0	2	25.0
B - good clinical result	2	7.7	0	0.0	0	0.0	1	7.1	0	0.0	1	12.5
C - clinical improvement	3	11.5	0	0.0	1	100.0	1	7.1	0	0.0	3	37.5
D - questionable clinical improvement	1	3.8	1	33.3	0	0.0	0	0.0	1	12.5	1	12.5
E - transient clinical improvement	7	26.9	1	33.3	0	0.0	4	28.6	4	50.0	0	0.0
F - no response to treatment	6	23.1	0	0.0	0	0.0	4	28.6	2	25.0	0	0.0
G - clinical deterioration	3	11.5	0	0.0	0	0.0	1	7.1	1	12.5	1	12.5
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>9</b>	<b>34.6</b>	<b>1</b>	<b>33.3</b>	<b>1</b>	<b>100.0</b>	<b>5</b>	<b>35.7</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	<b>6</b>	<b>75.0</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>17</b>	<b>65.4</b>	<b>2</b>	<b>66.7</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	<b>9</b>	<b>64.3</b>	<b>8</b>	<b>100.0</b>	<b>2</b>	<b>25.0</b>

La voie topique seule a été la plus utilisée (26 patients). Elle comporte l'application de compresses imprégnées ainsi que des irrigations (fistulaires ou au niveau d'abcès). 9 patients ont bien répondu au traitement mené par cette voie. Parmi eux, une éradication du pathogène et/ou rétablissement complet a été obtenue chez 4 patients. Il y a, par contre, 17 cas de réponses inadéquates, avec en particulier 7 cas d'amélioration clinique transitoire, 6 cas d'absence de réponse au traitement et 3 cas de détérioration clinique.

La voie orale associée à la voie topique (3 patients seulement) a entraîné une éradication du pathogène (33%), une amélioration clinique transitoire (33%) et une amélioration clinique discutable (33%). La voie rectale associée à la voie topique (1 patient) a, quant à elle, entraîné une amélioration clinique.

Des préparations phagiques dirigées contre *Staphylococcus* ont été administrées chez 14 patients. On dénombre 5 cas de bonnes réponses, dont 3 éradications du pathogène et/ou rétablissement du patient. Les réponses inadéquates (9 patients) sont principalement représentées par des améliorations cliniques transitoires (4 patients) et des absences de réponse au traitement (4 patients). Il faut aussi souligner la détérioration de l'état clinique d'un patient.

Les préparations phagiques dirigées contre *Pseudomonas* (8 patients) se sont toutes révélées « inefficaces » : 4 cas d'amélioration clinique transitoire, 1 cas d'amélioration clinique discutable, 2 cas d'absence de réponse au traitement et 1 cas de détérioration clinique.

Enfin, les « autres » préparations (8 patients) regroupent des phages dirigées contre *Staphylococcus* et *Pseudomonas* (3 patients), *Enterococcus* (2 patients), *Escherichia coli* (1 patient), *Proteus* (1 patient) et *Salmonella* (1 patient). Des bonnes réponses ont été obtenues chez 6 patients.

Le groupe des hommes atteints d'infection génitale ou urinaire comporte 29 patients (figure 34) dont 13 cas de prostatite seule, 6 cas de prostatite associée à une infection urinaire et 10 cas d'infection urinaire seule. Une bonne réponse au traitement a été obtenue chez 9 des 15 patients traités par voie intrarectale (60%) et chez 4 des 12 patients traités par une association voie rectale/voie topique (33%). Il y a des différences d'efficacité en ce qui concerne la sélectivité des préparations phagiques utilisées. Un taux important de bonnes réponses au

traitement a été retrouvé chez les patients traités par des phages dirigés contre *Enterococcus* (7 patients sur 12, soit 58,3%). Ce taux est de 40% (2 patients sur 5) chez les patients traités par des phages dirigés contre *Escherichia coli*. D'un point de vue statistique, cette différence n'est pas significative. De plus, le taux d'éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient est nettement plus élevé chez les patients traités par phages dirigés contre *Enterococcus* (7 patients sur 12, soit 58,3%) que chez ceux traités par phages dirigés contre *Escherichia coli* (1 patient sur 5, soit 20%).

Ces résultats permettent de mettre en évidence l'activité des phages après une administration par voie rectale. On peut donc supposer que les phages sont, suite à l'administration rectale, absorbés et distribués au niveau du site de l'infection.

Il y a 22 patientes atteintes d'infection génitale ou urinaire, dont 3 cas d'infection vaginale seule, 5 cas d'infection vaginale et urinaire et 14 cas d'infection urinaire seule (figure 35). Les voies d'administration les plus efficaces chez ces patientes sont la voie intravaginale et la voie orale avec toutes les deux 50% de bonnes réponses au traitement (respectivement 3 patientes sur 6 et 2 patientes sur 4). Cependant, le plus haut taux d'éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient est obtenu chez les femmes recevant le traitement par voie intrarectale (1 patiente sur 3, soit 33,3%). Comparativement, ce taux est de 25% chez les patientes traitées par voie orale (1 patiente sur 4) et de 16,7% chez celles traitées par voie intravaginale (1 patiente sur 6).

Il n'y a pas de différences significatives en ce qui concerne l'efficacité des préparations phagiques dirigées contre *Escherichia coli* et celles dirigées contre *Enterococcus* : 30 % de bonnes réponses au traitement, dont 14,3% d'éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient dans le premier cas et 28,6% de bonnes réponses au traitement, dont 20% d'éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient dans le second cas.



Figure 34 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients masculins ayant une infection génitale ou urinaire

Category of response to treatment	Way of administration of the phage preparation						Type of phage preparations applied					
	Rectal (n = 15)		Rectal/topical <sup>a</sup> (n = 12)		Other <sup>b</sup> (n = 2)		Enterococcal (n = 12)		<i>E. coli</i> (n = 5)		Other <sup>c</sup> (n = 12)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	7	46.7	3	25.0	1	50.0	7	58.3	1	20.0	3	25.0
B - good clinical result	1	6.7	1	8.3	0	0.0	0	0.0	1	20.0	1	8.3
C - clinical improvement	1	6.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	1	8.3
D - questionable clinical improvement	0	0.0	2	16.7	0	0.0	0	0.0	0	0.0	2	16.7
E - transient clinical improvement	2	13.3	2	16.7	1	50.0	0	0.0	2	40.0	3	25.0
F - no response to treatment	4	26.7	4	33.3	0	0.0	5	41.7	1	20.0	2	16.7
G - clinical deterioration	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>9</b>	<b>60.0</b>	<b>4</b>	<b>33.3</b>	<b>1</b>	<b>50.0</b>	<b>7</b>	<b>58.3</b>	<b>2</b>	<b>40.0</b>	<b>5</b>	<b>41.7</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>6</b>	<b>40.0</b>	<b>8</b>	<b>66.7</b>	<b>1</b>	<b>50.0</b>	<b>5</b>	<b>41.7</b>	<b>3</b>	<b>60.0</b>	<b>7</b>	<b>58.3</b>

Les préparations phagiques administrées par voie rectale (15 patients) ont amené de bonnes réponses au traitement chez 9 patients, dont 7 cas d'éradication du pathogène et/ou rétablissement complet. Parmi les réponses insuffisantes (6 patients), on retrouve principalement 4 patients non répondeurs au protocole thérapeutique.

La voie rectale associée à la voie topique (comprenant l'application de compresses imprégnées) a été utilisée chez 12 patients. Il y a 4 patients pour qui une bonne réponse au traitement a été obtenue : 3 cas d'éradication du pathogène et 1 cas de bons résultats cliniques. Les réponses inadéquates (8 patients) sont représentées par une absence de réponse au traitement (4 patients), une amélioration clinique discutable (2 patients) et une amélioration clinique transitoire (2 patients).

Les autres voies utilisées (2 patients) sont l'association des voies orale et topique (1 patient) et des voies orale et rectale (1 patient). Une éradication du pathogène et/ou rétablissement et une amélioration clinique transitoire ont été observées.

Les préparations dirigées contre *Enterococcus* (12 patients) a permis d'obtenir 7 cas d'éradication du pathogène. Mais 5 patients n'ont pas répondu au traitement.

Les préparations dirigées contre *Escherichia coli* (5 patients) ont entraîné l'éradication du pathogène et de bons résultats cliniques chez un patient. Parmi les réponses insuffisantes (3 patients), on retrouve deux cas d'amélioration clinique transitoire (40%) et un cas d'absence de réponse au traitement (20%).

Enfin, les « autres » préparations utilisées (12 patients) sont des préparations dirigées contre *Pseudomonas* (3 patients), *Enterococcus* et *Staphylococcus* (2 patients), *Staphylococcus* (1 patient), *Klebsiella* (1 patient), *Escherichia coli* et *Klebsiella* (1 patient), *Enterococcus* et *Klebsiella* (1 patient), *Enterococcus* et *Escherichia coli* (1 patient), *Enterococcus* et *Citrobacter* (1 patient) et *Enterococcus* et *Pseudomonas* (1 patient). 5 patients ont bien répondu à ces préparations, tandis que 7 patients ont eu des réponses insuffisantes.

Il faut souligner qu'aucun des patients traités n'a vu son état clinique se détériorer.



Figure 35 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patientes ayant une infection génitale ou urinaire

Category of response to treatment	Way of administration of the phage preparation								Type of phage preparations applied					
	Vaginal (n = 6)		Oral (n = 4)		Rectal (n = 3)		Other <sup>a</sup> (n = 9)		E. coli (n = 10)		Enterococcal/ E. coli (n = 7)		Other <sup>b</sup> (n = 5)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	1	16.7	1	25.0	1	33.3	0	0.0	1	10.0	1	14.3	1	20.0
B - good clinical result	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
C - clinical improvement	2	33.3	1	25.0	0	0.0	2	22.2	2	20.0	1	14.3	2	40.0
D - questionable clinical improvement	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
E - transient clinical improvement	1	16.7	1	25.0	0	0.0	2	22.2	3	30.0	1	14.3	0	0.0
F - no response to treatment	2	33.3	1	25.0	2	66.7	5	55.6	4	40.0	4	57.1	2	40.0
G - clinical deterioration	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>3</b>	<b>50.0</b>	<b>2</b>	<b>50.0</b>	<b>1</b>	<b>33.3</b>	<b>2</b>	<b>22.2</b>	<b>3</b>	<b>30.0</b>	<b>2</b>	<b>28.6</b>	<b>3</b>	<b>60.0</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>3</b>	<b>50.0</b>	<b>2</b>	<b>50.0</b>	<b>2</b>	<b>66.7</b>	<b>7</b>	<b>77.8</b>	<b>7</b>	<b>70.0</b>	<b>5</b>	<b>71.4</b>	<b>2</b>	<b>40.0</b>

La voie vaginale (6 patientes) a permis d'obtenir un cas d'éradication du pathogène et deux cas d'amélioration clinique. Les réponses ont été insuffisantes chez 3 patientes : 2 patientes n'ont pas répondu au traitement et une patiente a eu une amélioration clinique transitoire.

La voie orale (4 patientes) a entraîné 50% de bonnes réponses au traitement dont 1 cas d'éradication du pathogène et/ou rétablissement complet du patient. Parmi les réponses insuffisantes, on remarque une patiente qui n'a pas répondu au traitement phagique.

La voie rectale (3 patientes) a permis d'obtenir l'éradication du pathogène chez 1 patiente. Mais 2 patientes n'ont pas répondu au traitement.

Les « autres » voies utilisées (9 patientes) sont : la voie topique (1 patiente), les bains de siège (1 patiente), les voies orale et topique (1 patiente), les voies orale, rectale et topique (1 patiente), les voies rectale et topique (1 patiente), les voies vaginale et orale (1 patiente), les voies vaginale et rectale (1 patiente), les voies vaginale et topique (1 patiente) et les voies vaginale, orale et topique (1 patiente). Il y a eu 2 cas d'amélioration clinique, 2 cas d'amélioration clinique transitoire et 5 patientes non répondeuses au traitement.

Les préparations dirigées contre *Escherichia coli* (10 patientes) ont entraîné des réponses satisfaisantes chez 3 patientes. Les réponses insuffisantes (7 patientes) sont des cas d'amélioration clinique transitoire (3 patientes) et des absences de réponse au traitement (4 patientes).

Les préparations dirigées contre *Enterococcus* et *Escherichia coli* (7 patientes) se sont avérées efficaces chez 2 patientes. Parmi les réponses non satisfaisantes (5 patientes) figurent 4 absences de réponse au traitement.

Enfin, les « autres » préparations (5 patientes) regroupent des préparations dirigées contre *Enterococcus* (2 patientes), *Staphylococcus* (1 patiente), *Enterobacter* (1 patiente) et *Enterococcus* et *Proteus* (1 patient). Elles ont entraîné 3 bonnes réponses au traitement, mais 2 patientes n'ont pas répondu au protocole.

Les infections de l'arbre respiratoire concernent 24 patients (figure 36). La voie d'administration la plus utilisée pour traiter ces patients a été la voie topique (représentée par des gargarismes et des gouttes nasales de préparation phagique). Elle a permis d'obtenir 25% de bonnes réponses au traitement (3 patients sur 12) dont 16,7% d'éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient (2 patients sur 12). L'association des voies orale et topique a permis une bonne réponse au traitement chez 33% des sujets. Cependant, il n'y a pas eu d'éradication du pathogène et/ou de rétablissement complet parmi les 6 patients traités. Seulement 3 patients ont été traités par inhalation d'aérosols. Il y a un cas de bons résultats cliniques (33,3%) et deux cas de réponses non satisfaisantes (66,6%). Il est toutefois difficile de tirer une conclusion à partir de ces 3 patients. De plus, les auteurs n'ont pas précisé pourquoi l'administration de phages sous forme d'aérosols n'a pas été davantage utilisée.

Les préparations phagiques dirigées contre *Staphylococcus* ont une efficacité estimée à 30% (6 patients sur 20 ayant une bonne réponse au traitement), dont 10% d'éradication du pathogène.

Les résultats des traitements phagiques destinés à traiter les infections respiratoires sont dans l'ensemble nettement moins bons que les autres traitements menés. Ceci pourrait s'expliquer par une moindre diffusion des phages au niveau de l'arbre respiratoire. Par conséquent, les concentrations phagiques ne permettraient pas d'obtenir une activité satisfaisante.

Enfin, le groupe des patients ayant une infection cutanée est composé de 10 sujets (figure 37). La voie topique, la plus utilisée (6 patients), a été efficace chez 1 seul patient (16,7% d'efficacité). L'association des voies orale et topique a par contre montré une efficacité de 66,7% (chez 2 patients sur 3). La voie orale seule s'est montrée inefficace sur le seul patient chez qui elle a été utilisée. 9 des 10 patients de ce groupe ont reçu des phages dirigés contre *Staphylococcus*, avec une efficacité de 22,2% (2 patients sur 9 ayant une bonne réponse au traitement). Toutefois, aucun traitement n'a permis une éradication du pathogène et/ou rétablissement du patient.

Figure 36 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients ayant une infection de l'arbre respiratoire

Category of response to treatment	Way of administration of the phage preparation				Type of phage preparations applied	
	Topical <sup>a</sup> (n = 12)	Oral/topical (n = 6)	Inhalation of aerosol (n = 3)	Other <sup>b</sup> (n = 3)	Staphylococcal (n = 20)	Other <sup>c</sup> (n = 4)
	n %	n %	n %	n %	n %	n %
A - pathogen eradication and/or recovery	2 16.7	0 0.0	0 0.0	0 0.0	2 10.0	0 0.0
B - good clinical result	1 8.3	0 0.0	1 33.3	1 33.3	2 10.0	1 25.0
C - clinical improvement	0 0.0	2 33.3	0 0.0	0 0.0	2 10.0	0 0.0
D - questionable clinical improvement	1 8.3	1 16.7	1 33.3	0 0.0	3 15.0	0 0.0
E - transient clinical improvement	2 16.7	0 0.0	0 0.0	1 33.3	2 10.0	1 25.0
F - no response to treatment	4 33.3	3 50.0	0 0.0	0 0.0	7 35.0	0 0.0
G - clinical deterioration	2 16.7	0 0.0	1 33.3	1 33.3	2 10.0	2 50.0
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>3 25.0</b>	<b>2 33.3</b>	<b>1 33.3</b>	<b>1 33.3</b>	<b>6 30.0</b>	<b>1 25.0</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>9 75.0</b>	<b>4 66.7</b>	<b>2 66.7</b>	<b>2 66.7</b>	<b>14 70.0</b>	<b>3 75.0</b>

La voie topique (12 patients) correspond à des gargarismes et à l'administration de gouttes nasales de préparations phagiques. Il y a 3 cas de bonnes réponses au traitement et 9 cas de réponses insuffisantes. Parmi les réponses non satisfaisantes, on remarque 4 patients qui ne répondent pas au traitement et 2 patients dont l'état clinique se détériore.

L'association des voies orale et topique (6 patients) ne montre pas une efficacité supérieure : 2 patients ont une amélioration clinique mais 3 ne répondent pas au traitement.

L'inhalation d'aérosols (3 patients) entraîne de bons résultats chez 1 patient, une amélioration clinique discutable chez 1 autre patient mais une détérioration de l'état clinique du 3<sup>e</sup> patient.

Les « autres » voies utilisées (3 patients) sont : la voie orale (1 patient) et l'association de la voie orale à l'inhalation d'aérosols (2 patients). Les résultats sont presque identiques, avec 1 réponse satisfaisante et 2 réponses inadéquates.

Les préparations dirigées contre *Staphylococcus* (20 patients) entraînent des bonnes réponses chez 6 patients, dont 10% d'éradication du pathogène et/ou rétablissement des patients. Parmi les réponses non satisfaisantes (14 patients), on remarque une proportion importante des patients non répondeurs (7 patients). Il y a également 2 patients chez qui l'état clinique s'est détérioré.

Les « autres » préparations (4 patients) sont dirigées contre *Pseudomonas* (2 patients), *Pseudomonas* et *Stenotrophomonas* (1 patient) et *Escherichia coli* (1 patient). Les réponses sont médiocres : 1 patient présente de bons résultats cliniques mais 3 patients ont des réponses inadéquates (dont 2 patients ayant une détérioration de leur état clinique).

Figure 37 : Evaluation des résultats de la thérapie phagique chez des patients ayant une infection cutanée

Category of response to treatment	Way of administration of phage preparation						Type of phage preparation applied			
	Topical <sup>a</sup> (n = 6)		Oral/topical <sup>a</sup> (n = 3)		Oral (n = 1)		Staphylococcal (n = 9)		Pseudomonas (n = 1)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A - pathogen eradication and/or recovery	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
B - good clinical result	1	16.7	1	33.3	0	0.0	1	11.1	1	100
C - clinical improvement	0	0.0	1	33.3	0	0.0	1	11.1	0	0.0
D - questionable clinical improvement	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
E - transient clinical improvement	4	66.7	1	33.3	0	0.0	5	55.6	0	0.0
F - no response to treatment	0	0.0	0	0.0	1	100	1	11.1	0	0.0
G - clinical deterioration	1	16.7	0	0.0	0	0.0	1	11.1	0	0.0
<b>Good response (total A–C):</b>	<b>1</b>	<b>16.7</b>	<b>2</b>	<b>66.7</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>	<b>2</b>	<b>22.2</b>	<b>1</b>	<b>100</b>
<b>Inadequate response (total D–G):</b>	<b>5</b>	<b>83.3</b>	<b>1</b>	<b>33.3</b>	<b>1</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>77.8</b>	<b>0</b>	<b>0.0</b>

La voie topique inclut l'administration de compresses imprégnées et de gouttes auriculaires de préparation phagique. Elle a été utilisée chez 6 patients, mais un seul cas de bons résultats cliniques a été rapporté. Parmi les réponses inadéquates (5 patients), il y a 4 patients qui ont eu une amélioration clinique transitoire et un patient qui a vu son état clinique se détériorer. L'association des voies orale et topique a été utilisée chez 3 patients seulement : deux patients ont eu une bonne réponse au traitement et un patient a eu une amélioration clinique transitoire.

La voie orale (seule), utilisée chez un seul patient, n'a pas montré d'efficacité (absence de réponse au traitement). Cependant, aucune conclusion ne peut être réalisée à partir de ce seul cas.

Les préparations phagiques dirigées contre *Staphylococcus* (9 patients) se sont montrées intéressantes chez 2 patients (22,2%). Les réponses non satisfaisantes regroupent 5 cas d'amélioration clinique transitoire, un cas d'absence de réponse au traitement et un cas de détérioration clinique.

Enfin, la préparation dirigée contre *Pseudomonas* (1 seul patient) a permis d'obtenir de bons résultats cliniques. De la même manière, ce seul cas ne permet pas de tirer d'enseignements.

## e. Discussion

Les données présentées ici résument les résultats d'un essai thérapeutique, dont le but principal n'est pas d'être une étude de recherche. Il n'y donc pas de données issues d'un groupe contrôle, de patients traités par antibiotiques, comparable au groupe recevant le traitement phagique. Certains prérequis permettent de penser que les résultats obtenus ne sont pas la conséquence de l'évolution naturelle (d'au moins une partie) des infections étudiées. Cependant la preuve finale de l'efficacité de la thérapie phagique ne pourra être fournie que par un essai clinique contrôlé.

Les résultats du traitement phagique obtenus dans cette étude semblent prometteurs. Ils suggèrent qu'il est possible d'obtenir une réponse satisfaisante à la thérapie phagique chez un nombre substantiel de patients. Les infections traitées chez ces patients sont des cas sérieux voire critiques (ostéomyélites, prostatites chroniques...). La durée de l'infection chez ces patients, avant le début du traitement phagique, est importante : en moyenne 43 mois (la durée minimale de l'infection étant de 4 mois et la durée maximale de 600 mois). Malgré cela, les bonnes réponses au traitement, observées chez 2/5 des patients (40%), sont obtenues sur des périodes relativement courtes : chez ce sous-groupe, la durée moyenne de l'infection est de 30 mois et la durée moyenne du traitement est de 66 jours (soit légèrement plus de 2 mois). L'éradication du pathogène et/ou la guérison complète des patients (catégorie A) est obtenue chez 1 patient sur 5 (20%). Parmi ces patients, la moitié d'entre eux ont eu un traitement antibiotique préalable, parfois de longue durée, inefficace, ainsi que des complications et un syndrome d'immunodéficience.

De plus, l'éradication du pathogène et/ou la guérison des patients (catégorie A) obtenue chez plus d'un tiers des sujets masculins ayant une infection génitale ou urinaire (37,9%) après une thérapie phagique de 66 jours en moyenne et plus particulièrement l'éradication du pathogène chez 50% des patients ayant une prostatite bactérienne chronique (confirmée par deux cultures bactériennes négatives consécutives, par une diminution du nombre de cellules inflammatoires du liquide prostatique et par une réduction du volume de la prostate) n'est probablement pas liée à une guérison spontanée.

On est en droit de se demander si les résultats rapportés dans cette étude sont cohérents par rapport à ceux obtenus dans l'institut de Géorgie (Institut Eliava) ou ceux présentés dans les précédents rapports de l'IJET (Institute of Immunology and Experimental Therapy).

L'Institut Eliava possède une collection très complète de bactériophages thérapeutiques, un centre de recherche et un savoir-faire qui fait référence en matière de phagothérapie. De plus, les phagothérapeutes géorgiens ont quatre-vingts ans d'expérience clinique ininterrompue dans toutes les spécialités médicales, y compris sur les enfants et les nouveau-nés. Ce centre a traité par phagothérapie le plus important nombre de patients à travers le monde. Il rapporte des taux de guérison élevés (plus élevés que ceux de l'étude présentée ici) allant de 67% pour les infections pulmonaires à 100% pour les ostéomyélites. (Kutateladze et Adamia, 2010). Cependant, ces données ne sont pas corrélées à des critères cliniques permettant l'évaluation des patients. Il n'y a, de plus, pas de données de laboratoires qui pourraient confirmer

l'efficacité des traitements ou justifier la faible incidence, voire l'absence, d'effets indésirables de la thérapie phagique. Enfin, l'hétérogénéité des patients traités, l'administration concomitante d'antibiotiques et les différents protocoles thérapeutiques utilisés rendent difficiles les éventuelles interprétations (et la comparaison avec les résultats de l'étude présentée).

Les précédents rapports de l'IJET mettent en évidence une efficacité supérieure de la thérapie phagique par rapport à celle décrite dans cette étude. En effet, les taux de bonnes réponses au traitement dépassent généralement les 90%, allant de 61% (ulcères variqueux des membres inférieurs) à 100% (furoncles, méningites purulentes) (Weber et al, 2000). La principale variable qui pourrait permettre d'expliquer ces différences est la méthode de contrôle et d'évaluation des patients. Avant la mise en place de l'Unité de Thérapie Phagique (PTU) à l'IJET, des préparations phagiques produites par l'institut étaient distribuées aux hôpitaux de la région qui mettaient en place le traitement et rapportaient les résultats à l'institut. Avec la mise en place du PTU, les patients restent sous la surveillance directe des médecins de l'institut, ce qui permet des observations plus détaillées et précises et un meilleur suivi des patients. L'évaluation de l'efficacité de la thérapie phagique n'en est que plus critique et plus fiable.

Dans cette étude, les critères mis en place par l'Unité de Thérapie Phagique pour l'évaluation de l'efficacité de la phagothérapie (catégories B et C) sont définis de telle manière que tout changement des symptômes infectieux qui pourrait résulter d'une rémission spontanée sont exclus. De plus, la réduction d'une partie des symptômes de l'infection durant l'administration des préparations phagiques mais qui ne dure pas à la fin du traitement phagique (catégorie E) est classée parmi les réponses inadéquates au traitement. Elle pourrait également être considérée comme un effet positif de la thérapie phagique puisque l'infection régresse légèrement tout au long du protocole (elle est tout du moins maîtrisée), sans pour autant être éradiquée. Cette catégorie représente une part non négligeable des patients traités lors de l'étude (21,6%). L'absence de réponse au traitement (catégorie F) regroupe également des patients chez qui l'infection a été stabilisée, car aucune dégradation clinique n'est observée. D'un point de vue clinique, cette catégorie peut ne pas être considérée comme une mauvaise réponse au traitement, puisque l'infection ne progresse plus. Par exemple, dans le cas de patients ayant une infection de prothèse, la thérapie phagique pourrait prolonger leur



fonctionnement. Il est aussi notable qu'une aggravation de l'infection, ce qui est sans équivoque un traitement inefficace, est observée chez seulement 6,5% des patients (catégorie G).

Dans un essai clinique, une réduction du taux de bactéries dans les échantillons prélevés sur le site de l'infection est considérée comme une preuve de l'efficacité du traitement (et non pas forcément la complète éradication du germe pathogène). A la lumière de ce critère, les résultats présentés dans cette étude pourraient être meilleurs.

Les auteurs ont observé des changements significatifs de l'efficacité de certains phages lytiques dirigés contre des souches bactériennes isolées sur les patients au cours du protocole. Cette baisse d'efficacité pourrait être causée par l'instabilité génétique et l'hétérogénéité des cellules bactériennes de la population infectante, par des modifications au niveau des prophages bactériens ou par une l'acquisition de résistance bactérienne. Ceci peut également évoquer le problème d'une surinfection par une nouvelle souche bactérienne durant le traitement phagique, ce qui diminuerait presque nécessairement l'efficacité du traitement. Dans cette étude, les préparations administrées sont exclusivement monophagiques. L'administration de cocktails de phages pourrait permettre de réduire ce phénomène. En particulier, les améliorations cliniques transitoires ou discutables pourraient diminuer par l'administration de cocktails de phages au profit de réponses plus marquées ou plus durables. La seule exception à ce phénomène concerne les phages antistaphylocoques. Le faible pourcentage de résistance bactérienne à ces phages résulte probablement de la polyvalence de ces derniers. En effet, chacun de ces phages a la capacité de lyser plus de 50% des souches de *Staphylococcus aureus*, isolées à partir des patients ou issues de la collection du laboratoire.

Les différents groupes ou sous-groupes de patients de l'analyse sont composés d'un nombre restreint d'individus recevant le traitement phagique expérimental. Les résultats obtenus sont une base de travail satisfaisante et permettent d'envisager certaines hypothèses. Mais, leur fiabilité et leur extrapolation sont légitimement discutables. Il est, par exemple, difficile d'interpréter l'efficacité du traitement phagique administré par voie orale sur les infections orthopédiques (100%) sur seulement 4 patients.

Dans l'étude, le plus important taux de réussite de la thérapie phagique fait suite à l'administration de phages par voie orale. Il est significativement plus important que lors de l'administration de phages par voie topique. Ceci peut être surprenant car il y a peu d'études confirmant l'absorption (translocation) des phages, ainsi que leur distribution chez l'homme. Un phénomène comparable à la translocation bactérienne est toutefois envisagé par certains scientifiques (Gorski et al. 2006). De plus, de nombreux phagothérapeutes préconisent de privilégier l'administration des phages par voie topique. D'autre part, des observations ont montré que la voie orale pourrait causer une réaction anti-inflammatoire importante, marquée par une forte diminution de la concentration sérique de protéine C-réactive, et n'entraîne généralement pas de production d'anticorps anti-phages neutralisants (Gorski et al. 2012). En conséquence, les effets observés suite à l'administration de phages par voie orale pourraient, au moins en partie, être associés à l'activité des phages.

L'éradication du pathogène et/ou le rétablissement complet du patient (catégorie A) est obtenu dans presque la moitié des cas (44%) suite à l'administration phagique par voie rectale. Cette voie permettrait une pénétration satisfaisante des phages, comme cela a été confirmé sur des modèles animaux (Miedzybrodzki et tal. et Gorski), ainsi qu'une distribution des phages au niveau du site infectieux.

Dans l'étude, le choix des voies d'administration en fonction de la pathologie n'est pas justifié, ni argumenté. Ainsi, certains choix peuvent, au regard de nos pratiques (influencées par les voies d'administration des antibiotiques), interpellier. De plus, les sous-groupes ne sont pas nécessairement comparables, que ce soit en termes d'effectifs ou de caractéristiques. Il est donc difficile d'établir une relation de causalité entre la voie d'administration et l'efficacité du traitement phagique.

L'administration conjointe d'antibiotiques et/ou antiseptiques au cours du traitement phagique a été limitée à certaines situations spécifiques (par exemple, en cas de co-infection à une bactérie pathogène pour laquelle l'IET ne dispose pas de phages appropriés). Les données obtenues dans cette étude ne suggèrent pas une amélioration clinique liée à l'administration conjointe d'antibiotiques et de phages. Néanmoins, les antibiotiques administrés aux patients n'ont pas été mentionnés. Il n'est donc pas possible de déterminer si certaines associations phages-antibiotiques se sont révélées plus intéressantes que d'autres.

Certains auteurs envisagent une diminution de l'efficacité de la thérapie phagique en cas d'administration d'antibiotiques. Au contraire, des rapports évoquent qu'une telle association



pourraient améliorer les résultats de la thérapie phagique (Sulakvelidze et Kutter, 2005 et Kutateladze et Adamia, 2010). Ce point précis nécessite des investigations plus poussées et notamment des essais cliniques appropriés.

Enfin, la durée cumulée moyenne de thérapie phagique est de 55 jours. Une éventuelle corrélation entre la durée du traitement et son efficacité n'a pas été mise en avant. Dans cette étude, la durée de la thérapie a été établie en fonction de l'évolution clinique des patients. Pour l'heure, il n'existe pas de données concernant une durée optimale de traitement phagique chez l'Homme. Les données obtenues chez l'animal suggèrent une efficacité plus importante de la thérapie phagique sur de courtes administrations (parfois même une dose unique de phages de titre élevé). Ces données sont toutefois difficiles à extrapoler chez l'Homme. Les expériences menées chez l'animal ont été réalisées sur des infections bactériennes aiguës. Dans le cas présent, les patients présentent des infections chroniques (la durée moyenne de l'infection est ici de 43 mois). Clairement, ce point nécessite des recherches plus approfondies, afin de déterminer une durée minimale permettant d'obtenir des résultats satisfaisants.

## 4. Sécurité de la thérapie phagique

L'étude menée par l'Institut de Thérapie Expérimentale Immunologique Ludwik Hirszfeld (IIEI) entre 2008 et 2012 s'est intéressée aux effets indésirables potentiels de la thérapie phagique. De la même manière que précédemment, les figures 38 à 40 sont issues de cette étude (« Clinical aspect of phage therapy » extrait de « Advances in Virus Research », Volume 83, Ryszard Miedzybrodzki et al., 2012).

### a. Effets de la thérapie phagique sur les marqueurs inflammatoires

L'impact de la thérapie phagique, en réponse à une infection, sur les marqueurs de l'inflammation a été étudié par deux analyses statistiques. Les marqueurs permettant les études sont la vitesse de sédimentation, le taux de protéine C-réactive et de leucocytes. Dans chacune des études, les paramètres sont étudiés après respectivement 5 à 8 jours, puis 9 à 32 jours de phagothérapie. Les résultats sont ensuite comparés à ceux trouvés lors du prélèvement réalisé juste avant le début de la phagothérapie (figure 38).

La première analyse (groupe A) inclut tous les patients chez qui les données ont pu être collectées avant, pendant et/ou après la thérapie phagique, quel que soit le type d'infection et l'administration conjointe ou non d'agents antibactériens. La comparaison des marqueurs de l'inflammation avant le début de la thérapie phagique et pendant l'administration de phages ne révèle pas de différences significatives. En particulier, on n'observe pas d'hyperleucocytose qui témoignerait d'un phénomène inflammatoire (et/ou infectieux) au cours du traitement phagique, ni de leucopénie qui traduirait un déficit immunitaire. La vitesse de sédimentation érythrocytaire (test de dépistage des maladies inflammatoires et cancéreuses) et la concentration sanguine en protéine C réactive (marqueur précoce, sensible et spécifique de la réaction inflammatoire, augmentant proportionnellement à son intensité) sont assez élevées avant le début du traitement phagique et ne sont pas modifiées significativement par l'administration de phages.

Figure 38 : Influence de la thérapie phagique sur les marqueurs de l'inflammation

Biomarker		All patients			Selected group <sup>b</sup>		
		A	B		B		
		n	Mean	± SE	n	Mean	± SE
WBC count (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Baseline:	32	6.5	± 0.3	15	7.0	± 0.3
	After 5–8 days:	32	6.7	± 0.4	15	7.6	± 0.5
	Baseline:	110	7.0	± 0.2	46	7.1	± 0.3
	After 9–32 days:	110	6.9	± 0.2	46	7.3	± 0.3
Erythrocyte sedimentation rate (mm/hr)	Baseline:	22	30.1	± 6.9	12	42.4	± 10.1
	After 5–8 days:	22	29.0	± 6.5	12	43.3	± 9.6
	Baseline:	77	24.4	± 3.1	31	34.8	± 5.6
	After 9–32 days:	77	23.9	± 3.0	31	36.1	± 5.7
C-reactive protein (mg/ml)	Baseline:	22	8.3	± 2.5	12	13.7	± 4.1
	After 5–8 days:	22	9.0	± 2.7	12	14.7	± 4.4
	Baseline:	79	10.3	± 1.6	36	16.2	± 2.9
	After 9–32 days:	79	11.1	± 1.6	36	16.7	± 3.0

La colonne A (All patients) regroupe tous les patients pour lesquels des résultats pertinents ont été obtenus selon un protocole similaire. La colonne B (Selected group) regroupe seulement des patients atteints d'ostéomyélites, d'infections orthopédiques (dont les infections de prothèse orthopédique), cutanées, des tissus mous ou de l'arbre respiratoire bas, traités uniquement par phages pendant toute la durée du protocole. Les données présentées ont été obtenues selon un protocole similaire. n est le nombre de patients de chaque catégorie.

Le « WBC count » est le taux de leucocytes. Les valeurs normales sont comprises entre 4 et 10 G/L, soit 4000 à 10 000/mm<sup>3</sup>. Les résultats obtenus ne montrent pas de modifications significatives du taux de leucocytes par le traitement phagique : le taux de leucocytes est respectivement de 6700/mm<sup>3</sup> après 5 à 8 jours de traitement (valeur contrôle : 6500/mm<sup>3</sup> ; 32 patients) et de 6900/mm<sup>3</sup> après 9 à 32 jours de traitement (valeur contrôle : 7000/mm<sup>3</sup> ; 110 patients) pour l'ensemble des patients. Chez les patients traités uniquement par phages, le taux de leucocytes est de 7600/mm<sup>3</sup> après 5 à 8 jours de traitement phagique (valeur contrôle : 7000/mm<sup>3</sup> ; 15 patients) et de 7300/mm<sup>3</sup> après 9 à 32 jours (valeur contrôle 7100/mm<sup>3</sup> ; 46 patients).

La vitesse de sédimentation érythrocytaire est exprimée en millimètre par heure (mm/h). Les vitesses « normales » sont inférieures à 15 mm/h chez l'homme de moins de 50 ans et inférieures à 20 mm/h chez l'homme de plus de 50 ans. Chez les femmes, les valeurs normales sont inférieures à 20 mm/h chez les patientes de moins de 50 ans et inférieures à 30 mm/h chez les patientes de plus de 50 ans. On ne remarque pas de modifications significatives de la vitesse de sédimentation érythrocytaire chez les patients au cours du traitement phagique. Chez l'ensemble des patients, la vitesse de sédimentation érythrocytaire est de 29 mm/h après 5 à 8 jours de traitement (valeur contrôle : 30,1 mm/h ; 22 patients) et de 23,9 mm/h après 9 à 32 jours de traitement (valeur contrôle 24,4 mm/h ; 77 patients). Chez les patients traités uniquement par phages, la vitesse de sédimentation érythrocytaire est de 43,3 mm/h après 5 à 8 jours de traitement (valeur contrôle : 42,4 mm/h ; 12 patients) et de 36,1 mm/h après 9 à 32 jours de traitement (valeur contrôle : 34,8 mm/h ; 31 patients). On remarque une diminution globale de la vitesse de sédimentation érythrocytaire, que ce soit chez l'ensemble des patients ou chez les patients traités uniquement par phages.

La concentration sanguine en protéine C réactive (CRP) est normalement inférieure à 6 mg/L. Le traitement phagique n'impacte pas significativement ce marqueur biologique de l'inflammation. Chez l'ensemble des patients, la concentration en CRP est de 9 mg/L après 5 à 8 jours de traitement (valeur contrôle : 8,3 mg/L ; 22 patients) et de 11,1 mg/L (valeur contrôle : 10,3 mg/L ; 79 patients). Chez les patients traités uniquement par phages, la concentration en CRP est de 14,7 mg/L après 5 à 8 jours de traitement (valeur contrôle 13,7 mg/L ; 12 patients) et de 16,7 mg/L (valeur contrôle : 16,2 mg/L ; 36 patients). Les concentrations élevées de CRP peuvent s'expliquer par le phénomène infectieux.

La seconde analyse (groupe B) s'intéresse aux patients ayant des infections orthopédiques, des infections cutanées, des infections des tissus mous ou de l'arbre respiratoire bas, chez qui aucun autre agent antibactérien (que le phage) n'a été administré. Elle inclut au total 62 patients, dont 70% ont une infection à *Staphylococcus aureus*. Là encore, l'analyse statistique ne montre pas de modifications significatives des marqueurs de l'inflammation au cours du traitement phagique.

Cependant, une réduction significative de la concentration de protéine C-réactive de 22,5% (de 26,2 mg/L à 20,3 mg/L ;  $p = 0,006$ ) a été observée chez un sous-groupe de patients (26 patients) après 9 à 32 jours de thérapie phagique. Ce sous-groupe a été constitué en fonction des concentrations en CRP des patients. Seuls les patients, ayant une concentration en CRP supérieure à 25 mg/L, ont été sélectionnés.

En conclusion, on peut considérer un impact très modéré de la thérapie phagique sur les marqueurs inflammatoires lorsqu'ils sont dans des proportions normales ou subnormales. L'impact pourrait être légèrement plus important lorsque le processus inflammatoire est plus marqué. La phagothérapie pourrait alors participer à réduire le processus inflammatoire.

### **b. Effets indésirables de la thérapie phagique**

Les effets de la thérapie phagique sur les différentes fonctions physiologiques des patients sont analysés par l'étude de marqueurs hématologiques, urinaires et biochimiques. Des prélèvements sont réalisés à quatre périodes de la thérapie phagique : entre 3 et 6 jours, entre 7 et 20 jours, entre 21 et 48 jours et enfin entre 49 et 84 jours cumulés de traitement. Les résultats, en valeur moyenne, sont ensuite comparés à ceux obtenus juste avant le début du traitement.

### *b.1 Principaux effets indésirables*

Les principaux effets indésirables de la thérapie phagique dans cette étude sont des symptômes digestifs, des réactions locales au site d'administration phagique, des surinfections et une élévation de la température corporelle.

- Symptômes digestifs

Les symptômes digestifs sont étudiés chez les patients recevant le traitement phagique par voie orale (11 patients recevant le traitement phagique par voie orale seule et 22 patients recevant le traitement phagique par voies orale et topique, soit 33 patients au total). Les principaux effets relevés sont des nausées (3 patients sur 33 soit 9%), des douleurs abdominales chez un patient et une réduction de l'appétit chez un autre patient. De plus, cinq patients ont noté un goût désagréable de la préparation phagique administrée.

- Réactions locales au site d'administration

Les réactions locales au site d'administration de la préparation phagique sont observées chez 26 des 141 patients traités (soit 18,4%). Les préparations concernées sont des gouttes nasales, des compresses imprégnées, des bains de siège, des gargarismes, des irrigations fistulaires ou vaginales et des suppositoires. Les réactions rapportées sont, pour la plupart, mineures : rougeurs, picotements, démangeaisons, douleurs locales, irritations cutanées, sentiment d'inconfort suite à l'irrigation vaginale, sècheresse et irritation des muqueuses de l'arbre respiratoire supérieur, aggravation d'une dermatite atopique (chez 1 patient), urticaire (chez 1 patient) et cloques purulentes (chez 1 patient). La sensation de picotements et de douleur locale a été rapportée chez 8 patients. Dans une grande majorité de cas, ces réactions sont des épisodes brefs (jusqu'à 30 minutes) et transitoires : elles cessent après plusieurs jours d'administration phagique ou lors du remplacement de la préparation phagique par une autre.

Le protocole a dû être interrompu chez 2 sujets (soit 1,4%) à cause de fortes réactions locales : dans un cas il s'agit d'importantes douleurs locales persistantes et dans l'autre cas d'une aggravation de la dermatite atopique au site d'administration du phage. Les composants des préparations phagiques responsables des réactions observées n'ont pas été identifiés par les auteurs.

- Surinfection

Une surinfection nécessitant la modification du traitement phagique, un arrêt de la phagothérapie ou l'administration supplémentaire d'antibiotiques ou d'antifongiques, s'est développée chez 7 des 153 patients analysés (soit 4,6%). Chez 5 de ces patients, la préparation phagique a été administrée uniquement par voie topique. Par ailleurs, une candidose a été diagnostiquée chez deux patients. Le risque de surinfection n'est pas une conséquence directe de l'administration de phages. Cependant, le spectre d'action étroit des préparations monophagiques expose les patients à de tels risques. L'administration de cocktails phagiques, permettant d'élargir le spectre d'action, pourrait minimiser le risque de surinfection.

Enfin, pour un patient, l'arrêt de la thérapie phagique s'est imposé au bout de 9 jours en raison d'une importante exacerbation des symptômes inflammatoires, associant œdème et douleur au niveau du site de l'infection. La nature de l'infection de départ (germe et site infectieux) chez ce patient n'est pas précisée par les auteurs.

- élévation de la température corporelle

Une élévation de la température corporelle est observée chez 10 des 153 patients (soit 6,5%). Chez cinq patients, il s'agit d'une température subfébrile (entre 37° et 38°C) et chez les cinq autres d'une température fébrile (> 38°C). Cet effet indésirable fait suite à l'administration de phages par voie topique (5 patients), par l'association des voies topique et orale (2 patients), par voie orale seule (1 patient), par voie rectale (1 patient) et par inhalation d'aérosols (1 patient). L'élévation de la température apparaît quelques heures seulement après l'administration de la première dose de phages. Dans la majorité des cas (9 patients), la température corporelle est revenue à la normale soit spontanément, ou suite à l'administration d'antipyrétique(s) ou du remplacement de la préparation phagique. Au contraire, l'élévation de la température corporelle a nécessité l'arrêt du protocole phagique chez un patient. Cette élévation était importante et persistante malgré l'administration d'antipyrétiques. L'arrêt du traitement phagique a coïncidé avec un retour à la normale de la température corporelle.

Les composants responsables de cette élévation de température corporelle n'ont pas été identifiés par les auteurs. De plus, le pourcentage de pureté des préparations administrées n'est pas mentionné. On ne peut donc pas exclure que les préparations phagiques soient

dépourvues de substances pyrogènes d'origine bactérienne (comme les LPS). La lyse bactérienne *in situ*, par les phages, pourrait également entraîner une libération de substances pyrogènes. Enfin, il est également possible qu'un ou plusieurs composant(s) de la préparation phagique induise(nt) une élévation de la température corporelle via la synthèse de cytokines impliquées dans la régulation thermique.

### *b.2 Effets sur la formule sanguine*

Les paramètres hématologiques obtenus durant l'étude permettent de connaître l'impact de la phagothérapie sur la formule sanguine des patients. D'après les résultats (Figure 39), il n'y a pas de modifications significatives de l'hématocrite, de la concentration en hémoglobine, du taux d'érythrocytes et de leucocytes, ainsi que des pourcentages des différentes cellules (lymphocytes, monocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles) de la numération formule sanguine, suite au traitement phagique.

Le traitement phagique ne modifie pas les paramètres hématologiques étudiés. Il n'y aurait donc pas d'influence de la phagothérapie sur la formule sanguine des patients et sur le fonctionnement de leur moelle osseuse.

La seule exception est une légère diminution du taux de plaquettes après 21 à 48 jours de traitement : de  $263,9 \pm 10,2$  à  $252,1 \pm 10,4 \cdot 10^3/\text{mm}^3$  cellules ( $n = 79$  ;  $p < 0,01$ ). Cependant, cette diminution reste quantitativement peu importante et surtout transitoire, puisqu'il n'y a plus de différence significative entre le taux plaquettaire des patients traités par thérapie phagique et le taux plaquettaire contrôle après 48 à 84 jours de traitement : respectivement  $256,2 \pm 11,9$  et  $257,7 \pm 11,7 \cdot 10^3/\text{mm}^3$  cellules ( $n = 51$ ).

Il faut toutefois remarquer que sur l'ensemble des patients de l'étude, une légère diminution du taux plaquettaire a été observée chez 3 patients : entre 109 et  $147 \cdot 10^3/\text{mm}^3$  cellules. Pour un de ces patients, cette diminution a été passagère et le taux plaquettaire est revenu à une valeur normale lors du contrôle suivant. Au contraire, une augmentation de ce taux a été observé chez 3 autres patients : de 410 à  $486 \cdot 10^3/\text{mm}^3$  cellules. Pour un patient, le taux plaquettaire a même atteint la valeur de  $610 \cdot 10^3/\text{mm}^3$  cellule.



Figure 39A: Impact de la thérapie phagique sur les marqueurs hématologiques

Parameter (unit)	Cumulative phage use	Number of analyzed cases	Baseline value		Value during PT		p <sup>a</sup>
			Mean	± SE	Mean	± SE	
Erythrocytes (cells × 10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	3–6 days	17	4.416	± 0.129	4.453	± 0.147	ns <sup>b</sup>
	7–20 days	103	4.697	± 0.051	4.676	± 0.052	ns
	21–48 days	80	4.723	± 0.062	4.715	± 0.065	ns
	49–84 days	51	4.625	± 0.061	4.598	± 0.064	ns
Hemoglobin (g/dl)	3–6 days	17	13.10	± 0.48	13.17	± 0.48	ns
	7–20 days	103	13.77	± 0.19	13.74	± 0.19	ns
	21–48 days	80	13.78	± 0.21	13.69	± 0.20	ns
	49–84 days	51	13.62	± 0.23	13.56	± 0.23	ns
Hematocrit (%)	3–6 days	17	39.3	± 1.1	39.2	± 1.2	ns
	7–20 days	103	41.3	± 0.5	41.1	± 0.5	ns
	21–48 days	80	41.5	± 0.5	41.2	± 0.5	ns
	49–84 days	51	40.8	± 0.6	40.6	± 0.6	ns
Platelets (cells × 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3–6 days	16	243.9	± 18.7	250.1	± 21.3	ns
	7–20 days	99	256.9	± 8.5	254.7	± 8.0	ns
	21–48 days	79	263.9	± 10.2	252.1	± 10.4	<0.01
	49–84 days	51	257.7	± 11.7	256.2	± 11.9	ns
Leukocytes (cells × 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	3–6 days	17	6.535	± 0.392	6.888	± 0.477	ns
	7–20 days	103	6.941	± 0.185	6.838	± 0.185	ns
	21–48 days	80	6.977	± 0.217	7.056	± 0.260	ns
	49–84 days	51	6.772	± 0.239	6.705	± 0.261	ns

Le taux normal de globules rouges se situe entre 4,5 et 6,2 millions/mm<sup>3</sup> chez l'homme et entre 4 et 5,4 millions/mm<sup>3</sup> chez la femme. Les valeurs présentées au cours de cette étude sont normales et le traitement phagique ne modifie pas le taux d'hématies : 4,453 millions/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 4,416 millions/mm<sup>3</sup> ; 17 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 4,676 millions/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 4,697 millions/mm<sup>3</sup> ; 103 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 4,715 millions/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 4,723 millions/mm<sup>3</sup> ; 80 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 4,598 millions/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 4,625 millions/mm<sup>3</sup> ; 51 patients) après 49 à 84 jours de traitement. Le traitement phagique n'engendre donc pas d'hémorragie, d'hémolyse, ou de maladies hématologiques ou médullaires osseuses.

Les valeurs normales de l'hémoglobine sont de 14 à 18 g/dl chez l'homme et de 12 à 16 g/dl chez la femme. Les valeurs obtenues au cours de l'étude sont normales. De plus, le traitement phagique ne modifie pas significativement le taux d'hémoglobine : il est de 13,17 g/dl (valeur contrôle : 13,10 g/dl ; 17 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 13,74 g/dl (valeur contrôle : 13,77 g/dl ; 103 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 13,69 g/dl (valeur contrôle : 13,78 g/dl ; 80 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 13,56 g/dl (valeur contrôle : 13,62 g/dl ; 51 patients) après 49 à 84 jours de traitement. Le traitement phagique n'engendre donc pas d'anémie chez les patients traités.

Les normes biologiques de l'hématocrite se situent entre 40 et 52% chez l'homme et entre 37 et 46% chez la femme. Les valeurs obtenues au cours de l'étude sont normales et ne mettent pas en évidence une éventuelle modification de l'hématocrite lors du traitement phagique : il est de 39,2% (valeur contrôle : 39,3% ; 17 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 41,1% (valeur contrôle : 41,3% ; 103 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 41,2% (valeur contrôle : 41,5% ; 80 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 40,6% (valeur contrôle : 40,8% ; 51 patients) après 49 à 84 jours de traitement.



Le taux normal de plaquettes sanguines se situe entre 150 000 et 450 000/mm<sup>3</sup>. Les valeurs présentées lors de l'étude sont normales. Une légère diminution du taux de plaquette intervient après 21 à 48 jours de thérapie phagique : le taux de plaquettes est de 252 100/mm<sup>3</sup> lors du traitement phagique et la valeur contrôle est de 263 900/mm<sup>3</sup> (79 patients). Les autres valeurs ne mettent pas en évidence de modifications significatives du taux de plaquettes lors du traitement phagique : le taux plaquettaire est de 250 100/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 243 900/mm<sup>3</sup> ; 16 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 254 700/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 256 900/mm<sup>3</sup> ; 99 patients) après 7 à 20 jours de traitement et de 256 200/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 257 700/mm<sup>3</sup> ; 51 patients) après 49 à 84 jours de traitement. Le traitement phagique n'engendre donc ni thrombocytose, ni thrombopénie.

Le taux normal de globules blancs se situe entre 4000 à 10 000/mm<sup>3</sup>. Les valeurs obtenues lors du traitement phagique sont normales et il n'y a pas de différences significatives avec les valeurs contrôles : le taux de leucocyte chez les patients traités par phages est de 6 888/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 6 535/mm<sup>3</sup> ; 17 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 6 838/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 6 941/mm<sup>3</sup> ; 103 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 7 056/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 6 977/mm<sup>3</sup> ; 80 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 6 705/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle : 6 772/mm<sup>3</sup> ; 51 patients) après 49 à 84 jours de traitement.

Figure 39B : Impact de la thérapie phagique sur les marqueurs hématologiques

Parameter (unit)	Cumulative phage use	Number of analyzed cases	Baseline value		Value during PT		p <sup>a</sup>
Lymphocytes (%)	3-6 days	15	32.5	± 2.2	30.8	± 2.5	ns
	7-20 days	95	32.2	± 1.0	32.2	± 1.0	ns
	21-48 days	74	33.7	± 1.1	33.4	± 1.1	ns
	49-84 days	49	32.7	± 1.3	31.7	± 1.3	ns
Monocytes (%)	3-6 days	8	6.2	± 1.2	6.9	± 1.2	ns
	7-20 days	61	4.9	± 0.4	5.1	± 0.5	ns
	21-48 days	47	5.3	± 0.5	5.4	± 0.6	ns
	49-84 days	30	5.3	± 0.6	5.0	± 0.6	ns
Neutrophils (%)	3-6 days	15	59.0	± 2.3	61.5	± 3.0	ns
	7-20 days	95	60.1	± 1.0	60.0	± 1.0	ns
	21-48 days	73	58.2	± 1.1	58.7	± 1.2	ns
	49-84 days	49	59.1	± 1.3	60.5	± 1.5	ns
Eosinophils (%)	3-6 days	8	2.3	± 0.7	2.4	± 0.6	ns
	7-20 days	56	2.5	± 0.3	3.0	± 0.3	ns
	21-48 days	45	2.8	± 0.2	2.8	± 0.2	ns
	49-84 days	30	2.2	± 0.2	2.5	± 0.2	ns
Basophils (%)	3-6 days	7	0.2	± 0.1	0.3	± 0.2	ns
	7-20 days	52	0.3	± 0.1	0.4	± 0.1	ns
	21-48 days	41	0.4	± 0.1	0.2	± 0.0	ns
	49-84 days	28	0.3	± 0.1	0.5	± 0.3	ns

<sup>a</sup> Statistical significance of differences was determined using the Wilcoxon matched pairs test.

<sup>b</sup> Not significant.

La norme biologique pour les lymphocytes est de 25 à 33%. On remarque que les données obtenues lors de cette étude sont dans la norme haute et que le traitement phagique ne modifie pas significativement le pourcentage de lymphocytes. En effet, ce pourcentage est de 30,8% (valeur contrôle 32,5% ; 15 patients) après 3 à 6 jours de traitement phagique, 32,2% (valeur contrôle : 32,2% ; 95 patients) après 7 à 20 jours de traitement phagique, 33,4% (valeur contrôle 33,7% ; 74

patients) après 21 à 48 jours de traitement phagique et 31,7% (valeur contrôle : 32,7% ; 49 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique. Le traitement phagique n'entraîne pas d'effets immunodépresseurs.

La norme biologique pour les monocytes est comprise entre 2 et 6%. L'étude met en évidence des pourcentages de monocytes dans la norme haute. Par contre, le traitement phagique n'a pas d'influence sur le pourcentage de cette catégorie de leucocytes : le pourcentage en monocytes est de 6,9% (valeur contrôle 6,2% ; 8 patients) après 3 à 6 jours de traitement phagique, 5,1% (valeur contrôle : 4,9% ; 61 patients) après 7 à 20 jours de traitement phagique, 5,4% (valeur contrôle : 5,3% ; 47 patients) après 21 à 48 jours de traitement phagique et 5% (valeur contrôle 5,3% ; 30 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

Le pourcentage normal de neutrophiles est compris entre 50 et 70%. Les valeurs obtenues au cours de l'étude sont normales et ne montrent pas une quelconque influence de la thérapie phagique sur cette catégorie de leucocytes. Le pourcentage de neutrophiles est de 61,5% (valeur contrôle : 59% ; 15 patients) après 3 à 6 jours de traitement phagique, 60% (valeur contrôle : 60,1% ; 95 patients) après 7 à 20 jours de traitement phagique, 58,7% (valeur contrôle : 58,2% ; 73 patients) après 21 à 48 jours de traitement phagique et 60,5% (valeur contrôle : 59,1% ; 49 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

Le pourcentage normal de polynucléaires éosinophiles est de 1 à 3%. Les valeurs obtenues lors de l'étude sont normales et la thérapie phagique n'engendre pas de modifications significatives du pourcentage d'éosinophiles. En détail, le pourcentage d'éosinophiles est de 2,% (valeur contrôle : 2,3% ; 8 patients) après 3 à 6 jours de traitement phagique, 3% (valeur contrôle : 2,5% ; 56 patients) après 7 à 20 jours de traitement phagique, 2,8% (valeur contrôle : 2,8% ; 45 patients) après 21 à 48 jours de traitement phagique et 2,5% (valeur contrôle : 2,2% ; 30 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique. L'administration de phages ne semble pas donc engendrer de réponse allergique.

Enfin, le pourcentage de polynucléaires basophiles se situe normalement entre 0,25 et 0,5%. Le traitement phagique ne modifie pas significativement ce pourcentage, qui reste normal tout au long de l'étude : le pourcentage en basophiles est de 0,3% (valeur contrôle : 0,2% ; 7 patients) après 3 à 6 jours de traitement phagique, 0,4 % (valeur contrôle : 0,3% ; 52 patients) après 7 à 20 jours de traitement phagique, 0,2% (valeur contrôle : 0,4% ; 41 patients) après 21 à 48 jours de traitement phagique et 0,5% (valeur contrôle : 0,3% ; 28 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

En conclusion, on peut mentionner un taux plaquettaire anormal chez 3,9% des patients (6 patients sur 153). Les risques de thrombose ou à l'inverse hémorragique, même s'ils ne sont pas très marqués, sont donc à prendre en considération.

### *b.3 Effets sur le pancréas*

Un des marqueurs particulièrement suivis pour le pancréas est la concentration sanguine en amylase, dont une valeur anormalement élevée peut être un signe de pancréatite (voire d'autres affections du pancréas ou des glandes salivaires). Lors du traitement par phages,

aucune modification significative n'a été mise en évidence (figure 40). Ceci suggèrerait que le traitement phagique n'entraîne pas de dysfonctionnement pancréatique et, en particulier, d'inflammation du pancréas.

#### *b.4 Effets sur la glycémie*

L'analyse montre une augmentation significative de la glycémie à jeun après 3 à 6 jours, 7 à 20 jours et 49 à 84 jours de thérapie : respectivement de  $84,4 \pm 7,6$  à  $98,1 \pm 9$  mg/dl ( $n = 14$  ;  $p < 0,05$ ),  $84,4 \pm 3,1$  à  $93,3 \pm 1,7$  mg/dl ( $n = 92$  patients ;  $p < 0,05$ ) et  $81,1 \pm 5,1$  à  $96,2 \pm 2,9$  mg/dl ( $n = 46$  ;  $p < 0,05$ ) (figure 40). Cependant les valeurs moyennes de la glycémie à jeun restent dans la norme haute (60 à 100 mg/dl). Cet effet hyperglycémiant s'exerce dès le début de traitement phagique et ne progresse pas lors de la poursuite du traitement.

L'effet hyperglycémiant semble toucher l'ensemble des patients de l'étude (diabétiques et non diabétiques). Parmi les patients non diabétiques de l'étude (141 patients ayant une glycémie à jeun  $< 126$  mg/dl avant le début du traitement phagique), seulement deux patients ont eu une glycémie à jeun  $> 126$  mg/dl durant le traitement. Ce chiffre est à relativiser car dans les deux cas, la glycémie à jeun suivante était inférieure à 126 mg/dl. De plus, 22 patients ont eu une glycémie à jeun comprise entre 100 et 126 mg/dl durant le traitement. La glycémie à jeun suivante était normale (60 à 99 mg/dl) chez 12 patients. (L'étude ne mentionne cependant pas le nombre de patients ayant une glycémie à jeun comprise entre 100 et 126 mg/dl avant le protocole).

En conclusion, la phagothérapie semble avoir un réel impact sur la glycémie. Son effet hyperglycémiant reste toutefois quantitativement modéré (augmentation moyenne de 0,1 g/dl) mais devra faire l'objet de précautions d'emploi et d'une surveillance chez les sujets diabétiques ou à glycémie à jeun élevée. L'effet du traitement phagique sur la production d'insuline par les cellules  $\beta$  des ilots de Langerhans n'est pas abordé dans cette étude. Les mécanismes responsables de l'effet hyperglycémiant n'ont pas été mis en évidence. Il est envisageable que l'effet hyperglycémiant de la phagothérapie soit corrélé à une action sur le pancréas.

Figure 40 A: Impact de la thérapie phagique sur les marqueurs biochimiques

Parameter (unit)	Cumulative phage use	Number of analyzed cases	Baseline value		Value during PT		p <sup>o</sup>
			Mean	± SE	Mean	± SE	
Fasting blood sugar (mg/dl)	3–6 days	14	84.6	± 7.6	98.1	± 9.0	<0.05
	7–20 days	92	84.4	± 3.1	93.3	± 1.7	<0.05
	21–48 days	71	82.9	± 3.9	94.5	± 1.5	ns <sup>o</sup>
	49–84 days	46	82.1	± 5.1	96.2	± 2.9	<0.05
Creatinine (mg/dl)	3–6 days	16	0.92	± 0.14	1.01	± 0.14	ns
	7–20 days	91	0.93	± 0.03	0.93	± 0.03	ns
	21–48 days	69	0.90	± 0.02	0.91	± 0.02	ns
	49–84 days	47	0.91	± 0.03	0.93	± 0.03	ns
Total protein (g/dl)	3–6 days	5	7.50	± 0.32	7.31	± 0.33	ns
	7–20 days	10	7.20	± 0.16	7.08	± 0.13	ns
	21–48 days	23	7.24	± 0.11	7.17	± 0.11	ns
	49–84 days	22	7.38	± 0.11	7.39	± 0.12	ns
Total bilirubin (mg/dl)	3–6 days	17	0.57	± 0.05	0.58	± 0.06	ns
	7–20 days	92	0.64	± 0.03	0.66	± 0.03	ns
	21–48 days	72	0.62	± 0.03	0.65	± 0.04	ns
	49–84 days	46	0.56	± 0.03	0.56	± 0.04	ns
Aspartate transaminase (UI)	3–6 days	17	34.0	± 12.9	31.5	± 10.5	ns
	7–20 days	97	24.7	± 2.4	26.1	± 3.0	ns
	21–48 days	71	23.2	± 1.3	24.2	± 1.0	<0.05
	49–84 days	47	21.4	± 0.9	21.8	± 1.2	ns

L'analyse de la glycémie à jeun montre une augmentation statistiquement significative de ce marqueur après 3 à 6 jours, 7 à 20 jours et 49 à 84 jours de thérapie : respectivement de  $84,4 \pm 7,6$  à  $98,1 \pm 9$  mg/dl (n = 14 ; p < 0,05),  $84,4 \pm 3,1$  à  $93,3 \pm 1,7$  mg/dl (n = 92 patients ; p < 0,05) et  $81,1 \pm 5,1$  à  $96,2 \pm 2,9$  mg/dl (n = 46 ; p < 0,05). La phagothérapie semble entraîner un effet hyperglycémiant.

La créatininémie permet de détecter un dysfonctionnement de la filtration rénale. Les valeurs normales de la créatinine sérique sont de 7 à 13 mg/l (soit 0,7 à 0,13 mg/dl) chez l'homme et 6 à 11 mg/L (soit 0,6 à 0,11 mg/dl) chez la femme. Le traitement phagique ne modifie pas significativement ce marqueur : la concentration de créatinine sérique est de 1,01 mg/dl (valeur contrôle 0,92 mg/dl ; 16 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 0,93 mg/dl (valeur contrôle : 0,93 mg/dl ; 91 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 0,91 mg/dl (valeur contrôle : 0,9 mg/dl ; 69 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 0,93 mg/dl (valeur contrôle : 0,91 mg/dl ; 47 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

La concentration normale de protéines totales dans le sang est de 65 à 80 g/l (soit 6,5 à 8 g/dl). Une hypoprotidémie pourrait mettre en évidence un défaut de synthèse (insuffisance hépatique) ou une fuite anormale au niveau rénal (syndrome néphrotique, glomérulonéphrite). Les valeurs obtenues au cours de l'étude sont normales et ne témoignent pas d'un éventuel impact des phages sur ce marqueur. La concentration de protéines totales dans le sang est de 7,31 g/dl (valeur contrôle : 7,5 g/dl ; 5 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 7,08 g/dl (valeur contrôle : 7,2 g/dl ; 10 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 7,17 g/dl (valeur contrôle : 7,24 g/dl ; 23 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 7,39 g/dl (valeur contrôle : 7,38 g/dl ; 22 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

Les taux normaux de bilirubine totale dans le sang sont de 0,3 à 1,9 mg/dl. Une augmentation de ce taux peut être la conséquence d'une atteinte hépatique, d'un obstacle au niveau des voies biliaires ou

d'une hémolyse. Dans l'étude, les taux de bilirubine sanguine totale sont normaux et le traitement phagique n'entraîne pas de modifications de la bilirubinémie totale. En particulier, le taux de bilirubine sanguine totale est de 0,58 mg/dl (valeur contrôle : 0,57 mg/dl ; 17 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 0,66 mg/dl (valeur contrôle : 0,64 mg/dl ; 92 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 0,65 mg/dl (valeur contrôle : 0,62 mg/dl) après 21 à 48 jours de traitement et 0,56 mg/dl (valeur contrôle : 0,56 mg/dl) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

L'aspartate transaminase ou aspartate aminotransférase (ASAT) est une enzyme qui se trouve en concentration importante dans les muscles (cardiaques et squelettiques), le foie, le rein et le cerveau. Les valeurs normales de la concentration sanguine d'ASAT sont comprises entre 10 et 40 UI/L (à 37°C). Donc lors de l'étude, les valeurs obtenues sont normales. Le traitement phagique augmente significativement la concentration sanguine d'ASAT après 21 à 48 jours de traitement : de 23,2 UI/L à 24,2 UI/L (71 patients ;  $p < 0,05$ ). Les autres valeurs de l'étude ne mettent pas en évidence de modifications statistiquement significatives de la concentration sanguine d'ASAT lors du traitement phagique : 31,5 UI/L (valeur contrôle 34 UI/L ; 17 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 26,1 UI/L (valeur contrôle : 24,7 UI/L ; 97 patients) après 7 à 20 jours de traitement et 21,8 UI/L (valeur contrôle 21,4 UI/L ; 47 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

Figure 40 B: Impact de la thérapie phagique sur les marqueurs biochimiques

Parameter (unit)	Cumulative phage use	Number of analyzed cases	Baseline value	Value during PT	$p^a$
Alanine transaminase (UI)	3-6 days	17	29.1 ± 7.6	29.8 ± 7.5	ns
	7-20 days	94	24.7 ± 1.8	24.9 ± 2.2	ns
	21-48 days	68	24.9 ± 1.8	25.7 ± 1.8	ns
	49-84 days	46	21.9 ± 1.6	27.0 ± 3.8	ns
$\gamma$ -Glutamyl transpeptidase (UI)	3-6 days	9	49.3 ± 13.2	40.1 ± 7.8	ns
	7-20 days	22	46.8 ± 8.3	41.1 ± 7.2	<0.01
	21-48 days	28	30.9 ± 4.1	28.2 ± 4.2	<0.05
	49-84 days	23	34.8 ± 7.0	32.4 ± 5.8	ns
Alkaline phosphatase (UI)	3-6 days	5	74.8 ± 17.5	90.2 ± 18.3	ns
	7-20 days	13	104.4 ± 19.4	97.3 ± 16.9	ns
	21-48 days	27	85.1 ± 7.8	78.5 ± 6.9	ns
	49-84 days	17	70.1 ± 6.9	75.0 ± 8.7	ns
Amylase (UI)	3-6 days	4	57.0 ± 6.0	55.8 ± 7.3	ns
	7-20 days	10	61.8 ± 7.9	68.3 ± 9.7	ns
	21-48 days	20	59.1 ± 5.1	57.4 ± 5.5	ns
	49-84 days	15	63.3 ± 7.3	63.0 ± 7.2	ns

<sup>a</sup> Statistical significance of differences was determined using the Wilcoxon matched pairs test.

<sup>b</sup> Not significant.

L'alanine transaminase ou alanine aminotransférase (ALAT) est une enzyme présente en concentration importante au niveau hépatique. Les valeurs normales de la concentration sanguine d'ALAT sont comprises entre 10 et 45 UI/L (à 37°C). L'étude réalisée montre que les valeurs d'ALAT sont normales et que le traitement phagique ne modifie pas significativement ce marqueur. En effet, la concentration sanguine d'ALAT est de 29,8 UI/L (valeur contrôle 29,1 UI/L ; 17 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 24,9 UI/L (valeur contrôle : 24,7 UI/L ; 94 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 25,7 UI/L (valeur contrôle : 24,9 UI/L ; 68 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 27 UI/L (valeur contrôle : 21,9 UI/L ; 46 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.



Les gamma glutamyl transpeptidases ( $\gamma$ -GT) sont des enzymes, notamment hépatiques, impliquées dans le métabolisme des acides aminés. Une augmentation importante du taux sanguin de  $\gamma$ -GT peut témoigner d'une affection hépatique ou des voies biliaires. Les valeurs normales en  $\gamma$ -GT sanguine sont de 7 à 40 UI chez l'homme et 7 à 28 UI chez la femme (à 37°C). Dans les études, les valeurs sont dans la norme haute. Le traitement phagique entraîne une diminution statistiquement significative du taux sanguin de  $\gamma$ -GT après 7 à 20 jours et 21 à 48 jours de traitement : respectivement de 46,8 UI à 41,1 UI (22 patients ;  $p < 0,01$ ) et de 30,9 UI à 28,2 UI (28 patients ;  $p < 0,05$ ). Par contre, les valeurs obtenues après 3 à 6 jours et 49 à 84 jours de traitement ne montrent pas de différences statistiquement significatives : respectivement 40,1 UI (valeur contrôle : 49,3 UI ; 9 patients) et 32,4 UI (valeur contrôle : 34,8 UI ; 23 patients).

Le dosage sanguin des phosphatases alcalines (PAL) présente un intérêt pour détecter des atteintes hépatiques, des atteintes osseuses et certains cancers. Les valeurs normales des PAL sont comprises entre 40 et 100 UI (à 37°C). Les valeurs obtenues au cours du traitement sont normales et ne montrent pas de modifications statistiquement significatives lors de l'administration des phages. Le taux sanguin de PAL est de 90,2 UI (valeur contrôle : 74,8 UI ; 5 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 97,3 UI (valeur contrôle : 104,4 UI ; 13 patients) après 7 à 20 jours de traitement, 78,5 UI (valeur contrôle : 85,1 UI ; 27 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 75 UI (valeur contrôle : 70,1 UI ; 17 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

Enfin, le dosage de l'amylase sanguine permet de diagnostiquer et de suivre l'évolution d'une pancréatite, d'autres pathologies du pancréas ou d'une affection des glandes salivaires. Les valeurs normales de l'amylase sanguine sont comprises entre 10 et 90 UI (à 37°C). Le traitement phagique n'engendre pas de modifications statistiquement significatives de l'amylase sanguine et les valeurs obtenues sont normales. En effet, le taux d'amylase sanguine est de 55,8 UI (valeur contrôle : 57 UI ; 4 patients) après 3 à 6 jours de traitement, 68,3 UI (valeur contrôle : 61,8 UI ; 10 patients), après 7 à 20 jours de traitement, 57,4 UI (valeur contrôle : 59,1 UI ; 20 patients) après 21 à 48 jours de traitement et 63 UI (valeur contrôle : 63,3 UI ; 15 patients) après 49 à 84 jours de traitement phagique.

### *b.5 Effets sur la fonction hépatique*

Il n'y a pas de changements significatifs du taux des protéines sériques (albumine et globulines), de la bilirubine totale, de l'alanine transaminase (ALAT) et des phosphatases alcalines. L'analyse statistique révèle une légère, mais significative, augmentation du taux de l'aspartate transaminase (ASAT) après 21 à 48 jours de thérapie phagique : de  $23,2 \pm 1,3$  à  $24,2 \pm 1$  UI ( $n=71$  ;  $p < 0,05$ ). Cette augmentation reste toutefois transitoire puisque le taux de l'ASAT n'est plus significativement augmenté après 49 à 84 jours de phagothérapie. En particulier, une augmentation transitoire du taux de l'ASAT a été observée chez 4 patients durant le traitement (de 41 à 138 UI). Il est néanmoins important de signaler que l'ALAT est plus spécifique des pathologies hépatiques que l'ASAT. En effet, une élévation du taux de l'ASAT peut également évoquer une pathologie musculaire, une atteinte cardiaque aiguë ou encore une pathologie des voies biliaires (intra ou extra hépatique).

De plus, une légère, mais significative, diminution du taux sanguin des  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases a été observée après 7 à 20 jours, puis après 21 à 48 jours de traitement. Là encore, cette diminution est transitoire puisqu'elle n'est plus observée après 49 à 84 jours de protocole.

A la vue de cette étude, l'impact de la phagothérapie sur la fonction hépatique semble très modéré, voire nul.

### *b.6 Effets sur la fonction rénale*

La concentration en créatinine sérique n'est pas significativement modifiée pendant le traitement phagique (figure 40). Il n'y donc pas de dysfonctionnements de la filtration rénale lors de l'administration de phages. De plus, il n'y pas eu de résultats anormaux constatés chez les patients n'ayant pas de désordres de la fonction rénale, d'infection urinaire ou de diabète avant le début du traitement.

Parmi les patients de l'étude, incluant des patients diabétiques, des patients ayant une infection urinaire ou des patients ayant une fonction rénale amoindrie, une protéinurie a été recherchée durant le traitement phagique (elle peut être exprimée en débit, g/24 heures, ou en concentration g/l). Une augmentation de la protéinurie peut aussi être physiologique (suite à une activité physique intense par exemple) ou pathologique (fièvre, infarctus du myocarde...). Lorsque l'augmentation de la protéinurie est persistante, il y a généralement une atteinte rénale (souvent d'origine glomérulaire). Un résultat positif (supérieur à la limite de sensibilité : 0,3 g/l) est observé chez 12 patients de l'étude. Chez huit sujets, la concentration urinaire maximale en protéines n'a pas dépassé 0,5 g/L : 6 de ces patients ont une concentration urinaire en protéines qui a diminué jusqu'à passer en dessous du seuil de détection ; pour les deux autres patients la concentration urinaire en protéines s'est maintenue durant le traitement (mais il faut souligner que le résultat était positif chez ces patients avant le début du traitement). Les auteurs ont observé une concentration urinaire supérieure à 0,5 g/L chez 4 patients : un patient diabétique et insuffisant rénal traité par phages pour une infection urinaire (la concentration urinaire en protéines a diminué, passant de 2,8 g/L avant le traitement à 1,1g/L), un patient souffrant d'infection urinaire chronique et traité par phages pour une infection purulente « profonde » (la concentration urinaire en protéines a tout

d'abord atteint 0,5 g/L après le début du traitement pour finalement décroître à 0,2 g/L à la fin du traitement phagique), un patient diabétique avec une infection périprothétique (la concentration urinaire en protéines s'est élevée jusqu'à 0,94 g/L durant le traitement avant de redescendre à une valeur de 0,26 g/L à la fin du traitement phagique), et un patient diabétique avec une ostéomyélite (la concentration urinaire en protéines était de 0,42 g/L avant le traitement et a fluctué entre 0,38 g/L et 0,64 g/L pendant le traitement). Les auteurs ont mentionné la présence de quelques cas de valeurs subnormales, mais toutefois transitoires et non significatives cliniquement, durant le traitement phagique.

Ces données suggèrent que la thérapie phagique n'affecte pas significativement la fonction rénale et en particulier la filtration glomérulaire.

### *b.7 Autres effets observés*

D'autres effets ont été observés ou rapportés par les patients : une sensation transitoire d'inconfort au niveau de la muqueuse nasale (1 patient) et des vertiges (1 patient) suite à l'administration de phages sous forme de gouttes nasales ; des douleurs rénales et une sensation de fatigue générale (1 patient), une réduction transitoire du cycle menstruel (1 patiente) suite à l'administration de phages sous forme de gouttes nasales et de gargarismes ; par voie topique : une ulcération plane (1 patient) et des démangeaisons cutanées au niveau axillaire (1 patient), toutes deux hors du site d'application des phages, des maux de tête (1 patient) ; de petites ecchymoses au niveau de la poitrine et des jambes associées à des saignements gingivaux et précédées par un épistaxis et des saignements gingivaux, sans autres signes hémorragiques (1 patient) suite à l'administration phagique par voie rectale. Ces symptômes (épistaxis, saignements gingivaux, ecchymoses) avaient toutefois été décrits par le patient avant le début de la thérapie phagique. De plus, ils ont cessé de manière progressive tout au long du premier cycle d'administration phagique et n'ont pas été observés lors du second cycle du protocole ; une augmentation de la fréquence des défécations et des flatulences (1 patient), une constipation (1 patient), des douleurs musculaires au niveau des jambes et des douleurs articulaires au niveau sacro-iliaque et du genou (1 patient), une sensation d'inconfort abdominal (1 patient) suite à l'administration phagique par voie rectale ; des démangeaisons cutanées transitoires au niveau du visage (1 patient) suite à l'administration de phages par l'association des voies rectales et topiques ; une augmentation de mucosités purulentes au niveau de l'arbre respiratoire (1 patient) suite à l'administration



phagique par aérosols ; un œdème au niveau du site d'application des phages par voie topique (1 patient) qui a nécessité l'arrêt du traitement ; un œdème aigu au niveau de la hanche et de la jambe (1 patient), une douleur suite à la fermeture d'une fistule empêchant l'évacuation de pus (1 patient) suite à l'administration de phages par voie orale (une thrombose veineuse pourrait également en être à l'origine, mais la thérapie phagique a été interrompue par précaution chez ce patient) ; et enfin des symptômes grippaux (2 patients).

On peut noter que ces symptômes regroupent l'ensemble des effets observés durant la thérapie phagique, et qu'ils ne sont pas tous forcément une conséquence directe du traitement.

### **c. Discussion**

L'étude montre que la thérapie phagique n'entraîne pas d'altérations au niveau des organes vitaux (foie, rein, pancréas). De plus, elle n'affecte pas la formule sanguine : le taux de leucocytes circulants n'est pas significativement modifié par le traitement phagique (que ce soit les monocytes, les lymphocytes ou les polynucléaires) ; en particulier, le taux d'éosinophiles reste dans des valeurs normales, ce qui est rassurant quant aux réactions allergiques.

Les précédents rapports de l'IIET, durant la période 1970-2005, ont une portée scientifique discutable quant aux résultats de l'efficacité des traitements phagique, mais permettent d'avoir un recul intéressant. Ils confirment la faible incidence des effets indésirables et sont donc un argument supplémentaire en faveur de la sécurité de la thérapie phagique. De plus, l'IIET n'a jamais reçu d'informations ou de plaintes mentionnant de possibles effets indésirables directement liés à un traitement par thérapie phagique (bien qu'il n'y avait pas, durant cette période, de suivi prolongé).

D'autres études récentes réalisées sur les bactériophages confirment la faible incidence et la faible intensité des effets indésirables potentiellement liés à la phagothérapie (Wright et al., 2009). Parmi les symptômes décrits, on retrouve des troubles gastro-intestinaux, ainsi que des réactions allergiques, rapportés chez moins de 0,5% des patients traités (Alisky et al., 1998).

Les causes responsables des effets indésirables peuvent être le phage lui-même et notamment sa capsid de nature protéique, les débris provenant des bouillons de cultures utilisés dans les préparations phagiques, les débris de lyse bactérienne lors de la propagation des phages dans

les préparations thérapeutiques ou lors de la phagothérapie. Les effets observés peuvent aussi être des symptômes des pathologies du patient.

L'apport de débris bactériens peut être double : l'apport externe provient de la préparation même des suspensions phagiques. Pour propager un phage, il est nécessaire de le cultiver en présence de la bactérie cible, qui sera lysée par le phage. Les impuretés et notamment les endotoxines présentes dans la préparation de phages thérapeutiques sont, grâce aux technologies actuelles, éliminables en quasi-totalité lors de la phase de purification. Les préparations actuelles ont donc l'avantage de ne comporter qu'une infime quantité de débris bactériens, ce qui n'était pas toujours le cas autrefois. De plus, il est possible de vérifier la concentration en endotoxines de la préparation phagique à l'aide de tests commercialisés.

L'apport interne provient de la lyse des bactéries détruites au niveau du site infectieux. En effet, la destruction de la bactérie par les phages peut entraîner un relargage des toxines (endotoxines et exotoxines) présentes dans la cellule. Une expérience basée sur l'injection de lysats de bactéries Gram + a entraîné des effets indésirables, d'intensité faible à sévère, pouvant expliquer certains effets observés au cours de l'étude (Abedon et al., 2011). Ce phénomène de relargage de toxines n'est pas propre à la phagothérapie, puisqu'il peut également intervenir lors du traitement avec des antibiotiques bactéricides.

Les données de l'étude menée par l'IJET révèlent qu'il n'y a pas de modifications significatives des marqueurs inflammatoires. Cependant, une étude plus ancienne, menée par l'IJET entre janvier 2006 et octobre 2007 sur 37 patients, a montré une diminution significative de la concentration sérique en protéine C réactive et du taux de lymphocytes circulants pendant la thérapie phagique (Miedzybrodzki et al., 2009). Dans les faits, la CRP passait d'une moyenne de 23,3 mg/L avant le traitement à 16,1 mg/L au bout de 9 à 32 jours de traitement. Le taux de lymphocytes circulants diminuait, quant à lui, de  $7,8 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> (valeur contrôle) à  $7,1 \cdot 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup>. Les apparentes différences entre les conclusions de ces deux études pourraient s'expliquer par une différence des valeurs basales des marqueurs inflammatoires. En effet, dans l'étude analysée, les taux contrôles de CRP et de lymphocytes circulants sont plus faibles (de l'ordre des valeurs obtenues pendant et à la fin du traitement de l'ancienne étude). La conclusion de ces observations est une possible

diminution du phénomène inflammatoire lorsqu'il est exacerbé au début du traitement phagique.

Enfin, certains éléments permettent d'expliquer la bonne tolérance du traitement phagique. Les bactériophages sont très sélectifs d'une espèce bactérienne, voire même d'une souche bactérienne donnée. Leur spectre d'action très étroit permet d'éviter les répercussions sur la flore commensale non pathogène. Même en cocktails, les préparations phagiques ont un spectre plus étroit que celui d'une grande partie des antibiotiques (Abedon et al., 2011). Il n'y a donc pas de « dysbiose » (altération de l'équilibre normal de la flore bactérienne), à l'origine de certains des effets indésirables des antibiotiques à large spectre.

## 5. Pharmacologie de la thérapie phagique

La pharmacologie phagique a débuté très tôt, avant même que la véritable nature de ces virus ne soit établie. Les premières études de pharmacologie ont été confrontées aux limites scientifiques de l'époque. Elles ont néanmoins permis d'en apprendre davantage sur ces virus et d'utiliser ces connaissances pour parfaire l'outil thérapeutique. Des travaux plus récents complètent, et parfois corrigent, ces premières études. Ils demeurent cependant très largement insuffisants pour connaître en détail le comportement des phages dans l'organisme.

### a. Pharmacocinétique :

La pharmacocinétique est l'étude du devenir du principe actif dans l'organisme en fonction du temps, depuis son site d'administration jusqu'à son élimination. Lorsqu'on s'intéresse aux substances (et entités) antibactériennes, le terme « organisme » doit avoir une signification plus large et intégrer les flores microbiennes associées à l'organisme. Classiquement, la pharmacocinétique fait intervenir quatre principales étapes (système ADME) :

- L'absorption : ensemble des phénomènes intervenant dans le transfert du principe actif depuis son site d'administration jusqu'à la circulation sanguine.

- La distribution : processus de répartition du principe actif dans l'ensemble des tissus et organes de l'organisme. Elle se fait à deux niveaux : la distribution plasmatique ou sanguine et la distribution tissulaire.
- La métabolisation : processus par lequel une modification de la structure du principe actif est effectuée par des systèmes enzymatiques. Elle a pour conséquence la formation de métabolites actifs, inactifs ou toxiques.
- L'excrétion : élimination définitive du principe actif de l'organisme.

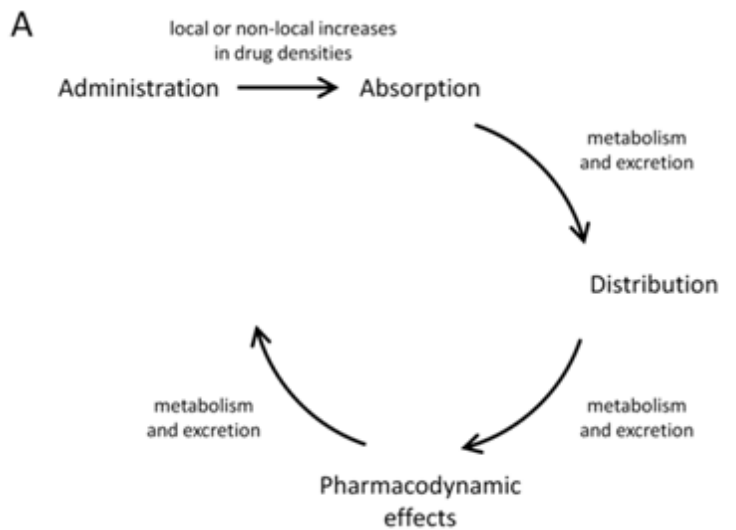
Par rapport au cycle de vie classique des principes actifs dans l'organisme, la thérapie phagique présente deux différences principales (figure 41). Elles interviennent lors des étapes d'absorption et de métabolisation.

- Absorption :

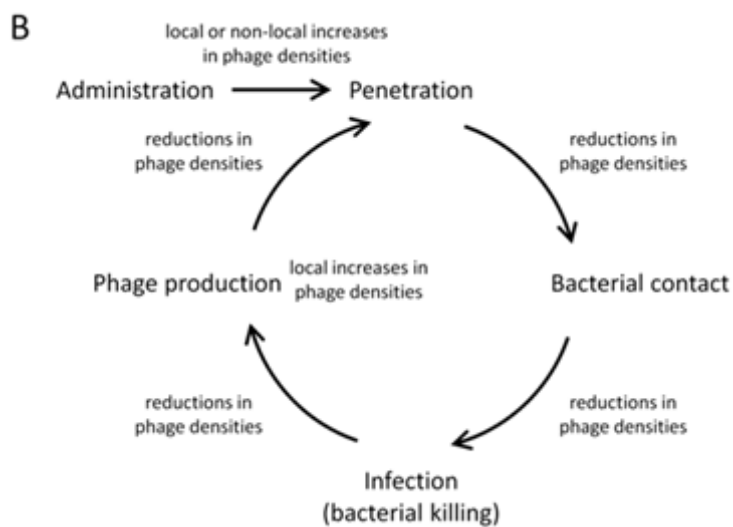
Le terme « pénétration » est employé pour décrire les mouvements phagiques au travers des membranes biologiques, leur permettant d'atteindre la circulation sanguine et les différents tissus de l'organisme, ainsi que dans les biofilms bactériens.

L'étape d'absorption ne peut pas être considérée comme telle en thérapie phagique. Lorsqu'un traitement topique est mené, cette étape (de « pénétration ») n'est pas limitante car les virus sont directement mis en contact avec les tissus infectés. Par contre, cette étape (de « pénétration ») devra être envisagée lors des traitements systémiques.

Figure 41 : Comparaison des étapes de pharmacocinétique des phages avec celles des substances médicamenteuses



Source : « Phage Therapy : Emergent Property Pharmacology », Andrew J. Curtright et Stephan T. Abedon, Journal of bioanalysis and biomedecine, 1948-593X.S6, 2011.



Les étapes de pharmacocinétique pour les principes actifs chimiques sont décrites dans le cycle A. Elles regroupent 4 principales étapes suite à l'administration : l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'excrétion. Le métabolisme et l'excrétion du principe actif interviennent dès le premier contact avec les organes responsables. Ils peuvent donc se produire avant ou après que le principe actif ait atteint l'organe cible, à l'origine des effets pharmacodynamiques.

Le cycle pharmacocinétique des bactériophages (cycle B) met en évidence certaines différences. Les bactériophages pénètrent dans l'organisme et diffusent au niveau du site infectieux lors d'un traitement systémique. Dans le cas d'un traitement topique, les phages vont être directement en contact avec les bactéries pathogènes. L'infection des bactéries par les phages mène à une production phagique *in situ* (phénomène d'auto-amplification). Ceci permet de contrebalancer la diminution de densité phagique par le système immunitaire ou par les conditions environnementales (acidité gastrique par exemple).

L'administration topique de phage (qui inclut l'administration de phages par voie pulmonaire) ne nécessite pas d'étape d'absorption ni de distribution. Elle fait intervenir une étape dite de « pénétration » de la préparation phagique au niveau des biofilms bactériens. Cette pénétration phagique au niveau des biofilms serait plus efficace que celle des antibiotiques (Gilbert et al., 2011). En effet, la lyse bactérienne induite par les phages, notamment au niveau de la couche externe des biofilms bactériens, pourrait faciliter la pénétration des phages dans ces biofilms. On parle alors de « pénétration active ». Elle permet ainsi aux préparations phagiques d'atteindre les bactéries sous-jacentes, qui sont autant de cibles pour l'établissement de cycles lytiques.

La thérapie phagique par voie orale peut également induire une pénétration phagique au niveau des biofilms bactériens sans étapes d'absorption et de distribution. Elle a alors pour objectif le traitement des infections du tractus gastro-intestinal. La pénétration des phages au niveau de bactéries intestinales n'est pas parfaitement élucidée. En particulier, deux problèmes peuvent se présenter. D'une part, l'acidité gastrique peut inactiver les bactériophages et donc réduire leur efficacité. Lors de l'administration de phages par voie orale (que ce soit pour un traitement local ou à visée systémique), le passage des préparations au niveau des sucs gastriques doit toujours être pris en compte. D'autre part, la dilution des bactériophages au niveau des sécrétions gastriques et du bol alimentaire peut diminuer les densités phagiques dans la lumière gastro-intestinale, en-deçà des seuils nécessaires à la bonne conduite du traitement.

L'administration *per os* de préparations phagiques conduit à une assimilation des phages et donc à un passage dans la circulation sanguine par un phénomène appelé « translocation phagique ». Les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène ne sont, par contre, pas bien connus. La durée déterminée pour ce passage varie selon les études. Il a été montré que l'administration orale de phages chez des souris entraîne un passage sanguin en cinq à dix minutes (Keller et Engley, 1958). Une autre étude menée sur des lapins mentionne un délai de quatre jours pour retrouver des phages dans la circulation sanguine (Gorski et al., 2006). En ce qui concerne l'être humain, très peu de documents traitent de la translocation phagique. La présence de bactériophages dans le flux sanguin de patients a toutefois été mise en évidence après dix jours de phagothérapie, par voie orale, contre diverses infections (Gorski et al., 2006). Ce délai d'assimilation paraît relativement long, surtout lorsqu'on le confronte à

l'efficacité de la phagothérapie, qui intervient parfois après quelques jours de traitement seulement. La question de la détection des bactériophages dans la circulation sanguine se pose nécessairement. Cette étape de pénétration doit donc intervenir dans un laps de temps allant de quelques minutes à plusieurs jours après l'administration orale de phages. Elle dépend indiscutablement du type de préparation phagique employé ainsi que des conditions d'administration.

L'administration par voie orale étant pratique, simple (sauf exceptions) et bien acceptée par les patients, il est intéressant de pouvoir l'utiliser dans le cadre de la phagothérapie, comme c'est le cas dans l'antibiothérapie. La principale limite est l'incertitude quant à l'assimilation, en quantité suffisante, des bactériophages.

L'administration de phages par voie rectale dans l'optique d'un traitement systémique semble également possible et intéressante. En effet, l'administration intra-rectale génère rapidement des taux plasmatiques en bactériophages (« phagémie ») élevés. Cette voie d'administration a d'ailleurs été comparée à la voie intramusculaire. L'administration intra-rectale a permis des taux de « phagémie » aussi élevés que lors d'injection intramusculaire en un temps plus court : cinq minutes en intrarectale contre quinze minutes en intramusculaire pour obtenir le même pic de concentration plasmatique en bactériophages (Hoffmann, 1965).

Des approches plus directes pour atteindre la circulation sanguine sont possibles : l'administration sous-cutanée, intramusculaire ou intraveineuse. L'assimilation des phages par ces voies est plus fiable que lors d'administration *per os*. Par contre, ces voies d'administration sont plus invasives et nécessitent donc une purification plus importante des préparations phagiques. De plus, la compliance des patients est généralement moindre.

- Distribution :

La répartition des principes actifs utilisés en thérapeutique dépend d'un certain nombre de propriétés (caractéristiques physico-chimiques des principes actifs, affinités respectives pour les protéines sanguines et tissulaires, irrigation des organes...). Les mécanismes mis en jeu pour la distribution sanguine et tissulaire des bactériophages ne sont pas élucidés. On peut

néanmoins émettre l'hypothèse qu'ils sont différents de ceux utilisés par les molécules de principe actif.

Il a tout d'abord été mis en évidence que des phages injectés par voie intraveineuse disparaissent de la circulation sanguine en quelques heures (Appelmans, 1921). Cela signifie qu'il y a une migration potentielle des particules virales du sang vers un ou plusieurs autre(s) compartiment(s). Des études plus récentes tendent à confirmer ces premières observations : suite à l'administration orale de phages à des animaux de laboratoire, on retrouve les phages dans la circulation sanguine en deux à quatre heures, puis dans divers organes (foie, reins, rate) après dix heures (Sulakvelidze et al., 2001).

Cette étape de distribution pourrait faire intervenir les globules rouges. Certains auteurs décrivent une possible liaison entre bactériophages et érythrocytes (Bystricky, 1965 et Reynaud, 1992). D'autres scientifiques mettent en doute de telles interactions.

Les problèmes de distribution pour obtenir des effets pharmacodynamiquement positifs se posent lors de l'administration systémique des phages, puisque ceux-ci doivent atteindre les tissus infectés. Les infections bactériennes accroissent la perméabilité tissulaire, ce qui peut favoriser la distribution des phages à ce niveau (Abedon ST, 2011). De plus, les propriétés d'auto-amplification phagiques peuvent compenser, au moins en partie, les limites de la distribution : si les phages lytiques atteignent le site de l'infection bactérienne, alors ils peuvent agir sur les bactéries et impacter leur pathogénicité. Si, en plus, leur capacité de réplication est suffisante, alors les phages peuvent se multiplier et impacter significativement les bactéries responsables de l'infection. Une étude réalisée sur des souris saines ou présentant une encéphalite à *Shigella dysenteriae* a montré que, suite à des injections intrapéritonéales, des phages étaient décelés au niveau de leur encéphale. La proportion de bactériophages à ce niveau était beaucoup plus importante chez les souris infectées, ce qui témoigne d'une dissémination des virus vers le cerveau et d'une multiplication sur le lieu d'infection (Dubos et al., 1943).

Cette dissémination des bactériophages dans les différents organes de l'organisme aurait des limites. En effet, certaines parties de l'organisme ne permettraient pas une bonne diffusion des bactériophages jusqu'à la zone d'infection (Skurnik et Strauch, 2006). Cependant, les auteurs ne citent pas les organes en question.



- Métabolisme :

Le métabolisme est l'étape au cours de laquelle une modification de la structure du principe actif est réalisée. Elle a principalement pour but de préparer l'élimination de la substance exogène de l'organisme et fait intervenir des systèmes enzymatiques, principalement hépatiques. Dans certains cas, le métabolisme permet de convertir une prodrogue en substance active d'un point de vue thérapeutique, qui a alors un effet favorable.

L'inhibition *in vitro* des bactériophages lors d'un contact avec du sang, du pus, de la bile ou de la salive a été montrée relativement tôt dans l'histoire de la phagothérapie (Evans, 1933). Elle a contribué à discréditer la thérapie phagique : certains scientifiques supposaient que les réussites thérapeutiques observées n'étaient pas dues au pouvoir lytique des bactériophages mais aux débris bactériens présents au sein des suspensions (imparfaitement purifiées) susceptibles de stimuler le système immunitaire adaptatif ou à l'introduction de protéines (constituant de la capsid phagique) à même d'induire une réponse immunitaire innée (Krueger et Scribner, 1941). Plus tard, une inactivation des bactériophages par l'acidité de l'estomac, par des anticorps dirigés contre ces phages ou par une température non optimale a été démontrée (Smith et al., 1987).

De plus, d'un point de vue pharmacocinétique pur, la séquestration phagique par le système immunitaire menant à une réduction des taux de bactériophages actifs dans l'organisme ne relève pas d'une action métabolique. En effet, la séquestration phagique n'a pas pour conséquence une modification de la structure du bactériophage.

Par contre, l'auto-amplification phagique *in situ* peut être décrite comme une action métabolique, bien qu'elle ne soit pas associée à l'action des enzymes hépatiques. Elle permet d'atteindre, voire de maintenir, des densités phagiques suffisantes au niveau du site infectieux, ce qui est indispensable au succès de la thérapie phagique. Ce réapprovisionnement permanent en bactériophages permet en outre de compenser l'action du système immunitaire et l'élimination des bactériophages.

- Elimination :

De nombreux travaux témoignent de l'élimination des bactériophages dans l'urine ou dans les fèces. La présence de phages dans les fèces a, par exemple, été démontrée sur des veaux suite

à l'administration orale de plusieurs phages (Smith et al., 1987). Elle a été confirmée chez l'homme, lors d'administrations orales de phages T4 (Bruttin et Brüssow, 2005).

Le fait que les phages atteignent le système urinaire, suite à une administration systémique, est un élément important pour le traitement des infections urinaires (Abedon ST, 2012).

Cette élimination s'effectue après une période plus ou moins longue, jusqu'à plusieurs jours, de persistance des phages au sein de l'organisme (Sulakvelidze et al., 2001).

## **b. Pharmacodynamie**

Les effets bactéricides de certaines phages pourraient résulter d'une action directe, lyse de la bactérie cible par le phage, et/ou indirecte, via le système immunitaire.

### *b.1 Effets directs*

- Effet des phages sur les biofilms bactériens

Les biofilms sont des ensembles de cellules isolées (bactéries, champignons, algues ou protozoaires) et de microcolonies de cellules filles, associées entre elles et/ou aux surfaces et interfaces, et incluses dans une matrice constituée d'exopolysaccharides bactériens, de matières organiques et non organiques, ainsi que de macromolécules piégées du milieu environnant. Leur formation est inévitable sur toute surface non protégée, dès lors que les conditions minimales requises sont remplies (surface, micro-organismes, eau et éléments nutritifs). L'impact des biofilms concerne le secteur industriel (réseaux d'eau, échangeurs de chaleur, industrie agro-alimentaire, industrie maritime) et le secteur médical (plaque dentaire, implants, prothèses, cathéters). 65% des infections recensées chez l'Homme, dans les pays développés, sont causées ou entretenues par des biofilms. Plus de 80% des infections bactériennes sont chroniques à cause de ces biofilms.

Les biofilms réduisent les réponses immunitaires (échappement aux défenses immunitaires de l'hôte) et augmentent les résistances aux antibiotiques. Les raisons expliquant la résistance des biofilms sont multiples : tout d'abord, la couche muqueuse gêne la diffusion des molécules au sein du biofilm, elles ne peuvent alors plus atteindre les bactéries cibles. De plus, certaines molécules peuvent réagir chimiquement avec les constituants de la couche muqueuse (par exemple les  $\beta$  lactamines sont dégradées par des  $\beta$  lactamases extracellulaires).

Enfin, l'état physiologique des bactéries du biofilm pourrait être modifié, ce qui a des répercussions sur l'efficacité des substances antibactériennes. La résistance des bactéries en biofilms dépend notamment de l'ancienneté du biofilm.

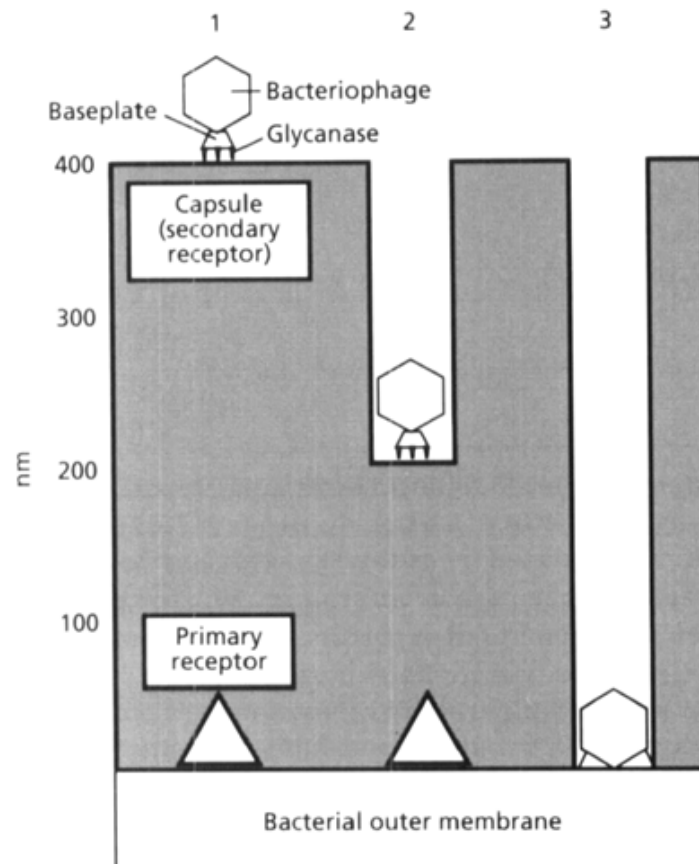
Au niveau de la désinfection, la résistance des cellules incluses dans un biofilm est généralement supérieure à celle des cellules en suspension et elle augmente avec l'âge du biofilm. Après détachement, la sensibilité des bactéries serait identique à celle des cellules en suspension. De plus, les meilleurs désinfectants pour des cellules en suspension ne sont pas toujours les plus efficaces pour des bactéries de biofilms.

Lorsqu'on étudie le comportement des antibiotiques sur des bactéries planctoniques (c'est à dire des bactéries placées dans une solution ou dans une boîte de Pétri), celles-ci n'ont pas le temps de s'organiser en biofilms et sont donc totalement accessibles. Cependant, au cours d'une infection bactérienne chronique, les bactéries ont la possibilité de former des biofilms dans l'organisme. Les antibiotiques vont détruire les bactéries circulantes, supprimant ainsi les symptômes, mais ne pourront pas atteindre celles enchâssées dans le biofilm qui vont perdurer dans l'organisme. Le biofilm va alors servir de nid à partir duquel les infections vont récidiver.

Les bactériophages ont-ils la capacité d'atteindre les bactéries en biofilms ?

La première observation de la destruction d'un biofilm par les bactériophages a été réalisée en 1956 (par Adam et Park ; Dublanche et Patey, 2011). Depuis, un intérêt est porté aux mécanismes enzymatiques mis en jeu par les phages pour atteindre et altérer ces biofilms. Lors d'un travail sur des bactériophages dirigés contre *Escherichia coli*, la synthèse d'une glycanase par le bactériophage a été mise en évidence. Cette enzyme a la capacité de lyser la capsule mucoïde des biofilms (Stirm et al., 1971). De plus, les bactériophages ont la capacité de s'arrimer à une molécule située à la surface de la capsule polysaccharidique, sur un récepteur dit « secondaire » (figure 42). Cette adhésion permet la sécrétion d'une dépolymérase et par la suite l'arrimage du phage à une molécule dite « récepteur primaire » à la surface de la paroi bactérienne (Hughes et al., 1998).

Figure 42: Schéma représentant la traversée d'un biofilm par un bactériophage



Source : « Biofilm susceptibility to bacteriophage attack : the role of phage-borne polysaccharide depolymerase », Hughes et al., Microbiology 144, 3039-3047, 1998

Le schéma représente les trois étapes de pénétration d'un bactériophage au sein d'un biofilm. La première étape (1) correspond à l'arrimage du phage au niveau d'une molécule de surface servant de « récepteur secondaire » (secondary receptor). Elle permet au phage d'amorcer sa traversée de la capsule mucoïde du biofilm par dégradation de cette capsule grâce à une glycanase (2). Enfin, la traversée s'achève par la fixation du phage à une molécule de surface de la bactérie, servant de « récepteur primaire » (primary receptor) (3).

- Traitements phagiques actifs et passifs

L'effet anti-infectieux des bactériophages peut résulter de différents mécanismes d'action. Ces différentes approches de la destruction bactérienne par les phages sont appelées traitement actif ou traitement passif. Les traitements actifs et passifs dépendent des caractéristiques phagiques et de celles des bactéries cibles (Abedon et Thomas-Abedon, 2010) (figure 43).

Le traitement actif fait intervenir le phénomène de « lyse de l'intérieur ». Il s'agit en réalité de la lyse bactérienne observée à la fin du cycle lytique. Cette lyse est induite par des protéines (comme les holines et endolysines) produites à l'intérieur des bactéries au cours de l'infection phagique. Les protéines entraînent une perturbation de la paroi bactérienne, menant à la lyse de la bactérie. Les phages néoformés dans les bactéries infectées au cours du cycle lytique se retrouvent alors dans le milieu extracellulaire environnant.

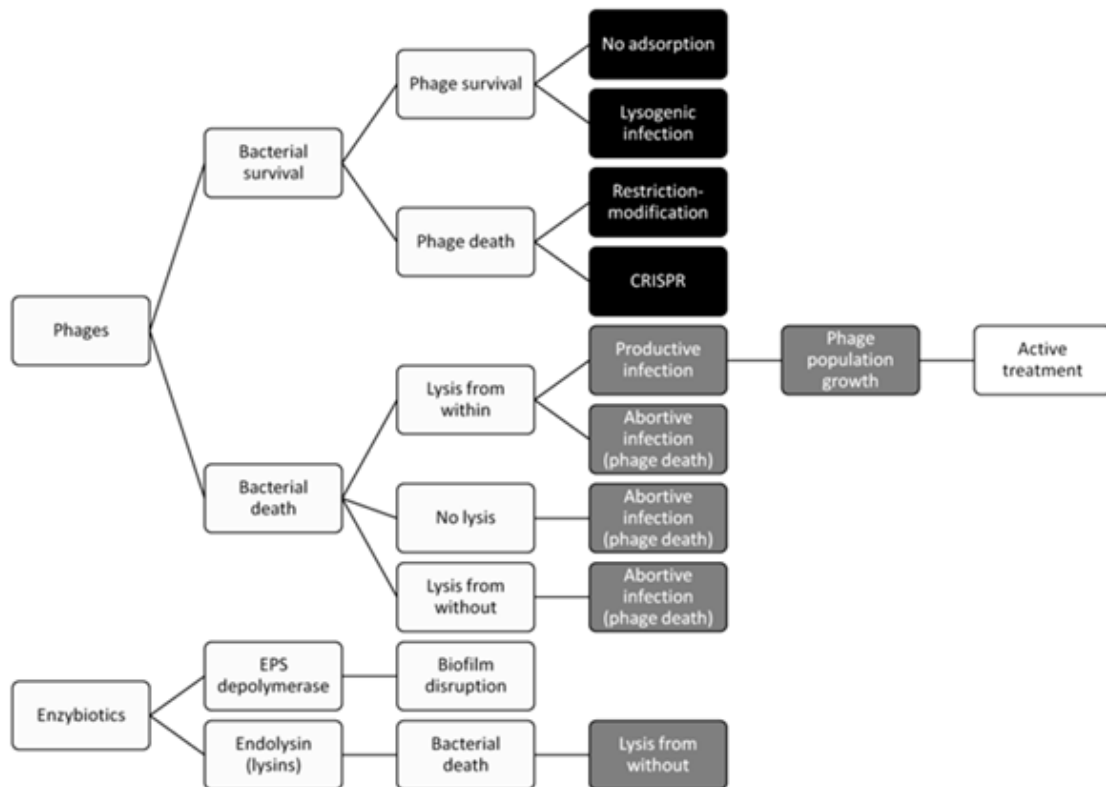
Le traitement passif repose sur le phénomène de « lyse de l'extérieur », qui fait partie des infections abortives. Les infections abortives sont des infections qui n'aboutissent pas à la production de nouveaux virus. Elles peuvent être la conséquence de l'expression de gènes bactériens de résistance (Abedon, 2011). Elles peuvent également résulter de l'absence de facteurs spécifiques nécessaires à la production phagique, associée à la présence des facteurs nécessaires à la destruction bactérienne par les phages.

Le phénomène de « lyse de l'extérieur » est la conséquence de perturbation au niveau de la paroi bactérienne, suite à l'adsorption de plusieurs phages au niveau de cette bactérie. Les enzymes responsables de cette perturbation cellulaire accèdent à la paroi depuis le milieu extérieur. La « lyse de l'extérieur » entraîne une destruction rapide de la cellule bactérienne (plus rapide que celle réalisée par la « lyse de l'intérieur »).

Les conséquences de ces traitements actifs et passifs doivent être prises en compte lors d'un traitement phagique. En effet, lorsqu'un traitement actif est mené, une administration phagique unique peut permettre d'obtenir une élimination complète de la bactérie pathogène. Lors d'un traitement passif, plusieurs administrations peuvent être nécessaires pour maintenir des densités phagiques suffisantes à la réalisation du traitement.

En pratique, il s'agit de tester expérimentalement, pour un phage isolé contre une souche bactérienne, les potentiels de réplication phagique en présence de bactéries cibles, en plus de la destruction bactérienne.

Figure 43 : Les différents effets des phages et enzybiotiques sur les bactéries



Source : « Phage therapy : Emergent Property Pharmacology », Andrew J. Cutright et Stephen T. Abedon, Journal of Bioanalysis and Biomedecine, 2011

« Phages » fait référence aux particules phagiques intactes, alors qu’ « Enzybiotics » sont des produits phagiques purifiés. Les échecs des traitements phagiques impliquent une survie de la bactérie cible (fond noir et texte blanc). Les traitements passifs interviennent lorsqu’un nombre suffisant de phages permet la mort bactérienne, sans augmentation de la population phagique (fond gris avec écriture blanche, à l’exception de « Productive infection » et « Phage population growth »). Les traitements actifs (fond blanc et texte noir) permettent une amplification *in situ* de la population phagique, à même de maintenir des densités phagiques suffisantes à l’éradication de la bactérie cible.

Les infections au cours desquelles la destruction bactérienne est obtenue sans réplication phagique sont qualifiées d’ « abortives ».

Certains bactériophages peuvent produire une activité antibactérienne via des molécules agissant de l’extérieur plutôt que de l’intérieur. L’exploitation de ces formes purifiées comme moyen de traitement antibactérien est décrite en termes d’« enzybiotique ». Les deux principales enzybiotiques sont les endolysines phagiques et les dépolymérase de substances polymériques extracellulaires (EPS).

Les endolysines sont des enzymes intervenant dans « la lyse de l'intérieur ». Elles jouent un rôle important dans la destruction bactérienne, permettant la libération des phages néoformés. De plus, les endolysines peuvent être utilisées dans une forme purifiée. Elles sont alors dirigées contre les bactéries Gram + et procèdent à une lyse de l'extérieur, par action au niveau du peptidoglycane.

Les dépolymérase d'EPS affectent principalement les polymères extracellulaires qui permettent l'intégrité du biofilm bactérien. Ils ne sont pas directement bactéricides. Ces enzymes phagiques peuvent à la fois augmenter les capacités de pénétration phagique et rendre les biofilms bactériens plus sensibles aux traitements antibactériens, dont les antibiotiques.

## *b.2 Effets indirects*

La lyse bactérienne, observée lors de l'administration de phages, pourrait être la conséquence d'une activité immunomodulatrice des phages. Il paraît donc important de connaître les effets des phages sur les cellules phagocytaires, les lymphocytes B et T et sur la production de cytokines.

- Effets des phages sur les cellules phagocytaires

L'activité des cellules phagocytaires est l'une des fonctions essentielles de la réponse immunitaire antibactérienne. En s'intéressant aux interactions entre phages et cellules phagocytaires, on peut déterminer si l'activité antibactérienne est la conséquence de l'activité directe des phages *in vivo* ou si l'activation des cellules phagocytaires intervient. De plus, connaître les interactions entre phages endogènes (présents en quantité importante dans les flores humaines) et cellules phagocytaires peut être intéressant dans la compréhension des mécanismes de défense complexes contre les agents bactériens.

- ✓ Effets des phages sur les phagocytes

La première description de l'influence des phages sur les phagocytes a été rapportée par Felix d'Hérelle, qui a étudié l'effet de phages dirigés contre *Shigella* sur les « leucocytes » de cochons d'inde (l'auteur n'a pas spécifié s'il étudiait les cellules péritonéales, qui sont

principalement des macrophages, ou des leucocytes périphériques, qui sont majoritairement des granulocytes). Après l'incubation de bactéries, de phages et de leucocytes pendant 10 minutes, l'index phagocytaire des cellules a augmenté de manière importante par rapport au contrôle (composé seulement de bactéries et de leucocytes). Felix d'Hérelle a également mis en avant que le développement de la résistance bactérienne contre les phages est accompagné d'une résistance des bactéries à la phagocytose. Il a alors conclu que les phages agissent comme des opsonines (substance qui se lie à des antigènes et induit leur phagocytose par des macrophages, des monocytes ou des leucocytes neutrophiles) qui participent manifestement à la phagocytose bactérienne. Cet effet est selon lui médié par un facteur soluble présent dans les préparations phagiques.

Une autre étude menée chez les cochons d'Inde a démontré que le phage T5 n'affecte pas la phagocytose d'*Escherichia coli* par les granulocytes (Kantoch et al., 1958). Les phages adsorbés aux bactéries pouvaient rester actifs jusqu'à la phagocytose des bactéries par les granulocytes. Cependant, des travaux menés par les mêmes auteurs montrent que le phage T2 pourrait diminuer la phagocytose bactérienne (par les granulocytes) de différentes espèces bactériennes, dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Mycobacterium tuberculosis*, chez les chevaux (Kantoch et al. 1958). Les auteurs ont montré que cet effet était dose-dépendant : à une concentration phagique de  $10^{10}$ /mL, l'inhibition de la phagocytose était presque totale alors qu'à de plus faibles concentrations de phages, la diminution de l'activité des granulocytes était plus modérée. Le processus d'inhibition est également temps-dépendant : l'augmentation de la durée d'incubation entraîne une diminution de la destruction bactérienne par la phagocytose. Enfin, le processus peut être provoqué par des phages qui sont actifs ou inactifs et il est impacté par la température. La plus forte inhibition intervient d'ailleurs lorsque les phages sont inactivés par les anticorps, ce qui suggère que les complexes immuns auraient un rôle prépondérant dans la diminution de la phagocytose bactérienne par les granulocytes.

Une autre étude s'est intéressée aux effets de deux phages T4 et F8 (dirigés contre *Pseudomonas aeruginosa*) sur la phagocytose d'*Escherichia coli* (Przerwa et al., 2006). Les expériences *in vitro*, par co-incubation des 2 phages avec les cellules phagocytaires, ont montré une inhibition de la phagocytose bactérienne d'*Escherichia coli* de manière dose-dépendante. Cependant, l'incubation d'*Escherichia coli* avec le seul phage T4 (et les cellules phagocytaires) entraîne une légère augmentation de l'efficacité de la phagocytose. Des



résultats similaires ont été obtenus avec les neutrophiles et les monocytes. Dans cette même étude, des expériences menées sur des souris ont montré que le phage T4 augmente l'intensité de la phagocytose par les neutrophiles, lorsque les souris sont infectées par des bactéries. A *contrario*, lorsque les souris ne sont pas infectées, le phage T4 diminue faiblement la phagocytose par les monocytes et n'a pas d'effets significatifs sur l'intensité de la phagocytose par les neutrophiles.

*In vitro*, le monitoring de la phagocytose de *Staphylococcus aureus* par des neutrophiles isolés de patients traités par thérapie phagique, a révélé que les phages pourraient, à terme, diminuer la phagocytose. La corrélation entre l'altération de la phagocytose et le traitement phagique n'est pas clairement établie. Cependant, l'activité des neutrophiles des patients a retrouvé un niveau normal 3 mois après l'arrêt du traitement phagique. De plus les phages accélèrent le turn-over des neutrophiles. Cela a été montré par l'augmentation du nombre de cellules immatures et la diminution concomitante du nombre de cellules matures (Weber-Dabrowska et al., 2002).

En conclusion, la phagocytose des bactéries par des granulocytes et des monocytes peut être inchangée, augmentée ou diminuée en fonction des phages utilisés, des doses administrées ainsi que des bactéries étudiées (Gorski et al., 2012).

#### ✓ Effet des phages sur l'explosion respiratoire

L'explosion respiratoire est une rapide augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène par le métabolisme oxydatif des phagocytes lors d'une infection. D'une part, cette réaction est une composante essentielle de l'immunité innée, permettant aux cellules phagocytaires d'éliminer les pathogènes. D'autre part, une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène mène à un stress oxydatif à l'intérieur de la cellule. Les bactéries et les virus peuvent induire un stress oxydatif dans les cellules hôtes lors d'une infection. Il est donc primordial de connaître les effets des phages sur la production des espèces réactives de l'oxygène, afin de s'assurer de l'innocuité de la thérapie phagique à cet égard.

La première étude pour évaluer l'influence des phages sur la génération des espèces réactives de l'oxygène a montré, *in vitro*, qu'une préparation purifiée de phage T4 induit une très faible explosion respiratoire comparativement aux cellules bactériennes, que ce soit dans les monocytes ou les neutrophiles (Przerwa et al., 2006). De plus, lorsqu'ils sont incubés

ensemble, les phages réduisent, de manière dose-dépendante, l'explosion respiratoire induite par *Escherichia coli*. Les effets sont significatifs avec des titres en phages élevés ( $10^9$  et  $10^{10}$  PFU/ml).

Une autre étude a montré qu'une préparation purifiée de phages T4 peut inhiber l'explosion respiratoire induite par des lipopolysaccharides ou des cellules bactériennes (Miedzybrodzki et al., 2008). Il a également été montré que ni les préparations purifiées ni les lysats de phages A3/R dirigés contre les staphylocoques n'induisent, *in vitro*, une explosion respiratoire significative des monocytes ou des neutrophiles.

Ces résultats suggèrent que les préparations phagiques, suite à leur administration à des patients, ne sont pas susceptibles d'induire un stress oxydatif par des espèces réactives de l'oxygène.

#### ✓ Effets des phages sur les autres fonctions des cellules phagocytaires

Les effets des phages sur la migration des cellules phagocytaires et l'expression des récepteurs Toll-like ont été étudiés par l'Unité de Thérapie Phagique de l'Institut de Thérapie Expérimental Ludwik Hirszfeld.

La majorité des préparations phagiques, purifiées et non purifiées, n'affectent pas la migration cellulaire des granulocytes et des monocytes chez l'homme. La seule exception a été une activité inhibitrice du phage T4 sur la migration de ces cellules. Ce phage présente une protéine Hoc dans sa capside qui pourrait être responsable des activités immunomodulatrices (Dabrowska et al., 2007).

Les récepteurs Toll-like font partie des principales classes de récepteurs des cellules phagocytaires impliqués dans les réponses d'immunité innée et dans les réactions inflammatoires. En particulier, l'activation des monocytes et des macrophages, par les bactéries pathogènes et virus, médiée par l'activation des récepteurs Toll-like, résulte en une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires, d'espèces réactives de l'oxygène et de monoxyde d'azote. Les ligands naturels des récepteurs Toll-like 4 (TLR4) et Toll-like 2 (TLR2) sont les lipopolysaccharides. Les études *in vitro* menées par l'Unité de Thérapie Phagique ont montré que les préparations de phages T4 n'ont pas d'effets sur le pourcentage de cellules TLR2+ et TLR4+ (présentant des récepteurs Toll-like 4 et 2) que ce soit pour des monocytes non stimulés ou stimulés par des lipopolysaccharides. De plus, les

préparations purifiées de phages T4 n'impactent pas l'expression du récepteur Toll-like 2 ou Toll-like 4, alors que les lysats de phages T4 augmenteraient légèrement l'expression du récepteur Toll-like 4 sur les monocytes.

Ces données sont importantes dans le cadre de la thérapie phagique puisqu'elles semblent indiquer que les préparations phagiques n'auraient pas d'activité pro-inflammatoire dépendante des récepteurs Toll-like.

#### ✓ Effets sur les cellules tueuses NK

Peu d'études s'intéressent aux lymphocytes NK (cellules tueuses naturelles).

Les bactériophages pourraient avoir un impact sur les cellules NK. En effet, une étude révèle que le nombre de cellules NK était diminué chez une partie des patients, après 49 à 84 jours d'administration de bactériophages par voie intrarectale. En revanche, il n'y avait pas de modification du nombre de cellules tueuses naturelles lors d'administration par voie topique ou orale (Gorski et al., 2012).

#### ✓ Effets sur les cellules dendritiques

En ce qui concerne les cellules dendritiques, il a été mis en évidence une diminution de l'activité phagocytaire de ces cellules suite à l'administration de phages par voie orale. Ceci aurait pour conséquence de limiter leur rôle dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative (Gorski et al., 2006).

#### • Interactions des phages avec les lymphocytes T et B

Les données suggèrent que les préparations phagiques pourraient moduler les fonctions immunitaires par des interactions directes avec les lymphocytes T et B. De manière générale, les préparations purifiées de phages semblent provoquer des effets immunodépresseurs. Cependant, certaines préparations (notamment les lysats de phages anti-staphylococciques) auraient, quant à elles, des effets immunostimulateurs.

Mankiewicz et al. (1974) ont rapporté une diminution de la réaction cutanée à la tuberculine de cochons d'Inde tuberculeux, suite à l'administration intrapéritonéale de mycobactériophages. De plus, ces auteurs ont démontré que lorsque les mycobactériophages

étaient ajoutés à des cultures de lymphocytes, ils pouvaient inhiber, de manière dose-dépendante, l'activation de ces lymphocytes induite par des phytohématagglutinines. Le fait que les phages puissent exercer *in vitro* une activité immunodépressive a été confirmé par des études montrant qu'une préparation purifiée de phages T4 inhibait la prolifération des lymphocytes T humains induite par le complexe CD3-TCR (Gorski et al., 2006). Cependant, Zimecki et al., (2003) ont montré que des préparations purifiées de phages dirigés contre *Staphylococcus aureus* pourraient exercer des effets stimulateurs sur l'activité des splénocytes.

Un autre axe de recherche s'intéresse à l'adhésion des phages aux cellules immunitaires. Les cellules T humaines interagissent avec des phages T4 et HAP1 (phage T4 mutant sans protéine Hoc) (Kniotek et al. 2004). Les expériences menées sur des protéines phagiques recombinantes purifiées ont montré que les cellules T humaines adhèrent à la protéine gp 24 (une protéine de la capsid du phage T4) et non pas aux protéines Hoc (Gorski et al., 2012). Les anticorps monoclonaux bloquant les chaînes communes des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 3$  diminuent significativement ces interactions. Ceci suggère que les interactions dépendent, au moins en partie, de la fixation à des récepteurs appartenant à la famille des intégrines. De plus, les expériences semblent montrer que la protéine VLA-5 (intégrine  $\alpha 5\beta 1$ ) est la principale intégrine responsable de l'adhésion des cellules T humaines à la protéine gp 24.

Les phages pourraient également diminuer la production, *in vitro*, d'immunoglobulines induites par des alloantigènes, ainsi que la réponse en anticorps spécifiques chez les souris (Kniotek et al., 2004). De plus, les phages inhibent l'activation de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription clef dans la régulation de nombreux gènes, dont ceux codant pour des cytokines pro-inflammatoires (Gorski et al., 2006). Ces effets immunodépresseurs des phages *in vitro* ont été confirmés par des expériences *in vivo*. Ces dernières ont montré que les phages ont considérablement augmenté la survie d'une transplantation cutanée allogénique, que ce soit chez des souris sensibilisées ou non sensibilisées, ainsi que la réponse inflammatoire au niveau du site de transplantation (Gorski et al., 2006).

- Effet des phages sur la production de cytokines

Plusieurs études ont montré que les phages peuvent affecter, substantiellement, la production de diverses cytokines. Les effets sur la production de cytokines peuvent néanmoins varier en fonction des phages administrés et des infections étudiées (Gorski et al., 2012).

Une augmentation de la synthèse de cytokines a ainsi été observée après l'inoculation de préparations phagiques. Par exemple, l'administration d'une préparation purifiée de phages dirigés contre *Staphylococcus aureus* a eu pour conséquence d'activer la production d'IL-6 dans des splénocytes cultivés *in vitro* (Zimecki et al., 2003).

Au contraire, d'autres travaux démontrent une diminution de la concentration de certaines cytokines dans l'organisme. L'administration de phages dirigés contre *Klebsiella pneumoniae* à des souris infectées (infections cutanées compliquées en bactériémies) a entraîné une diminution des concentrations en IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IL-10 dans le sérum et dans les poumons des souris (Kumari et al., 2010). La diminution des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$  a également été mise en évidence suite à l'administration de suspensions de bactériophages pour traiter des infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* (Debardieux et al., 2010).

Ces données expérimentales ont été confirmées chez l'homme par une étude clinique qui a démontré que la thérapie phagique influence la production de cytokines chez les patients traités (Weber-Dabrowska et al. 2000). Les effets de la phagothérapie sont variables selon le niveau de TNF- $\alpha$  des patients avant le début du traitement : ceux ayant un niveau sérique bas, voire modéré, de TNF- $\alpha$  ont vu une normalisation (augmentation) de la production de cytokines sous traitement phagique ; ceux ayant un niveau initialement élevé de TNF- $\alpha$  ont vu le taux de TNF- $\alpha$  diminuer lors du traitement phagique. Les phages agissent de manière similaire, *in vitro* sur des cellules de patients atteints de mononucléose, sur la production de cytokines induite par des lipopolysaccharides (Weber-Dabrowska et al., 2000).

- Conséquences

La plupart des observations décrites sur les interactions avec le système immunitaire résultent d'études *in vitro*. Ces interactions varient selon de nombreux paramètres : le mode d'administration des phages, le type et la localisation de l'infection, la dose et la nature des phages utilisés. De plus, il faut garder en mémoire que, malgré l'étape de purification, une suspension phagique contient toujours une faible quantité de débris bactériens, qui peuvent également interagir avec le système immunitaire. De la même manière, les fragments de lyse bactérienne entraînés par la phagothérapie peuvent interagir avec le système immunitaire. L'importance des phénomènes immunologiques liés à la phagothérapie au sein de l'organisme

n'est pas clairement définie. Des études plus approfondies sont donc nécessaires à une bonne connaissance de l'impact des phages sur le système immunitaire.

## 6. Antibiothérapie et phagothérapie

Les bactériophages et les antibiotiques ont une action commune, à savoir le contrôle et/ou l'éradication d'une bactérie pathogène. Leur mode d'action respectif est, par contre, radicalement différent. Une majorité d'articles récents propose la phagothérapie comme alternative à l'antibiothérapie, lorsque celle-ci est devenue inefficace. Ceci contribue à placer la phagothérapie dans une situation inconfortable, qui a, par le passé, semé le trouble sur son efficacité.

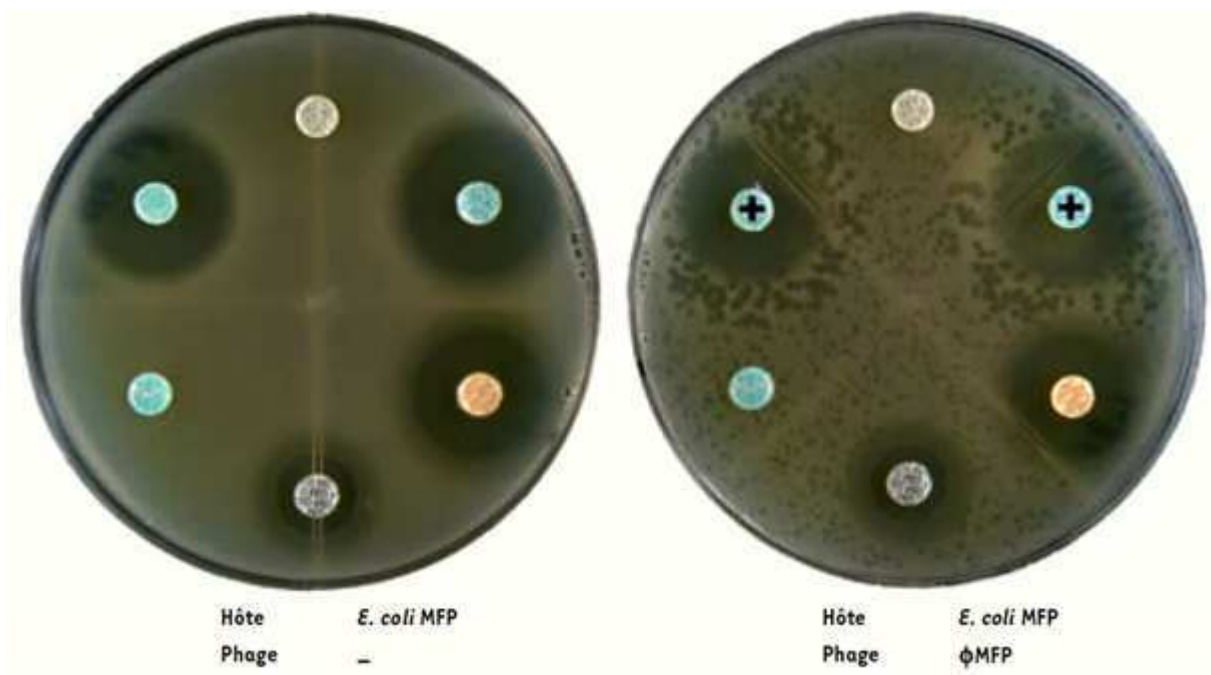
La question est de savoir si l'association de ces deux thérapies est intéressante et mérite d'être explorée.

Comme c'est le cas dans l'étude menée par l'Institut de Thérapie Expérimentale Immunologique Ludwik Hirszfeld (« Clinical aspect of phage therapy », Ryszard Miedzybrodzki et al., 2012), certains travaux tendent à montrer que l'association de l'antibiothérapie et de la phagothérapie n'a pas d'intérêts cliniques. Les antibiotiques administrés en association aux phages, ainsi que les modalités d'administration des deux thérapies ne sont pas toujours documentées.

Certains scientifiques émettent, au contraire, l'hypothèse qu'une telle association peut être bénéfique. Les phages, appliqués localement, vont permettre de réduire la masse bactérienne dans un premier temps. La cinétique de l'action lytique des phages étant rapide, elle laisse le temps aux antibiotiques d'atteindre une concentration suffisante au niveau du foyer infectieux. Le fait que les antibiotiques ne soient pas détruits par les phages et que ces derniers peuvent être autoproduits *in situ* renforce leurs actions. Cette stratégie en deux temps permet aussi de pallier à la non destruction des bactéries quiescentes par les phages. Dans un premier temps, la phagothérapie agit sur le foyer infectieux actif. Dans un second temps, l'antibiothérapie intervient sur un faible inoculum.

Il a été montré que l'addition à des cultures bactériennes de faibles doses d'antibiotiques, qui bloquent la division cellulaire et induisent la formation de filaments, augmente significativement la production phagique. De tels antibiotiques augmentent le volume bactérien, permettant ainsi une surproduction de phages et accélèrent la lyse de la bactérie par les phages. Ce phénomène est appelé la « synergie phages-antibiotiques » (PAS) ; Il a été mis en évidence avec des antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et des quinolones (figure 44) (Comeau et al., 2008). De plus, ce phénomène a été confirmé avec différents phages non apparentés. On peut donc supposer que les antibiotiques leur confèrent un avantage commun.

Figure 44 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques » (PAS) avec le phage  $\phi$ MFP sur *Escherichia coli* MFP



Source : « La synergie phages-antibiotiques : un enjeu pour la phagothérapie », André M. Comeau et al., *Medecine Sciences* n°5, volume 24, mai 2008.

Sur la gauche, un antibiogramme montrant la sensibilité de la souche uropathogène *Escherichia coli* MFP à différents antibiotiques. Cette souche est résistante à l'amoxicilline et à la triméthoprime/sulfaméthoxazole (absence de halo d'inhibition autour des deux pastilles). Sur la droite, le même antibiogramme avec addition de plusieurs centaines de phages virulents  $\phi$ MFP dans le tapis bactérien. Les plages de lyse sont beaucoup plus importantes à proximité des antibiotiques  $\beta$ -lactames aztréonam et cefixime (indiqués avec des +). L'augmentation de la taille des plages, phénomène PAS, est causée par une surproduction de phages et une lyse plus rapide des bactéries par les phages. La gentamicine et la tétracycline n'ont pas donné de réponse PAS (taille de plages de lyse normale autour des halos).

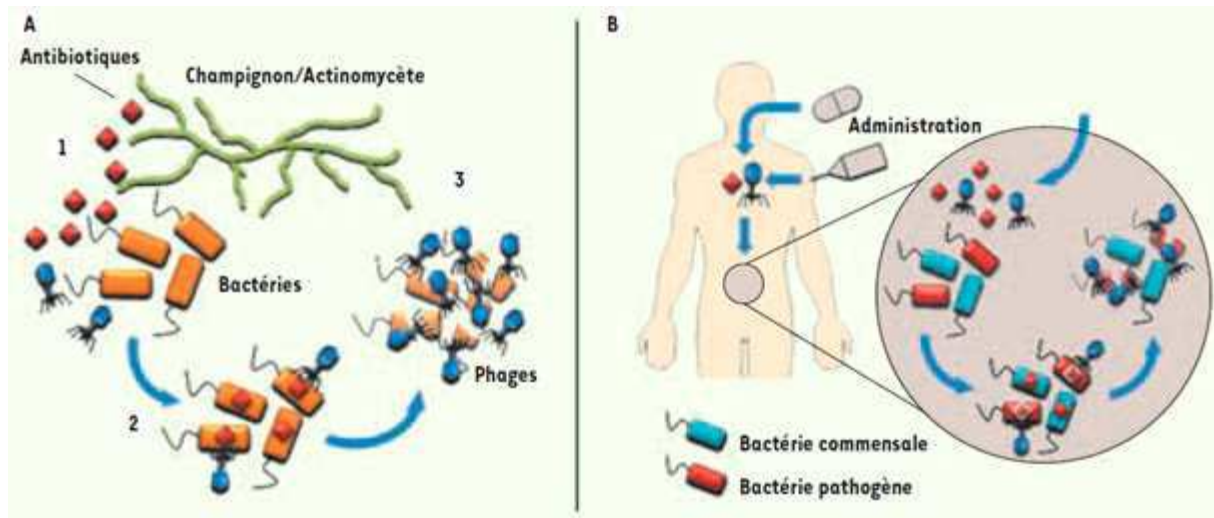
Cette synergie phages-antibiotiques pourrait être utilisée à des fins médicales thérapeutiques ou prophylactiques (figure 45). La question est de savoir si le phénomène PAS est une simple curiosité biologique, utile pour la phagothérapie, ou s'il correspond à une particularité, jusque-là inconnue, des cycles de vie phagique, à savoir la capacité des phages à s'adapter à un environnement moins favorable pour la croissance bactérienne. La présence naturelle de faibles quantités d'antibiotiques, sécrétés par des champignons et certaines bactéries (actinomycètes par exemple) dans l'environnement, constitue une forte pression de sélection pour l'émergence de stratégie de résistance. La filamentation chez les bactéries en présence de certains antibiotiques en est une. Cette stratégie s'avère avantageuse pour l'évolution. Les phages profitent de la physiologie altérée des bactéries « stressées », pour amplifier le nombre de phages produits par cycle d'infection, par rapport aux situations plus saines. D'un point de vue écologique, cette stratégie peut s'expliquer : sous l'effet des antibiotiques, les bactéries hôtes de ces phages sont vouées à disparaître ou à voir leur nombre décroître. La production de phages supplémentaires permettrait alors aux phages de perdurer jusqu'à la rencontre de nouveaux hôtes, dans des environnements plus sains. Une sorte de « mutualisme » existerait donc entre les organismes producteurs d'antibiotiques et les phages capables de PAS, pour concurrencer plus efficacement les bactéries sensibles. Cette synergie entre producteurs d'antibiotiques et phages pourrait jouer un rôle dans l'équilibre des populations microbiennes dans les sols, les eaux ou à l'intérieur de l'être humain.

L'intérêt d'une telle association a également été démontré *en vivo*, chez des poulets. En effet, l'administration conjointe de phages dirigés contre *Escherichia coli* et d'antibiotiques (l'enrofloxacin) a montré une efficacité thérapeutique supérieure à celle de chacun des traitements pris individuellement (William E. Huff et al., 2004). Cette association a d'ailleurs permis la survie de l'intégralité des poulets infectés, ce qui n'a pas été le cas en les traitant avec les phages ou les antibiotiques seuls.

Des études supplémentaires sont indispensables pour préciser l'impact du phénomène PAS sur les écosystèmes microbiens et déterminer les mécanismes moléculaires impliqués. Ces connaissances peuvent également être précieuses pour la mise en place de protocoles thérapeutiques associant phages et antibiotiques.



Figure 45 : Le phénomène de « synergie phages-antibiotiques » (PAS) dans l’environnement (A) et en phagothérapie (B)



Source : « La synergie phages-antibiotiques : un enjeu pour la phagothérapie », André M. Comeau et al., *Medecine Sciences* n°5, volume 24, mai 2008.

Certains champignons et bactéries produisent des antibiotiques contre d’autres bactéries, en compétition pour les mêmes ressources (1). Les phages infectent plus efficacement les bactéries « stressées » par les antibiotiques (2) et se propagent donc plus rapidement. Ce scénario représente une sorte de mutualisme entre les phages et les producteurs d’antibiotiques, pour éliminer les compétiteurs bactériens (3).

Dans le cadre de la phagothérapie, des traitements mixtes d’antibiotiques et de phages pourraient permettre une élimination plus efficace des bactéries pathogènes, en limitant l’agression de la flore endogène commensale et saprophyte grâce à la grande sélectivité phagique.

## 7. Formes pharmaceutiques

La galénique ne limite aucunement les possibilités de la phagothérapie. Elle nécessite de s’appuyer sur les connaissances et l’expérience en phagothérapie pour développer les outils thérapeutiques les mieux adaptés aux différents traitements envisagés. La phagothérapie peut être administrée par des voies diverses et sous des formes galéniques variées.

Les bactériophages ne sont pas des virus fragiles. Ils supportent le froid et peuvent être conservés à +4°C (réfrigérateur) plusieurs mois, voire plusieurs années. Ceci est un aspect important si une production industrielle est envisagée. Congelés, les phages pourraient se

conserver encore davantage (presque indéfiniment). La forme liquide (suspension) est la forme la plus fréquente. Les flacons ou ampoules sont habituellement conservés au réfrigérateur. Les suspensions permettent des voies d'administrations variées : des formes liquides destinées à être appliquées sur la peau, des préparations buccales (pour une action systémique par voie sublinguale, ou locale), des gouttes auriculaires, des gouttes nasales, des collyres (stériles d'un point de vue bactérien), des suspensions pour irrigation vaginale, des préparations liquides administrées dans les poumons sous forme d'aérosols à l'aide d'un nébuliseur (pour une action locale notamment) et des formes destinées à être injectées (voie intramusculaire, sous-cutanée, intraveineuse si la suspension est très fine voire même les voies intrapleurale, intrapéritonéale, intrarachidienne).

En guise d'exemple, on peut citer le Pyophage<sup>TM</sup> qui est une spécialité fabriquée à l'Institut de virologie de Tbilissi. C'est une suspension d'un mélange d'au moins trente phages de spécificité étendue sur staphylocoque, streptocoque, pyocyanique, colibacille et *Proteus*. Le produit est conditionné en ampoule de 5 mL sous la forme d'un liquide limpide. Le titre annoncé pour chacune des spécialités phagiques est de l'ordre de  $10^5$ . La conservation est d'au moins 1 an à +4°C.

Des formes semi-solides (crèmes, pommades, gels...) contenant des bactériophages peuvent être réalisées mais elles ne sont pas souvent formulées.

Des formes solides peuvent également être conçues en vue d'administration par différentes voies (rectale, vaginale ou orale notamment). Ainsi, la fabrication de suppositoires ou d'ovules vaginaux a déjà été réalisée. Les phages supportent la dessiccation. Cette propriété, couplée à leur résistance au froid, permet d'envisager la lyophilisation des phages en vue d'une administration orale ou (éventuellement) sublinguale. Si une administration *per os* est envisagée, l'administration phagique devra être précédée de celle d'anti-acides pour préserver les phages lors de leur passage dans l'estomac. La formulation de gélules gastro résistantes contenant des phages peut également permettre d'éviter l'action destructrice des sucs gastriques.

Enfin, des formes adhésives sont formulées en vue d'une action locale. Le principal exemple est le PhagoBioDerm<sup>TM</sup> (figure 46), développé par une équipe de biologistes géorgiens à partir de 1995. C'est un matériel biologique composé d'un support biodégradable (polyester amide) sur lequel a été déposé un mélange de bactériophages lytiques pour les cinq bactéries les plus souvent responsables de suppurations (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*,

*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Proteus*), ainsi qu'un antibiotique (ciprofloxacine ou lincomycine selon le cas), un anesthésique local (benzocaïne) et une substance protéolytique (chymotrypsine ou trypsine). Le film protège la surface de la plaie des contaminations externes tout en activant les macrophages et la régénération tissulaire, tandis que la trypsine assurerait un « nettoyage » des tissus mortifiés. Il est indiqué dans les blessures cutanées infectées, les escarres, les ulcères (dont ceux d'origine diabétique) et les brûlures.

Figure 46 : Photo du PhagoBioDerm™



Source ; [www.polymerpharm.ge](http://www.polymerpharm.ge)

Le PhagoBioDerm est un pansement médicamenteux composé de ciprofloxacine, de pyobactériophages, de chymotrypsine, de benzocaïne et d'un polymère biodégradable. Ce pansement est de petite taille (4 x 5 cm). Il a une haute activité bactéricide, qui est, en plus, prolongée par la libération progressive des principes actifs et phages. Sa durée de conservation est de 2 ans.

De nombreuses voies d'administration ont été utilisées dans l'histoire de la phagothérapie. Bien que l'administration topique ne permette pas toujours les plus importants taux de guérison (étude menée par l'Institut de Thérapie Expérimentale Immunologique Ludwik

Hirszfeld par exemple), de nombreux articles et phagothérapeutes militent pour des administrations locales, plutôt qu'en intraveineuse ou en *per os*. Les raisons évoquées sont multiples. Il s'agit notamment de la sécurité de la phagothérapie vis à vis des toxines bactériennes, de ne pas diluer les préparations phagiques ce qui amènerait à des densités insuffisantes pour la réalisation du traitement (notamment dans les cas de traitements passifs) et de limiter l'inactivation potentielle des phages par le système immunitaire (Dublanche, 2009).

## 8. Patients candidats à la phagothérapie

Tous les patients sont des candidats potentiels à la phagothérapie. Aucune étude ne montre les possibilités phagiques sur de jeunes enfants ou sur des sujets âgés. Mais l'expérience géorgienne est très rassurante à ce sujet. En effet, de jeunes enfants sont traités par bactériophages, sans que l'incidence d'effets indésirables ne soit augmentée. Ceci peut s'expliquer par le fait que les premiers contacts avec les bactériophages interviennent très tôt chez le nourrisson. En effet, les bactériophages sont retrouvés dans le colostrum. Ilsensemencent donc le tube digestif du nourrisson, dont le pH est neutre.

De la même manière, aucune étude de phagothérapie n'est menée sur des femmes enceintes ou allaitantes. Un raisonnement similaire peut néanmoins être envisagé. Ces situations physiologiques ne seraient donc pas des contre-indications à la phagothérapie.

## 9. Phagoprophylaxie

Les bactériophages suscitent un réel intérêt dans la prévention de maladies infectieuses bactériennes. Les domaines concernés sont nombreux. Dans certains domaines, la phagoprophylaxie n'en est qu'au stade de projet ou d'option envisagée. Dans d'autres domaines, les premières applications voient le jour.

### a. Utilisation en agro-alimentaire

Les antibiotiques sont à l'heure actuelle très largement utilisés dans l'industrie agricole, tant en prophylaxie que pour le traitement de maladies infectieuses. Cette surconsommation contribue fortement à l'apparition croissante de résistances bactériennes face aux antibiotiques. Il peut donc être intéressant de favoriser l'emploi des bactériophages et limiter par conséquent l'utilisation des antibiotiques (Inal, 2003).

L'administration de bactériophages pour traiter les animaux de rente destinés à l'alimentation humaine est de plus en plus envisagée. Les études portent notamment sur les volailles, les porcs et les ruminants. Elles démontrent une diminution de la quantité de bactéries, *Salmonella enterica* ou *Campylobacter jejuni*, présentes chez les volailles, suite à l'administration de cocktails phagiques (Fiorantin et al., 2005 ; Connerton et al., 2011). D'autres études tendent à prouver que les bactériophages seraient également indiqués pour réduire la population bactérienne d'*Escherichia coli* O157:H7 colonisant le tractus gastro-intestinal des troupeaux de ruminants, réservoir principal de cette bactérie (Goodridge et Bisha, 2011).

Les bactériophages sont utilisés dans le traitement des infections de certaines plantes, comme les arbres fruitiers, mais aussi les plants de tomates et poivrons. L'Agriphage<sup>TM</sup> contient plus de  $10^{12}$  PFU de phage par litre et est préconisé pour traiter le « feu bactérien » (maladie provoquée par *Erwinia amylovora* affectant notamment les poiriers et pommiers). La première commercialisation de ce produit date de 1990 et l'enregistrement auprès de l'Environmental Protection Agency (EPA) a été obtenu en 2005. Ces toutes dernières années, les maladies infectieuses bactériennes en agriculture ont suscité un grand intérêt pour l'application de la thérapie phagique. Le développement rapide des besoins alimentaires et les effets néfastes produits par l'utilisation de produits chimiques à grande échelle n'y sont pas étrangers.

Enfin, les applications possibles des bactériophages dans le domaine de l'aquaculture font l'objet d'un nombre important de publications. Les bactériophages sont parfaitement adaptés à cet environnement, puisqu'ils se trouvent habituellement dans les milieux aquatiques. Les maladies sont causées par différents pathogènes (*Pseudomonas*, *Streptococcus*...). Pour le

contrôle de ces pathogènes, ce sont souvent les antibiotiques qui sont employés (tétracyclines, quinolones, sulfonamides...). Cependant, la diffusion des antibiotiques par l'eau contribue à la pollution de l'environnement. C'est pourquoi, il est envisagé de traiter par phages certains élevages.

## **b. Décontamination alimentaire**

De nombreuses précautions sont prises pour assainir les denrées alimentaires. Elles demeurent néanmoins des milieux de culture pour les micro-organismes, pathogènes ou non. Ainsi, les bactéries seraient responsables de plus de 90% des toxi-infections d'origine alimentaire. Parmi ces toxi-infections alimentaires (TIA), 75% seraient le fait de trois principales bactéries : *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*. D'autres bactéries, telles qu'*Escherichia coli* ou *Listeria monocytogenes*, sont également fréquemment présentes sur les aliments et peuvent s'avérer très pathogènes.

Les études portant sur l'assainissement des denrées alimentaires démontrent que l'utilisation des bactériophages permet de réduire quantitativement le nombre de bactéries, tout en préservant les qualités organoleptiques des aliments (Holck et Berg, 2009 ; Soni et al., 2010).

Une application récente a vu le jour aux Etats Unis et concerne les aliments contaminés par *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie est à l'origine de la listériose, maladie de répartition mondiale, peu fréquente et sporadique (3,2 cas/millions d'habitants en Europe en 2011 dont environ 300 cas par an en France ; 2,5 cas/millions d'habitants aux Etats-Unis en 2011). La listériose n'en est pas moins une maladie grave (sa létalité peut atteindre 30%), à l'origine de septicémies, de méningites et d'avortements chez les femmes enceintes. Parmi les malades, 80% correspondent à des YOPI (Young, old, pregnant, immunodepressed). Le risque a été considéré comme suffisamment sérieux pour que les Etats-Unis reconnaissent nécessaire le traitement des aliments frais (poissons, viandes, produits laitiers) avant emballage. Deux produits, sensiblement équivalents, conçus par une firme hollandaise d'une part (Listex P100<sup>TM</sup> par EBI Food Safety) et par une firme américaine d'autre part (LMP-102<sup>TM</sup> par Intralytix) ont reçu les approbations nécessaires. La FDA (Food and Drug Administration) a reconnu en 2006 que la procédure GRAS (Generally Recognised As Safe) était respectée et que l'EPA avait approuvé ces produits. Ces deux produits sont des mélanges de six phages naturels dirigés contre *Listeria*. Il s'agit de la première application contre le risque de contamination bactérienne de produits alimentaires destinés à la consommation humaine. Plus

récemment, EcoShield™ et SalmoFresh™ (développés par Intralytix), préparations phagiques respectivement dirigées contre *Escherichia coli* O157:H7 et *Salmonella enterica*, ont reçu l'approbation de la FDA.

Des spécialités dirigées contre différentes bactéries pathogènes, comme certains sérotypes d'*Escherichia coli*, de *Salmonella*, ou de *Campylobacter jejuni*, sont actuellement en préparation.

Les bactériophages ont également été étudiés pour pallier au problème du développement d'*Enterobacter sakazakii* dans les poudres de lait infantile (Kim et al., 2007). Le phage T4-like ESP 732-1, dirigé contre *Enterobacter sakazakii*, a un effet antibactérien dose-dépendant, que ce soit à 24°C ou à 37°C. La préparation phagique la plus concentrée (10<sup>9</sup> PFU/mL) a d'ailleurs permis de totalement éradiquer le germe pathogène des préparations infantiles.

Les phages sont donc envisagés et déjà partiellement employés pour prévenir les infections bactériennes, en étant directement au contact des aliments.

### **c. Désinfection des surfaces inertes**

Dans le même esprit que pour l'assainissement des denrées, l'usage des bactériophages est envisagé pour éliminer les germes pathogènes de l'environnement. En effet, les phages se sont avérés efficaces en application sur des surfaces inertes pour les débarrasser des bactéries ou des biofilms. En particulier, l'usage des phages serait indiqué pour traiter régulièrement l'intérieur des réseaux hydrauliques, comme par exemple les tuyaux de circulation d'eau de boisson des volailles, qui regorgent généralement de bactéries et de biofilms (surtout des bactéries générant des infections entériques comme *Campylobacter spp.*) (Inal, 2003). De plus, des études ont démontré l'efficacité des bactériophages (CP8 et CP30), appliqués sur les surfaces, contre *Campylobacter jejuni* et contre les biofilms associés (Scott et al., 2007 ; Siringan et al., 2011).



#### **d. Prévention des infections dans le domaine médical**

Dans le domaine médical, les bactériophages pourraient avoir diverses applications.

Il est envisageable et envisagé d'utiliser les bactériophages chez le personnel de santé et les patients (patients opérés, porteurs sains...). Par exemple, l'élimination du staphylocoque doré dans le nez des personnels et patients des services de chirurgie est à l'étude. Les bactériophages ne distinguent pas les staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM) des staphylocoques dorés sensibles à cet antibiotique (SASM). Ils permettent d'éliminer les staphylocoques pathogènes, sans distinction de sensibilité. Par conséquent, la phagoprophylaxie peut permettre de prévenir une partie des infections post chirurgicales (notamment dans le cadre de chirurgies ostéo-articulaires) dont la principale complication infectieuse est due à cette bactérie.

L'élimination du portage intestinal de *Clostridium difficile*, afin d'éviter la contamination des autres patients du service (notamment dans le cadre de longs séjours hospitaliers) peut également s'avérer intéressante.

L'action des bactériophages pourrait également s'appliquer à l'aseptisation du matériel médical (sondes, sutures, cathéters) et des surfaces en milieu hospitalier (blocs opératoires, services d'hospitalisation) comme le démontre l'équipe de Carson dans une étude sur l'élimination des biofilms présents sur le matériel médical (Carson et al., 2010).

#### **e. Avantages et limites dans le domaine médical**

##### *e.1 Avantages*

L'administration de phages prophylactiques dans le domaine médical offre certains avantages.

En prophylaxie, les densités bactériennes sont souvent moindres. Les produits de la dégradation bactérienne par les phages seront, par conséquent, quantitativement moins importants. La sécurité phagique est donc renforcée.

De plus, l'association des bactériophages à certains antibiotiques pourrait permettre de réduire les doses d'antibiotiques administrées et ainsi réduire certains effets indésirables.

Enfin, les phages n'interfèrent pas avec la cicatrisation (Chan et Abedon, 2012). Ceci est un élément important à prendre en compte dans le cadre de certaines chirurgies.



## *e.2 Limites*

Dans la mesure où les bactéries sont présentes à de faibles densités, un traitement actif pourrait ne pas être possible. En effet, le seuil de densités bactériennes nécessaires à une autoréplication phagique peut ne pas être atteint. Un traitement passif devrait donc être envisagé.

De plus, les traitements prophylactiques sont souvent des traitements empiriques, puisque le pathogène auquel l'individu pourrait être exposé n'est, dans la majorité des cas, pas connu par avance. L'utilisation de cocktails phagiques, permettant d'élargir le spectre d'activité, pourrait donc être préférée en prophylaxie.

## **10. Administration de cocktails phagiques**

Un cocktail est une préparation contenant un mélange bien établi et caractérisé de bactériophages.

Des préparations thérapeutiques ont été commercialisées en France et étaient décrites dans le dictionnaire Vidal (Dublanche, 2009). Il y avait 5 cocktails différents distribués par le laboratoire Robert et Carrière : Bacté-Coli-Phage, Bacté-Intesti-Phage, Bacté-Dysentérie-Phage, Bacté-Pyo-Phage et Bacté-Rhino-Phage. Ces préparations avaient des indications qui différaient selon le germe et l'infection en cause. Elles ont été disponibles jusqu'en 1978.

### **a. Avantages potentiels**

La sélectivité phagique est très étroite : les phages peuvent être dirigés contre une, ou éventuellement quelques espèces bactériennes, mais souvent seulement contre certaines souches bactériennes d'une espèce donnée (Hyman et Abedon, 2010). Cette sélectivité impose une thérapie « ciblée » : l'utilisation d'un phage particulier est limitée à un petit nombre d'espèces ou de souches bactériennes. Afin d'augmenter le spectre d'activité des bactériophages, il est possible de mélanger des phages dirigés contre différentes souches bactériennes d'une même espèce ou contre différentes espèces bactériennes pouvant être responsables d'une pathologie.

Au regard de la thérapie phagique, il est important de savoir que les phages peuvent avoir des propriétés pharmacodynamiques et pharmacocinétiques différentes. Ces différences peuvent impacter le traitement phagique et notamment la capacité des phages à éliminer une population bactérienne donnée. En particulier, il y a trois principales variables : la capacité d'un phage thérapeutique à atteindre la bactérie cible, la capacité à détruire ces bactéries une fois qu'elles sont atteintes, et la capacité des phages à se répliquer suffisamment *in situ* pour atteindre des densités phagiques permettant un succès thérapeutique. Chacune de ces variables tend à varier en fonction du génotype phagique, du génotype de(s) bactérie(s) cible(s) ainsi que des conditions physiologiques et environnementales, en particulier les facteurs chimiques, immunologiques et anatomiques du patient qui peuvent modifier les déplacements phagiques, l'adsorption et l'infection du bactériophage. Statistiquement, plus on administre de phages, plus on a de chance qu'au moins un phage puisse atteindre la souche bactérienne cible, se répliquer au cours de l'infection bactérienne et permettre la lyse de la bactérie. De plus, si les phages constituant le mélange ont des modes d'infection différents (via différents récepteurs), alors la probabilité d'un échec thérapeutique due à une mauvaise reconnaissance entre phages et bactéries ou due aux conditions physiologiques ou pathologiques, est réduite.

Les contraintes temporelles, comme lors d'une infection aiguë mettant en jeu le pronostic vital du patient, sont difficiles à appréhender en thérapie phagique. En effet, l'espèce, la souche, le génotype bactérien ou même le niveau de sensibilité de la bactérie à un phage spécifique ne sont pas toujours connus et compliquent la mise en place du traitement phagique. Le traitement par un phage monovalent risque alors d'être inefficace, puisque potentiellement non adapté au pathogène en cause. Puisque les cocktails permettent de cibler davantage d'espèces bactériennes et d'obtenir davantage de succès thérapeutique, dans un plus grand type de situations, ils semblent plus adaptés aux traitements présomptifs. Ils permettent en outre d'éviter un délai d'administration trop important.

L'association de différents phages au sein d'un cocktail peut diminuer le risque d'évolution vers la résistance. En effet, plus le nombre de mutations indépendantes nécessaires à la résistance d'une bactérie est important, plus la probabilité que cette bactérie devienne résistante est faible. Même si un faible nombre de bactéries cibles deviennent résistantes à un des phages du cocktail, il est peu probable, en dehors d'une résistance croisée, que des

mutations ultérieures permettent une résistance de la bactérie contre tous les phages du cocktail. En effet, un phage de la formulation, au moins, devrait être actif contre le pathogène muté, bloquant dans le même temps la propagation et l'évolution de la résistance en détruisant cette bactérie. Pour cela, la formulation doit contenir plusieurs phages lytiques dirigés contre une même souche bactérienne.

La formulation de cocktails facilite également le développement et la commercialisation des traitements phagiques. Cette approche permettrait d'utiliser plus longtemps la préparation réalisée, ce qui est un argument important pour les industriels (en termes de retour sur investissement et de problématique quant aux autorisations nécessaires à une mise sur le marché). De plus elle rendrait plus facile l'utilisation de la spécialité dans différentes régions, si différentes souches d'une même bactérie circulent à travers le monde. Le coût du développement des cocktails est probablement plus important que celui des préparations monophagiques. Néanmoins, il ne devrait pas être un frein important au regard des avantages que la formulation de cocktails peut fournir, d'autant que les productions phagiques restent très économiques.

Enfin, le mélange de phages en cocktails ne devrait pas modifier la sécurité phagique, dans la mesure où les phages qui les composent n'entraînent pas de nombreux effets indésirables. La sécurité phagique, lors de l'administration en association, a d'ailleurs été démontré (Abedon et Thomas-Abedon, 2010 ; Abedon et al., 2011). De plus, il n'y a pas de preuves montrant un impact supérieur des cocktails phagiques, par rapport aux phages administrés seuls, sur les effets pharmacologiques d'autres principes actifs administrés simultanément ou sur les problèmes de tolérance liés à la réponse immunitaire des patients.

#### **b. Limites des cocktails**

Deux limites principales peuvent réduire l'efficacité des cocktails phagiques contre une population bactérienne donnée.

Tout d'abord, il est possible que les coinfections d'une même bactérie par des bactériophages différents impactent négativement la productivité phagique (la réplication). En effet, les phages peuvent ne pas être compatibles durant le phénomène d'infection bactérienne, ce qui

réduirait l'importance de la réplication d'un ou plusieurs bactériophages (Abedon, 1994). Ce problème est minoré si un traitement passif est envisagé, puisque dans ce cas, la préparation phagique doit simplement être bactéricide. De plus, plus le nombre de phages présents dans un cocktail est élevé, plus le risque d'incompatibilité entre les phages est important.

En incluant davantage de phages dans une préparation, on augmente les besoins en bactéries pour une réplication phagique *in situ* et on réduit la densité de chaque espèce phagique au sein du cocktail. Au début du traitement phagique, les ratios entre les densités phagiques et les densités de bactéries cibles sont relativement bas. Le risque de coinfections est donc moindre. De plus, lorsque toutes les bactéries sont infectées, suite au développement *in situ* des populations phagiques, le phénomène de coinfections ne pose plus problème (si toutes les infections demeurent bactéricides). Les problèmes de coinfections phagiques interviennent donc à la transition entre ces deux états.

Les phages d'un cocktail ont des propriétés pharmacodynamiques différentes et en particulier, des capacités de réplication différentes. Donc, lors d'un traitement actif, la croissance phagique *in situ* peut être réduite à certains phages, par sélection naturelle.

Le phénomène de coinfections phagiques peut être problématique lors du traitement actif des biofilms bactériens. En règle générale, les phages pénètrent activement dans les biofilms bactériens, avant de se multiplier à l'intérieur, ce qui permet la libération de phages plus profondément dans le biofilm (Abedon et Thomas-Abedon, 2010). Des titres élevés de phages dans les cocktails favorisent les coinfections et peuvent gêner la bonne réplication phagique *in situ*. Dans ce cas, les cocktails peuvent s'avérer moins efficaces que les traitements phagiques par des cocktails à densités moindres ou que les traitements monophagiques. Deux stratégies permettent de limiter ce phénomène : la réduction de la diversité du cocktail phagique (en particulier, le retrait des phages incompatibles après des observations au laboratoire), ou l'administration de doses répétées qui permet de pallier à la moindre production phagique *in situ*.

La mise en place de courbes doses-effets, lors du développement des protocoles phagiques, peut permettre de mieux appréhender la multiplication phagique, le phénomène de coinfection, et la pénétration phagique dans les biofilms bactériens en fonction du titre en phages de la préparation (Chan et Abedon, 2012).

La seconde limite potentielle est la capacité des cocktails phagiques à empêcher l'évolution de la résistance bactérienne aux phages. Dans un cocktail, il n'est pas certain que le phage, ayant l'arsenal nécessaire pour détruire la bactérie mutante résistante, soit à des densités suffisantes pour permettre une rencontre avec la population bactérienne mutée. D'autant plus que les mutants bactériens résistants peuvent être présents à de faibles densités au sein de la population bactérienne. Si un traitement actif est envisagé pour éliminer la bactérie mutante, les densités respectives en phages et bactéries peuvent être inadéquates. Néanmoins, si les bactéries mutantes se multiplient et atteignent des densités suffisantes, alors un traitement actif peut être envisagé (avec des titres appropriés en phages).

De plus, le problème de la résistance bactérienne peut être surmonté par l'administration de doses phagiques importantes et répétées, dans le cadre d'un traitement passif (Cairns et Payne, 2008). En effet, il n'y a pas d'auto-amplification phagique *in situ* lors d'un traitement passif. Les administrations phagiques répétées permettent de maintenir les densités phagiques à des seuils suffisants pour permettre la lyse des bactéries résistantes.

Enfin, les cocktails sont des préparations « standards » et ne sont pas forcément les plus appropriées lors d'infections graves. La sensibilité des bactéries aux phages du cocktail doit toujours faire l'objet de vérifications, si possible au préalable. Il est également possible d'envisager les cocktails comme des solutions de première intention, en attendant que la préparation spécifique contenant le (ou les) phage(s), virulent(s), dirigé(s) contre le pathogène soi(en)t disponible.

## V. Limites potentielles de la phagothérapie

### 1. Cadre réglementaire

Bien que la phagothérapie soit une thérapeutique connue depuis plus de quatre-vingt-dix ans, elle doit être réévaluée et codifiée à la lumière des connaissances scientifiques modernes. Elle entre de ce fait dans le domaine de l'expérimentation humaine. Or à ce sujet, une réglementation très précise garantit les droits et devoirs des soignants et des malades. De ce point de vue, la phagothérapie est dans une situation particulière en France et dans le monde.

En résumé, quelle peut être la place de la phagothérapie dans les pharmacopées françaises, européennes et mondiales ? Les bactériophages peuvent-ils répondre à la définition d'un médicament ?

#### a. Le bactériophage en tant que médicament

Selon le code de la santé publique (article L5111-1) en vigueur en France, 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 administré à l'homme ou à l'animal en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions organiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique ». Il s'agit d'une transposition de la définition européenne du médicament contenue dans la directive 65/65/CEE du 26 janvier 1965. La transposition de ce texte en droit national a été effectuée par l'ordonnance du 23 septembre 1967, puis a été modifiée en décembre 1971, puis en juillet 1975, avant d'être insérée dans l'article L.511 du Code de la santé publique. A la lumière de cette définition, les bactériophages seraient des médicaments puisqu'ils permettent de restaurer une voire des fonctions organiques. La question a d'ailleurs été posée à l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de la Santé (ANSM, anciennement Afssaps) en décembre 2007. La réponse obtenue en avril 2008 stipule qu'« un avis réglementaire a été demandé en 2004 à l'Agence Européenne du Médicament (EMA) sur deux produits à base de bactériophages. Sur la base des informations fournies pour ces deux

produits, il avait été conclu que ces produits pouvaient répondre à la définition du médicament ».

## **b. Le statut de la phagothérapie**

Les règlementations ayant évolué depuis l'abandon de la phagothérapie en France, dans les années soixante-dix, il n'est pas simple de trouver un cadre légal à cette thérapie.

### *b.1 Absence d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM)*

En France, la phagothérapie n'est actuellement ni autorisée, ni interdite. Les bactériophages, autrefois inscrits au Vidal (jusqu'en 1978), ne bénéficient plus de leur ancienne AMM. En effet, conformément aux articles R. 5121-36-1 et R. 5121-102 du Code de la Santé Publique, issus respectivement des décrets n° 2008-435 et n° 2008-436 du 6 mai 2008, une AMM devient caduque au bout de 3 ans d'arrêt de commercialisation. Suite au retrait du marché, une nouvelle AMM est désormais nécessaire et doit répondre aux critères actuels de sécurité sanitaire (ANSM, 2013 ; Article R51211-102, Article R5121-36-1, 2008).

De plus, les procédures d'AMM sont conçues pour encadrer la mise sur le marché de compositions médicamenteuses fixes. La mise à jour régulière de la composition en phages d'une préparation, souhaitable d'un point de vue thérapeutique, n'est pas possible à la vue de la réglementation. En d'autres termes, la réglementation en place pour encadrer la mise sur le marché d'un nouveau médicament est inadaptée à la phagothérapie (Dublanche et Patey, 2011) et à sa nécessité d'adapter le traitement en fonction du patient traité.

### *b.2 Procédures possibles sans AMM*

Différentes procédures seraient envisageables pour mettre en place la phagothérapie sans AMM. Cependant, elles affichent toutes un certain nombre de limites. Il pourrait s'agir de :

- Référencer les maladies en « maladies orphelines de traitement ». Cette option est difficile à envisager compte tenu du fait que le statut de maladies orphelines s'applique aux maladies comptant moins de 2000 malades. Elle n'est donc pas applicable aux infections nosocomiales.

- Considérer les préparations de phages comme des « préparations magistrales ». Une préparation magistrale est, selon le Code de la Santé Publique : « tout médicament préparé extemporanément en pharmacie selon une prescription destinée à un malade déterminé » (Article L.5121-1). Cependant, de telles préparations ne peuvent être réalisées qu'à partir de produits référencés.
- Considérer les bactériophages comme des probiotiques. Les probiotiques sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (Organisation Mondiale de la Santé, 2001). Les micro-organismes en question, des bactéries ou des levures, ont différentes actions possibles (selon la composition et la formulation) : améliorer le transit intestinal, diminuer la fréquence et la durée des diarrhées et renforcer le système immunitaire. Les bactériophages ne répondent pas à la définition des probiotiques, puisque ce ne sont pas des micro-organismes vivants. Leur utilisation en tant que probiotiques n'est donc pas possible.
- Appliquer le paragraphe 35 du chapitre C de la Déclaration d'Helsinki, indiquant 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. Dans toute la mesure du possible, cette intervention devra faire l'objet d'une recherche pour en évaluer la sécurité et l'efficacité. Dans tous les cas, les nouvelles informations devraient être enregistrées et, le cas échéant, rendues publiques ». C'est sur ce paragraphe que s'appuie l'Institut Ludwik Hirszfild en Pologne. Son autorisation à pratiquer la phagothérapie a également nécessité l'aval du Comité d'éthique de son académie, obtenu en juin 2005. Dans ce cas, la phagothérapie ne peut être qu'un recours de dernière intention, utilisé une fois que toutes les autres options thérapeutiques ont été épuisées.



- Appliquer l'article 83 du règlement 726/2004 du Parlement Européen, par lequel il est possible d'employer, dans une démarche d'application compassionnelle, un médicament en cours d'essais cliniques ou un médicament n'ayant pas d'AMM et dont une demande d'AMM a été déposée. Une application compassionnelle correspond à la mise à disposition de ce type de médicament « à un groupe de patients souffrant d'une maladie invalidante, chronique ou grave, ou d'une maladie considérée comme mettant la vie en danger, ces patients ne pouvant pas être traités de manière satisfaisante par un médicament autorisé » (Article 83, 2004). Cet article a permis la mise en place de la phagothérapie afin de traiter des patients en échec thérapeutique au Centre des Brûlés de l'Hôpital Militaire de Bruxelles. Cette application thérapeutique compassionnelle avait au préalable reçu l'approbation d'un Comité d'éthique local. Des essais cliniques de phagothérapie ont pu être lancés en Angleterre et en Allemagne, dans ce même cadre d'utilisation compassionnelle. Cependant, ce règlement ne permet que des essais ponctuels pour des applications forcément limitées, comme cela est explicité dans le document explicatif associé au règlement (EMA, 2007).

Parmi toutes ces options, certaines rendent possible une application thérapeutique de la phagothérapie. Néanmoins, aucune d'elles n'est réellement satisfaisante.

### *b.3 Evolution réglementaire possible*

Une adaptation des règlements nationaux et européens est indispensable pour une mise en place cohérente de la phagothérapie. Ainsi, les phages pourraient faire partie d'une section spécifique des médicaments de thérapie innovante.

Les institutions européennes se sont engagées à suivre les progrès scientifiques et à revoir constamment la législation communautaire à la lumière des nouveaux développements afin de mettre à disposition des patients les traitements novateurs. Pour cela, elles ont convenu d'un règlement sur les thérapies innovantes (règlement CE 1394/2007). Entré en vigueur en décembre 2008, ce règlement a modifié l'environnement réglementaire applicable aux approches thérapeutiques qui font appel aux gènes, tissus ou cellules. Ainsi, il confirme le statut de médicament, spécialité pharmaceutique, aux produits de thérapie génique, cellulaire, de l'ingénierie tissulaire et aux produits combinant dispositifs médicaux et cellules ou tissus. Il

a pour objectif de faciliter et stimuler la recherche sur ces nouvelles approches dans un cadre harmonisé au niveau européen, d'assurer un accès au marché de l'ensemble des Etats membres de l'Union Européenne via une procédure d'autorisation de mise sur le marché centralisée (l'AMM octroyée par la Commission Européenne s'impose dans tous les pays de l'Union Européenne), de développer la qualité et la sécurité de ces nouveaux produits (à partir de référentiels adaptés et en imposant une obligation de suivi de la sécurité et de l'efficacité), d'améliorer l'évaluation de ces produits innovants avec la mise en place d'un comité des thérapies innovantes à l'EMA (le Committee for Advanced Therapies : CAT) et de stimuler la recherche et le développement de ces produits par la mise en place de mesures incitatives. Il convient de garder à l'esprit qu'une part importante des opérateurs économiques intervenant dans ce domaine n'est pas les grandes entreprises pharmaceutiques, mais les petites et moyennes entreprises ou les hôpitaux.

La mise en place d'une section spécifique à la phagothérapie au sein des thérapies innovantes permettrait un développement pertinent et harmonisé de cette thérapie au niveau européen. Elle faciliterait, de plus, la personnalisation nécessaire en thérapie phagique, c'est à dire l'administration de phages et l'organisation d'un système de production adaptées à l'infection d'un patient donné.

#### *b.4 Réglementation en agro-alimentaire*

L'utilisation des bactériophages dans l'industrie agro-alimentaire ne manque pas d'intérêts. Cependant, la réglementation sur l'assainissement des denrées, régie par la directive européenne 89/107/CEE (« Additifs alimentaires et conditions d'emploi ») ne permet que l'emploi de produits chimiques, d'autres substances ou procédures de traitements approuvés par l'Union Européenne. Les bactériophages, en tant que décontaminant à visée alimentaire, ne sont, pour l'heure, pas autorisés.

## 2. Limites industrielles et publiques

### a. Limites industrielles

Des contraintes pour breveter les bactériophages existent et limitent les investissements des laboratoires pharmaceutiques. Le nombre d'essais cliniques mis en place par ces laboratoires est donc limité.

D'une part, la phagothérapie n'est pas une thérapie innovante. En effet, les phages et leur utilisation thérapeutique ont été décrits depuis longtemps. Or, un brevet a pour objectif d'encadrer et protéger la mise sur le marché d'éléments novateurs. Pour valider ce critère, il faudrait donc proposer une nouvelle niche particulière de phages, jamais décrite auparavant.

D'autre part, si un phage jamais décrit par le passé était proposé, il serait nécessaire de séquencer son génome en totalité et de breveter cette séquence précise. Or, il existe dans la nature de nombreux autres phages, proches génétiquement et physiologiquement, qui ne seraient pas protégés par le brevet déposé. L'industrie pharmaceutique pourrait donc contourner les problèmes de brevet en utilisant des phages proches mais non similaires. De plus, la mise à jour régulière des phages, nécessaire pour suivre l'évolution bactérienne, est incompatible avec le dépôt d'une séquence génomique précise et fixe auprès de l'office des brevets.

Le manque d'investissement de la part de l'industrie pharmaceutique provient également du fait qu'en phagothérapie, une dose de phage en administration unique ou avec une faible fréquence d'administration peut être suffisante à la réalisation du traitement. La production ne rapporterait donc pas autant que les bénéfices réalisés actuellement grâce aux antibiotiques. Les perspectives limitées de profits n'incitent donc pas l'industrie pharmaceutique à mettre en place des essais cliniques, pourtant indispensables à l'évaluation de la phagothérapie.

### b. Peu de démarches publiques

Malgré la prise de conscience indéniable des pouvoirs publics sur la montée en puissance et les risques que représentent la résistance bactérienne aux antibiotiques, peu de démarches sont entreprises pour mettre au point des outils thérapeutiques alternatifs. L'intérêt suscité par les bactériophages reste limité et restreint. Ainsi, sur les 15 dernières années, seules deux questions, émanant de la Sénatrice Maryvonne Blondin, ont porté sur la réhabilitation de la

phagothérapie dans le système de santé français. La réponse gouvernementale, par l'intermédiaire de Michèle Delaunay (alors ministre déléguée auprès de la ministre des affaires sociales et de la santé, chargée des personnes âgées et de l'autonomie) stipule que « la dimension de cette problématique impose d'interpeller les partenaires européens que sont l'Agence Européenne du Médicament et la Commission européenne, car la position de l'ASNMM ne peut se limiter à une approche uniquement nationale » (Sénat, 2013).

En septembre 2013, la députée européenne Michèle Rivasi a affirmé lors du congrès « Le renouveau de la phagothérapie, Pourquoi ? Comment ? » que « les politiques n'étaient pas au courant de l'existence de cette thérapie et du débat actuel qu'elle suscite ». Cette méconnaissance est probablement liée à la faible exposition médiatique des phages. Toutefois, cette situation est en train d'évoluer.

### **c. Evolution récente**

Le Centre d'Analyse Stratégique (CAS) du gouvernement français, institution d'expertise et d'aide à la décision qui dépend des services du Premier ministre, annonce, dans une note de novembre 2012 que « parmi les pistes de recherche de complément ou d'alternative aux antibiotiques, l'une d'entre elles (la phagothérapie) nécessite d'être évaluée rapidement [...] la phagothérapie, le traitement des infections bactériennes avec les bactériophages permet, dans un certain nombre de cas, de traiter les infections à bactéries les plus résistantes ». Il attire également l'attention sur « les procédures d'AMM actuelles qui ne sont adaptées ni au développement industriel de cocktails de phages préparés à l'avance, ni à une approche sur-mesure à petite échelle, qui consiste à isoler et préparer (en quelques semaines) un phage spécifique de la bactérie du patient. Les procédures d'AMM sont conçues pour des médicaments inertes et fixes ne permettant pas la mise à jour régulière de cocktails de phages que l'on doit adapter en fonction des bactéries ». Ainsi, il envisage l'adaptation du Code de la Santé Publique, à l'instar de la réglementation sur les vaccins, permettant de réadapter les cocktails (après obtention préalable d'une AMM pour ces cocktails) selon les bactéries ciblées, sans qu'une nouvelle procédure d'AMM ne soit exigée. Enfin, l'analyse du CAS préconise la mise en place et le financement de programmes de recherches sur l'innocuité, l'efficacité et les champs d'application potentiels de la phagothérapie, ainsi que sur la faisabilité d'une production de cocktails répondant aux exigences sanitaires actuelles. Sa démarche est donc globale : médicale, réglementaire, qualitative et industrielle.

Dans le monde, quelques dizaines de firmes à capitaux privés exploitent les bactériophages en tant qu'agents antibactériens. La plupart de ces firmes envisagent de développer des traitements contre des infections touchant les plantes ou les animaux. D'autres développent des produits prophylactiques. Il y a, au final, très peu de firmes qui s'intéressent exclusivement à l'usage thérapeutique des bactériophages dans les maladies humaines. Mais, ces dernières années, la perspective d'utiliser les bactériophages à la place, en relai ou en complément des antibiotiques suscite de nouveaux intérêts. En effet, les dépôts de brevets à visée thérapeutique sont de plus en plus nombreux. Divers projets voient le jour et c'est ainsi que des essais cliniques inédits devraient débiter au sein de sept hôpitaux de France, de Belgique et de Suisse à l'automne prochain (2014). Le projet européen, nommé Phagoburn, rassemble des partenaires privés et publics et implique des hôpitaux civils et militaires. Il va inclure environ 200 patients, issus d'unités de grands brûlés. La start-up française Pherecydes Pharma mettra au point les cocktails de bactériophages. Quant à la production, elle sera assurée par Clean Cells, établissement pharmaceutique basé à Nantes. Deux produits thérapeutiques dirigés contre deux espèces bactériennes (colibacille et pyocyanique) vont être testés sur des brûlures infectées. L'objectif est, dans un premier temps, de montrer une efficacité de la phagothérapie comparable à celle du traitement de référence. Il s'agira ensuite d'étudier la vitesse d'éradication des bactéries pathogènes. Il est à noter que les tests précliniques de phages sur des modèles animaux, menés par Pherecydes Pharma, ont attesté d'une « très bonne efficacité des produits » (Jérôme Gabard, le PDG de Pherecydes Pharma).

Enfin, les réunions, journées et colloques concernant les bactériophages et leurs utilisations thérapeutiques sont de plus en plus nombreuses. La députée européenne Michèle Rivasi a, par exemple, organisé une réunion sur la phagothérapie (et sa réglementation) au Parlement européen en septembre 2013. Cette réunion a entraîné une demande de proposition écrite sur les critères de qualité des préparations phagiques exigés par l'EMA. La députée a également inscrit le sujet des phages dans le projet pilote de la commission « Horizons 2020 » (programme européen pour la recherche et l'innovation) et prévoit, en 2014, de présenter un rapport d'initiative spécifique sur la phagothérapie.

### 3. Résistance bactérienne

#### a. Mécanismes mis en jeu

##### *a.1 Inhibition de l'adsorption phagique*

Pour infecter une bactérie cible, les bactériophages doivent pouvoir s'attacher à des structures externes (récepteurs). Selon les phages, l'attachement peut se faire au niveau de lipopolysaccharides bactériens, des acides téichoïques, des protéines de la paroi, de flagelles ou de pili.

L'identification du récepteur bactérien ciblé est importante car les mutations bactériennes, entraînant une modification du récepteur, sont une cause fréquente de résistance aux phages. En effet, le phage ne reconnaît plus la bactérie initialement ciblée, il ne peut alors plus pénétrer dans la cellule bactérienne (Skurnik et Strauch, 2006).

Le développement de résistance bactérienne aux phages peut avoir des aspects bénéfiques. Certaines mutations au niveau des lipopolysaccharides engendrent une diminution de la virulence du mutant bactérien. De même, des mutations au niveau des flagelles peuvent atténuer la mobilité et la virulence des bactéries mutées. Enfin, des mutations au niveau des pili peuvent réduire la survie et la pathogénicité des mutants.

##### *a.2 Facteurs intracellulaires et infections abortives*

Certains facteurs cytosoliques sont indispensables à l'infection phagique (réplication, assemblage ou libération). Des mutations modifiant ces facteurs peuvent conduire à une résistance bactérienne. Par exemple, le phage  $\phi$ 2954 dirigé contre *Pseudomonas syringae* nécessite la glutarédoxine-3 de la bactérie hôte pour transcrire un segment de son ARN. Une délétion au niveau du gène codant pour la glutarédoxine-3 entraîne la résistance de la bactérie mutante.

Les bactéries sont capables d'échapper à une infection par les bactériophages par un autre mécanisme nommé « système d'avortement de l'infection » (ou Abi, abortive infection system). Ce système provoque l'autodestruction (« suicide ») de la bactérie infectée avant que

la synthèse de nouveaux virions ne soit réalisée. Ce système met en jeu une toxine protéique et un brin d'ARN antitoxine spécifique. Cet élément est appelé ToxIN et correspond à un système toxine-antitoxine (TA) (Fineran et al., 2009). Lors de l'infection d'une bactérie par un phage, la composante antitoxine peut être dégradée, ce qui permet à la toxine protéique de détruire la membrane bactérienne.

Les systèmes toxine-antitoxine sont retrouvés dans la plupart des génomes bactériens. Ils peuvent être localisés au niveau du chromosome ou au niveau de plasmides. La dissémination par transfert horizontal est donc possible. Si les systèmes TA peuvent permettre la résistance bactérienne contre les phages, leur impact réel sur la phagothérapie n'est pas bien connu. Il paraît toutefois indispensable de les prendre en considération. Il faut également noter que des bactériophages mutants, permettant d'éviter les systèmes TA, ont pu être isolés. Ceci démontre que les résistances bactériennes peuvent être surmontées par des bactériophages.

### *a.3 Déstabilisation du génome phagique*

L'acronyme CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) désigne une série de courtes séquences génétiques répétées sur le génome des bactéries, régulièrement entrecoupée par des séquences variables appelées « spacers ». Les loci de ces séquences sont généralement situés à proximité de gènes Cas (CRISPR-associated). Le système CRISPR/Cas a un mode d'action qui n'est pas encore parfaitement élucidé, mais il est supposé fonctionner ainsi. Les gènes Cas codent pour des protéines Cas. Les séquences CRISPR sont transcrites en ARN, qui sont découpés par les protéines Cas au niveau des séquences palindromiques en segment d'ARN de plus petites tailles. Chaque segment d'ARN comporte alors un spacer. Lorsqu'un phage infecte la bactérie et que son génome comporte une séquence (appelée proto-spacer) parfaitement identique à un spacer, il y a hybridation entre le spacer d'un fragment d'ARN CRISPR et le proto-spacer du génome phagique. La conséquence de cette hybridation est l'arrêt de la traduction des ARNm viraux : l'infection phagique est alors bloquée.

Récemment, près de 40% des bactéries séquencées présentent le système de résistance CRISPR/Cas. De plus, il a été démontré que la mise en contact de bactéries avec des bactériophages (qui n'avaient pas préalablement infecté les bactéries) entraîne l'apparition de

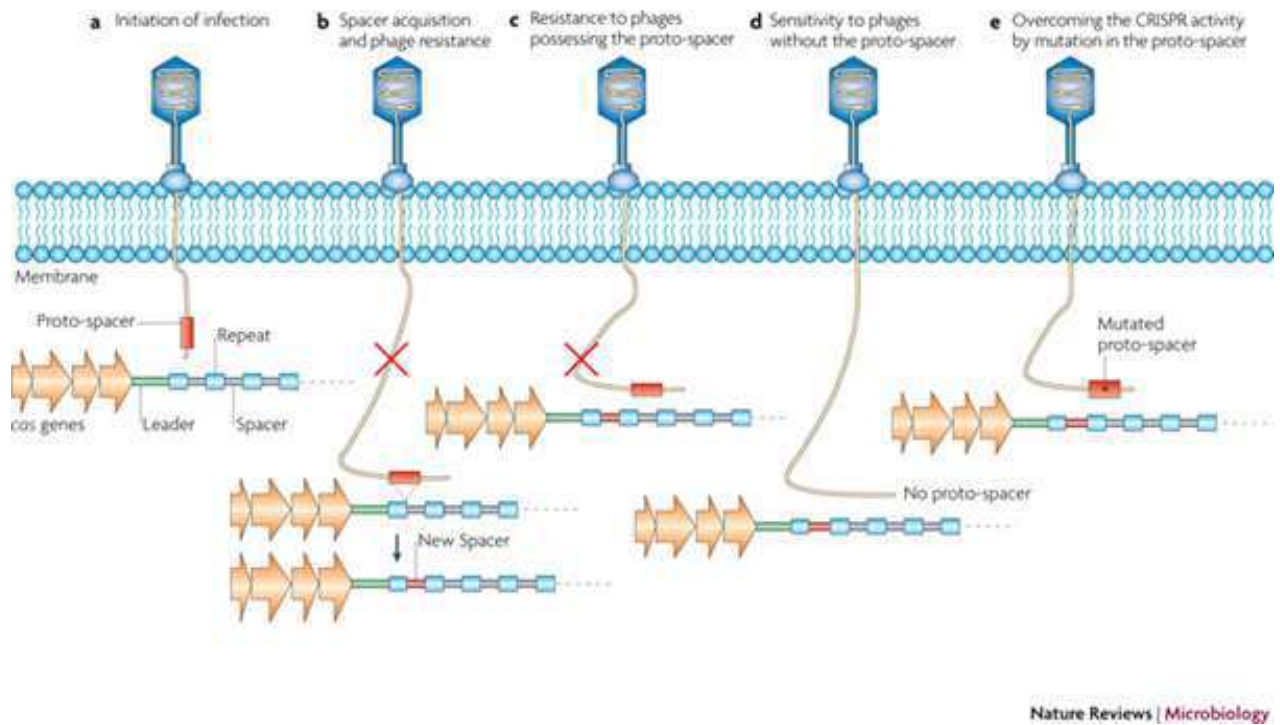
nouveaux spacers dans les loci des CRISPR des bactéries qui n'ont pas été lysées par des phages. Les spacers correspondraient, à la base, à un ADN extrachromosomique qui dériverait du génome de phages rencontrés précédemment par la bactérie. L'apparition de spacers est donc un mécanisme adaptatif d'immunisation (une acquisition de résistance) des bactéries vis-à-vis d'une infection par des phages.

Le mécanisme d'acquisition de nouveaux spacers demeure hypothétique (Labrie et al., 2010). Lors d'une infection phagique, les bactéries phago-résistantes (par un autre mécanisme que celui des CRISPR) ne sont pas éliminées. Ces bactéries présentant des CRISPR pourraient acquérir, à partir du génome du phage, un nouveau spacer correspondant au proto-spacer phagique et espacé par une nouvelle séquence palindromique. Les bactéries deviennent alors résistantes aux phages présentant ce proto-spacer (figure 47).

Les CRISPR peuvent donc être considérés comme un historique des infections phagiques rencontrées par la bactérie.



Figure 47: Schéma représentant le système CRISPR/Cas



Source : « Bacteriophage resistance mechanisms », Labrie, Samson et Moineau, extrait de Nature Reviews Microbiology, 8, 317-327, 2010

Ce schéma représente le mode d'action proposé du système CRISPR/Cas. Lors de l'infection d'une bactérie par un phage (a), les phages vont éliminer une grande partie des bactéries. Certaines bactéries résistantes (b) acquièrent un nouveau spacer dans leur génome, correspondant au proto-spacer des phages rencontrés. Les bactéries possédant ce nouveau spacer sont alors résistantes aux phages portant le proto-spacer correspondant (c). Elles demeurent sensibles aux phages exempts de proto-spacers correspondants aux spacers de la bactérie (d). Enfin, la coévolution phage-bactérie peut permettre le contournement de cette résistance, par une mutation du proto-spacer, qui ne sera plus reconnu par le spacer de la bactérie (e).

#### *a.4 Intégration d'un phage tempéré*

Lorsqu'une bactérie est infectée par un phage tempéré, le génome du phage n'est pas détruit. Il devient un composant intégré à part entière du génome bactérien. Les bactéries infectées deviennent alors résistantes à ce phage intégré, ainsi qu'aux phages proches génétiquement (Abedon et al., 2011 ; Dublanche 2009).

## b. Conséquences

L'existence et l'évolution continue des résistances bactériennes aux phages suscitent des interrogations et sont autant de problèmes à anticiper. Un certain nombre d'arguments permettent toutefois de nuancer l'impact futur de ces résistances.

Tout d'abord, les bactériophages ont un spectre d'action étroit. La résistance d'une bactérie (ou d'une souche bactérienne) est donc nécessairement limitée, puisque seules les bactéries cibles peuvent devenir résistantes au phage en question.

L'administration de cocktails phagiques ciblant des récepteurs bactériens différents et continuellement mis à jour en fonction de l'évolution des bactéries cibles réduit considérablement l'impact que pourraient avoir les résistances bactériennes (Kutateladze et Adamia, 2010).

La coévolution permanente du couple phage/bactérie permet la sélection de virus qui échappent aux mécanismes de résistance acquis par la bactérie. Cette coévolution permet donc de relativiser le risque de résistances aux phages des bactéries. En ce qui concerne le système CRISPR/Cas, l'action est, d'une part, limitée aux phages que la bactérie a déjà rencontrés auparavant, c'est à dire au cours d'une infection pour laquelle elle s'était déjà avérée résistante. Cela limite la probabilité de survenue de ce mécanisme (Hyman et Abedon, 2010). D'autre part, les bactériophages peuvent échapper à la phago-résistance bactérienne due à la présence de spacers correspondant aux proto-spacers phagiques, par un réarrangement dans leurs proto-spacers (Labrie et al., 2010). Ce mécanisme peut consister en une recombinaison homologue, une mutation ponctuelle ou une courte délétion.

Enfin, les phago-résistances se mettent en place relativement lentement, environ dix fois plus lentement que celles mises en place contre les antibiotiques : toutes les  $10^6$  divisions bactériennes pour les antibiotiques, contre  $10^7$  pour les bactériophages (Carlton, 1999). Or, les bactériophages ont une croissance exponentielle et mutent au même rythme que leurs cellules hôtes. Le différentiel temporel entre la croissance des populations bactériennes et phagiques et les évolutions respectives au cours du développement permettraient aux phages de ne jamais être complètement « dépassés » par les phago-résistances bactériennes (Inal, 2003).

## 4. Limites pharmacologiques

### a. Traitement ciblé

Une thérapie phagique nécessite de connaître la bactérie responsable de l'infection. Cet élément indispensable peut être contraignant pour l'utilisation en routine de la phagothérapie. En effet, plusieurs obstacles peuvent se présenter :

- Il est nécessaire d'isoler et d'étudier la bactérie responsable de la pathologie, ce qui implique de réaliser un prélèvement correct et d'avoir un laboratoire performant. Cela demande une maîtrise technique et des contraintes temporelles potentiellement gênantes.
- La zone d'infection peut être difficile à atteindre, ce qui complique la manœuvre du prélèvement, ainsi que celle d'un traitement local.
- Certaines infections sont à germes multiples.
- Enfin, si un contaminant (contamination extérieure ou flore endogène du patient) est isolé et déterminé en lieu et place du germe pathogène, l'échec thérapeutique est certain.

Lors d'infections graves à évolution rapide, l'emploi d'un cocktail peut être recommandé en première intention, afin d'élargir le spectre d'action de la préparation. Dans le même temps, il s'agira de s'assurer que tous les germes incriminables sont sensibles aux phages du cocktail. Dans un second temps, une préparation contenant un ou plusieurs phages spécifiquement dirigés contre la ou les bactéries pathogènes peut être mise au point.

### b. Seuil bactérien

Lorsque l'infection bactérienne est débutante, la population bactérienne est relativement faible. Les probabilités de rencontres aléatoires entre les bactéries et les bactériophages sont donc moindres et le seuil de densité bactérienne nécessaire à l'infection phagique peut ne pas

être atteint. Les bactériophages risquent de ne pas être efficaces contre cette infection, puisqu'ils seront éliminés avant d'avoir atteint leur cible.

De même, si l'infection à traiter est due à des bactéries à multiplication lente, le seuil de population bactérienne nécessaire à atteindre est obtenu plus tardivement que lors d'infections provoquées par des bactéries à multiplication rapide. Il y a alors également un risque d'inefficacité thérapeutique des phages.

Cet aspect de la thérapie phagique est important à considérer lors de la mise en place du protocole thérapeutique. Pour éviter un échec thérapeutique, il est préférable de ne pas mettre en place la thérapie phagique au tout début d'une infection et de privilégier des administrations répétées lors d'infections à croissance lente. Au contraire, dans le cas d'infections causées par des bactéries à multiplication rapide, un faible nombre d'administrations, voire une administration unique, peuvent suffire (Capparelli et al., 2010).

De plus, certaines études tendent à montrer une efficacité moindre des bactériophages sur les bactéries quiescentes. La stratégie consistant à associer la thérapie phagique et l'antibiothérapie peut se révéler particulièrement intéressante, puisque les antibiotiques permettraient alors d'agir sur les bactéries relictuelles et éventuellement quiescentes (Dublanche, 2009).

### **c. Le phénomène de translocation**

L'infection d'une bactérie par un phage se réalise à la faveur d'une rencontre aléatoire entre la bactérie et le phage. Pour traiter une infection bactérienne, il paraît, en théorie, préférable de favoriser cette rencontre par un traitement local.

Les administrations par voie orale permettent aux phages d'atteindre la circulation sanguine par le phénomène de translocation. Les phages vont alors circuler aléatoirement dans l'organisme. Seule une petite partie des phages administrés vont atteindre le site infectieux. Cela engendre donc une perte quantitative de phages potentiellement efficaces contre la bactérie pathogène. De plus, la quantité de phages au niveau du site infectieux pourrait être insuffisante par rapport au seuil de phages nécessaires à une infection virale efficace : il y a donc un risque d'échec thérapeutique. Pour éviter cet échec, les préparations phagiques, dans leur ensemble, doivent avoir un titre suffisant. Le minimum requis est de  $10^5$  PFU/mL.

Enfin, par un raisonnement similaire, les infections des organes internes seraient plus difficiles à traiter que les infections superficielles ou locales.

#### **d. Infections à bactéries intracellulaires**

Les bactériophages ne pénètrent pas dans les cellules eucaryotes. Il serait donc *a priori* impossible de traiter par thérapie phagique des infections bactériennes causées par des germes intracellulaires, puisque les phages ne peuvent pas atteindre et s'attacher aux bactéries cibles.

Cependant, certaines études et observations menées sur des germes intracellulaires laissent à penser le contraire.

En 1940, le traitement par phages de fièvre typhoïde due à *Salmonella typhi* a donné des résultats thérapeutiques satisfaisants. Toutefois, les salmonelles ne sont que des bactéries intracellulaires facultatives. L'interprétation des résultats reste donc difficile.

L'étude du génome de *Legionella pneumophila*, germe intracellulaire strict, a montré la présence de séquences génomiques comportant de fortes analogies avec celles des phages. Ceci pourrait être une preuve indirecte de l'existence de bactériophages dirigés contre cette bactérie. De plus, le Centre National de Référence des légionnelles (Institut de Veille Sanitaire) a cherché des preuves directes de cette existence. La conclusion de leurs travaux est qu'il existe des bactériophages dirigés contre ces germes intracellulaires stricts (Lammertyn et al., 2008).

Enfin, les espèces bactériennes appartenant au genre *Mycobacterium* ont une multiplication intracellulaire. Il a été mis en évidence des phages dirigés contre ces bactéries, ils sont appelées mycobactériophages. Certaines espèces de mycobactéries ne sont pas ou peu pathogènes pour l'homme (*Mycobacterium smegmatis* ou *Mycobacterium kansasii*). Une étude a permis de mettre en évidence des phages non lytiques contre ces deux espèces bactériennes (infection chronique permettant la production de phages qui sont excrétés sans lyse de la bactérie), mais lytiques contre *Mycobacterium tuberculosis*. *In vitro*, une souche de *Mycobacterium smegmatis* lysogénisée par le phage a été inoculée à une culture cellulaire contaminée par le bacille de la tuberculose. Après avoir été phagocytée, *Mycobacterium smegmatis* libère des phages capables de lyser *Mycobacterium tuberculosis*. Cette méthode a permis l'élimination de toutes les souches de mycobactéries pathogènes *in vitro* (Danelishvili et al., 2006).

La question d'une efficacité potentielle de la phagothérapie sur les bactéries intracellulaires demeure incertaine et nécessite donc des études supplémentaires, puisque les études citées précédemment semblent infirmer les prévisions théoriques.

## 5. Limites immunologiques à la phagothérapie

Les protéines, notamment sous forme d'assemblage particulière, peuvent être fortement immunogènes lorsqu'elles sont introduites dans un organisme. De plus, le système immunitaire réagit à l'intrusion d'agents infectieux potentiellement pathogènes. La capsidique étant de nature protéique et le phage lui-même étant un virus et donc infectieux, il paraît nécessaire de s'interroger sur les effets immunologiques que peut engendrer l'administration de phages dans l'organisme.

### a. Réponse immunitaire innée

Une sélection *in vivo* de bactériophages mutants a permis de mettre en évidence une persistance accrue des phages dans l'organisme, grâce à un mécanisme d'échappement par rapport au système immunitaire, et une efficacité thérapeutique plus importante (Merril et al., 1996).

#### a.1 Macrophages

Les premières études de pharmacologie portant sur l'élimination des bactériophages ont montré qu'ils étaient principalement éliminés par le système réticulo-endothélial (notamment par les macrophages, et en particulier ceux du foie nommés cellules de Küpffer). En effet, des travaux ont mis en évidence l'accumulation de phages dans le foie et dans la rate avant leur élimination (Nungester et Watrous, 1934). Puis, une étude est venue confirmer l'action des cellules de Küpffer sur les bactériophages, ainsi que l'importante distribution de phages actifs au niveau hépatique (Inchley, 1969).

*A contrario*, une étude a permis d'observer une distribution plus importante de phages actifs dans la rate que dans le foie, et ce indépendamment de la voie d'administration (Geier et al., 1973). Les deux travaux précédents s'accordent cependant sur la moindre vitesse

d'inactivation des phages dans la rate par rapport à celle survenant dans les autres organes et en particulier dans le foie. Ceci se traduisait par la persistance d'une concentration significative de phages dans la rate plusieurs jours après l'inoculation de ces phages. Cette faible inactivation par les macrophages dans la rate pourrait avoir pour conséquence une mise en mémoire plus efficace des lymphocytes B vis-à-vis des phages. Elle permettrait à terme une réponse immunitaire adaptative plus efficace contre ces phages (Kaur et al., 2012).

Néanmoins, des travaux plus récents suggèrent que les macrophages ne joueraient pas un rôle aussi important que celui qui avait été imaginé par le passé dans l'inactivation des phages. Certaines expériences permettent, en effet, de supposer que l'inactivation des bactériophages ne serait pas due à l'activité des macrophages (Srivastava et al., 2004).

### *a.2 Autres cellules du système immunitaire inné*

Les granulocytes, une fois activés, seraient capables d'inactiver les bactériophages. Cette inactivation pourrait être causée par l'acide hypochloreux, libéré par les granulocytes activés (Gorski et al., 2012). Cependant, certains travaux laissent à penser que l'inactivation des phages ne serait pas due à l'activité des granulocytes (Uchiyama et al., 2009).

Une expérience a permis de mettre en évidence que des sujets souris dépourvues de lymphocytes NK présentent une inactivation des phages similaire aux souris témoins (non dépourvus en lymphocytes NK). La conclusion de ce travail est que les lymphocytes NK ne joueraient pas de rôle dans l'inactivation des phages (Srivastava et al., 2004).

Enfin, il a été montré par microscopie électronique que les cellules dendritiques phagocytent relativement rapidement les bactériophages (Barfoot et al., 1989).

## **b. Réponse immunitaire adaptative**

### *b.1 Réponse immunitaire à médiation humorale*

Les anticorps dirigés contre les virus sont une des principales composantes de la réponse immunitaire antivirale. Dans le cas de virus pathogènes, ces anticorps peuvent avoir

différentes actions effectrices: la neutralisation virale, la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et la phagocytose.

Les anticorps qui ont été étudiés dans la grande majorité des études d'immunologie phagique sont des anticorps neutralisants. Les anticorps ont des paratopes qui se lient aux épitopes viraux (parmi lesquels on retrouve des parties virales essentielles à l'infection des cellules hôtes). En particulier, les anticorps neutralisants antiphagiques empêchent généralement l'infection de la bactérie hôte par le phage, en se liant aux phages, notamment au niveau de la queue. Cependant, l'interaction entre phages et anticorps n'engendre pas systématiquement l'inactivation phagique. En effet, lorsque les anticorps se lient à des protéines virales indispensables à l'infection, celle-ci ne peut plus avoir lieu. Il en résulte alors une nette diminution de l'activité phagique antibactérienne. Par contre, lorsque les anticorps se lient à d'autres protéines (non indispensables à l'infection bactérienne), la virulence phagique n'est pas forcément impactée.

Les anticorps neutralisants antiphagiques peuvent être considérés comme une des plus importantes limites potentielles à la thérapie phagique. En effet, de nombreuses données expérimentales semblent indiquer que ces anticorps réduisent l'efficacité thérapeutique des phages. D'une part, des études ont montré que des sérums humains et animaux non immunisés par des phages ont déjà un faible taux d'anticorps neutralisants antiphagiques. La présence de tels anticorps peut s'expliquer par l'omniprésence des phages dans l'environnement, tant dans les sources alimentaires que dans les flores humaines et animales. Ceci engendre une immunisation constante vis à vis des antigènes phagiques. D'autre part, il a été montré chez l'animal, que suite à l'administration systémique de phages, des anticorps neutralisants sont produits à des concentrations élevées (Jerne, 1956). Cependant, cette étude est relativement ancienne et les résultats méritent d'être confirmés par les connaissances scientifiques actuelles. Enfin, la clairance des phages T7 du sang des souris est plus faible chez les animaux déficients en cellules B que chez les animaux de type sauvage (Srivastava et al., 2004). Ceci est un argument de plus en faveur de l'activité antiphagique des anticorps produits par les plasmocytes, différenciés à partir de lymphocytes B.

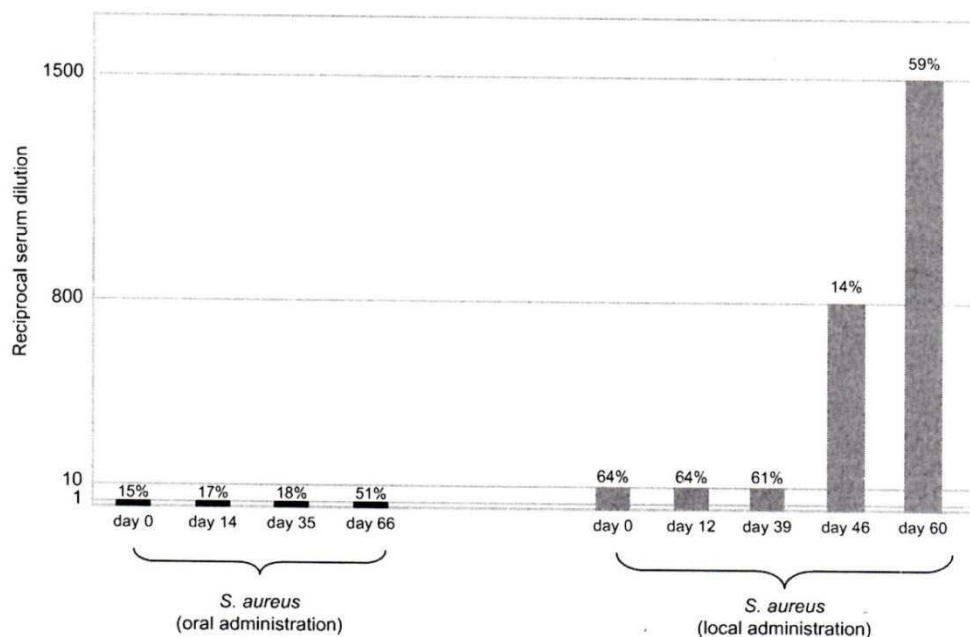
Prises dans leur intégralité, ces données indiquent que les anticorps neutralisants pourraient réellement impacter et faire décroître l'activité des phages à visée thérapeutique. Cependant,



l'intensité de la réponse humorale antiphagique peut varier selon le type de phage. Certains phages sont faiblement immunogènes et requièrent des administrations répétées, couplées à l'administration d'adjuvants, pour induire une réponse immunitaire détectable (Sulakvelidze and Barrow, 2005).

Dans une étude récente, des anticorps neutralisants antiphagiques présents dans le sérum de patients ayant une infection bactérienne ont été étudiés (Gorski et al., 2012). Les tests d'agglutination peuvent être utilisés pour mesurer la quantité d'anticorps dirigés contre un antigène particulaire (en l'occurrence phagique). Dans ces tests, des dilutions successives de l'échantillon sérique dans lequel on souhaite déterminer la quantité d'anticorps sont mélangés à une quantité fixe de bactériophages. La dilution la plus forte permettant d'avoir une agglutination, qui inactive au moins 10% des phages, est alors déterminée. Cette dilution est appelée le « titre » en anticorps. Les résultats présentent le facteur de dilution sérique maximal neutralisant au moins 10% des phages. Des anticorps neutralisants antiphagiques ont été mis en évidence dans le sérum de patients avant l'administration de phages, jusqu'à une dilution sérique de 1/100. Ceci confirme l'immunisation de certains patients par des phages « naturels ». La présence en anticorps neutralisants a augmenté chez certains patients durant le traitement jusqu'à une dilution sérique de 1/1500 (soit un facteur de dilution de 1500), suite à l'administration de phages par voie topique. Par contre, il est intéressant de constater qu'il n'y a pas d'augmentation significative de l'activité neutralisante des anticorps chez les patients recevant le traitement phagique par voie orale (figure 48).

Figure 48 : La neutralisation phagique dans le sérum de patients durant la thérapie phagique suite à une administration orale ou locale

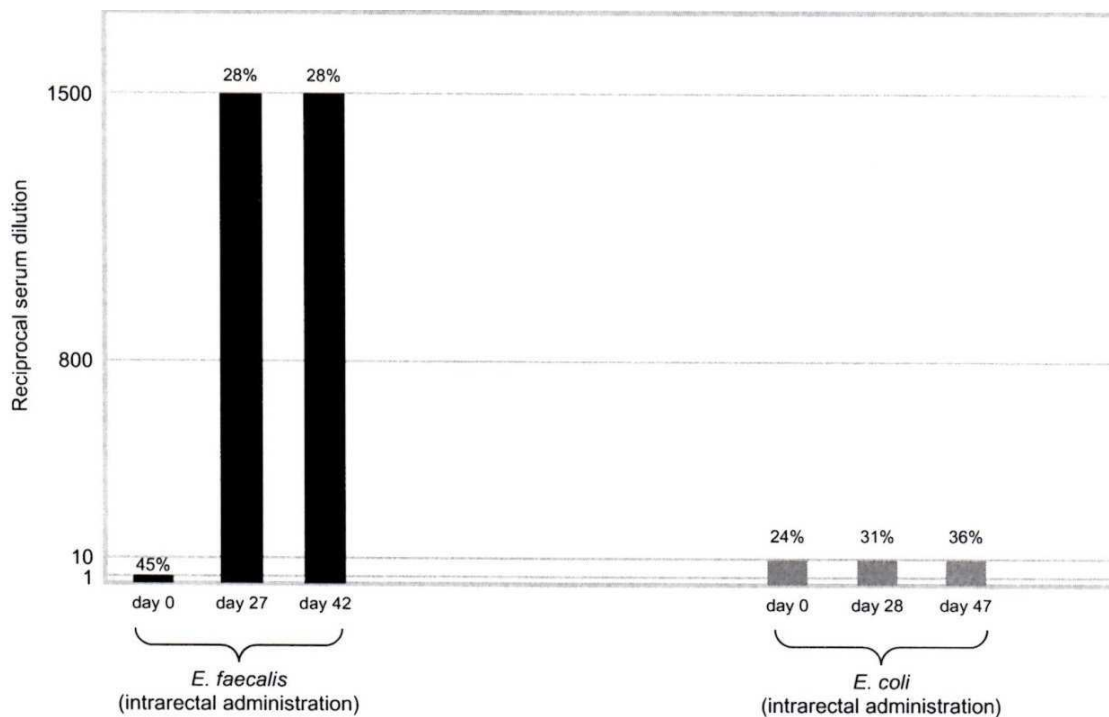


Source : « Phage as modulator of immune response » de andrzej Gorski et al. extrait de « Advances in Virus research », volume 83, 2012.

Dans cette étude, 50 µl de phages (titrés à 10<sup>6</sup> UFC/ml) est mélangé à 450µl de sérum et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Les prélèvements sériques sont dilués selon un certain facteur de dilution. Un échantillon est prélevé et ajouté à des souches bactériennes sur des plaques d'agar. Le tout est laissé à incuber à 37°C pendant 8 heures. Le degré de neutralisation phagique dans le sérum est déterminé par rapport à un contrôle (bouillon bactérien). Les résultats obtenus sont ceux de 2 patients : le premier est traité oralement (gauche), le second est localement (droite) avec des phages dirigés contre *Staphylococcus aureus*. La neutralisation phagique est étudiée par la plus forte dilution sérique qui neutralise au moins 10% des phages. Le pourcentage exact de neutralisation par des anticorps est mentionné au-dessus des barres. Plus la dilution sérique mettant en évidence une agglutination des phages est importante, plus l'activité neutralisante des anticorps dans l'échantillon initial est grande. Donc, plus le facteur de dilution est élevé, plus le taux d'anticorps neutralisants initial est important. On remarque que suite à l'administration de phages par voie orale, le taux d'anticorps neutralisants produit par le patient est nettement moins important que suite à une administration locale. Par voie orale, l'échantillon sérique n'est pas dilué aux jours 0, 14, 35 et 66. Le pourcentage de neutralisation phagique augmente très légèrement : respectivement 15%, 17%, 18% et 51%. Par voie locale, on remarque une augmentation des dilutions de l'échantillon sérique permettant une neutralisation phagique au cours du traitement. La neutralisation est d'environ 60% à une dilution au 1/10 aux jours 0 et 12 et 39. Durant cette période, l'activité neutralisation des anticorps n'augmente donc pas. Puis, la neutralisation passe à 14% à une dilution sérique au 1/800 au 46<sup>e</sup> jour de traitement et à 59% à une dilution sérique au 1/1500 au 60<sup>e</sup> jour de traitement. L'activité neutralisation des anticorps augmente donc fortement après le 45<sup>e</sup> jour de traitement phagique.

La réponse immunitaire à l'administration phagique dépend également des patients qui peuvent être divisés en groupe « répondeur » et « non répondeur » et du type de phage administré (figure 49). Ces deux facteurs de variabilité peuvent donc jouer un rôle dans l'efficacité des traitements phagiques envisagés.

Figure 49: La neutralisation phagique dans le sérum de patients suite à une administration intrarectale



Source : « Phage as modulator of immune response » de Andrzej Gorski et al. extrait de « Advances in Virus research », volume 83, 2012.

La réponse en anticorps antiphagiques neutralisants est étudiée chez deux patients : le premier est traité par voie rectale par des phages dirigés contre *Enterococcus faecalis* (gauche) et le second par voie rectale par des phages dirigés contre *Escherichia coli* (droite). Le protocole est le même que précédemment : 50 µl de phages (titrés à 10<sup>6</sup> UFC/ml) est mélangé à 450µl de sérum et incubé à 37°C pendant 30 minutes. Un échantillon est prélevé et ajouté à des souches bactériennes sur des plaques d'agar. Le tout est laissé à incuber à 37°C pendant 8 heures. La neutralisation phagique dans le sérum est déterminée par rapport à un contrôle (bouillon bactérien). Elle est étudiée par la plus forte dilution sérique qui neutralise au moins 10% des phages. On remarque clairement que selon le type de phage administré et selon le patient, l'action neutralisante des anticorps peut être, pour une même voie d'administration, très différente.

Lors de l'interprétation des résultats des études sur les anticorps antiphagiques, il faut prendre en considération le fait que la production de ces anticorps peut être stimulée par les particules phagiques elles-mêmes mais aussi par certains composants des cellules bactériennes présents dans les préparations phagiques, notamment les lipopolysaccharides (LPS). Ceci a été démontré dans une étude menée sur des souris (Michael et Kuwata, 1969). Suite à l'administration systémique de phage T2, il y a une production d'anticorps antiphagiques. Mais l'administration systémique de 50 µg de lipopolysaccharides d'*Escherichia coli* B (sans pré-immunisation des souris par des phages T2) augmente le taux d'anticorps neutralisants anti-T2 dans le sang des souris. Un effet similaire est observé suite à l'administration de LPS de *Shigella*. Cependant, le taux d'anticorps antiphagiques est substantiellement plus faible suite à l'administration de LPS que suite à l'administration de phage T2 à la dose de 10<sup>9</sup> UFC par souris (unité mesurant le nombre de colonies se développant sur une gélose). De plus, l'activité des anticorps neutralisants antiphagique du sérum des souris est augmentée sur une période plus courte suite à l'administration des LPS que suite à l'administration du phage T2. Le phénomène de production d'anticorps antiphagiques induits par lipopolysaccharides n'est pas parfaitement connu. En particulier, la dose minimale de lipopolysaccharides susceptible d'induire la production d'anticorps antiphagiques n'est pas déterminée. Ceci est à prendre en considération puisque les LPS sont des composants des cellules bactériennes présents à de faibles concentrations, y compris dans les préparations de phages purifiés. Lors de l'analyse d'études sur la production d'anticorps antiphagiques, et plus largement sur la thérapie phagique, la présence de LPS est un aspect à ne pas négliger. Par contre, l'immunisation contre des cellules bactériennes intactes n'a pas d'effets contre les phages et inversement, puisque les caractéristiques antigéniques des phages et des bactéries sont différentes.

L'immunogénicité des phages, associée à leur quantification aisée et à leur absence de toxicité, a conduit à l'utilisation du phage phi X 174 pour l'évaluation de l'immunité humorale dans le diagnostic et le monitoring de patients ayant des immunodéficiences primaires ou secondaires (Ochs et al., 1971 ; Wedgwood et al., 1975). Ce phage est un puissant antigène dépendant des cellules T qui entraîne une réponse humorale primaire et secondaire suite à l'injection intraveineuse de phages. Il est encore actuellement utilisé pour évaluer l'immunité humorale en médecine clinique. Cependant, la formation d'anticorps dirigés spécifiquement contre le phage phi X 174 nécessite la coopération de cellules

présentatrices d'antigènes, de cellules B et de cellules T. Donc les résultats anormaux peuvent être non seulement la conséquence de dysfonctionnements de cellules B mais aussi de cellules T, du complément et/ou des molécules d'adhésion.

### *b.2 Réponse immunitaire à médiation cellulaire*

Les cellules T jouent un rôle primordial dans la réponse aux infections virales par l'intermédiaire des cellules T CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> responsables de l'immunité à médiation cellulaire faisant suite à l'infection. On pourrait donc s'attendre à ce que l'administration de phages induise une réponse immunitaire à médiation cellulaire.

Les données de phagothérapie sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire sont peu abondantes, notamment en comparaison à celles sur la réponse humorale (Górski et al., 2012).

Toutefois, une étude a montré que, lors de l'administration de phages à des souris immunocompétentes et à des souris déficitaires en lymphocytes T, la cinétique des phages (notamment la cinétique d'élimination) est similaire. Ces résultats montrent donc l'absence de rôle significatif des lymphocytes T dans le cadre d'une phagothérapie, et ce malgré la phagocytose des phages par les cellules dendritiques, impliquées dans l'activation des lymphocytes T (Srivastava *et al.*, 2004).

### **c. Conséquences**

De ces travaux, il ressort que les éléments de l'organisme les plus à même d'inactiver les bactériophages seraient les anticorps dirigés contre ces virus. Les inconvénients potentiels qui pourrait en résulter ne devraient cependant pas impacter la phase initiale du traitement des infections aiguës. En effet, la cinétique d'action des bactériophages est supérieure à la production des anticorps.

Les nombreux contacts entre l'organisme et les phages pourraient expliquer la réponse immunitaire modérée via des lymphocytes B (bien que la production d'anticorps neutralisants a été démontrée) et la faible (voire l'absence de) réponse effective des lymphocytes T cytotoxique, contrairement à une réponse immunitaire classique face à un virus, et en dépit de la phagocytose des phages par les cellules dendritiques (Gorski et al., 2012). Il serait par

contre intéressant de connaître la durée pendant laquelle les anticorps sécrétés demeurent présents. En effet, s'il est nécessaire de réaliser une nouvelle administration de phages (lors d'une récurrence d'infection par exemple), il ne faudrait pas que les phages nouvellement administrés soient neutralisés par les anticorps. Il serait alors nécessaire d'augmenter les doses de phages à administrer ou d'administrer un autre phage actif contre la bactérie pathogène avec un profil antigénique différent du phage précédemment administré.

## VI. Conclusion :

La phagothérapie a été découverte il y a plus de quatre-vingt-dix ans. Après des débuts prometteurs, elle est progressivement tombée dans l'oubli dans les pays Occidentaux. Actuellement, elle suscite de nouveau l'intérêt de scientifiques et de quelques industriels et hommes politiques. Les avantages qu'offre la phagothérapie n'y sont probablement pas étrangers. En effet, les bactériophages peuvent être considérés comme des « médicaments (car ils répondent effectivement à la définition du médicament) intelligents », puisqu'ils sont auto-répliquant (capable de multiplication *in situ*) et auto-limitant. De plus, le pouvoir bactéricide des phages virulents, la possibilité d'éliminer la bactérie pathogène sans altération de la flore endogène et le faible nombre d'effets indésirables observés justifient indéniablement le positionnement de la phagothérapie comme une alternative crédible à l'antibiothérapie ou en association avec les antibiotiques. L'utilisation de phages en prophylaxie offre également des possibilités intéressantes dans des domaines variées.

La réhabilitation de la phagothérapie nécessite cependant quelques étapes avant de pouvoir être effective. Tout d'abord, des approfondissements semblent indispensables pour évaluer d'une part son incidence sur l'organisme, notamment son interaction avec le système immunitaire à long terme, et, d'autre part, la coévolution des phages administrés avec les bactéries. Cette coévolution antagoniste nécessite un contrôle, également sur le long terme, de la portée des phago-résistances et de l'impact potentiel de la thérapie phagique sur l'évolution générale des bactéries. Ces explorations futures imposent de réaliser des recherches *in vitro*, et *in vivo*, chez l'animal et chez l'homme. C'est ici qu'arrive la deuxième étape à prendre en compte pour la réhabilitation de la phagothérapie. En effet, le cadre légal actuel ne semble pas permettre une exploitation correcte de cette alternative thérapeutique par les laboratoires pharmaceutiques. En découle une difficulté notoire à mettre en place des essais thérapeutiques chez l'homme. Ces essais sont cependant nécessaires à l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché de bactériophages en tant que médicaments. Une possibilité pour briser ce cercle vicieux serait de modifier la réglementation en instaurant une clause particulière pour les bactériophages, à l'instar de celle mise en place pour les vaccins.

L'émergence, le développement et la multiplicité des antibiorésistances créent une situation préoccupante, que nous devons considérer comme un signal d'alarme, impliquant une réaction vive et sans délai. Des programmes de recherche, dans le domaine de la phagothérapie, sont envisagés et commencent à voir le jour. Le dernier en date, nommé Phagoburn, est l'illustration d'une prise de conscience collective, à l'échelle européenne.

A ce jour, toutes les propriétés des bactériophages ne sont pas connues. Les éventuelles applications que pourraient offrir ces virus ne se limitent pas à la seule phagothérapie. En effet, les phages sont étudiés dans d'autres domaines parmi lesquels on retrouve la biologie moléculaire, la génétique, les transplantations cutanées ou le traitement de tumeurs.



## *Bibliographie*

Abedon, S.T. : « Lysis and the interaction between free phages and infected cells », dans « The Molecular Biology of Bacteriophage T4 », 397-405, 1994

Abedon, S.T et Thomas-Abedon, C. : « Phage therapy pharmacology », *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 11 : 28-47, 2010

Abedon, S.T et al., : « Phage treatment of human infections », *Bacteriophage* 1, 66-85, 2011

Ackermann, H-W. : « Le matin des bactériophages », *Virologie*, 35-43, 2001.

Ackermann, H-W. : « 5500 phages examined in the electron microscope », *Archive of virology*, 2007.

Agirrezabala et al : « Maturation of phage T5 involves structural modification of both shell and inner core components », *Journal of Molecular Biology*, 2005

Alessandrini, D. : « Bacteriophagum antityphicum polyvalens », 1924.

Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., Troitsky, N. : « Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. », *Journal of Infection*, 36, 5–15, 1998

ANSM Caducité des AMM et des enregistrements In: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. : [http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Caducitedes-AMM-et-des-enregistrements/\(offset\)/2](http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Caducitedes-AMM-et-des-enregistrements/(offset)/2), 2013.

ANSM : « Evolution des consommations d'antibiotiques en France entre 2000 et 2012 : nouveau rapport d'analyse de l'ANSM », sur [www.ansm.sante.fr](http://www.ansm.sante.fr), Point d'information du 17/06/2013

Appelmans, R. : « Le bacteriophage dans l'organisme », *CR Séances Soc Biol Fil*, 85, 722–724, 1921

Appelmans, R. : « Au sujet de la valeur thérapeutique du bactériophage », *Archives internationales de Pharmacologie*, 1922.

Arber, W. : « Host Specificity of DNA produced by *Escherichia coli* », *J. Mol. Biol*, 20, 483–496, 1966

Article 83, Règlement 726/2004 du Parlement Européen, 2004

Article L5111-1, Code de la Santé Publique, 2007

Article R5121-102, Code de la Santé Publique, 2008

Article R5121-36-1, Code de la Santé Publique, 2008

Asheshov et al. : « Studies on cholera bacteriophage, part II : Classification of bacteriophage and its practical application », Indian Journal of Medicine Research, 1933.

Asheshov, Lahiri et al. : « Studies on cholera bacteriophage, Part III : Virulence and development of bacteriophage », Indian Journal of Medicine Research, 1933.

Barfoot, R., Denham, S., Gyure, L.A., Hall, J.G., Hobbs, S.M., Jackson, L.E. : « Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph », Immunology, 68, 233– 239, 1989

Beckrich et Hauduroy : « Le bactériophage dans le traitement de la fièvre typhoïde », Comptes rendus de la Société de Biologie de Paris, 1922.

Bordet et Ciuca : « Exsudats leucocytaires et autolyse microbienne », Comptes rendus de la Société de Biologie de Paris, 1920.

Bordet et Ciuca : « Le bactériophage de D'Hérelle, sa production et son interprétation », Comptes rendus de la Société de Biologie de Paris, 1920.

Breitbart, M. : « Marine viruses: truth or dare », Ann Rev Mar Sci, 4: 425-448, 2012

Breitbart, M. et Rohwer, F. « Here a virus, there a virus, everywhere the same virus ? », Trends microbiol, 13:278-284, 2005

Bruynoghe, R. et Maisin, J. : « Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du Staphylocoque », Journal des Comptes rendus de la Société de Biologie, volume 85, 1120-1121, 1921

Cairns, B. et Payne, R.J.H : « Bacteriophages therapy and the mutant selection window », Antimicrob. Agents Chemother, 52:4344-4350, 2008

Capparelli, R., Nocerino, N., Iannaccone, M., Ercolini, D., Parlato, M., Chiara, M. : « Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica* : a fresh appraisal of bacteriophage therapy », Journal of Infectious Diseases, 201, 52–61, 2010

Carlton, R.M. : « Phage therapy: past history and future prospects », Archivum immunologiae et therapiae experimentalis, 47, 267–274, 1999

Carson, L., Gorman, S.P., Gilmore, B.F. : « The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* », FEMS Immunology & Medical Microbiology, 59, 447–455, 2010

CAS : « Les bactéries résistantes aux antibiotiques : Note d'analyse 299, dans « Centre d'analyse stratégique du Premier Ministre français », <http://www.strategie.gouv.fr/content/bacteries-resistantes-antibiotiques-na299>, 2012

Chan, B. et Abedon, S.T. : « Bacteriophage adaptation, with particular attention to issues of phage host range », dans « Bacteriophage in Dairy Processing », Nova Science Publishers, 2012

Chanishvili, N. : « Phage therapy – history from Twort and d'Hérelle through soviet experience to current approaches », Extrait de « Advances in Virus Research », volume 83, 2012

Chanishvili, N., Chanishvili, T., Tediashvili, M., Barrow, P.A. : « Phages and their application against drug-resistant bacteria », Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 76, 689–699, 2001

Chibani-Chennoufi, S., Bruttin, A., Dillmann, M.L. et Brussow, H. : « phage-host interaction an ecological perspective », J. Bacteriol., 186:3677-3686, 2004

Comeau, A.M., et al., : « La synergie phages-antibiotiques : un enjeu pour la phagothérapie », Medecine Sciences n°5, volume 24, 2008.

Commission Européenne (1988), Directive européenne 89/107/CEE

Commission Européenne (2003), Directive européenne 2003/63/CE

Connerton, P.L., Timms, A.R., Connerton, I.F. : « *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy », Journal of applied Microbiology, 111, 255–265, 2011

Courcoux, P. et Corday : « Un cas de pyélonéphrite gravidique traité par le bactériophage de d'Hérelle », bulletins et mémoires de la Société des Hôpitaux de Paris, 1922

Curtright, A.J. et Abedon, S.T. : « Phage Therapy : Emergent Property Pharmacology », Journal of Bioanalysis and Biomedicine, 1948-593X.S6, 2011

D'Hérelle, F. : « Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique », Comptes rendus des Académies des Sciences de Paris, volume 84 :719-721, 1917

- D'Hérelle, F. : « Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire, Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris, volume 167, 970-972, 1918
- D'Hérelle, F. : « Sur le rôle du microbe bactériophage dans la typhose aviaire », Comptes rendus de l'Académie des Sciences Paris, volume 169, 932-4, 1919
- D'Hérelle, F. : « Sur le ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature dudit « microbe filtrant bactériophage » », Comptes rendus de la Société de Biologie de Paris, volume 83, 219-21., 1920
- D'Hérelle, F. : « Sur le sérum antibactériophage », Comptes rendus des Sociétés de Biologie de Paris, 85:701-702, 1921
- D'Hérelle, F. : « Essai de traitement de la peste bubonique par le bactériophage », La Presse Médicale, volume 33, 1925
- D'Hérelle, F. : « Le bactériophage et son comportement », Edition Masson et compagnie, 1926
- D'Hérelle, F. : « Le bactériophage et ses applications thérapeutiques » dans « La pratique médicale illustrée », 1933
- D'Hérelle et Eliava : « Unicité du *bacteriae* sur la lysine du bactériophage », 1921
- Da Costa Cruz : « Le traitement des dysenteries bacillaires par le bactériophage », Comptes rendus de la Société de Biologie de Paris, volume 91, 845, 1924.
- Dabrowska, K. et al. : « Hoc protein regulates the biological effects of T4 phage in mammals », Arch. Microbiol., 187 :489-498
- Dalsace : « Le bactériophage de d'Hérelle. Ses applications en thérapeutique urinaire », Thèse Médicale, 1925.
- Danelishvili, L., Young, L.S. et Bermudez, L. : « In vivo efficacy of phage therapy for *Mycobacterium avium* infection as delivered by a nonvirulent mycobacterium », Microbial Drug Resistance, 12 :1-6, 2006
- De Frutos, M. : « Les bactériophages ou comment les bactéries tombent malades », Université de Paris-Sud

Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O. : « Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections », *Journal of Infectious Diseases*, 201, 1096–1104, 2010

Données du réseau Sentinelle sur <http://www.sentiweb.fr>

Dublanchet, A., Patey, O. : « La phagothérapie: passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation) », *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 26, 165–175, 2011

Dublanchet, A. : « Des virus pour combattre les infections », Edition Favre, 2012

Eaton et Bayne-Jones « Bactériophage therapy : Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections », *Journal of the American Medical Association*, 1934

Edwards, R.A. et Rohwer, F. : « The phage proteomic tree : a genome based taxonomy for phages », *Journal of Bacteriology*, volume 184, N°16, 4529-4535, 2002

Edwards, R.A. et Rohwer, F. : « Viral metagenomics », 2005

Eliava, Pozersky : « De l'action destructive des sels de quinine sur le bactériophage de d'Hérelle », *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie*, 85 :139-141, 1921

Eliava : « Au sujet de l'adsorption du bactériophage par les leucocytes », *Comptes rendus des sociétés de biologie* 105 :829-831, 1930

Eliava, Nattan-Larrier : « Bactériophage et perméabilité placentaire », *Comptes rendus des séances de la Société de Biologie*, 106 :794-797, 1931

Ellis, Delbrück : « The growth of bacteriophage », 1939

EMA : Guideline on compassionate use of medicinal products, 2007

EMA : Advanced-therapy-medicinal-product classification in: European Medicines Agency : [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000296.jsp&mid=WC0b01ac058007f4bc](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000296.jsp&mid=WC0b01ac058007f4bc), 2013

Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissement de santé, menée par le Réseau d'Alerte d'Investigations et de Surveillance des Infections Nosocomiales (Raisin), l'Institut nationale de Veille Sanitaire (InVS), et le Ministère des Affaires Sociales et de la Santé, mai-juin 2012

- Euzéby, J.P. : « Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'école nationale vétérinaire de Toulouse », 2006
- Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., Salmond, G.P : « The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 894–899, 2009
- Fiorentin, L., Vieira, N.D., Barioni, J.W. : « Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers », *Avian Pathology*, 34, 258–263, 2005
- Forterre : « The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions », 2006
- Fuhrman, J.A : « Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects », *Nature Rev.*, 399 :541-548, 1999
- Geier, M.R., Trigg, M.E., Merrill, C.R. : « Fate of bacteriophage lambda in non-immune germfree mice », *Nature*, 246, 221–222, 1973
- Gilbert, P., Rickard, A.H., McBain, A.J. : « Biofilms and antimicrobial resistance », *Pharmacocine*, 128-138, 2011
- Goodridge, L.D., Bisha, B. : « Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods », *Bacteriophage*, 1, 130–137, 2011
- Górski, A., Miedzybrodzki, R., Borysowski, J., Dabrowska, K., Wierzbicki, P., Ohams, M., : « Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy », *Advances in virus research*, 83, 41–71, 2012
- Górski, A., Kniotek, M., Perkowska-Ptasinska, A., Mróz, A., Przerwa, A., Gorczyca, W., : « Bacteriophage translocation », *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 46 :313-319, 2006
- Gratia, A. : « La lyse transmissible du Staphylocoque. Sa production ; ses applications thérapeutiques », *Comptes rendus de la Société de biologie Paris*, 1922.
- Gratia, A. : « Studies on the d'Hérelle phenomenon », *Journal of Experimental Medicine*, 1921.
- Hankin, E.H « L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du choléra », *Annales de l'Institut Pasteur*, volume 10, 511-523, 1896.

Hershey, A.D., Chase, M. : « Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage », *The Journal of general physiology*, 36, 39–56, 1952

Holck, A., Berg, J. : « Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures », *Applied and environmental microbiology*, 75, 6944–6946, 2009

Huff, W.E., Huff, G.R., Rath, N.C. Balog, J.M. et Donoghue, A.M. ; « Bacteriophage potential role in food safety », *Preharvest and Postharvest Food Safety Contemporary Issues and Future Directions*, Blackwell Publishing, 2004.

Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Jones, M.V. : « Biofilm susceptibility to bacteriophage attack : the role of phage-borne polysaccharide depolymerase », *Microbiology*, 144, 3039–3047, 1998

Hyman, P. et Abedon, S.T : « Bacteriophage host range and bacterial resistance », *Adv. Appl. Microbiol.*, 70 :217-248, 2010

Inal, J.M. : « Phage therapy : a reappraisal of bacteriophages as antibiotics », *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 51, 237–244, 2003

Inchley, C.J. : « The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage », *Clinical and experimental immunology*, 5, 173–187, 1969

Jacob, F., extrait de «Qu'est-ce que la vie », conférence donnée le 1<sup>er</sup> janvier 2000 dans le cadre de «L'université de tous les savoirs »

Jerne, N.K. : « The presence in normal serum of specific antibody against bacteriophage T4 and its increase during the earliest stages of immunization », *The Journal of Immunology*, 76, 209–216, 1956

Kabeshima, T. : « Sur le ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature dudit « microbe filtrant bactériophage » de d'Hérelle », *Comptes rendus de la Société de biologie Paris*, 1920

Kabeshima, T. : « Thérapie expérimentale des porteurs de germes », *Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris*, volume 170, 71, 1920

Kantoch, M., Skurski, A. et Wieczorek, Z : « In vitro blockade of bacterial phagocytosis of leukocytes by means of bacterial viruses », *Schweiz Z Pathol. Mikrobiol.*, 21 :1106-1119, 1958

Kaur, T., Nafissi, N., Wasfi, O., Sheldon, K., Wettig, S., Slavcev, R. : « Immunocompatibility of bacteriophages as nanomedicines », *Journal of Nanotechnology*, ID 247427,1-13, 2012

Kazhal, Iftimovich : « From the history of fight against bacteria and viruses », 1968

Kniotek, M. et al. : « Phages as immunomodulators of antibody production », « Genomic issues, Immune System Activation and Allergy » (*Immunology* 2004), 33-36, 2004

Kniotek, M. et al. : « Bacteriophage interactions with T cells and Platelets », « Genomic issues, Immune System Activation and Allergy » (*Immunology* 2004), 189-193, 2004

Krueger et Scribner : « The bacteriophage : its nature and its therapeutic use », *Journal of the American Medical Association*, 1941.

Kumari, S. et al. : « Evidence to support the therapeutic potential of bacteriophage Kpn5 in burn wound infection caused by *Klebsiella pneumonia* in BALB/c mice », *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20 :935-941, 2010

Kutateladze et Adamia : « Bactériophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics », *Trans Biotechnol*, 28 : 591-595, 2010

Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S. : «Bacteriophage resistance mechanisms », *Nature Reviews Microbiology*, 8, 317–327, 2010

Lammertyn, E., Voorde, J.V., Meyen, E., Maes, L., Mast, J., Anné, J. : « Evidence for the presence of *Legionella* bacteriophages in environmental water samples », *Microbial ecology*, 56, 191–197, 2008

Larkum : « Bacteriophagy in uranary infections », 1925.

Mankiewicz, E. et al. : « The effect of mycobacteriophage particles on cell-mediated immune reactions », *Can. J. Microbiol.*, 20 :1209-1218, 1974

McKinley : « The bacteriophage in the treatment of infections », *Archives of Internal Medecine*, 1923.

Merril,C.R., Biswas, B., Carlton, R., Jensen, N.C., Creed, G.J., Zullo, S., et al. : « Longcirculating bacteriophage as antibacterial agents », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 3188–3192, 1996

Michael, J.G et Kuwatch, C.J : « Contribution of endotoxin to antibody formation against T2 phage », *Nature*, 222 :684-685, 1969



- Miedzybrodzki et al : « Clinical aspect of phage therapy », « Advances in Virus Research », Volume 83, Ryszard., 2012
- Miedzybrodzki et al. : « A retrospective analysis of changes in inflammatory markers in patients treated with bacterial viruses », Clin. Exp. Med, 9 :303-312, 2009
- Miedzybrodzki et al. : « Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expansive than antibiotic treatment », Post Med. Hig Dosw, 61:461-465, 2007
- Miedzybrodzki et al. : « Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes », Virus Res., 131 :233-242, 2008
- Morison : « Bacteriophage in cholera », Transactions of the Royal Society of Tropical Medecine London, 1935
- Morison : « Bacteriophage in the treatment and prevention of cholera », 1932
- Nungester, W.J., Watrous, R.M. : « Accumulation of bacteriophage in spleen and liver following its intravenous inoculation », Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 901–905, 1934
- Ochs, H.D., Davis, S.D. et Wedgwood, R.J : « Immunologic responses to bacteriophage phi X 174 in immunodeficiency disease », J. Clin. Invest, 50:2559-2568, 1971
- Otto, Munter : « d'Herreleschen Phänomen », Deutsche Medical, 1921.
- Pherecydes Pharma, Bio-nano technologies innovantes : les bactériophages contre les infections, Start-up Pherecydes Pharma, <http://fr.pherecydespharma.com/>, 2013
- Politzer, R., Cholera. WHO, monograph series, n°43, 1019, 1959
- Pozniak, G., et al. « Bacteriophages provide regulatory signals in mitogeninduced murine splenocyte proliferation », Cellular and Molecular Biology Letters, 8,699–712, 2013
- Przerwa, A., Zimecki, M., Switala-Jelen, K., Dabrowska, K., Krawczyk, E., Luczak, M., Weber-Dabrowska, B., Syper, D., Miedzybrodzki, R., et Gorski, A. : « Effects of bactériophages on free radical production and phagocytic functions », Med. Microbiol. Immunol, 195:143-150, 2006
- Rakieten : « The preservation of a polyvalent staphylococcus bacteriophage », 1932
- Richet, A. et Delarue : « Bulletin de la Société de médecine des hôpitaux de Paris », 1924

Ruffat : « 175 ans d'industrie pharmaceutique française », Histoire de synthélabo, 1996

Sanger. F., Nicklen, S., Coulson, A.R. : « DNA sequencing with chain-terminating inhibitors », Proceedings of the National Academy of Sciences, 74, 5463–5467, 1977

Scott, A.E., Timms, A.R., Connerton, P.L., Carrillo, C.L., Radzum, K.A., Connerton, I.F. : « Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation », PLoS pathogens, 3, 119, 2007

Sénat (2013) : Question sur la phagothérapie, « Question orale sans débat n° 0350S », publiée dans le JO Sénat du 21/02/2013 - page 543 ; Réponse du Ministère chargé des personnes âgées et de l'autonomie publique dans le JO Sénat du 22/05/2013 – page 4294 <http://www.senat.fr/questions/base/2013/qSEQ13020350S.html>

Siringan, P., Connerton, P.L., Payne, R.J., Connerton, I.F. : « Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms », Applied and environmental microbiology, 77, 3320–3326, 2011

Skurnik, M., Strauch, E. : « Phage therapy: facts and fiction », International journal of medical microbiology, 296, 5–14, 2006

Smith, British Medical Journal, 1924

Soni, K.A., Nannapaneni, R., Hagens, S. : « Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100 », Foodborne pathogens and disease, 7, 427–434, 2010

Souriau, Hua, Lefranc et al. : « Présentation à la surface de phages filamenteux : les multiples applications de phage display », 1998

Spence, McKinley : « The therapeutic value of bacteriophage in the treatment of bacillary dysentery », Southern Medical Journal, 1924

Srivastava, A.S., Kaido, T., Carrier, E. : « Immunological factors that affect the *in vivo* fate of T7 phage in the mouse », Journal of virological methods, 115, 99–104, 2004

Stirm, S., Bessler, W., Fehmel, F., Freund-Mölbart, E. : « Bacteriophage particles with endoglycosidase activity », Journal of virology, 8, 343, 1971

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G. : « Bacteriophage therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy », 45, 649–659, 2001

- Sulakvelidze et Kutter : « Phage therapy in humans », « Bacteriophages : Biology and Applications », CRC Press, 381-436, 2005
- Sulakvelidze, A. et Barrow, P. : « Phage therapy in animals and agribusiness », « Bacteriophages. Biology and Applications », CRC Press, 2005
- Suttle : « Marine viruses-major players in the global ecosystem », Nature Reviews Microbiology, 801-812, 2007
- Thingstad, T.F et Lignell, R. : « Theoretical models for the control of bacteria growth rate, abundance, diversity and carbon demand », Aquat. Microb. Ecol., 13:19-27, 1997
- Uchiyama, J., Maeda, Y., Takemura, I., Chess-Williams, R., Wakiguchi, H., Matsuzaki, S. : « Blood kinetics of four intraperitoneally administered therapeutic candidate bacteriophages in healthy and neutropenic mice », Microbiology and immunology, 53, 301–304, 2009
- Weber-Dabrowska, B., Zimecki, M., Mulczyk, M. et Gorski, A. : « Effet of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils », FEMS Immunol. Med. Microbiol, 34:135-138, 2002
- Weber-Dabrowska, B., Mulczyk, M., et Gorski, A. : « Bactériophage therapy of bacterial infections : an update of our institute's experience », Archive of Immunology Therapy Experimental, 48: 547-551, 2000
- Wedgwood, R.J., Ochs, H.D., et Davis, S.D. : « The recognition and classification of immunodeficiency diseases with bacteriophage phi X174 », Birth Defects Orig. Artic Ser., 11:331-338, 1975
- Woese, C. et al. « Towards a natural system of organisms : Proposal for the domain Archaea, Bacteria and Eucarya » extrait des Comptes rendus de l'Académie américaine des Sciences, volume 87 N°12, 1990
- Wright et al. : « A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ; a preliminary report of efficacy », Clin. Otolaryngol., 34:349-357, 2009
- Zimecki, M., Weber-Dabrowska, B., Lusiak-Szelachowska, M., Mulczyk, M., Boratynski, J. et Pozniak, G. : « Bacteriophages provide regulatory signals in mitogeninduce murine splenocyte proliferation », Cellular and Molecular Biology Letters, 8,699–712, 2003

## Résumé :

### TITRE :

Place de la phagothérapie dans le traitement des infections bactériennes humaines : intérêts, enjeux et limites

### RESUME :

Le développement des infections bactériennes multirésistantes, dont les infections nosocomiales, est un véritable enjeu de santé publique et nécessite la mise au point de nouvelles thérapies. Parmi les différents traitements envisagés, la phagothérapie apparaît comme une option intéressante. Il s'agit du traitement des infections bactériennes par des virus, les bactériophages. Découverts au début du XXe siècle, grâce au travail de deux microbiologistes F. d'Herelle et F. Twort, les bactériophages ont rapidement été utilisés en médecine humaine. Cependant, l'arrivée des antibiotiques a brutalement réduit leur utilisation en Occident.

Depuis peu, les bactériophages suscitent à nouveau un vif intérêt. En effet, ils ont la particularité d'infecter les cellules procaryotes (bactéries), tout en étant inoffensifs pour les cellules humaines, animales ou végétales. De plus, ce sont des virus sélectifs d'une espèce bactérienne, voire de certaines souches bactériennes. Il n'y a donc pas de répercussions sur la flore commensale non pathogène, à l'origine de certains des effets indésirables des antibiotiques à large spectre. Leur méthode d'obtention est connue et simple à mettre en pratique. Elle fait intervenir la propagation, la purification, la numération puis le contrôle.

La connaissance plus approfondie de ces virus permet de mettre en évidence qu'ils ne sont pas tous de bons candidats à la phagothérapie. Seuls les phages lytiques présentent un intérêt en thérapie phagique. Une étude très complète, menée par l'Institut de Thérapie Expérimental Ludwik Hirsfeld, permet d'avoir un large aperçu des possibilités thérapeutiques et des effets indésirables potentiels de la phagothérapie. Certaines limites pourraient se présenter : la résistance bactérienne aux phages, ainsi que le rôle du système immunitaire. Enfin, il s'agira de s'intéresser au statut réglementaire des phages et à leurs perspectives industrielles.

DISCIPLINE : Sciences pharmaceutiques

### MOTS CLES :

Phagothérapie – Bactériophages – Felix d'Hérelle - Cycles productifs – Cycles lysogéniques – Applications thérapeutiques – Sécurité phagique – Immunologie phagique

### INTUTILE ET ADRESSE DE L'UFR :

U.F.R des sciences pharmaceutiques, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat,  
33076 Bordeaux Cedex

TITRE EN ANGLAIS :

Phage therapy in the treatment of human bacterial infections : interests, issues and limitations

The arising of multidrug-resistant bacterial infections, including nosocomial infections, is a major public health issue and requires the development of new therapies. Among the various possible treatments, phage therapy appears to be an attractive option. This is the treatment of bacterial infections by viruses: bacteriophages. Discovered in the early twentieth century through the work of two microbiologists F. d'Herelle and F. Twort, bacteriophages were quickly used in human medicine. The advent of antibiotics abruptly reduced their use in the West.

Yet recently they are again attracting research. Their interest resides in the fact that they have the capacity to infect prokaryotic cells (bacteria), while being harmless to human, animal or plant cells. Moreover they are selective viruses of a bacterial species or even of bacterial strains. As such, there is no impact in non-pathogenic commensal flora, which often causes the adverse effects of broad-spectrum antibiotics. Their method of production is known and easy to implement. It involves the propagation, purification, count and control.

The deeper understanding of these viruses can highlight that they are not all valid candidates to phage therapy: only lytic phages are of therapeutical value. A comprehensive study by the Institute for Experimental Therapy Ludwik Hirszfeld, grants a large overview of treatment options and potential adverse effects of the phage therapy. Some limits may arise: notably bacterial resistance to phages and the role of the immune system. Finally, we should study the regulatory status of phages and their industrial perspectives.