



HAL
open science

La phagothérapie : une solution thérapeutique “ alternative ” voire “ complémentaire ” aux problèmes des résistances bactériennes

Sophia Marbough

► **To cite this version:**

Sophia Marbough. La phagothérapie : une solution thérapeutique “ alternative ” voire “ complémentaire ” aux problèmes des résistances bactériennes. Sciences pharmaceutiques. 2016. dumas-01377303

HAL Id: dumas-01377303

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01377303>

Submitted on 6 Oct 2016

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 2016

Thèse n° 106

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par **Sophia MARBOUH**

Née le 5 novembre 1988 à Neuilly sur Seine

Le 21 septembre 2016 à Bordeaux

**LA PHAGOTHERAPIE : UNE SOLUTION THERAPEUTIQUE
« ALTERNATIVE » VOIRE « COMPLEMENTAIRE » AUX
PROBLEMES DES RESISTANCES BACTERIENNES**

Directeur de thèse

Professeur Hervé Fleury

Jury

Pr V. DUBOIS, Professeur des Universités-PH
Pr H FLEURY, Professeur des Universités-PH
Dr S. IMMÉR, Docteur en Pharmacie

Président
Membre
Membre

Remerciements

La rédaction de la thèse est un travail solitaire mais il ne serait pas réalisable sans le soutien d'un grand nombre de personnes :

En premier lieu, je tiens à remercier vivement les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail :

Au Professeur Hervé Fleury.

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger ma thèse. Pour la confiance qu'il m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail et pour son aide dans l'élaboration de cette thèse.

Sincères remerciements

Au Docteur Véronique Dubois.

Pour m'avoir fait l'honneur d'avoir accepté de présider le jury.

Sincères remerciements

Au Docteur Sabine Immer

Pour m'avoir fait l'honneur de participer à mon jury. Pour avoir eu le courage et la ténacité de me supporter pendant six mois pour mon stage de fin d'étude. J'en garderai un souvenir impérissable d'une très belle expérience et pour cela je vous en remercie.

Votre stagiaire, sincères remerciements

J'aimerai ensuite remercier chaleureusement le Docteur Michel Galiay pour sa relecture enrichissante, pour sa grande disponibilité et ses nombreux conseils.

Sincères remerciements

Les prochains remerciements vont à ma famille.

A ma mère Irène qui s'est armée de courage, qui a relu consciencieusement et décortiqué ma thèse dont le sujet lui était inconnu.

A mon père Alban et son ami d'enfance Jean de Los Frailes pour toute l'aide qu'ils ont pu m'apporter !

A mes deux sœurs Camille et Anne-Nour.

A ma tante Sylvie et mes oncles Alexandre et Aissa

Je les remercie pour leur soutien quotidien et leur enthousiasme à l'égard de mes recherches, leur regard m'a été d'une grande aide pour expliciter et affiner mes propos.

Ces remerciements familiaux s'achèvent pour ceux qui n'ont pas vu l'aboutissement de mes études mais qui s'en nul doute auraient été fiers, ma grand mère Hanna et mon grand père Marcel.

A mes amis qui ont traversé ces années d'études avec moi et qui m'ont supportée, Marine, Alexandre, Julien, Guillaume et tous les autres !

Je dédie cette thèse à mes parents

Table des matières

I. Introduction	14
II. De la découverte du bactériophage à la naissance de la phagothérapie	16
1. Définition	17
a. Bactériophage	17
b. La phagothérapie.....	17
c. La phagoprophylaxie.....	17
2. Les prémisses de la phagothérapie	17
a. Ernest Hanbery Hankin	17
b. Nikolay Gamaleya.....	19
c. Frederick Twort	19
3. Les Travaux de Félix d'Hérelle.....	21
a. La lutte contre les sauterelles.....	21
b. La dysenterie bacillaire : le premier isolement de phage.....	22
c. La première application de phage « in vivo » chez les animaux.....	23
i. La typhoïde aviaire.....	23
ii. Le Barbone.....	24
d. La première application de phage in vivo chez l'homme : « le premier essai clinique ».....	25
4. De l'essor de la phagothérapie au déclin.....	26
a. Période d'enthousiasme généralisée pour la phagothérapie.....	26
b. Le débat houleux sur la nature du bactériophage	27
i. L'hypothèse d'Alessandro Taurelli SALIMBENI : le « Myxomyces shigaphagus ».....	27
ii. L'hypothèse de Tamézo KABESHIMA : le « Ferment d'immunité bactériolysant ».....	27
iii. L'hypothèse de Bordet et Ciuca.....	28
iv. L'hypothèse de Bail	28
c. La commercialisation des phages à usages thérapeutiques.....	29
d. Les premières images de bactériophages.....	31
5. Du concept d'antibiose à la découverte des antibiotiques.....	33
a. Notion d'antibiose.....	33
i. Définition	33
ii. Histoire.....	33
b. La découverte des antibiotiques.....	34
6. Du déclin jusqu'au regain de la phagothérapie	35
a. L'institut Eliava.....	35
b. L'agro-alimentaire	36
c. Le regain de la phagothérapie.....	37

III. Description des bactériophages.....	39
1. Définition du virus.....	40
2. Le monde du vivant	40
a. La classification du monde vivant.....	40
b. La place des virus dans le monde du vivant	42
c. Habitat	43
3. Structure et classification.....	44
a. Structure des phages	44
b. Classification des phages.....	45
i. L'ordre des Caudovirales [67] [78].....	47
ii. L'ordre des Ligamenvirales [67] [78].....	48
iii. Phage à symétrie cubique : [67] [78].....	49
iv. Phage pléomorphe (ou phage à symétrie complexe) [67] [78]	50
i. Phage à symétrie hélicoïdale (ou phage filamenteux) [67].....	51
4. Les types d'invasions du bactériophage	52
a. Les cycles de reproduction	52
b. L'architecture globale du phage T4.....	54
c. Le cycle lytique = phage lytique	55
i. Adsorption [70] [79].....	55
ii. Transcription [70] [79] [80]	56
iii. Réplication [70] [79] [80].....	57
iv. L'assemblage des particules de phages [70] [79] [81]	59
v. La libération des phages [70] [79].....	59
d. Cycle lysogénique = phage tempéré [70] [79]	61
5. La pharmacologie.....	61
a. La pharmacocinétique.....	61
i. Absorption	62
ii. La distribution [83] [84].....	63
iii. Métabolisation [83] [84].....	63
iv. Elimination [83] [84]	64
b. Pharmacodynamique.....	65
i. « Seuil de répllication » ou « seuil de prolifération »	65
ii. Interaction avec le système immunitaire	66
IV. La phagothérapie aujourd'hui.....	70
1. Résistances bactériennes.....	71
a. Définition BMR	71
i. Epidémiologie BMR [60]	73
b. Les plans d'actions contre les résistances bactériennes.....	74
c. La consommation des antibiotiques en France :.....	74
i. Définitions :	74
ii. La consommation des antibiotiques en ville.....	75
iii. La consommation des antibiotiques dans les établissements de santé	76
iv. L'évolution des résistances bactériennes depuis 10 ans.....	77

2. Les avantages de la Phagothérapie:	79
a. La spécificité des phages :.....	79
b. L'action bactéricide.....	79
c. Destruction du biofilm bactérien.....	79
i. Qu'est ce qu'un biofilm	79
ii. Etapes de formation d'un biofilm [109].....	81
iii. Destruction du biofilm par les bactériophages :.....	81
d. Le coût :	83
3. Les limites	83
a. Liés au cycle d'infection du bactériophage :.....	83
b. Liés à la spécificité :	83
c. Liés à la pharmacologie et pharmacodynamique des phages.	83
d. Les résistances aux bactériophages = système anti-phage.....	84
i. Inhibition de l'adsorption :	84
ii. Bloquer l'injection du génome viral.....	85
iii. Coupure des acides nucléiques exogènes.	85
iv. Le système d'avortement de l'infection (Abi)	87
e. Effets secondaires des phages :.....	88
i. Au phage lui-même :	88
ii. Aux impuretés de la suspension phagique :.....	88
iii. Aux débris de la lyse bactérienne :	89
4. Préparation des suspensions phagiques à usage thérapeutique	90
a. Où trouver des bactériophages :.....	90
b. La préparation des suspensions phagiques à usage thérapeutique	90
i. La propagation :	90
ii. La purification :	91
iii. La numérotation :	91
iv. Les contrôles	91
c. Mode d'emploi des bactériophages.....	92
d. Galénique des bactériophages.....	93
5. Les perspectives thérapeutiques	93
a. Les essais cliniques.....	93
b. Bactériophages et antibiotiques : une association gagnante.....	96
i. Le phénomène « Phage-Antibiotic Synergy » (=PAS) :.....	96
ii. Mise en évidence in vitro de l'effet synergique [135]	97
iii. Intérêts.....	98
c. La guérison naturelle dirigée [127] [128]	98
d. Phagoprophylaxie.....	100
6. Cadre réglementaire	101
a. Situation actuelle [130] [131] [75].....	101
i. Les biomédicaments.....	101
ii. Le financement.....	102
V. Conclusion	103
VI. Bibliographie	105

Table des Illustrations

Figure 1 : Photographie de portrait de la Cambridge Antiquarian Society prise autour de 1900.....	18
Figure 2 : Photographie de Frederick William Twort.....	20
Figure 3 : Portrait de Félix d'Hérelle	26
Figure 4 : Annonce for phage preparations from Laboratoire du bactériophage in Paris. France, 1936. Photograph from Dr William Summers'archive	30
Figure 5 : Observation au ME x 15 000 Bactériophages concentrés autour de la bactérie,.....	32
Figure 6 : Observation au ME x 14 000. Bactériophages autour d'une bactérie vaguement délimitée. Il y a destruction de la membrane bactérienne avec sortie du contenu du cytoplasme de la bactérie.....	32
Figure 7 : Observation au ME x 14 000 : Lyse totale de la bactérie	32
Figure 8 : Chronologie de la découverte des antibiotiques et date d'identification de souches résistantes correspondantes (extrait du livre « microbiologie » édition Dunod	34
Figure 9 : Phylogénie extraite du Generelle Morphologie (Haeckel 1866).....	41
Figure 10 : Arbre phylogénétique du monde vivant d'après Woese et al. (1990).....	42
Figure 11 : Classification du monde viral tel qu'il était compris en 1969	45
Figure 12 : Basic morphological types of bacteriophages	46
Figure 13 : Basic morphological groups of bacteriophages with types of nucleic acid	46
Figure 14 : Représentation schématique des 3 familles de bactériophages composant l'ordre des Caudovirales. c = Capside, f=fibre de queue, q=queue, pb=plateforme basales, ep = fibres secondaire	48
Figure 15 : Schémas des différents cycles infectieux des bactériophages.	53
Figure 16 : D'après (Biologie marine, 2006). Le bactériophage T4.....	54
Figure 17 : adsorption et injection de l'ADN du phage T4	56
Figure 18 : Formation de concaténats pendant la réplication du génome T4	58
Figure 19 : Etape du développement intracellulaire. Modèle du bactériophage T4	60
Figure 20 : Cycle lytique du bactériophage T4	60
Figure 21 : Différence entre la pharmacocinétique d'un médicament classique et d'un phage	64
Figure 22 : Concept : « Kill the winner »	65
Figure 23 : « The Janus-Face of phages ».	68

Figure 24 : Tableau indiquant l'année d'introduction des antibiotiques sur le marché et l'année d'apparition des premières résistances	71
Figure 25 : Répartition des BMR en 2015.....	72
Figure 26 : Evolution de la consommation globale d'antibiotiques en secteur de ville France, 2004-2014.....	75
Figure 27 : Evolution de la consommation globale d'antibiotiques dans les établissements de santé.	76
Figure 28 : Evolution de la résistance à la méticilline chez le staphylococcus aureus, et aux céphalosporines de 3 ^{ème} génération chez Klebsiella pneumoniae et Escherichia coli, 2004-2014, données EARS-Net France-InVS	77
Figure 29 : Évolution de l'incidence des SARM et EBLSE par secteur d'activité hospitalière, France, 2010-2014, données BMR- Raisin – InVS	77
Figure 30 : Résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque en France. 2004-2014, données EARS-Net France CNRP-ONERBA. INVS	78
Figure 31 : Développement et structure d'un biofilm bactérien.	80
Figure 32 : Schéma de la dégradation du biofilm bactérien par une enzyme dépolymérase phagique (la glycanase).	82
Figure 33 : Comment le système CRISPR/Cas9 protège la bactérie.	86
Figure 34 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques » (PAS) avec le phage Φ MFP sur Escherichia coli MFP.....	96
Figure 35 : Protocole des traitements simples (traitement par les phages uniquement ou traitement par l'antibiotique uniquement) et traitement combiné (phage et antibiotique).	97
Figure 36 : Densité bactérienne après 70h.....	97
Figure 37 : Mise en évidence de la présence des anticorps anti-phage	99

Liste des abréviations

A

Abi = abortif infection system
A.B.M.R = Acinetobacter baumannii multirésistants
ADN = Acide DésoxyriboNucléique
A.N.S.E.S = Agence nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
A.M.A = American Medical Association
A.M.M = Autorisation de Mise sur le Marché
ARN = acide ribonucléique
ARNm = ARN messenger
ARNr = ARN ribosomique
A.T.U = Autorisation Temporaire d'Utilisation

B

B.H.R.e = Bactéries Hautement Résistantes Emergentes
B.P.F = Bonnes Pratiques de Fabrication
B.M.R = Bactérie Multi Résistante

C

C.A.S = centre d'analyse stratégique
Cas = CRISPR associées
C.E.S = Comité d'Experts Spécialisé
CRISPR = Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. (Courtes Répétitions palindromiques groupées et régulièrement inter espacées)

D

D.D.J = Doses Définies Journalières

E

E.B.L.S.E = Enterobactérie productrice de betalactamase
E.F.S.A= European Food Safety Authority
E.M.A = European Medicines Agency
E.P.C = entérobactéries productrices de carbapénémase
E.P.S = Extracellular Polymeric Substance
E.R.G = Entérocoques Résistants aux Glycopeptides
E.R.O = Espèces Réactives de l'Oxygène
E.R.V = Entérocoque résistant à la vancomycine
ESAC-NET = European Center for Disease Prevention and Control

F

F.D.A = Food and Drug Administration

G

GMP = Good Manufacturing Practice
G.R.A.S = Generally Recognized as safe

H

Hoc = Highly immunogenic outer capsid »

I

I.C.T.V = International Committee on Taxonomy of Virus

InVS = Institut de Veille Sanitaire

I.O.A = Infection Ostéoarticulaire

J

J.A.M.A = Journal of the American Medical Association

L

L.H.T = le système Lwoff, Horne et Tournier

L.P.S = Lipopolysaccharide

L.T.F = Long Tail Fibers

L.U.C.A = Last Universal Common Ancestor

M

M.C.P = Major Capsid protéine.

O

O.N.E.R.B.A = Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques

O.M.S = Organisation Mondiale de la Santé

P

P.A.M = Protospacer motif adjacent

P.A.S = Synergie Phages-Antibiotiques

P.A.M.P = Patterns Pathogen Associated Molecular

P.A.M.R = Pseudomonas aeruginosa multirésistants

PFU = Plages Formant Unité

P.S.D.P = Pneumocoque à sensibilité diminuée à la pénicilline

Q

Q.S = Quorum Sensing

S

S.A.R.M = Staphylococcus aureus résistant à la méticilline

Soc = Small outer capsid

S.T.F = Side Tail Fibers

T

T.A = Toxine-Antitoxine

T.L.R = Toll Like Receptor

I. Introduction

L'antibiorésistance pousse la recherche à aller plus loin, à trouver de nouvelles voies pour combattre des ennemis devenus de plus en plus résistants. En effet, l'âge d'or des antibiotiques a sonné le glas. Fort de leur succès dans le milieu du XX^{ème} siècle, ils ont constitué une des grandes découvertes majeures et ont permis de faire considérablement diminuer la mortalité. On pensait avoir trouvé la solution définitive aux infections bactériennes, cependant leurs utilisations massives en santé humaine et animale ont favorisé l'émergence de bactéries multirésistantes.

L'incessante augmentation des résistances bactériennes et la rareté de nouveaux antibiotiques sont à l'origine d'échecs thérapeutiques conduisant dans certaines situations à des impasses. Cette situation fait craindre à une « ère post antibiotique » et devient de plus en plus préoccupante. Ainsi la recherche de solutions alternatives devient une nécessité.

Une des solutions consiste en une ancienne thérapeutique utilisée au début du XX^{ème} siècle mais abandonnée dans l'Ouest après la découverte des antibiotiques : La Phagothérapie. Découverte il y a presque 100 ans, elle utilise des virus de bactéries, appelés bactériophages, prédateurs naturels des bactéries.

La phagothérapie serait-elle l'une des réponses aux bactéries multirésistantes ? Ne dit-on pas que les ennemis (virus) de mes ennemis (bactéries) sont mes amis.

Nous verrons à travers cette thèse l'histoire tumultueuse de la phagothérapie, de l'introspection des bactériophages aux potentiels offerts par cette thérapeutique.

II. De la découverte du bactériophage à la naissance de la phagothérapie

L'histoire du bactériophage est semée de conflits, d'interprétations et de compréhensions erronées. Il lui aura fallu parcourir un long chemin sinueux pour arriver à se faire une place dans le monde scientifique. Si aujourd'hui, la découverte du bactériophage est attribuée conjointement à Frederick Twort et à Félix d'Hérelle, il n'en fut pas toujours le cas. Ces deux chercheurs ont découvert indépendamment la « substance » capable de détruire les bactéries mais leurs interprétations furent différentes. Cependant, il est indéniable que l'invention de la phagothérapie revient à Felix d'Hérelle.

1. Définition

a. Bactériophage

Un bactériophage, appelé aussi phage, est un virus ayant pour hôte les bactéries. Le mot bactériophage est formé des mots grec *baktêria* (= bâton, à cause de la forme des premières bactéries observées) et de *phagos* (=mangeur), signifiant littéralement : mangeur de bactéries.

b. La phagothérapie

La phagothérapie est l'utilisation de bactériophages lytiques pour traiter des maladies infectieuses d'origine bactérienne. Le mot phagothérapie est formé des mots grecs *phagos* et *therapeia* (= cure).

c. La phagoprophylaxie

En médecine, une prophylaxie désigne tout processus prévenant l'apparition ou la propagation d'une maladie. Donc la phagoprophylaxie est l'utilisation des bactériophages lytiques pour prévenir les maladies bactériennes.

2. Les prémisses de la phagothérapie

a. Ernest Hanbery Hankin

Le bactériologiste britannique Ernest Hanbery Hankin fut le premier à faire allusion à l'existence des virus infectant les bactéries. En 1896, il publia, dans *les annales de l'Institut Pasteur* un article intitulé : « L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du choléra » [1]. Cet article est le premier témoignage scientifique de l'existence des phages dans lequel il essaie d'expliquer un phénomène surprenant se déroulant dans les rivières d'Inde. Il décrit ainsi : « Comment se fait-il que lorsque le choléra éclate sur un lieu de pèlerinage placé sur les rives d'un des fleuves, il ne descend pas dans les villages placés en aval ? » [1]

Suite à cette observation, Ernest Hanbery Hankin se consacra à une série d'expériences, et notamment une, qui consistera à mesurer le nombre d'unités de

bactéries *Vibrio cholerae* par millimètre cube dans la rivière de la Jumna. Ce travail l'amènera à découvrir « le pouvoir auto purificateur » de la rivière, en constatant une diminution importante du nombre d'unités du *Vibrio cholerae* entre l'eau à la sortie de la ville et celle localisée en aval de cette même ville.

« Pendant les chaleurs (11 avril), la rivière étant très basse [...] le nombre des microbes dans l'eau prise au- dessous de la ville dépassait toujours 100 000 par c.c et n'a pu être évalué exactement. Mais, à trois milles plus bas » (soit environ 4,827 km), « il n'y avait plus que 90 à 100, et que 26 à 80 à 12 milles et demi de la ville. » (soit environ 20,113 km) » [1]

Malgré cette découverte, Ernest Hanbrey Hankin n'a pas su identifier la nature et l'origine de la substance au « pouvoir antiseptique ». Cependant, il observera que la substance en question était thermolabile (l'eau bouillie n'avait plus d'action sur le cholera). De plus, toutes ses expériences ont été réalisées sur des échantillons d'eau de la Jumna et du Gange qui avaient été préalablement filtrés par un filtre Pasteur (appelé aussi filtre de « Chamberland » ou bien encore filtre de porcelaine) qui a la propriété de retenir les bactéries. Il conclura que cette substance était plus petite qu'une bactérie sans pour autant le prouver. Il faudra attendre l'avènement du microscope électronique pour pouvoir l'observer.

Ernest Hanbrey Hankin en mettant en évidence « l'action antiseptique » de l'eau de la Jumna, vient de réaliser, sans le savoir, la première observation d'un type de virus qui s'attaque uniquement aux bactéries.



Figure 1 : Photographie de portrait de la Cambridge Antiquarian Society prise autour de 1900

b. Nikolay Gamaleya

Il faudra attendre deux ans plus tard pour qu'un microbiologiste russe, Nikolay Gamaleya, observe un phénomène similaire en travaillant sur la bactérie *Bacillus anthracis*. De ses observations, il publiera l'article suivant « Bacteriolysins-ferments destroying bacteria » dans le *Russian archives of the pathological and clinical medicine*. Il y mentionnera un agent lytique transmissible, spécifiquement actif contre la bactérie *Bacillus anthracis* [2][3]. D'autres descriptions de bactériophages infectant le *Bacillus anthracis* furent rapportées plus tard par Philip B Cowles en 1931 [4] et par Elionor W McCloy en 1951 [5]

c. Frederick Twort

D'autres observations de bactériophages furent encore décrites. Notamment avec le microbiologiste anglais Frederick Twort avec sa publication en 1915 dans le *Lancet* : « An investigation on the nature of ultra microscopic viruses » [6]. Partant du constat que pour les bactéries pathogènes, on retrouvait dans la nature des variétés de bactéries non pathogènes de même genre, la règle devait aussi s'appliquer aux virus. Twort entreprit ainsi plusieurs expériences dans ce but.

Mais ses expériences n'aboutirent à aucune conclusion déterminante quand à l'isolement de virus non pathogène. Cependant, il observa en travaillant sur le virus de la vaccine (variole de vache) des résultats intéressants. En examinant les cultures de vaccine, il remarqua que les milieux étaient contaminés par une bactérie. Il observa la présence de colonies de *Micrococcus*. Certaines de ces colonies présentaient des altérations morphologiques. Ces colonies devenaient vitreuses et transparentes.

« In cultures that grew micrococci it was found that some of these colonies could not be subcultured, but if kept they became glassy and transparent » [6]

En observant ces zones au microscope, il observa que ces colonies vitreuses avaient été transformées en petites « granules ». Ces zones étaient le reflet de la destruction des cellules bactériennes. De plus, lorsqu'il mettait ces colonies vitreuses et transparentes au contact de colonies pures de *Micrococcus*, il remarqua que ces dernières subissaient le même sort, c'est-à-dire, leurs destructions.

Cependant Frederick Twort ne put apporter plus d'informations sur la nature de la substance à l'origine de la lyse bactérienne car invisible, mais il formula plusieurs hypothèses quant à son origine. Il évoqua soit une minuscule bactérie (« minute bacterium ») soit une petite amibe (« tiny amoeba ») soit un virus microscopique (« ultra-microscopic virus ») ou bien encore une enzyme.

Parmi ses diverses interprétations et au travers de ses expériences menées sur la vaccine, il conclura que la substance transparente devait vraisemblablement contenir une enzyme, car elle était détruite à 60°C. Quant à l'origine de l'enzyme, il lui sembla plus plausible que cette dernière devait être produite par le *micrococcus* lui-même, conduisant ainsi à sa propre mort. Pour lui, le phénomène était de nature diastatique.

« In the vaccinia experiments described above it is clear that the transparent material contains an enzyme, and it is destroyed at 60° C. (...) it may be that the micrococcus was never quite free from the transparent portion, or this may have passed through the cotton-wool plug and contaminated the micrococcus, but it seems much more probable that the material was produced by the micrococcus. » [6]

Il faudra attendre que le franco-canadien Felix d'Hérelle fasse une étude plus approfondie et isole les premiers bactériophages pour découvrir la nature virale de la substance.



Figure 2: Photographie de Frederick William Twort

3. Les Travaux de Félix d'Hérelle

a. La lutte contre les sauterelles

De tout temps, les sauterelles ont été considérées comme un véritable fléau. Leurs passages dévastateurs dans les régions agricoles occasionnaient famines et épidémies. A l'époque contemporaine de d'Hérelle, le problème des acridiens migrants subsistait toujours malgré la mise en place de moyens de lutte. Le premier moyen vraiment efficace contre ce fléau fut sans nul doute « l'appareil cypriste » qui offrait une défense mécanique mais ne permettait pas une destruction de ces dernières. D'autres techniques très diverses furent mises en place mais sans résultats probants et sans pour autant empêcher les invasions les années suivantes.

C'est en 1910, au cours d'un séjour au Mexique, que Felix d'Hérelle observa de manière fortuite un moyen de lutte efficace contre les sauterelles. En travaillant sur ces insectes, il remarqua que certaines populations étaient atteintes d'une diarrhée contagieuse et mortelle. D'Hérelle isola l'agent à l'origine de la « diarrhée des sauterelles » dans les selles des insectes malades. Cet agent, était d'origine microbienne : le coccobacille (« *Coccobacillus acridiorum* » connue sous le nom aujourd'hui d'*Enterobacter aerogenes*) [7]

Felix d'Hérelle, au vu de ses recherches, y voyait un procédé biologique pour lutter contre l'invasion de ces dernières. Cette épizootie d'origine bactérienne provoquait chez les acridiens une mortalité considérable et se propageait rapidement. Cette épizootie ne permettait pas l'extinction de l'espèce mais réduisait grandement le nombre d'envahisseurs au point que les préjudices agricoles occasionnés fussent négligeables.

Ces résultats enthousiasmèrent la République Argentine qui mandata d'Hérelle afin de propager cette épizootie pour lutter contre le fléau qui sévissait dans le pays. Pour mener à bien ses expériences, il infesta quelques mètres de champs agricoles par des bouillons de culture contenant le coccobacille. Ainsi, les sauterelles s'empoisonnèrent en mangeant l'herbe contaminée, la dissémination du coccobacille étant assurée par les déjections des sauterelles lors de leur déplacement. La technique fut radicale. [8]

Durant les années qui suivirent, d'Hérelle voyagea à travers le monde afin de diffuser cette épizootie dans les pays où le fléau des sauterelles sévissait. Mais cette découverte en cacha une autre. C'est au cours de ses recherches, qu'il observa à plusieurs reprises des anomalies sur certaines cultures de coccobacilles. Il écrira en 1949:

« The anomaly consisted of clear spots, quite circular, two or three millimetres in diameter, speckling the cultures grown on agar. I scratched the surface of the agar in these transparent patches, and made slides for the microscope; there was nothing to be seen. I concludes from this and other experiments that the something which caused the formaton of the clear spots must be so small as to be filtable, that is to say, able to pass a porcelain filter of the Chamberland type, which will hold back all bacteria » [9]

Pour d'Hérelle, ces « taches claires » étaient dues à « quelque chose » qui ne pouvait être vu au microscope et qui était filtrable. Il faudra attendre 1915, lors de ses travaux en Tunisie, pour que l'hypothèse de virus soit émise. C'est en travaillant encore sur les sauterelles, qu'il observa de nouveau au sein des cultures de coccobacilles des « taches claires ». Il fit part de ces anomalies à Charles Nicolle, directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, qui au vu de ces observations lui dira : « that may be the sign of a filtrable virus carried by your coccobacilli, a filtrable virus which is the true pathogenic agent, while the coccobacillus is only a contaminant » [10]

La nature de la substance était posée : c'était vraisemblablement un Virus

b. La dysenterie bacillaire : le premier isolement de phage

De retour en France, travaillant sur des cultures de shigelle responsables de la dysenterie bacillaire qui sévissaient sur un escadron de cavalerie, d'Hérelle mit en évidence le même phénomène de « taches claires » mais cette fois-ci sur des bactéries pathogènes pour l'Homme.

Ces recherches aboutirent à une note présentée à l'académie des Sciences en 1917 : « sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques » [11]. C'est dans celle-ci qu'il mentionne l'isolement des premiers « microbes filtrants bactériophages » à partir de selles de patients convalescents de dysenterie bacillaire. Pour lui, c'est un « microbe antagoniste invisible » auquel il donnera le nom de « bactériophage ».

Dans cette note, il évoquera les principales caractéristiques du virus. Entre autres, que cet agent est filtrable, non visible au microscope optique, capable d'inhiber la croissance bactérienne, cultivable et pour finir transmissible de culture de shigelle en culture de shigelle. A partir de là, il ne fera plus de doute pour d'Hérelle que c'est un « germe vivant ».

Il mentionnera aussi un fait marquant, ce germe vivant ne peut se développer qu'aux dépens de la bactérie : «En l'absence de bacilles dysentériques le microbe anti ne cultive dans aucun milieu [...] Il résulte de ces faits que le microbe antidysentérique est un bactériophage obligatoire » [11]

En ce qui concerne la morphologie et le mode de reproduction de ce microbe, l'observation n'étant pas permise avec les techniques contemporaines de d'Hérelle, celui-ci, n'émit aucune hypothèse. Quant au genre, d'Hérelle le dénommera « *Bacteriophagum intestinale*, qui rappelle sa propriété principale » [12]. En effet ce germe était trouvé dans l'intestin des malades dysentériques. Pour lui, il pensait qu'il ne s'agissait que d'un seul et unique microbe, tout en précisant n'avoir jamais isolé deux bactériophages identiques, car ce dernier « était susceptible par accoutumance d'acquérir la virulence vis a vis des diverses espèces bactériennes » [13]. Cette affirmation est aujourd'hui inexacte. En effet on dénombre des milliers de bactériophages différents par leurs morphologies et leurs spécificités. D'Hérelle parle d'accoutumance, cela semble surtout dû au fait que ces filtrats devaient contenir non pas une espèce de phage mais plusieurs variétés de phages.

Il terminera son article par cette conclusion : « En résumé, chez certains convalescents de dysenterie, j'ai constaté que la disparition du bacille dysentérique coïncidait avec l'apparition d'un microbe invisible doué de propriétés antagonistes vis-à-vis du bacille pathogène. Ce microbe, véritable microbe d'immunité, est un bactériophage obligatoire ; son parasitisme est strictement spécifique (...) Il est probable que ce phénomène n'est pas spécial à la dysenterie » [11]

D'Hérelle voit dans ces bactériophages un moyen thérapeutique révolutionnaire contre la lutte des maladies infectieuses. C'est dans cette optique qu'il approfondit ses recherches sur le mode d'action du microbe bactériophage contre la dysenterie bacillaire. Ceci aboutit à une note présentée à l'Académie des Sciences en 1918 dans laquelle il rapporte 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 » et il finit par « proposer comme traitement de la dysenterie bacillaire l'administration, dès l'apparition des premiers symptômes, de cultures actives du microbe bactériophage » [14]

Il étudiera aussi les selles de patients atteints de la fièvre typhoïde et il en viendra à la même conclusion : « la coïncidence constante de l'apparition de ce pouvoir antagoniste avec le début de la guérison, il est difficile de ne pas y voir une relation de cause à effet » [15]

L'étude de la typhoïde et de la dysenterie chez l'homme permit à d'Hérelle d'établir le rôle du bactériophage au cours de la maladie. Il y voit une thérapeutique antibactérienne révolutionnaire. En effet, au début du XX^{ème} siècle, les infections bactériennes étaient nombreuses et l'issue souvent fatale. D'autre part, l'absence de moyen de lutte efficace contre les bactéries lors de la Première Guerre Mondiale exacerbera cette situation. Ce nouveau moyen thérapeutique mena d'Hérelle à vérifier ses expériences chez l'animal afin de confirmer ses observations.

c. La première application de phage « in vivo » chez les animaux

i. La typhoïde aviaire

En 1919, une épidémie mortelle touchait principalement les gallinacées en France. Il s'agissait d'une maladie importée des Etats-Unis et connue sous le nom de « fowl typhoid » et dénommée en France sous le terme de « typhose aviaire ». Cette maladie est due à une bactérie nommée « *Bacterium sanguinarium* » [16]. En étudiant les selles des poules infectées, il remarqua les mêmes faits similaires qu'il avait observés lors des cas de dysenteries ou de typhoïdes humaines, à savoir la lutte entre une bactérie et un microbe bactériophage. Il démontra ainsi qu'il s'agissait d'un phénomène d'ordre général.

Au cours de cette étude, il observa qu'au même titre qu'une poule infestée propage la maladie via ses déjections, une poule infestée au départ mais devenue convalescente

grâce à l'acquisition d'un bactériophage, répand ce dernier à l'ensemble du poulailler via aussi ses déjections, et permet ainsi de diminuer l'épidémie jusqu'à l'étouffer. Il affirma ainsi à partir de ses recherches que « l'immunité est contagieuse au même titre que la maladie elle-même. » [17]

Dans cette optique, pour apporter une preuve scientifique de l'immunisation, il entreprit des expériences *in vivo* chez les animaux en les immunisant par l'administration de culture de bactériophage actif contre le germe responsable de la maladie. Sa première expérience *in vivo* fut faite sur des poules en milieu épizootique afin de les immuniser contre la typhose aviaire. Les expériences furent menées sur vingt-cinq poulaillers. L'injection du bactériophage « anti-gallinarum » entraîna le rétablissement des poules atteintes de la typhoïde aviaire. Pour les poules saines, elles furent immunisées et l'épizootie sévissant dans chaque poulailler fut enrayée. [18] C'est le début de la phagothérapie.

ii. Le Barbone

Ces premières expériences sur les animaux furent complétées par d'autres et notamment par l'étude de « le Barbone », maladie touchant les bovins et les buffles domestiques. Mais cette fois-ci, les expériences furent menées sur des animaux sains, c'est à dire en milieu non épizootique. C'est en travaillant sur la septicémie hémorragique du buffle (le Barbone) due à une bactérie du genre *pasteurella*, que d'Hérelle explique le phénomène d'immunisation en mettant en évidence que l'injection de culture du bactériophage confère à l'animal deux sortes d'immunité :

- 1- « l'immunité hétérologue »
- 2- « l'immunité homologue »

Pour comprendre le principe immunisant de d'Hérelle, il faut déjà mentionner ce que contient une culture de bactériophage. Pour d'Hérelle une culture de bactériophage renferme : « 1° des ultra-microbes bactériophages

2° des substances solubles contenues dans le milieu de culture, substances solubles provenant des corps des bactéries aux dépens desquelles se sont développés les ultra-microbes, puis les lysines sécrétées par ces ultra-microbes et qui restent dans le milieu une fois la lyse terminée ; enfin éventuellement, des anti-lysines de défense sécrétées par les bactéries » [19]

Il remarque qu'en injectant une culture de bactériophage contre le Barbone chez un animal sain, c'est à dire exempt de la bactérie pathogène du genre *pasteurella*, le bactériophage s'élimine rapidement (en un ou deux jours). En effet, en l'absence de bactéries, le phage ne peut se multiplier. Ainsi l'animal perd son immunité et redevient sensible à la maladie. Cependant, il reste sensible jusqu'à la mise en place de sa propre immunité qui se développe sous l'influence des substances solubles qui étaient présents dans la culture de bactériophage injectée dans l'animal. Dès que cette immunité est mise en place, l'animal redevient réfractaire à la maladie.

D'Hérelle conclura par : « L'injection de culture de bactériophage confère à l'animal : 1° Une immunité hétérologue uniquement due à la présence dans l'organisme des ultra-microbes bactériophages virulents vis-à-vis de la bactérie (..), qui assure la destruction des bactéries dès leur introduction dans l'organisme. Cette immunité cesse aussitôt que ces ultra-microbes ont été éliminés de l'organisme. En l'absence de réinfections fréquentes qui leur permettent de continuer à se multiplier dans l'organisme en gardant leur virulence pour la bactérie en cause, ce qui est le cas pour les expériences réalisées en milieu indemne, cette élimination est rapide.

2° Une immunité homologue ou organique, provoquée par une réaction de l'organisme de l'animal sous l'influence des principes solubles contenus dans la culture du bactériophage injectée ; cette immunité organique se caractérise principalement par l'apparition dans le sang d'un principe immunisant extrêmement puissant qui est vraisemblablement une anti toxine » [19]

Ainsi, d'après d'Hérelle le phénomène d'immunisation se déroule en deux étapes. La première étape est l'immunité hétérogène à l'origine d'une protection immédiate et dans laquelle le bactériophage a un rôle actif. La deuxième étape est l'immunité homologue à l'origine d'une immunité acquise et dans laquelle le bactériophage a un rôle passif. [20]

Cette immunisation par l'administration de culture de bactériophage sur des animaux sains lance les prémices de la phagoprophylaxie. De plus, grâce à ces travaux, il observa que la phagothérapie pouvait s'étendre à d'autres maladies et non pas seulement celles liées à l'intestin.

d. La première application de phage in vivo chez l'homme : « le premier essai clinique »

Après des essais positifs chez l'animal, d'Hérelle fit des essais chez l'homme. En 1921, il réalise des expériences sur sept enfants atteints de dysenterie bacillaire. Avant l'administration de ces cultures de bactériophage anti shiga chez les enfants, il s'assurera sur lui-même et sur son entourage de l'innocuité de ces cultures en les ingérant et en se les injectant. Aucune réaction, qu'elle soit locale ou générale, ne fut observée. L'innocuité étant démontrée, il put commencer ses recherches sur les enfants. Il ne fit les expériences que sur des patients dont la maladie était bien présente et prouvée par l'isolement du bacille pathogène. Il observa, après leur avoir fait ingérer deux millilitres de culture de bactériophage anti shiga, la disparition de selle sanglante avec l'amélioration en parallèle de l'état des patients au bout de 24h [21]. D'Hérelle venait de montrer que l'ingestion de cultures de bactériophage exerçait une action curative chez l'homme et donna ainsi un élan mondial à la phagothérapie.



Figure 3 : Portrait de Félix d'Hérelle [97]

4. De l'essor de la phagothérapie au déclin

a. Période d'enthousiasme généralisée pour la phagothérapie

Au début du XXème siècle, les moyens thérapeutiques capables de lutter contre les infections bactériennes étaient quasi nuls. La découverte du premier antibiotique, la pénicilline, ne date que de 1929 et l'utilisation des antibiotiques ne fut largement répandue qu'à partir de la Seconde Guerre Mondiale. Pour ces raisons, la phagothérapie connut un retentissement mondial, passionnant le monde scientifique pour cette nouvelle médication.

De ce fait, d'autres essais thérapeutiques furent mis en application. Entre autres, en Belgique, en 1921 Bruynoghe et Maisin ont été les premiers à appliquer le bactériophage dans les infections à staphylocoque sur six patients atteints d'anthrax ou de furoncle. Les effets se manifestèrent rapidement, entre 24-48h, avec la disparition des lésions. Au vu de ces résultats, ils envisagèrent ce traitement pour d'autres lésions causées par le staphylocoque [22].

L'année suivante, Beckrerich et Hauduroy employèrent le bactériophage dans le traitement de la fièvre typhoïde et paratyphoïde. Mais leurs essais furent mitigés, sur cinq cas de typhoïde deux cas décédèrent. Mettant en cause leur protocole (administration trop tardive du bactériophage), ils révélèrent cependant une coïncidence déroutante entre l'administration du bactériophage et une amélioration de l'état des patients dans les autres cas. Ils préconisèrent de généraliser la phagothérapie au plus grand nombre de cas possibles. [23]

En parallèle, l'isolement de plusieurs bactériophages notamment par d'Hérelle, permit le développement de traitements spécifiques contre les bactéries à l'origine de plusieurs maladies à travers le monde.

b. Le débat houleux sur la nature du bactériophage

Bien que le succès d'Hérelle ait eu un retentissement international, la nature du bactériophage resta fort longtemps discutée. Dès 1920, un courant d'opposants à sa théorie virale apparut et certains sont allés jusqu'à remettre en cause la paternité de la découverte du bactériophage. Plusieurs hypothèses furent émises mais peuvent être regroupées en deux écoles. La première rassemble ceux qui pensaient que le bactériophage était un microorganisme vivant, la seconde regroupe ceux qui clamaient que la substance lytique était de nature diastatique.

La plupart des hypothèses émises à l'encontre de la nature virale du bactériophage furent réfutées par d'Hérelle dans la version anglaise de son livre « le bactériophage, son rôle dans l'immunité ». Les quatre grandes principales hypothèses contre la nature virale du bactériophage sont :

i. L'hypothèse d'Alessandro Taurelli SALIMBENI : le « Myxomyces shigaphagus »

Pour Salimbeni comme pour d'Hérelle, la bactériolyse était bien due à un organisme vivant. Mais à la différence de d'Hérelle, Salimbeni démontra que le microorganisme était de nature mycosique car ce dernier sporulait. Ces spores avaient la capacité de traverser le filtre de Chamberland grâce à leur très petite dimension. Il les observa même au microscope après coloration : il vit : « un certain nombre de petits corpuscules ronds ou légèrement allongés et qu'on remarque assez facilement à cause de leur réfringence particulière ». [24], [25]. De ces observations, il en déduisit qu'il était en présence de « myxamibe » c'est à dire une forme appartenant au cycle de reproduction des champignons de la classe des myxomycètes. Ces myxamibes sont des cellules qui se nourrissent de bactéries et seraient donc à l'origine de la lyse bactérienne observée par Salimbeni. Il proposa d'appeler sa découverte « Myxomyces shigaphagus ».

D'Hérelle pratiqua la même expérience que Salimbeni mais il n'a jamais distingué, à aucun moment et quel que soit le grossissement, le microorganisme actif contre le shiga. Il observa certes des points réfringents comme Salimbeni mais il était impossible d'en déterminer la nature. Il observa seulement les phases successives du bactériophage sur la bactérie. [26] [27]

ii. L'hypothèse de Tamézo KABESHIMA : le « Ferment d'immunité bactériolysant »

Selon Kabeshima, il s'agirait d'un simple phénomène de digestion. Pour lui, il faut un catalyseur et une prodiastase pour que la lyse bactérienne puisse se produire. En ce qui concerne la prodiastase, elle serait fournie par les bactéries. Pour ce qui est du catalyseur, Kabeshima le nomme « Ferment d'immunité bactériolysant ». Il proviendrait de l'organisme qui est infecté par la bactérie pathogène. Au contact des bactéries pathogènes dans l'organisme, certaines glandes localisées dans le tube digestif sécrèteraient une sorte de catalyseur (« ferment ») contre les bactéries. Sous l'action du catalyseur, les prodiastases sont activées et entraînent l'autodestruction des bactéries. Cette action diastatique serait transmissible d'après ses expériences. [28]

Pour réfuter cette hypothèse, d'Hérelle évoque que le seul fait des expériences en série in vitro suffit à contester l'hypothèse de Kabeshima. Le catalyseur sécrété par les cellules de l'individu s'épuiserait rapidement et ne permettrait pas les expériences en série in vitro, car la dilution au cours des passages en séries ne laisserait qu'une infime trace de ce ferment d'immunité puisque ce dernier n'est doué d'aucune machinerie pour se multiplier et donc ne pourrait pas exercer son action. [29] [30]

iii. L'hypothèse de Bordet et Ciuca

C'est en travaillant sur des péritoines de cobayes qu'ils fondent leur hypothèse. Ils injectèrent dans le péritoine de leurs sujets une bactérie : *Escherichia coli*. Ils laissèrent agir l'immunité des sujets afin de recueillir quelques heures plus tard l'exsudat leucocytaire. D'après leurs expériences, en ajoutant un exsudat leucocytaire à une bactérie de coli, celui-ci aurait une activité particulière sur la bactérie : il modifierait la nutrition de la bactérie. Ce détournement de la nutrition de la bactérie serait au profit de la production d'un ferment lytique qui la conduirait inéluctablement vers la mort. Ce ferment attribuerait donc à la bactérie un pouvoir auto-lytique très marqué. De plus, ce pouvoir auto-lytique serait transmissible au descendant, conférant ainsi un caractère héréditaire au ferment. [31] [32].

Bordet et Ciuca mettront également en doute la paternité de d'Hérelle quant à la découverte de la lyse bactérienne et privilégieront Twort. Ce dernier avait plutôt été en faveur de la nature diastatique du phénomène ce qui était plus en concordance avec leurs travaux. [33]

D'Hérelle remet en cause l'explication de Bordet et Ciuca. Dans ses expériences passées, il avait mis en évidence que le bactériophage n'était pas spécifique d'une espèce bactérienne mais de plusieurs, via l'accoutumance de ces derniers aux bactéries. Or le caractère héréditaire, démontré dans l'expérience de Bordet et Ciuca, impliquait forcément la spécificité du « principe » sécrété. Ainsi comment expliquer qu'une espèce bactérienne influence l'hérédité d'une autre espèce bactérienne ? D'Hérelle rend donc caduque leur hypothèse en explicitant la non spécificité de l'action du bactériophage. [30]

De plus, il reproche l'inconstance de leurs résultats, et il considère leurs observations « comme un pur accident consécutif au passage occasionnel du virus bactériophage du contenu intestinal dans la cavité péritonéale. » [132]

iv. L'hypothèse de Bail

Bail n'écarte pas l'hypothèse du microorganisme vivant, mais pour lui, il s'agirait de petites particules dérivées de la destruction de la cellule bactérienne. Ces particules seraient filtrables et douées de la capacité de se reproduire. De plus, ces particules sécrèteraient une enzyme lytique strictement active sur l'espèce bactérienne qui l'a produite. Il aurait isolé ce principe lytique à partir de cultures de bactériophage actives contre la dysenterie de Flexner (*Shigella flexneri*).

Pour d'Hérelle, Bail a travaillé sur des cultures contenant un mélange de plusieurs types de shigelles et non pas que sur un seul type de shigelle (*S. flexneri*). Or la stricte spécificité du principe lytique de Bail ne permet pas de valider son hypothèse. [34]

Bien d'autres encore ont réfuté la nature « vivante » du bactériophage et de son action curative sur les maladies. Dans la plupart des hypothèses réfutées, d'Hérelle ne cessa de mettre en exergue les conditions non conformes des expériences. Pour lui, il fallait des conditions indispensables pour éviter les échecs de certains travaux et notamment vérifier que les phages utilisés soient réellement actifs contre la bactérie responsable de l'infection à traiter.

Cette incompréhension d'une partie du monde scientifique sur la nature virale du bactériophage est surtout due à un manque de connaissances sur les virus. La découverte du premier virus ne date que de 1892 avec le virus de la mosaïque du tabac qui infecte les plantes de tabac. Deux hommes ont contribué à cette découverte. Ivanovsky en 1892 qui montra qu'un extrait de feuille malade reste infectieux après filtration à travers un filtre de Chamberland. Pour ce dernier, l'agent responsable de la mosaïque du tabac était dû soit à une toxine de bactérie, soit à une très petite bactérie. Il faudra attendre 1898 avec Beijerinck pour que cet agent soit appelé « virus ». [35]

En 1932, une expérience réalisée aux Pays-Bas a mis en évidence que le principe de Twort n'est autre que le bactériophage de Félix d'Hérelle. Ils réalisèrent la même expérience que Twort : « nous avons réalisé le phénomène Twort consistant en l'apparition, dans les colonies de staphylocoque, d'une substance vitreuse composée de fins granules colorés en rouge par le Giemsa. Cette substance se caractérise en outre par sa stérilité, sa propagation et sa transmissibilité ». Le phénomène de Twort n'est nul autre que celui observé par Félix d'Hérelle [133]. Cependant cette polémique ne prit fin qu'avec l'observation au microscope des phages.

Malgré ces conflits sur la nature des phages, l'expansion mondiale de la phagothérapie continua son chemin.

c. La commercialisation des phages à usages thérapeutiques

L'un des premiers à avoir utilisé sur l'homme à grande échelle la phagothérapie est J. Da Costa Cruz en préparant 10 000 ampoules de phages pour traiter la dysenterie au Brésil. Au vu des résultats impressionnants, c'est à dire, un rétablissement du malade en 24-48 h, et avec un nombre d'échecs quasi nul, l'emploi du bactériophage par ingestion est devenu un traitement de routine au Brésil [40]. La frénésie autour du bactériophage se traduisit aussi par un grand nombre de publications. En 1932, E. W. Schultz rapporta que plus de 1200 papiers avaient été publiés sur ce phénomène. [41]

Face à cet engouement, l'industrie pharmaceutique s'empare de la production industrielle et de la commercialisation des phages. Dans les années 30, le laboratoire de bactériophage de Paris, fondé par Felix d'Hérelle, produisit plusieurs préparations de phages appelés : Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage et Bacté-staphy-phage et qui étaient inscrites dans le Vidal jusque dans les années 1980.



Figure 4 : **Advertisement for phage preparations from Laboratoire du bactériophage in Paris, France, 1936. Photograph from Dr William Summers'archive**

D'autres pays suivirent le pas, comme aux Etats-Unis, notamment avec trois grandes compagnies: E.R Squibb & Son, Lilly research laboratory et Swan-Myers (division des laboratoires Abbott). [42]

L'exaltation fut cependant de courte durée avec la remise en question de l'efficacité de ces productions de phages. Ces trois laboratoires américains furent l'objet d'une investigation menée par Margaret Straub et Martha Applebaum. De leur recherche en découla, en 1933, un article publié dans le Journal of the American Medical Association (= J.A.M.A). En analysant plusieurs lots de préparations de phages commerciales, elles remarquèrent que dans certaines préparations soit la quantité de phages était insuffisante soit absente. D'autre part, la présence de phage variait d'un lot à l'autre. [44]

Face à plusieurs doutes quant à la nature des phages, à des résultats expérimentaux trop contradictoires et à une commercialisation trop précoce, il n'en fallait pas moins pour que les autorités sanitaires prennent le dossier en main. C'est en 1934 que le « Council on Pharmacy and Chemistry » (créé en 1905 par l'American Medical Association (AMA)) sollicite une analyse de l'ensemble des publications ayant un rapport avec les phages. Il commissionna Monroe Eaton et Stanhope Bayne-Jones afin d'examiner l'ensemble des publications et d'évaluer les traitements par les phages. Il en ressort de ce rapport publié dans le J.A.M.A que la grande majorité des articles cliniques n'était pas suffisamment fiable, ceci étant dû à la faiblesse des contrôles et au nombre de cas trop faibles pour en faire une généralité.

De plus, la nature des phages n'étant pas clarifiée et les préparations de phages n'étant pas purifiées, la seule action des phages ne pouvait pas être prouvée.

Pour autant, en l'absence d'autres moyens thérapeutiques alternatifs dans les infections bactériennes, ce rapport négatif n'a cependant pas ralenti la poursuite des recherches. Les travaux sur les phages ne cessèrent de se multiplier. C'est pourquoi en 1941, le « Council on Pharmacy and Chemistry » jugea bon de réévaluer et de mettre à jour les travaux sur la phagothérapie. Le rapport rédigé par Albert Krueger et Jane Scribner arriva à la même conclusion que celle de leurs prédécesseurs.

Bien que dans les années 40, la nature virale des phages fût confirmée avec l'avènement du microscope électronique, un troisième et dernier rapport sur l'évaluation des bactériophages réalisait en 1945 par le J.A.M.A, se terminera par une interdiction de la phagothérapie sur le marché pharmaceutique américain. [42] [43].

d. Les premières images de bactériophages

L'observation du premier bactériophage fut permise grâce à l'apparition d'un nouvel outil : le microscope électronique. Il fut construit en 1931 par deux allemands Ernst Ruska (physicien) et Max Knoll (ingénieur). Cet outil permettait une meilleure résolution que le microscope optique et offrait ainsi l'observation des virus. Ce n'est qu'en 1939 que le premier microscope électronique à transmission commercial est produit par la société Siemens and Halske, il fut appelé l'« Hypermicroscope » [36]

La première observation d'un bactériophage revient à Helmut Ruska, à Pfankuch et à Kausche en 1940. Grâce au microscope électronique, H. Ruska fit l'une des premières observations du Bactériophage d'*Escherichia coli*. Après avoir ajouté un lysat de bactériophage à un bouillon de culture d'*Escherichia coli*, il observa ceci au microscope électronique [37]:

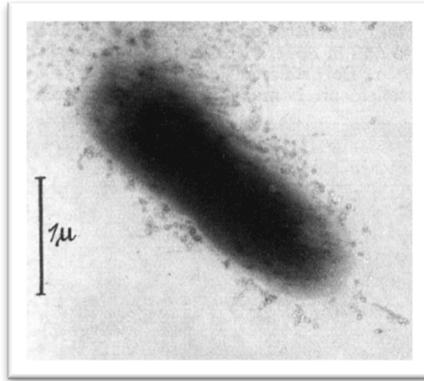


Figure 5 : Observation au ME x 15 000 Bactériophages concentrés autour de la bactérie, Il observe après l'ajout du lysat de bactériophage de *Escherichia coli* que la membrane de *Escherichia coli* est moins dense

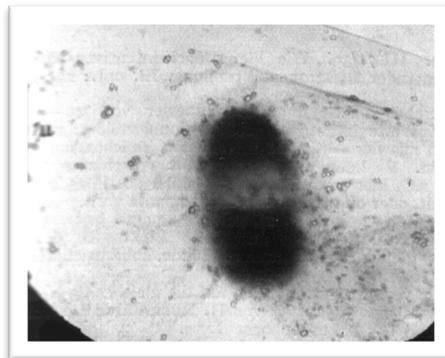


Figure 6 : Observation au ME x 14 000. Bactériophages autour d'une bactérie vaguement délimitée. Il y a destruction de la membrane bactérienne avec sortie du contenu du cytoplasme de la bactérie

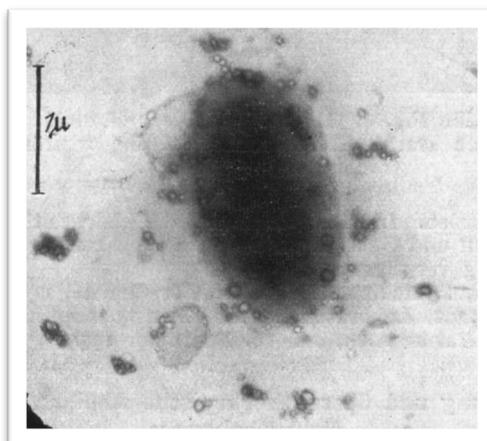


Figure 7 : Observation au ME x 14 000 : Lyse totale de la bactérie

Quand à Pfankuch et Kausche, ils firent aussi les mêmes observations mais à des grossissements plus élevés et donnèrent une taille approximative de 60 nanomètres de diamètre des phages anti coli [38].

Plus tard, Helmut Ruska confirma ses observations, en remarquant que les particules observées (phages) avaient des morphologies complexes et en 1943, il rapporta pas moins de quatre morphologies de bactériophages et proposera la première classification morphologique des phages. [39]

En dépit de la confirmation de la nature virale du bactériophage et un début très prometteur, la phagothérapie tomba dans l'oubli. Bien que la demande ne cessa de croître, la production industrielle ne suivit pas due à un manque de standardisation des méthodes et du matériel. L'inconstance des résultats expérimentaux et le manque d'homogénéité des préparations contribuèrent grandement au déclin de la phagothérapie. D'autre part, un nouveau moyen thérapeutique vit le jour avec la découverte du premier antibiotique par Fleming en 1929. Cette thérapeutique fut ainsi éclipsée de la médecine occidentale avec l'avènement des antibiotiques.

5. Du concept d'antibiose à la découverte des antibiotiques

a. Notion d'antibiose

i. Définition

L'antibiose est un phénomène biologique existant entre deux ou plusieurs organismes et conduisant à la destruction de l'un d'eux.

ii. Histoire

Le concept d'antibiose est né d'observations de plusieurs microbiologistes. Mais c'est Pasteur et Joubert qui apportèrent la première description de ce concept en 1877. C'est en travaillant sur le bacille de l'anthrax qu'ils constatèrent l'effet inhibiteur des bactéries saprophytes sur la croissance du bacille de l'anthrax. [45]

Mais le terme d'« antibiose » ne fut introduit qu'en 1889 ainsi que le terme « antibiotique ». Le premier à avoir utilisé ces deux termes est le mycologiste François Jean Paul Vuillemin. C'est lors d'une conférence en 1889 à Paris, où il discute des concepts de « symbiose » et d'« antibiose » concernant les parasites végétaux et leurs hôtes, qu'il emploie ces deux termes. Il terminera sa conférence par une phrase visionnaire : « L'homme, par une intervention raisonnée, dominera les maladies des plantes, des animaux, de sa propre espèce, autant qu'il connaîtra les puissances symbiotiques ou antibiotiques, qu'il doit renforcer ou neutraliser, pour que tout s'équilibre et se régularise autour de lui. » [46]

Dans sa conférence, Vuillemin utilise le terme antibiotique comme un adjectif. Ce dernier sera substantivé pour certains, par René Dubos, et pour d'autres, par Selman Waksman.

b. La découverte des antibiotiques

Généralement l'histoire de la découverte des antibiotiques est associée à Alexandre Fleming. Notamment par une découverte fortuite dans son laboratoire en 1928. En étudiant la croissance des colonies de staphylocoques, Fleming s'aperçut de retour de vacances qu'une de ses plaques de cultures avait été contaminée par une moisissure : le *Penicillium notatum*. Ce qui attira l'attention de Fleming fut l'inhibition de la bactérie par le micro organisme. Il vit dans sa découverte un impressionnant pouvoir antimicrobien. Il décida d'étudier les propriétés du micro organisme. Via ses recherches, il émit l'hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon était responsable de l'inhibition de la croissance de la bactérie. Il appellera cette substance « pénicilline » [47]. Cette inhibition de la croissance bactérienne par les moisissures avait été perçue 32 ans plus tôt par le français Ernest Duchesne mais c'est Fleming qui a été le premier à entrevoir le potentiel pour la médecine.

Malgré cette importante découverte, l'isolement de cette substance était impur, instable et difficile à préparer. Il faudra attendre 1940, avec E.B Chain et H.W Florey pour pallier ce problème d'extraction et de purification de la pénicilline. Cependant la quantité de pénicilline extraite à partir de la souche de *Penicillium notatum* était en quantité insuffisante pour une exploitation à plus grande échelle. Ils pallièrent à ce problème grâce au *Penicillium chrysogenum* qui permet de produire 200 fois plus de pénicilline que la souche de *Penicillium notatum* de Fleming [48].

Ce fut le départ de la production industrielle de la pénicilline par les laboratoires américains. Grâce à cette production industrielle, la pénicilline fut mise à disposition des troupes anglaises et américaines combattant dans le conflit de la Seconde Guerre Mondiale.

A partir de cette date, la découverte de nouveaux antibiotiques s'enchaîna. Du milieu du XXème siècle jusqu'à la fin de ce dernier, ce fut l'âge d'or des antibiotiques.

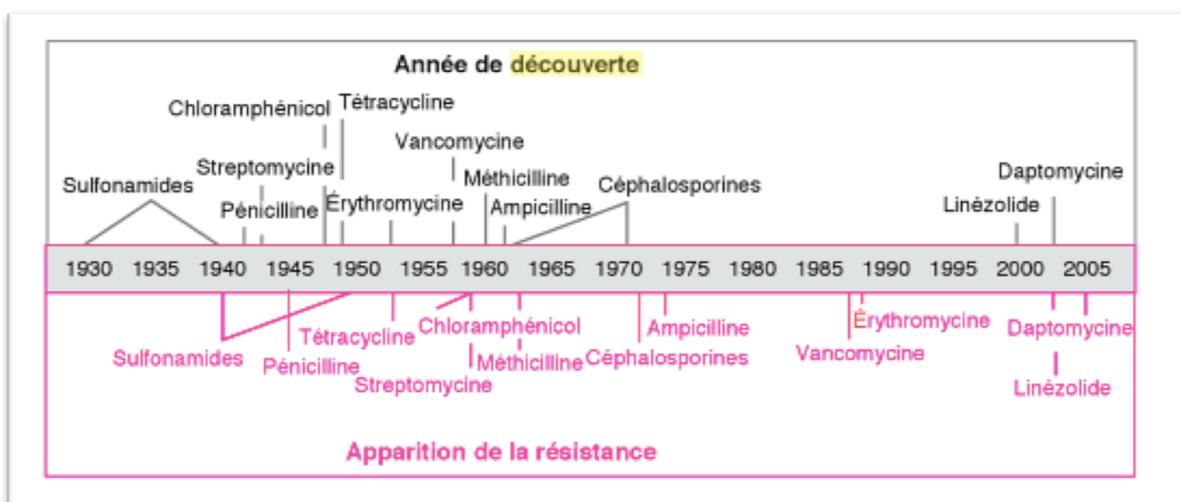


Figure 8 : Chronologie de la découverte des antibiotiques et date d'identification de souches résistantes correspondantes (extrait du livre « microbiologie » édition Dunod

6. Du déclin jusqu'au regain de la phagothérapie

a. L'institut Eliava

La Seconde Guerre Mondiale sonna le glas de la phagothérapie qui périclita au point d'être oubliée sauf dans une ville : Tbilissi en Géorgie.

En 1923 à Tbilissi s'installe l'institut ELIAVA qui utilise pour lutter contre les infections microbiennes la thérapie par les phages. C'est le premier institut au monde qui se consacra exclusivement aux phages et à ses applications thérapeutiques. Le fondateur de cet institut est George Eliava qui n'est nul autre que l'ancien élève de Félix D'Hérelle. On doit à ce microbiologiste une avancée importante dans les connaissances sur le bactériophage et sur la phagothérapie.

Il rencontre pour la première fois Félix d'Hérelle à l'Institut Pasteur à Paris au cours de l'année 1920. Il est séduit par l'idée de F. d'Hérelle d'utiliser les phages comme moyen thérapeutique. Commence alors entre eux une collaboration sur les phages. Avec d'Hérelle, il publiera en 1921 un article sur le « sérum antibactériophage » [49] et sur l'« unicité du bactériophage : sur la lysine du bactériophage. » [50]

Il collabora aussi avec Pozersky avec lequel il travailla sur l'« action destructive des sels de quinine sur le bactériophage de d'Hérelle ». Dans cet article, ils montreront que la quinine a une action destructive sur le bactériophage [51].

Ils étudièrent aussi ensemble l'« action de la température sur le bactériophage » [52]. Cette influence de la température avait déjà été étudiée par plusieurs scientifiques (Kabeshima, Gratia et Jaumain, et d'Hérelle) mais personne n'était d'accord sur la température détruisant les bactériophages. Les méthodes d'études utilisées par les scientifiques ne menaient qu'à des réponses incomplètes. Ainsi ils travaillèrent tous les deux sur l'influence de la température sur deux souches de bactériophages (le bactériophage anti shiga et le bactériophage anti staph) et ils en vinrent à la conclusion que « toutes les souches du bactériophage se comportent de la même manière vis-à-vis de la température : chauffées au dessus de 60° elles s'atténuent plus ou moins vite suivant l'espèce bactérienne sur laquelle on les fait agir ; toutes ne sont définitivement tuées, ou totalement paralysées, qu'aux environs de 75° C ». Aux vues de ces résultats, ils revinrent sur le phénomène Twort qui décrivait que son principe était détruit à 60°C. Ils conclurent leur article par : « le bactériophage ne cessant de manifester son action sur les cultures bactériennes sur géloses qu'après avoir subi la température de 75°C, il est peu vraisemblable que celui ci soit en cause dans le phénomène observé par Twort » Ils étudièrent aussi les souches de shiga devenues résistantes à l'action de bactériophages. Celles-ci étant devenues résistantes, car l'utilisation du bactériophage était d'activité moyenne vis à vis du shiga. [53].

Une autre de ses collaborations, le mena à étudier la taille des bactériophages. Avec son confrère Suarez, ils déterminèrent la dimension des bactériophages en menant plusieurs expériences d'ultrafiltration. Il en résulta que la taille du bactériophage ne dépassait pas « 5 µm » [54].

Eliava établit de nombreux travaux sur le bactériophage mais il ne publia que peu d'articles. Il ne put poursuivre ses recherches car sous le régime de Staline, Eliava fut déclaré « ennemi du peuple » et fut exécuté en 1937.

De cette époque jusqu'à nos jours, les bactériophages n'ont cessé d'être utilisés dans les pays de l'Est. En Occident, l'utilisation des phages dans la seconde moitié du XX^{ème} siècle, se fit dans un autre domaine, celui de la biologie moléculaire et sont à l'origine de grandes découvertes. Dans les années 2000, un secteur autre que la biologie s'intéressa aux phages : l'agro-alimentaire.

b. L'agro-alimentaire

Depuis 2006, plusieurs cocktails de bactériophages, estampillés GRAS (Generally Recognized as safe), garantissant l'innocuité vis à vis du consommateur, ont été autorisés par la FDA aux Etats-Unis dans le but de lutter contre une bactérie : la *listeria monocytogenes* dans l'industrie alimentaire.

Comme par exemple, le ListShield™ produit par Intralytix (compagnie spécialisée dans les biotechnologies située à Baltimore aux Etats-Unis) et le LISTEXP100™ développé par Microcos Food Safety (Compagnie située dans le Wageningen aux Pays-Bas). Ceux sont des préparations phagiques utilisées dans l'agro alimentaire aux Etats-Unis et au Canada. Ces préparations phagiques aident à lutter contre les contaminations bactériennes dans l'alimentation. [55].

En Europe, l'EFSA (European Food Safety Authority = Autorité Européenne de Sécurité des Aliments) s'est montrée plus récalcitrante quant à l'efficacité des bactériophages et a demandé d'évaluer les bactériophages dans les produits alimentaires. En 2012, l'organisation rend son verdict et déclare que les données analysées n'avaient pas été concluantes quand à l'efficacité du traitement des aliments par les bactériophages. [56].

Mais en 2014, en France, l'ANSES (Agence nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) revient sur le statut réglementaire des bactériophages et valide les analyses et les conclusions du CES BIORISK (Comité d'Experts Spécialisé = CES « Evaluation des risques biologiques liés aux aliments » BIORISK) concernant l'emploi du LISTEX P100 : « L'utilisation des phages dans les denrées alimentaires d'origine animale pour lutter contre les *Listeria* a été validée ». [57] [58].

Cependant depuis une dizaine d'années, l'application des bactériophages dans l'agro alimentaire ne semble plus être le seul champ d'application des bactériophages.

c. Le regain de la phagothérapie

Face à la propagation mondiale des bactéries multi-résistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques, l'impasse thérapeutique devient de plus en plus fréquente et devient un problème majeur de santé publique.

En effet, la découverte de la plupart des antibiotiques date du XX^{ème} siècle et seules quelques nouvelles classes d'antibiotiques ont été découvertes au XXI^{ème} siècle : la daptomycine appartenant à la famille des Lipopeptides, le linézolide appartenant quant à lui à la famille des oxazolidinone et la platensimycine appartenant à la famille des platensimycines. De plus, la découverte de nouveaux antibiotiques dans les classes actuelles d'antibiotiques est rare. La dernière découverte a été publiée cette année avec la Teixobactine. Mais cela reste insuffisant face à l'augmentation des résistances bactériennes.

D'après l'étude Burden menée par l'InVS, en France, on dénombre 158 000 personnes contractant chaque année une infection à bactérie multi-résistante et 12 500 en meurent. [59] [60]. Si aucune mesure n'est prise, d'ici 2050, plus de dix millions de personnes pourraient mourir chaque année à cause de l'antibiorésistance. [61] D'après le sous Directeur Général de l'OMS, le Dr Keiji Fukuda : « A post-antibiotic era— in which common infections and minor injuries can kill—far from being an apocalyptic fantasy, is instead a very real possibility for the 21st century. » [63].

La lutte contre les bactéries est une lutte sans fin, plusieurs moyens sont mis en œuvre pour préserver le plus longtemps possible l'efficacité des antibiotiques. La recherche de nouveaux moyens thérapeutiques sont en cours d'élaboration et plusieurs voies sont explorées. [136]

La première est la recherche de nouveaux antibiotiques. Pour cela un programme européen a été lancé en 2012 : « New Drugs 4 Bad Bugs ». Le but de ce programme est le développement de nouveaux antibiotiques contre les bactéries multirésistantes.

Mais aujourd'hui les antibiotiques ne sont plus la seule réponse aux bactéries pathogènes, de nouvelles approches sont explorées.

On travaille sur les résistances bactériennes avec la recherche d'inhibiteurs contre l'action des enzymes bêta-lactamases produites par certaines bactéries qui les rendent résistantes aux antibiotiques de la famille des bêta-lactamines. Un nouvel inhibiteur est en cours d'élaboration : le NXL 104 dont l'activité est étudiée en association avec la ceftazidime et en association avec l'aztréonam. Le NXL 104 est un nouvel inhibiteur injectable de bêta-lactamases à large spectre. Il n'est pas un inhibiteur classique (acide clavulanique, sulbactam, tazobactam) car il n'appartient pas à la famille des bêta-lactamines. Les résultats *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont montré de très bons résultats sur les entérobactéries même sur celles productrices de BSLE. [137]

Une autre voie est de cibler la virulence des bactéries avec la recherche d'antitoxines dirigées contre certaines toxines bactériennes.

On essaye aussi de limiter les effets indésirables des antibiotiques. L'entreprise Da Volterra produit le DAV132 qui permet d'éviter les effets indésirables et l'émergence d'infections à *Clostridium difficile* avec les antibiotiques. Il vise à protéger les flores intestinales contre les antibiotiques. Le DAV132 capture les résidus d'antibiotiques dans

le colon qui sont à l'origine des effets indésirables tout en permettant l'action des antibiotiques au niveau de l'intestin. **[138] [139]**

Une autre solution à l'antibiorésistance serait la phagothérapie. Elle semble être l'une des possibilités futures pour vaincre les bactéries pathogènes chez l'Homme.

III. Description des bactériophages

1. Définition du virus

Virus ou virion sont deux termes pour décrire deux états différents d'un même élément biologique.

La définition actuelle d'un virion nous est proposée par Lwoff en 1957 :

- Il possède un seul type d'acide nucléique : ARN ou ADN. Les deux molécules ne coexistent pas ensemble dans la particule virale. (Sauf le mimivirus et le cytomégalo virus qui contiennent de l'ADN et de l'ARN)
- Il se reproduit à partir de ce seul acide nucléique par réplication et est capable de se diviser de façon autonome
- Il présente un parasitisme intra cellulaire absolu : il détourne à son profit toute la machinerie de synthèse de la cellule hôte pour survivre.
- Il a une structure particulière et non cellulaire

Les virus sont considérés comme des éléments et non pas comme des cellules telles que les procaryotes et les eucaryotes, car ils ne possèdent ni de noyau ni de cytoplasme. La taille des virus varie de 10 à 300 nanomètre sauf certains virus de plus grande taille (exemple : mimivirus, etc).

Mais la définition de virus évolue en fonction des nouvelles découvertes. En 2012, P. Forterre parle de « cellule virale » pour évoquer tout organisme cellulaire ne répondant pas aux caractéristiques classiques que nous connaissons : archées, bactéries ou eucaryotes. [70]

2. Le monde du vivant

a. La classification du monde vivant

Jusqu'au début du XIX^{ème} siècle, le monde du vivant était partagé en deux règnes : le règne animal et végétal. Mais en 1683, grâce à Leeuwenhoek, et ses lentilles de microscope puissantes, un nouveau monde se profila devant lui : celui des organismes microscopiques. Avec l'observation de ces nouveaux organismes, il fallait leur trouver une place dans la classification du vivant. Ainsi un nouveau règne vu le jour, divisant le monde du vivant en trois règnes.

La première classification du vivant date de 1866 avec Haeckel. Son arbre universel du vivant séparait le monde vivant en 3 règnes : Plantae (plantes), Animalia (animaux) et Protista (terme créé par Haeckel regroupant les micro-organismes).

Jusque dans les années 1970, les représentations de l'arbre universel du vivant étaient basées sur des caractères morphologiques et/ou métaboliques. Toutefois l'utilisation des caractères phénotypiques ou biochimiques avait ses limites surtout lorsqu'il s'agissait de comparer des organismes très différents.

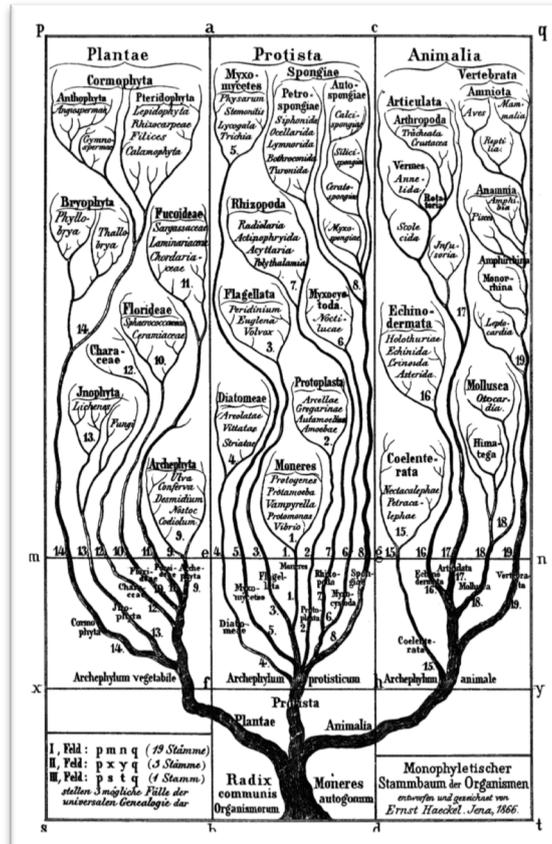


Figure 9 : Phylogénie extraite du *Generelle Morphologie* (Haeckel 1866).

Grâce à l'avènement de la biologie moléculaire, un nouveau tournant se dessina dans l'élaboration de l'arbre du vivant. Avec les travaux de Carl Woese et George Edward Fox, ils furent les premiers à utiliser le séquençage du gène d'ARNr 16S (présent chez les procaryotes) et celui de l'ARNr 18S (présent chez les eucaryotes) comme marqueur moléculaire. Un nouvel arbre universel du vivant fut constitué.

Si le choix de Woese et Fox se porta sur l'ARNr 16S et 18S, un des constituants des ribosomes, c'est parce que tous les organismes (à l'exception des virus) possèdent des ribosomes pour fabriquer les protéines qui leur sont nécessaires pour vivre. Simplement, les ribosomes diffèrent selon l'organisme. Woese et Fox ont séquencé ces deux marqueurs biologiques chez divers organismes. L'analyse de ces marqueurs permet de classer les organismes entre eux. Ils firent une découverte surprenante : le domaine des procaryotes fut scindé en deux groupes, celui des bactéries et celui des archées.

Ces nouvelles découvertes, grâce à la phylogénie moléculaire, amenèrent à une révision de l'arbre du vivant. La division du monde vivant était dorénavant basée sur les différences des ribosomes et non plus sur le phénotype. Le monde du vivant n'était plus divisé en trois règnes mais en trois domaines. (Le règne était dans les taxonomies classiques, le plus haut niveau de classification des êtres vivants, en raison de leurs caractères communs. Dans cette nouvelle classification à trois domaines, le règne est le deuxième niveau de classification.)

Ainsi pour Woese et Fox, les trois domaines sont : les bactéries, les archées et les eucaryotes (= regroupant les plantes, les animaux, les protistes et les champignons).

La génétique moléculaire révolutionna le monde de la biologie. Elle a permis la construction d'un arbre phylogénétique de référence dans lequel on trouve l'ensemble du monde vivant en partant d'un ancêtre commun : LUCA (Last Universal Common Ancestor). [70]

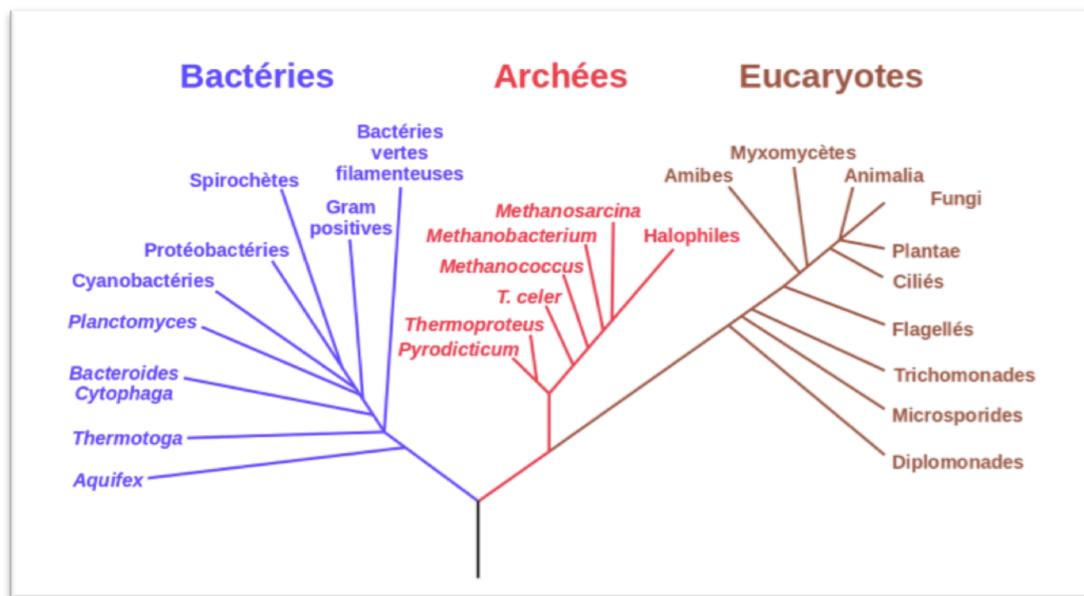


Figure 10 : Arbre phylogénétique du monde vivant d'après Woese *et al.* (1990)

(Le premier arbre universel fut publié pour la première fois en 1985) [71]

b. La place des virus dans le monde du vivant

La place des virus dans l'arbre de la vie fait débat dans le monde scientifique. Si on définit la vie comme étant la capacité d'un organisme à se reproduire par lui-même, alors le virus n'est pas un être vivant à proprement parler. Les virus devant obligatoirement infecter des cellules pour se multiplier, ils ne sont donc pas considérés comme des êtres vivants. Ils n'apparaissent donc pas dans l'arbre phylogénétique de la vie.

Cependant, étant dotés à la fois des caractéristiques du vivant et du non vivant, les virus ont été placés à la frontière du vivant et de l'inerte. De plus, le seul critère du parasitisme obligatoire pour placer le monde viral hors du vivant n'est pas suffisant pour les exclure. Certaines bactéries, par exemple, les rickettsies, sont des bactéries parasites intracellulaires obligatoires et font néanmoins parties du monde du vivant. [72]

Le débat du virus dans le monde du vivant est relancé en 2003 avec la découverte d'un nouveau virus infectant une amibe : le Mimivirus (Mimicking Microbe Virus). Ce virus d'une taille supérieure aux bactéries avec ses 400 nanomètres de diamètre est le premier virus visible au microscope optique. D'autres virus géants ont été découverts depuis, avec le Megavirus en 2011 avec ses 700 nanomètres et en 2013 avec la découverte de deux virus plus imposants encore que le Megavirus et regroupés sous le genre de Pandoravirus. [73]

La plupart des cellules des organismes des trois domaines du monde vivant peut être infectée par de nombreux virus. Les termes de bactériophage, archéovirus et virus sont employés selon que la particule virale infecte, respectivement, des bactéries, des Archées et des organismes eucaryotes. Pour la suite nous étudierons seulement les bactériophages.

c. Habitat

Grâce aux méthodes de détection et de dénombrement des particules virales, on a pu estimer que le nombre de bactériophages représentait la biomasse la plus importante sur la Terre. Ils seraient dix à cent fois plus que les bactéries, soit une abondance évaluée à 10^{30} à 10^{32} . Aujourd'hui, environ 6000 phages ont été étudiés, mais ils ne représenteraient que 10% de l'ensemble des phages.

Pour chaque bactérie connue, il existe au moins un phage identifié. En moyenne pour chaque bactérie on dénombre entre 10 à 100 phages spécifiques. Les bactériophages sont ubiquitaires, ils sont retrouvés dans tous les écosystèmes, qu'ils soient hostiles ou non. Même l'espèce humaine ne déroge pas à la règle et héberge, elle aussi, de nombreux phages. Les phages sont présents partout où il y a des bactéries.

Leur rôle dans les écosystèmes est encore mal connu. Cependant, on sait que les phages lytiques contribuent à renouveler très régulièrement la masse bactérienne de la planète. Quant aux phages tempérés, ils participent aux échanges de matériel génétique entre bactéries. [70] [74] [75]

3. Structure et classification

a. Structure des phages

Les phages ont une structure commune composée de deux éléments constants et obligatoires :

1. Le génome, composé d'acide nucléique (ADN ou ARN), support de l'information génétique. Il code pour les protéines de structure et les protéines non structurales. Sa composition d'acide nucléique permet de distinguer quatre organisations génomiques chez les phages :

ADN bicaténaire (linéaire ou circulaire)

ADN monocaténaire

ARN bicaténaire

ARN monocaténaire

La taille et le nombre de gènes, qui composent le génome, dépendent de la complexité du phage.

2. La capsid, de nature protéique, assure la protection du génome des atteintes physiques et chimiques, auxquelles le génome pourrait être exposé. Elle confère au phage sa forme. Elle permet sa dissémination et son interaction avec la cellule hôte. Elle est constituée de sous-unités identiques : les protomères. L'auto-assemblage de ces sous-unités conduit à la formation de capsomères. L'arrangement des capsomères entre eux détermine l'architecture du virion.

L'ensemble capsid-génome forme la nucléocapsid. Des éléments supplémentaires peuvent parfois être observés : une queue, une enveloppe ou des spicules. Concernant l'enveloppe entourant la nucléocapsid, elle est très fréquente chez les virus des cellules eucaryotes et, présente chez certains archéovirus mais elle est rare chez les phages.

b. Classification des phages

En 1962, une première tentative de classification standardisée des virus fut entreprise par Lwoff, Horne et Tournier : le système L.H.T. Cette classification est basée sur la nature du matériel génétique, la symétrie de la capsid, la nature de l'enveloppe de la nucléocapside, l'absence ou la présence de l'enveloppe, le nombre de capsomères pour les virions ayant une symétrie cubique et le diamètre de la nucléocapside pour les virions ayant une symétrie hélicoïdale [76]. Ils classèrent les phages dans la famille des « urovirales ».

THE LHT SYSTEM IN 1969						
Nucleic acid	Capsid symmetry	Naked (N) or enveloped (E)	Helical diameter or no. of capsomeres			
DNA	H	N	50 Å	Inoviridae		
		E	?	Poxviridae		
	C	N	12	Microviridae		
			32	Parvoviridae		
			42	Densoviridae		
			72	Papilloviridae		
			252	Adenoviridae		
			812	Iridoviridae		
	B	E	162	Herpesviridae		
		N Urovirales		Phages with tail		
RNA	H	N Rhabdovirales	90 Å	Myxoviridae		
			180 Å	Paramyxoviridae		
	E Sagovirales			Stomatoviridae		
				Thylaxoviridae		
	C	N Gymnovirales		32	Napoviridae	
				92	Reoviridae	
		E Togavirales			?	Blue tongue virus (sheep)
						?

Figure 11 Classification du monde viral tel qu'il était compris en 1969 [64]

En parallèle à cette classification du monde viral, la première classification consensuelle des phages date de 1967. Elle est faite par Bradley qui classifia les phages en six classes selon l'aspect de leurs capsides et de la nature biochimique de leur génome. Il les classa de A à F, le groupe A étant le plus complexe et le groupe F le plus simple. [65]

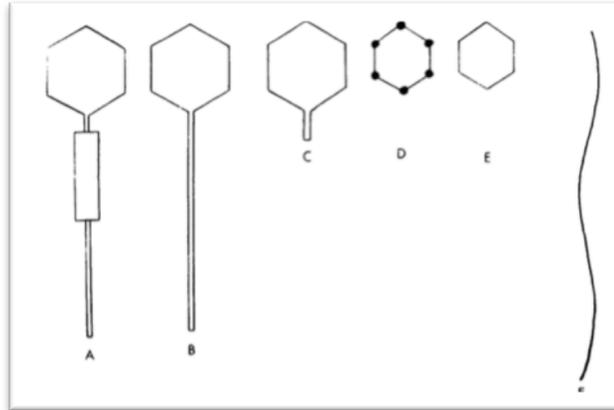


Figure 12: Basic morphological types of bacteriophages [65]

Group	Description	Nucleic acid type
A	Contractile tail	2-DNA
B	Long noncontractile tail	2-DNA
C	Short noncontractile tail	2-DNA
D	No tail, large capsomeres	1-DNA
E	No tail, small capsomeres	1-RNA
F	No head, flexible filament	1-DNA

Figure 13: Basic morphological groups of bacteriophages with types of nucleic acid [65]

A cette époque seulement 111 phages étaient connus [66]. Cette classification fut la base pour celles qui suivirent. Ackermann la modifia et la compléta en 1974 en divisant les groupes en sous groupes pour une meilleure identification.

Aujourd'hui, la classification de l'ensemble des virus est gérée par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Virus). Elle reprend une partie du système L.H.T. C'est ce comité qui se charge de l'établissement de la nomenclature et de la taxonomie des virus. On identifie à l'heure actuelle plus de 5500 phages. Ils présentent des morphologies très variées. Les critères de classification des bactériophages sont :

1. la nature de l'acide nucléique : ADN ou ARN, simple ou double brin
2. la forme de la capsid
3. la présence ou non d'une enveloppe ou peplos

L'ICTV classe les virus en ordres, puis en familles puis en sous familles et enfin en genres. A l'heure actuelle, la neuvième édition de la taxonomie virale proposée par l'ICTV permet de classer les phages connus en deux ordres et 18 familles. [67]

Bien que l'ICTV représente l'autorité officielle en taxonomie virale, un autre mode de classification alternatif des virus a été établi par David Baltimore : le système Baltimore. Il est complémentaire au système du ICTV mais il se base surtout sur le génome des virus et sur le procédé utilisé pour synthétiser l'ARN messager et celui de la réplication de l'ADN. [77]

i. L'ordre des Caudovirales [67] [78]

L'ordre « *Caudovirale* » rassemble trois des dix-huit familles des phages : *Myoviridae*, *Siphoviridae* et *Podoviridae*. Ces phages caudés ont une symétrie binaire c'est à dire qu'ils possèdent une tête, de symétrie cubique, et une queue de symétrie hélicoïdale. De plus, ils ne possèdent pas d'enveloppe et le génome est formé d'une molécule d'ADN bi-caténaire linéaire. Ils représentent plus de 96% des phages. Ils infectent les bactéries et les archées. Le choix des noms de ces trois familles provient des propriétés de leurs queues.

Les ***Siphoviridae***, regroupant 61% des *Caudovirales*. Ils ont une longue queue creuse et non contractile. (exemple : le phage λ)



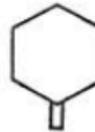
Siphoviridae

Les ***Myoviridae*** rassemblent 25% des *Caudovirales*. Ils ont une longue queue contractile. (exemple : le phage T4)



Myoviridae

Enfin, les ***Podoviridae*** ont une queue courte non contractile et constituent 14% des *Caudovirales*. (exemple : phage T7)



Podoviridae

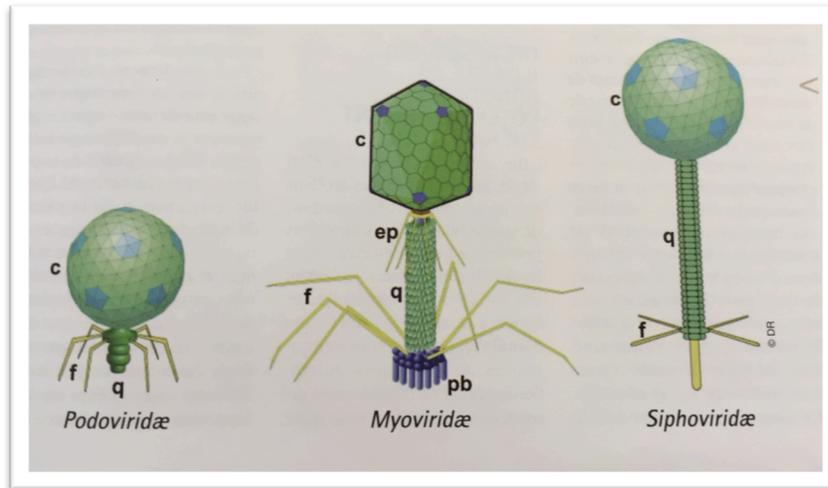


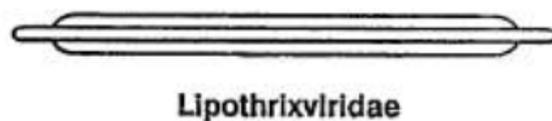
Figure 14 : Représentation schématique des 3 familles de bactériophages composant l'ordre des Caudovirales. c = Capside, f=fibre de queue, q=queue, pb=plateforme basales, ep = fibres secondaire [134]

Contrairement aux phages caudés, les autres familles sont plus rares et constituent moins de 3,7% des bactériophages. Ils sont de formes cubique, filamenteuse ou pléomorphique. La plupart des phages possèdent un ADN double-brin mais il existe des petits groupes de phages contenant un ADN simple brin, ou un ARN simple brin ou bien encore un ARN double brin.

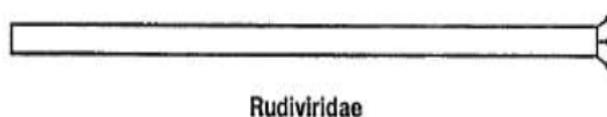
ii. L'ordre des Ligamenvirales [67] [78]

Ce second ordre regroupe des virus linéaires qui infectent les archées. Il existe deux familles dans cet ordre : la famille des *Lipothrixviridae* et la famille des *Rudiviridae*. Ces phages possèdent une capsid à symétrie hélicoïdale (ou filamenteuse).

La famille des *Lipothrixviridae* : il s'agit de phage filamenteux flexible à ADN bicaténaire linéaire possédant une enveloppe.



La famille des *Rudiviridae* : il s'agit de phage en forme de tige rigide, non enveloppé à ADN bicaténaire linéaire



Les 15 autres familles existantes ne sont rattachées à aucun ordre en raison de leur extrême diversité. On les classe de manière arbitraire par la symétrie de la capsid et par leur molécule d'acide nucléique.

iii. Phage à symétrie cubique : [67] [78]

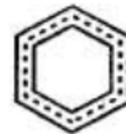
➤ à ADN :

Microviridae : Phage à ADN monocaténaire circulaire non enveloppé. Il correspond à la famille des phages les plus petits.



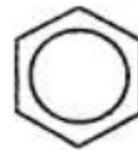
Microviridae

Corticoviridae : phage à ADN bicaténaire circulaire superenroulé. Il possède en plus une membrane interne riche en protéine entourant le génome



Corticoviridae

Tectiviridae : phage à ADN bicaténaire linéaire sans enveloppe. Il possède une membrane interne entourant le génome. Lors de l'infection, la membrane virale est transformée en structure tubulaire pour injecter le génome dans la cellule hôte



Tectiviridae
SH1

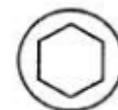
➤ à ARN :

Leviridae : phage à ARN monocaténaire linéaire. Il ne possède pas d'enveloppe.



Leviridae

Cystoviridae : phage à ARN bicaténaire segmenté linéaire possédant une enveloppe lipidique



Cystoviridae

iv. Phage pléomorphe (ou phage à symétrie complexe) [67] [78]

Globuloviridae : Phage à ADN bicaténaire linéaire. Il est pourvu d'une enveloppe. Cette famille infecte les archées.



'Globuloviridae'

Ampullaviridae : Phage à ADN bicaténaire linéaire qui infecte les archées. Le nom de la famille dérive du mot latin « ampulla » qui signifie « bouteille » pour rappeler la forme des virions de cette famille.



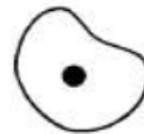
'Ampullaviridae'

Bicaudaviridae : Phage à ADN bicaténaire et circulaire qui infecte les archées. Il a une forme de citron. Le nom de la famille dérive du nom latin « bi » et « cauda » qui signifie deux queues.



'Bicaudaviridae'

Plasmaviridae : Phage ne possédant pas de capsid, l'ADN bicaténaire circulaire est entouré par une enveloppe lipidique



Plasmaviridae

Fuselloviridae : Phage a ADN bicaténaire circulaire. Il a une forme de citron. Il infecte les archées



Fuselloviridae

Salterprovirus : Phage qui n'est rattaché à aucune famille. Phage a ADN bicaténaire linéaire. Il infecte les archées



Salterprovirus

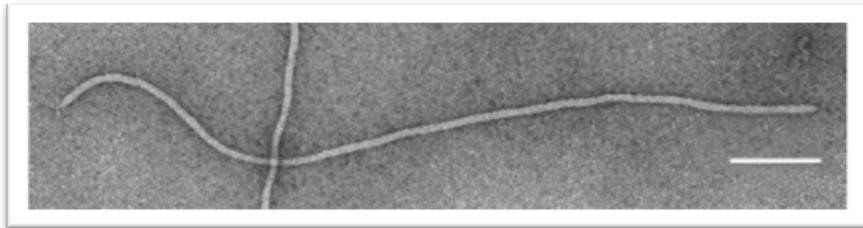
Guttaviridae : Phage à ADN bicaténaire



Guttaviridae

i. Phage à symétrie hélicoïdale (ou phage filamenteux) [67]

Inoviridae : Phage à ADN monocaténaire circulaire. Absence d'enveloppe. Le phage est un filament flexible.



[67]

Les phages qui nous intéressent pour la phagothérapie, sont ceux qui infectent les bactéries, c'est à dire :

Ordre	Famille	Acide nucléique
Caudoviridale	Myoviridae	ADN double brin
	Siphoviridae	
	Podoviridae	
	Corticoviridae	ADN double brin
	Tectiviridae	ADN double brin
	Plasmaviridae	ADN double brin
	Inoviridae	ADN simple brin
	Microviridae	ADN simple brin
	cystoviridae	ARN double brin
	leviviridae	ARN simple brin

4. Les types d'invasions du bactériophage

a. Les cycles de reproduction

Les bactériophages étant des parasites obligatoires, ils détournent la machinerie cellulaire de la cellule hôte pour pouvoir se répliquer. Il existe trois formes de cycles infectieux [68]:

- Le cycle lytique : il aboutit à la production de virus. Le bactériophage est dit virulent. Il provoque la lyse bactérienne après s'être multiplié afin de libérer les virions.
- Le cycle lysogénique : il n'y a pas de production virale mais il y a une persistance du génome viral (ou prophage) dans la bactérie. On parle de phages tempérés. Le génome viral peut persister sous deux formes :
 - Soit intégré au chromosome bactérien : c'est la lysogénie. C'est la forme la plus fréquente
 - Soit sous forme épisomique (plasmide), il n'est pas intégré au chromosome bactérien: on parle de pseudo- lysogénie. Cette forme peut être interprétée comme un état de non choix entre un cycle lytique et un cycle lysogénique. Cette forme est due le plus souvent à une détérioration de l'activité métabolique bactérienne interrompant le bon déroulement d'un cycle lytique. Le cours de ce cycle sera repris lorsque l'activité métabolique bactérienne sera restaurée. Mais ce cycle reste encore mal compris.

Remarque : sous l'influence des facteurs environnementaux, le cycle infectieux peut changer. Un phage tempéré pourra opter pour un cycle lytique.

- Le cycle chronique : il est beaucoup plus rare. Les particules virales produites lors de ce cycle infectieux sont libérées par bourgeonnement à travers la membrane bactérienne : il n'y a pas de destruction bactérienne pour libérer les virions.

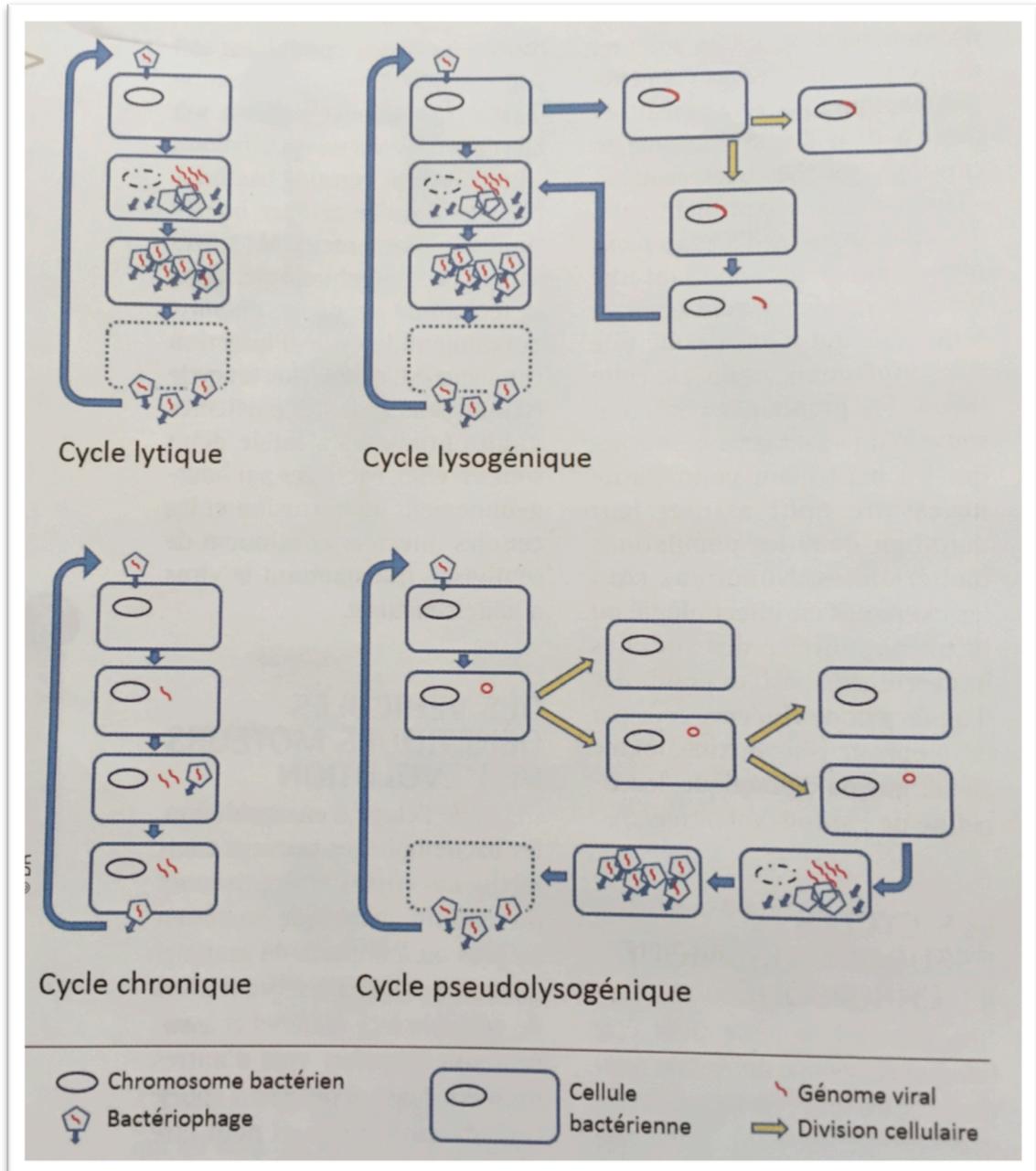


Figure 15 : Schémas des différents cycles infectieux des bactériophages.

Seuls les phages virulents sont utilisés en phagothérapie, car à l'issue du cycle lytique, il y a destruction de la bactérie. Cette propriété lytique confère ainsi un potentiel d'utilisation comme agent antibactérien. Nous étudions ainsi seulement les phages lytiques. La description du cycle lytique se base sur le modèle du phage T4, un des phages les plus étudiés en laboratoire. Il appartient à la famille des Myoviridae appartenant à l'ordre des Caudovirales, ordre représentant la majorité des phages connus à ce jour.

b. L'architecture globale du phage T4

Le phage T4 est un phage caudé ayant une symétrie binaire avec une tête et une queue. Les dimensions de la tête du phage T4 sont à peu près de 86 nm de large et de 120 nm de long.

La capsid de forme icosaédrique est composée de plusieurs protéines :

- trois protéines essentielles : la protéine gp 23 appelée MCP pour Major Capside protéine. La protéine gp24 qui constitue la protéine des sommets et la gp 20 constituant la protéine portail ou portale qui permet d'attacher la capsid à la queue contractile et à travers lequel l'ADN phagique pénètre lors de l'encapsidation et sort lors de l'infection.
- Deux protéines non essentielles : la protéine Hoc pour « Highly immunogenic outer capsid » et la protéine Soc pour « Small outer capsid » qui se lie à la gp 23 pour renforcer la structure de la capsid

La capsid renferme un ADN bicaténaire linéaire qui est entouré de 170 kb entouré de petites protéines comme par exemple la protéine alt. A cette capsid est fixée une queue contractile via un collier. La queue mesure environ 115 nm et est constituée de deux structures : la structure externe, une gaine contractile composée de la protéine gp 18, et la structure interne de la queue constituée de la protéine gp 19. Sur la queue se situent entre autres des éléments essentiels à l'arrimage du phage sur une bactérie : des fibres (LTF, long tail fibers), des crochets (STF, side tail fibers) et une plaque basale.

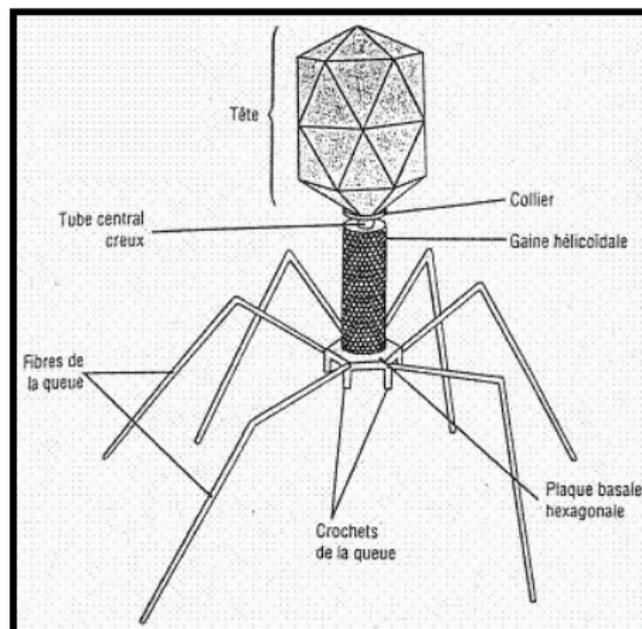


Figure 16 : D'après (Biologie marine, 2006). Le bactériophage T4.

Phage T4 virulent appartenant à la famille des Myoviridae, se compose d'une tête comportant une capsid polyédrique et un ADN double brin, d'une queue sur laquelle se situent entre autres des éléments essentiels à l'arrimage du phage sur une bactérie : des fibres (LTF, long tail fibers), des crochets (STF, side tail fibers) et une plaque basale.

c. Le cycle lytique = phage lytique

La plupart des différentes étapes du cycle des phages sont communes à tous les virus : adsorption, séparation de l'acide nucléique de son manteau protéique, l'expression et la réplication de l'acide nucléique, l'assemblage du virion, la libération et enfin la contamination.[70]

i. Adsorption [70] [79]

L'adsorption est la première phase du cycle d'infection d'un phage. Cette adsorption se fait en deux temps.

Dans un premier temps, l'interaction entre le virus et la cellule est réversible et est caractérisée par des liaisons faibles et réversibles. Ce contact permet au phage de se déplacer sur la surface de la cellule hôte afin de trouver des sites spécifiques (récepteurs) de liaison. Lors de la rencontre d'un site spécifique, l'interaction devient irréversible entre le virus et la cellule et constitue ainsi le deuxième temps : celui de l'adsorption.

La nature des récepteurs varie en fonction du phage et de la bactérie infectée, il s'agit de différentes molécules exposées à la surface cellulaire. Chez les bactéries gram négatives, les récepteurs peuvent être des composants du lipopolysaccharide (LPS) (exemple : phage T4 infectant *Escherichia coli* B) ou des protéines de la membrane externe (exemple : porine OmpC pour T4 infectant *Escherichia coli* K12). Chez les bactéries gram positives, les phages reconnaissent les acides teichoïques (constituants du peptidoglycane ou de la membrane plasmique). D'autres phages reconnaissent les polysaccharides de la capsule présentes chez certaines bactéries gram négatives ou positives (la capsule est un élément inconstant de la structure des parois bactériennes. Elle est de nature polysaccharidique sauf chez le *Bacillus anthracis* où elle est constituée de polypeptide). Pour terminer, d'autres phages reconnaissent les protéines des pili ou celles des flagelles. Le couple récepteur cellulaire- déterminant phagique de reconnaissance détermine la « spécificité d'hôte ».

L'adsorption du phage T4 implique plusieurs structures de la queue. La fixation du phage commence par le contact d'une fibre caudale longue (LFT = Long Tail fibers) de la queue avec le récepteur cellulaire. A mesure que le contact s'établit avec les six fibres caudales longues, il se produit un changement de conformation de ces fibres permettant à la plaque caudale de s'approcher de la surface cellulaire. Lorsque la plaque basale est bien déposée sur la surface cellulaire, de nouvelles fibres vont s'accrocher sur la paroi cellulaire : ce sont les six fibres caudales courtes (STF = Side tail fibers). Il se produit ainsi un changement de conformation de la gaine. La gaine se réorganise et se raccourcit. La plaque basale contient une protéine possédant une activité de lysozyme entraînant la perforation de la paroi bactérienne, facilitant ainsi la pénétration du tube central du phage à travers la paroi bactérienne. L'ADN est expulsé de la tête du phage à travers le tube de la queue et pénètre ainsi dans la cellule hôte. Le temps d'adsorption du bactériophage T4 est de l'ordre d'une minute, mais ce temps varie en fonction des phages.

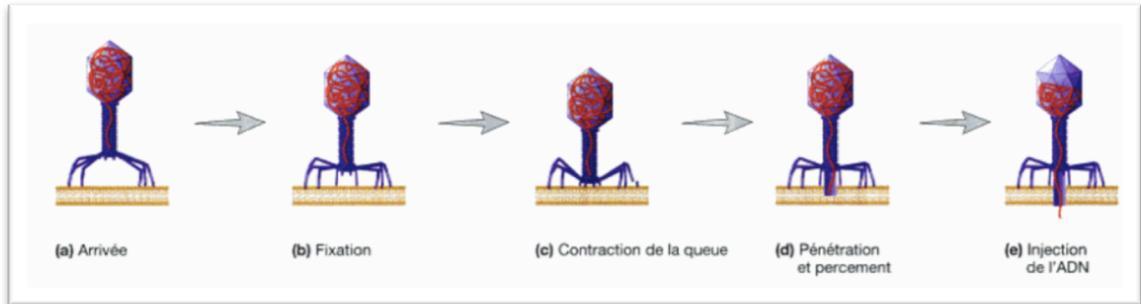


Figure 17 : adsorption et injection de l'ADN du phage T4 [79]

ii. Transcription [70] [79] [80]

Le génome du phage, une fois dans le cytoplasme de la cellule hôte, doit être transcrit et répliqué pour permettre la synthèse des protéines nécessaires à son développement. Pour cela, il détourne le métabolisme de la cellule hôte à son profit. Le phage T4 a un ADN bicaténaire linéaire, ce dernier servira de matrice pour la synthèse des ARN messagers qui seront traduits pour produire les protéines virales dont le but est la formation de nouveaux virions.

Une fois l'ADN du phage dans la cellule hôte (*Escherichia coli*), différents mécanismes de défense bactérienne tentent de stopper l'infection. Chez *Escherichia coli*, et chez les bactéries en général, les stratégies de défense contre la présence d'ADN étranger sont leurs nombreuses enzymes de restrictions. Le phage T4 détourne cette défense grâce à une particularité dans la composition de son génome.

En effet, le phage utilise le même moyen que la bactérie pour que son génome ne soit pas clivé par ses propres enzymes de restriction. La bactérie fabrique une enzyme appelée méthylase qui reconnaît aussi les sites de restriction sur le génome, mais à la différence de l'enzyme de restriction, elle ne coupe pas l'ADN mais le modifie en lui rajoutant un groupement méthyle sur un ou plusieurs nucléotides du site de restriction. Cette méthylation empêche ainsi la coupure par l'enzyme de restriction.

Le génome phagique T4 possède des cytosines qui vont pouvoir être hydrométhylées, (la cytosine étant la seule base pouvant être méthylée), et empêcher ainsi l'action des enzymes de restrictions bactériennes.

Une fois les systèmes de défenses contournés, l'ADN du phage est protégé dans la cellule hôte. Le phage T4, qui ne code pas d'ARN polymérase, va prendre le contrôle de l'ARN polymérase de la cellule afin de débiter la synthèse de son ARN messager. La transcription est divisée en trois étapes :

- Transcription des ARN messager précoces
- Transcription des ARN messager intermédiaires
- Transcription des ARN messager tardifs

Les gènes du phage T4 possèdent des promoteurs semblables à ceux d'*Escherichia coli* et permettent ainsi la transcription des gènes du phage par l'ARN polymérase de la cellule. Au début de l'infection, il y a une compétition entre la transcription des gènes phagiques et ceux de la cellule hôte. Pour que l'ARN polymérase choisisse préférentiellement de transcrire les gènes phagiques, le phage dispose de la protéine « alt » (altération) présente dans la capsid du phage. Elle est injectée dans la cellule hôte en même temps que le génome du phage. Cette protéine modifie l'une des sous unités de l'ARN polymérase en ajoutant un ADP-ribosyl sur une des deux sous unités alpha de la polymérase. Cet ajout permet d'inhiber la transcription des gènes de la cellule hôte au profit du phage et de transcrire l'ARN messager viral.

Cet ARN messager viral est appelé ARN messager précoce car il est transcrit avant la synthèse de l'ADN du phage (réplication). Cet ARN messager précoce dirige la synthèse des protéines et des enzymes nécessaires au détournement du métabolisme de la cellule hôte. Certaines des enzymes précoces dégradent l'ADN de l'hôte en nucléotides fournissant ainsi le matériel de base de la synthèse de l'ADN viral.

Durant la période précoce de transcription, des facteurs phagiques vont être produits pour déclencher après deux ou trois minutes d'infection la phase de transcription intermédiaire. Durant cette phase, il y aura l'expression des gènes codant pour les protéines de la réplication, par exemple la T4 polymérase ou bien des protéines comme la UvsX impliquée dans la recombinaison.

Puis vient ensuite au bout de 12 minutes, la transcription des gènes tardifs qui créent les protéines nécessaires à l'assemblage des particules virales. L'ARN tardif dirige la synthèse de trois sortes de protéines : les protéines de structure du phage, des protéines qui facilitent l'assemblage du phage et des protéines impliquées dans la lyse cellulaire et la libération des phages.

iii. Réplication [70] [79] [80]

La réplication de l'ADN du phage est initiée à partir des origines de réplication présentes dans le génome du phage. L'ADN du phage T4 est linéaire double brin et porte à ses extrémités des séquences de bases répétées qui ont pour fonction de protéger le génome et donc l'intégrité du matériel génétique.

Lors de la réplication de l'ADN linéaire double brin, ses extrémités ne peuvent être répliquées que s'il y a la présence d'une machinerie spéciale : la télomérase. Or, *Escherichia coli* n'en possède pas car son génome est circulaire, et le gène du phage T4 n'en code pas non plus. Ceci implique, que la réplication de l'ADN du phage T4 laisse une partie 3'OH simple brin à l'extrémité de l'ADN linéaire répliqué. Le phage λ , lui a résolu le problème par la circularisation de son ADN dès le début de l'infection.

Pour le phage T4, ce dernier a recours à la recombinaison homologe. La réplication et la recombinaison chez le phage T4 se font quasi simultanément et sont intimement imbriquées. Ces extrémités 3'OH simple brin vont s'apparier sur une séquence double brin homologue. Cette séquence double brin peut-être trouvée soit à l'extrémité de la même molécule soit à l'intérieur d'une autre molécule d'ADN phagique. Cette

recombinaison est permise grâce à l'existence de séquences redondantes dans les molécules d'ADN phagique.

Au point d'invasion se forme une structure Y avec une boucle (D-loop). La réplication peut ainsi se poursuivre. Ce mécanisme d'appariement –recombinaison – réplication conduit à la formation de longues structures branchées contenant une dizaine de génomes de phage appelés concatémères. Ces derniers seront clivés et encapsidés au cours de la phase tardive de la transcription. Chaque descendant a une unité génomique qui commence par un gène différent mais si le génome de chaque phage était circularisé, la séquence des gènes de chaque phage serait la même.

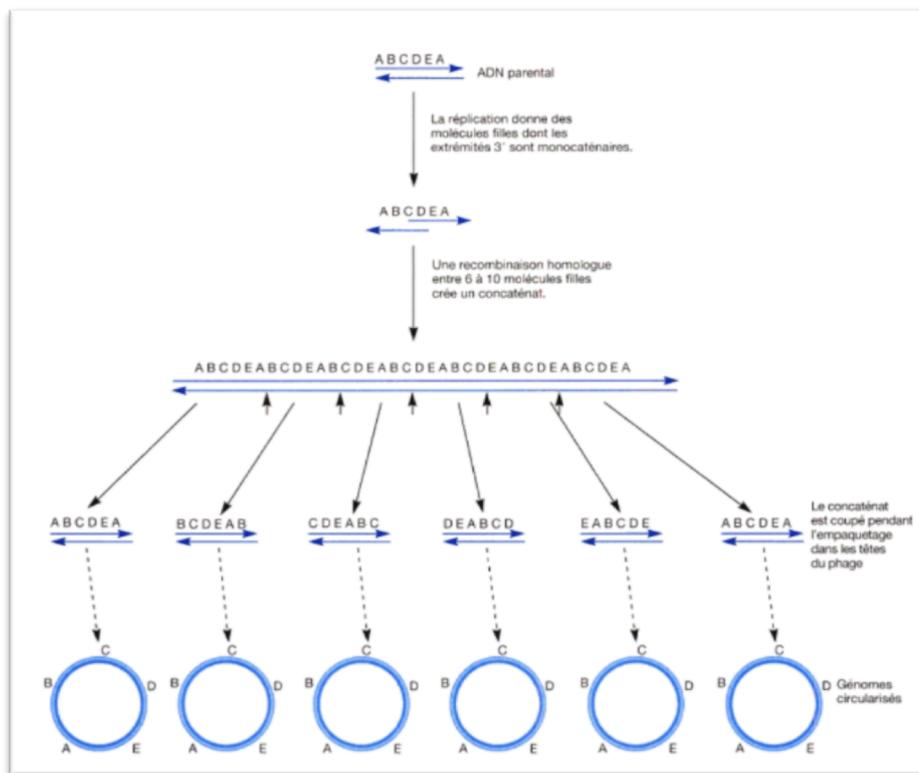


Figure 18 : Formation de concaténats pendant la réplication du génome T4 [79]

iv. L'assemblage des particules de phages [70] [79] [81]

L'assemblage du phage T4 est un processus complexe, il est divisé en trois voies :

- L'assemblage de la tête (procapside en capsid)
- L'assemblage de la plaque basale et de la queue
- L'assemblage des fibres de queue

La formation de la procapside :

la tête du phage est formée sur la membrane interne d'*Escherichia coli*. Chez la plupart des phages, la protéine majeure de la capsid (gp 23 pour T4) ne peut pas s'auto-assembler en capsid. Il est nécessaire d'avoir la présence d'un complexe initiateur. Ce complexe est composé de la protéine portail ou portale (gp 20), de multiples copies de la protéine majeure de capsid (gp 23) et de multiples copies de la protéine d'échafaudage. Chez le phage T4, l'absence de la protéine d'échafaudage conduit à la formation de virions non viables pour la suite de l'assemblage. Après la formation de la procapsid, les protéines d'échafaudages sont éliminées (elles sont découpées par une protéase du phage et éliminées avant l'encapsidation du génome).

Le transfert de l'ADN phagique est assuré par un complexe enzymatique appelé terminase. Ce complexe est constitué de deux sous-unités :

- Une sous unité appelée petite terminase (gp 16) qui reconnaît l'ADN à encapsider
- Une sous unité appelée grande terminase (gp 17) qui est une sous unité catalytique dont l'activité ATPase fournit l'énergie pour transporter l'ADN dans la capsid à travers la portale ou portail. Elle possède également une activité DNAase qui clive les concatémères d'ADN produits lors de la réplication de l'ADN viral, permettant l'entrée d'une unité de génome dans chaque capsid.

Ce complexe est arrimé à la procapsid grâce à l'interaction de la protéine gp 17 avec la protéine gp 20. La terminase, compléxée au portail (ou portale), se décroche une fois l'empaquetage de l'ADN terminé. Une fois la procapsid remplie d'ADN viral on ne parle plus de procapsid mais de capsid.

Cette capsid se combine ensuite spontanément avec la queue assemblée (plaque basale, tube de la queue entouré de la gaine, et les fibres de la queue) pour terminer l'assemblage du virion.

v. La libération des phages [70] [79]

Une fois les virions arrivés à maturation, ils se libèrent. Cela nécessite le franchissement de l'enveloppe cellulaire d'*Escherichia coli*. Ce processus se produit lorsqu'il y a suffisamment de particules virales assemblées. La lyse nécessite la présence de deux protéines : une holine et une endolysine.

La holine est une petite protéine hydrophobe qui dépolymérise la membrane bactérienne pour former des pores à travers lesquels passe l'endolysine. L'endolysine est un lysosyme qui dégrade la paroi bactérienne. Ces évènements entraînent ainsi l'éclatement de la cellule bactérienne et la libération d'une centaine de nouveaux phages en moyenne.

Un cycle complet dure quelques minutes ou au plus une heure en fonction du phage. De plus, le cycle étant plus rapide que la reproduction bactérienne, cela laisse peu de chance à la population bactérienne de survivre.

Ainsi les nouveaux phages libérés dans le milieu rencontrent les bactéries voisines conduisant à la mort de ces dernières. De ce fait, le nombre de phages augmente tandis que celui des bactéries diminue. En l'absence de bactérie, le processus s'arrête et le phage est éliminé puisqu'il ne peut plus se reproduire sans son hôte.

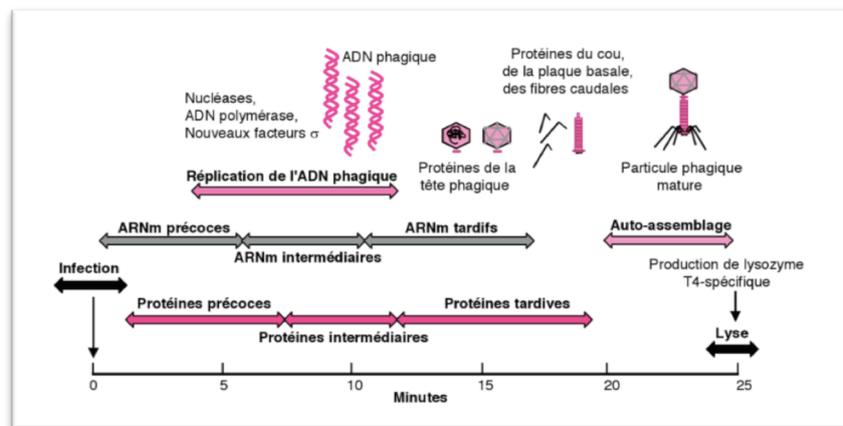


Figure 19 : Etape du développement intracellulaire. Modèle du bactériophage T4 [70]

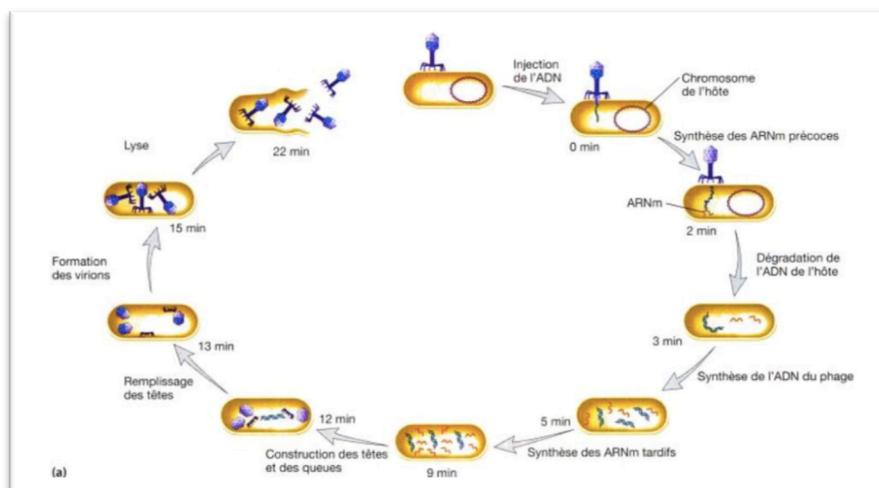


Figure 20 : Cycle lytique du bactériophage T4 [79]

d. Cycle lysogénique = phage tempéré [70] [79]

Les premières étapes du cycle lysogène sont identiques au cycle lytique. Cependant, l'ADN viral du phage tempéré introduit dans le cytoplasme est transformé en prophage, c'est à dire que l'ADN viral s'intègre au génome bactérien grâce à une intégrase virale. (Pour certains phages, il est conservé sous forme de plasmide dans la cellule hôte). Le prophage reste dormant et il est répliqué en même temps que le génome bactérien, c'est à dire, à chaque division cellulaire. Il est ainsi transmis aux descendants bactériens.

Ces phages confèrent ainsi de nouvelles propriétés, bénéfiques ou non, à la bactérie infectée. La cellule infectée est appelée cellule lysogène. Dans cette cellule, la voie lytique du virus est réprimée par l'action d'un répresseur codé par le prophage. Cependant, suite à des facteurs externes, le génome du phage peut s'exciser. Le phage libéré débute un cycle lytique, avec production de nouveaux virions et conduisant la cellule bactérienne à la mort.

Ces phages tempérés ne sont pas utilisés en thérapeutique car il sont de potentiels vecteurs de gènes dangereux pour le malade. En effet, au moment de l'excision du génome du phage, il « prend » de manière aléatoire une partie du génome hôte pour infecter d'autres bactéries phylogénétiquement proches. Cet échange d'information et de caractères entre bactéries est appelé transduction.

Ce qui permet de distinguer un phage lytique d'un phage tempéré, c'est l'absence d'intégrase dans le phage lytique. Grâce au séquençage du génome du phage, on peut dire si oui ou non il y a présence d'intégrase. On pourra aussi rechercher l'absence de gène de virulence.

5. La pharmacologie

a. La pharmacocinétique

La pharmacocinétique étudie le devenir d'une substance après son administration dans l'organisme, c'est à dire, « ce que fait l'organisme à un médicament ». Elle comprend quatre étapes :

- L'absorption : la substance doit traverser les membranes biologiques pour pénétrer dans la circulation systémique.
- La distribution : la substance se retrouve dans la circulation systémique sous forme libre ou sous forme liée et va migrer dans les différents tissus.
- Le métabolisme : la substance est transformée par le système enzymatique de l'organisme.
- L'excrétion : la substance est éliminée par l'organisme soit sous forme inchangée soit sous forme d'un ou plusieurs métabolites.

A l'heure actuelle, il existe peu d'études qui explorent la pharmacocinétique des préparations thérapeutiques des phages.

i. Absorption

Quelques travaux ont mis en évidence la présence de phage dans la circulation sanguine = phagémie. Le passage du phage à travers la barrière gastro-intestinale, est appelé « translocation phagique ».

Chez les animaux, plusieurs études ont été faites. En 1921, Bordet et Cuica, injectent sous la peau d'un cobaye un liquide lytique (contenant le bactériophage anti B. coli). Ils réalisent 7 heures plus tard une saignée du cobaye. Le sérum recueilli empêche le développement de B. coli mettant ainsi en évidence le passage du phage dans le sang alors que ce même sérum avant l'injection n'inhibait pas la croissance de B. coli. [82]

En 1958, Keller et Engley ont observé que les phages introduits dans le tube digestif des souris étaient retrouvés cinq minutes après dans le sang, bien que la quantité de phages récupérée à partir du sang était variable entre chaque souris.

Une autre, menée par Hoffmann en 1965, a montré que l'administration par voie rectale de bactériophages permettait une phagémie élevée chez les animaux. La phagémie était aussi élevée qu'après une injection de phage par voie intramusculaire, mais le pic plasmatique était obtenu après cinq minutes par voie rectale contre quinze minutes par voie intramusculaire.

Chez l'homme, très peu d'études ont été menées. En 1987, Weber Dabrowska a observé la présence de phages dans la circulation sanguine chez les patients au 10^{ème} jour de traitement par voie orale. Sachant qu'avant le traitement par les phages aucun bactériophage n'avait été détecté chez ces patients [83].

Il a été montré que la translocation des phages chez les sujets malades était plus élevée que chez les sujets sains. La perméabilité de la barrière intestinale est plus importante chez les malades et permet donc un passage des micro-organismes plus importante [83].

Concernant les traitements topiques, l'étape d'absorption n'est pas une étape limitante puisque les phages sont directement appliqués au niveau des tissus infectés. L'administration topique comprend aussi l'administration des phages par voies pulmonaires grâce à l'utilisation de formes inhalées. Les phages sont sous forme de poudre sèche et sont propulsés au niveau de l'appareil pulmonaire grâce à un inhalateur.

Les phages peuvent circuler dans le sang des sujets malades comme dans celui des sujets sains. Le temps nécessaire pour passer la barrière gastro-intestinale vers la circulation sanguine est variable. Mais à l'heure actuelle, les études ne sont pas suffisantes pour expliquer le mécanisme d'absorption per os. Cette voie est intéressante car elle est non invasive et bien acceptée par les patients. L'un des problèmes réside dans l'étape de translocation des phages, c'est à dire la proportion des phages à pouvoir traverser cette barrière gastro-intestinale. L'autre problème est l'inactivation des phages par l'acidité importante du suc gastrique. D'Hérelle a montré que la lyse bactérienne nécessite un pH alcalin. Le phage n'est pas pour autant détruit car si on neutralise ou alcalinise légèrement le milieu, le phénomène de lyse bactérienne se produit. [89] Une administration per os nécessiterait une alcalinisation préalable de l'estomac par exemple avec l'administration de bicarbonate de soude qui neutraliserait cette acidité gastrique. On pourrait aussi faire des comprimés ou des gélules gastro-

résistants de bactériophages plutôt que de faire des suspensions phagiques. Grâce aux comprimés ou aux gélules, les phages seraient ainsi libérés qu'après être parvenus dans les intestins. De plus l'utilisation des comprimés ou gélules est préférable plutôt que l'alcalinisation de l'estomac qui pourrait poser d'importants problèmes.

D'autres voies sont possibles, plus invasives et moins appréciées par les patients (la voie intramusculaire, la voie intraveineuse, la sous cutanée, etc) mais le taux de phages serait plus important au niveau sanguin que per os. La meilleure voie est l'intraveineuse car elle permet un passage direct dans la circulation sanguine et abolit ainsi l'étape d'absorption, mais les bactériophages sont piégés rapidement par le système réticulo-endothélial. [84]

ii. La distribution [83] [84]

En 1921, Appelmans injectait aux animaux des bactériophages à des doses variables. Après un temps plus ou moins long, il prélevait les organes des animaux afin d'y rechercher la présence des bactériophages. Certains organes prélevés chez les animaux, tués 24h après l'injection, montraient la présence de bactériophages. Cela signifie une migration des bactériophages du sang vers certains compartiments. [85]

En 1943, Dubos et son équipe ont injecté par voie intra-péritonéale, à des souris saines et à des souris atteintes de méningite à *Shigella dysenteria*, des phages anti shiga. Ils ont remarqué que la concentration des bactériophages chez les souris malades au niveau cérébral était considérablement plus élevée que celle dans leur circulation sanguine. De plus, la concentration de phages au niveau cérébral chez les souris malades était plus élevée que celle chez les souris saines. De plus, chez les souris saines, la concentration de phages au niveau cérébral était inférieure à celle trouvée au niveau sanguin. Cette concentration élevée au niveau cérébral des souris malades était due à la multiplication in vivo du phage lytique au contact de la bactérie.

En 2001, Sulakvelidze cite des expériences réalisées par Bogovazova dans lesquelles ce dernier indiquait que les phages après administration orale étaient retrouvés au bout de 2 à 4 heures dans le sang et au bout de 10 heures dans les organes (foie, rate, etc.)

Ces expériences ont montré une distribution des phages dans les organes (foie et rate) et dans l'organe où a lieu l'infection.

iii. Métabolisation [83] [84]

La métabolisation fait référence à la transformation, par réaction enzymatique, d'un médicament pour le rendre inactif afin de l'éliminer du corps. Ces modifications enzymatiques vont permettre de faciliter leur excrétion. (Remarque : pour certains médicaments, cette étape permettra de passer d'une prodrogue (inactive) en une substance active). La grande majorité des médicaments sont de nature chimique. Dans le cas d'un phage, ce dernier ne subit pas de modification chimique puisque le phage est composé principalement de protéines. C'est le système immunitaire de

l'individu qui va diminuer le taux de bactériophage dans l'organisme en le séquestrant puis en l'éliminant.

Cette séquestration ne relève pas d'une action métabolique puisqu'elle ne modifie pas la structure du phage. Malgré la séquestration par le système immunitaire, la multiplication in situ du phage au contact de la bactérie permet de maintenir un taux suffisant pour combattre la bactérie.

iv. Elimination [83] [84]

L'élimination des phages du corps est principalement due à la séquestration de ces derniers par le système immunitaire. Une expérience a été réalisée sur des souris pour étudier l'élimination de phage T4 après une injection intraveineuse. Ils ont étudié la réponse des macrophages du foie et de la rate des souris. Ils ont remarqué une élimination rapide des phages dans la circulation sanguine. Suite à leur élimination, les phages se sont révélés être plus concentrés dans le foie que dans la rate. De plus, ils ont remarqué que les phages sont plus rapidement éliminés dans le foie que dans la rate. [98]. Par contre l'élimination tardive des phages par la rate pourrait être à l'origine d'une réponse immunitaire adaptée avec la fabrication d'anticorps anti-phage. [100]

D'autres études témoignent de l'élimination des phages dans les urines et les selles. Leur élimination dans les urines, après avoir été administrés dans le sang, pourrait s'avérer utile pour le traitement des infections des voies urinaires.

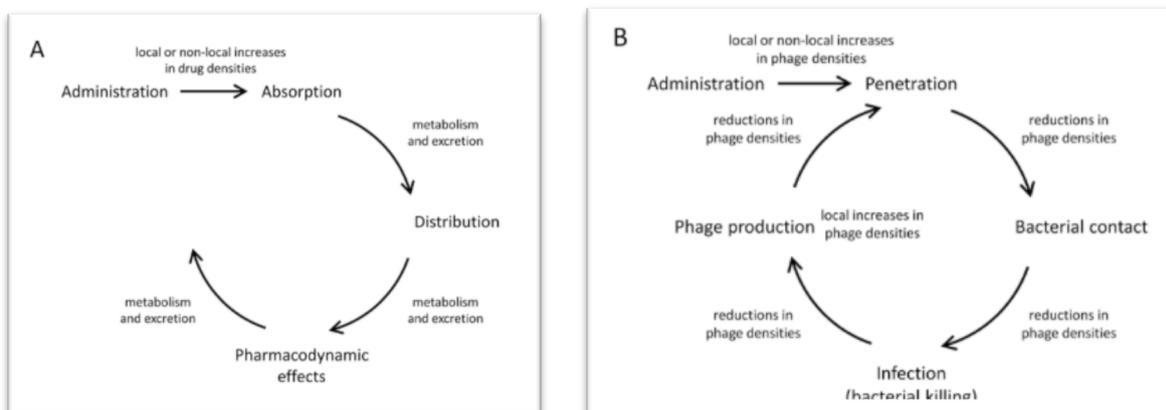


Figure 21 : Différence entre la pharmacocinétique d'un médicament classique et d'un phage [84]

b. Pharmacodynamique

La pharmacodynamique décrit les effets d'un principe actif, ici le phage, sur l'organisme.

i. « Seuil de réplication » ou « seuil de prolifération »

Peu d'études ont été faites sur la pharmacodynamique. Cependant, il en ressort que l'interaction entre le phage et la bactérie est due à une collision aléatoire entre les deux, puisque le phage ne peut activement se déplacer à l'encontre de sa proie bactérienne. De plus, pour qu'une population de phages se multiplie, il est nécessaire que la population de la cellule hôte dépasse une densité critique appelée le « seuil de réplication » ou le « seuil de prolifération ». En dessous de cette densité, la probabilité d'infection du phage est inférieure à la probabilité de son élimination par l'organisme. En conséquence, la capacité du phage à se multiplier est possible que si la population bactérienne à détruire est élevée. Cette hypothèse est connue sous le nom de « Kill the winner ». [92]

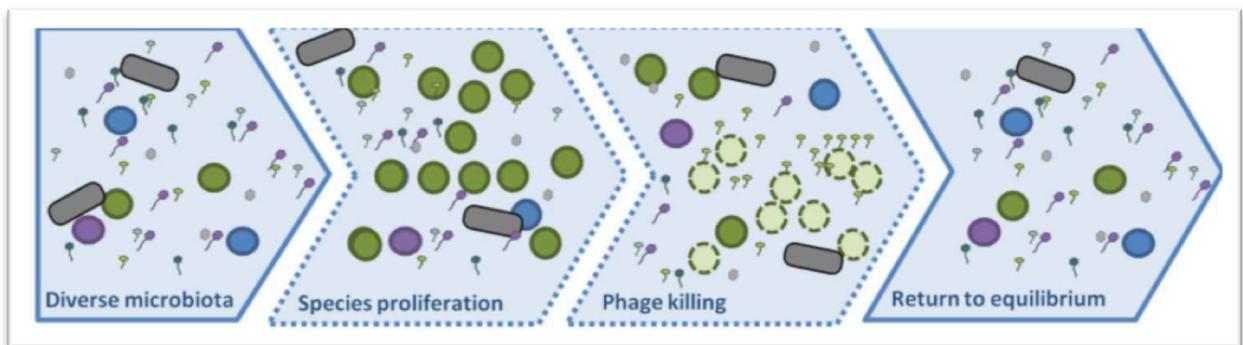


Figure 22 Concept : « Kill the winner » [92]

Etape 1 = Diverse microbiota. Les virus sont plus abondants que les bactéries mais ne les infectent pas à cause de leur faible concentration.

Etape 2 = Species prolifération. Toutefois, si certaines bactéries envahissent et atteignent le « seuil critique » (ici, la bactérie verte), les phages vont pouvoir les tuer : c'est l'étape 3 = Phage killing.

Etape 4 = Return to equilibrium. On a ensuite un retour à l'équilibre.

Légende : rond bleu, vert, violet et rectangle gris = différents types de bactéries



phages =  le vert actif contre la bactérie verte, le violet actif contre la bactérie violette, le gris actif contre la bactérie grise et le bleu actif contre la bactérie bleue

De ce fait, la phagothérapie doit être commencée tôt pour optimiser la guérison mais si on la débute trop tôt, les phages ne pourront pas se multiplier au niveau du site d'infection, car la population bactérienne serait trop faible. La conséquence est que les phages seraient éliminés de l'organisme avant même de pouvoir agir sur les bactéries pathogènes, menant la thérapie par les phages en échec. [86] Cependant, il est difficile de contrôler ce rapport entre bactéries et phages lors de la phagothérapie car on ignore le nombre de bactéries présentes au sein du foyer infectieux.

ii. Interaction avec le système immunitaire

Le rôle du système immunitaire d'un individu est de réagir à l'intrusion d'un organisme étranger. La substance étrangère va ainsi provoquer chez l'organisme infecté des réactions de défenses immunitaires.

➤ Le système immunitaire inné :

Action sur l'activité bactéricide des phagocytes humains :

Les polynucléaires, les monocytes (monocyte = cellule circulant dans le sang, macrophage= monocyte différencié en macrophage dans les tissus) et les cellules dendritiques sont des cellules réalisant la phagocytose.

Les polynucléaires sont les premières cellules à intervenir lors d'une infection bactérienne (surtout les polynucléaires neutrophiles). Ils constituent l'un des plus puissants systèmes de défense de l'homme. Ils phagocytent puis tuent les agents pathogènes (bactéries et champignons) grâce à deux mécanismes bactéricides agissant en coopération. Ils possèdent des substances lytiques et cytotoxiques dans leurs granules. Lors de la formation du phagosome, ces granulations fusionnent avec ce dernier afin de détruire le pathogène. Le deuxième mécanisme est le système bactéricide oxygène-dépendant. On parle d'« explosion oxydative ». Il est à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces substances synthétisées agissent à l'intérieur même du polynucléaire sur les substances à phagocytet et dans le milieu extracellulaire endommageant le milieu environnement (tissus, organes).

La phagocytose chez les macrophages est un processus plus lent que celle des polynucléaires neutrophiles. La digestion des substances phagocytées est souvent incomplète. Cela permet de présenter les antigènes aux lymphocytes et donc la formation d'anticorps anti-antigène. Ils libèrent aussi des substances toxiques dans le milieu extracellulaire, au même titre que les polynucléaires.

Les cellules dendritiques jouent quant à elles, un rôle de cellule phagocytaire et de cellule présentatrice d'antigènes. Elles ont un rôle dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

Une étude a montré que les bactériophages ne s'opposaient pas aux activités bactéricides des phagocytes humains. [101]

Action sur l'activation des cellules phagocytaires :

De plus, ils ne stimulent pas les cellules phagocytaires. En effet, parmi les mécanismes responsables de la reconnaissance des structures virales par le système immunitaire humain, il y a les Toll Like Receptor (TLR). Ils sont au nombre de dix chez l'homme. Ils interviennent au cours des mécanismes de l'immunité innée. Ils reconnaissent les Patterns Pathogen Associated Molecular (PAMP). Les acides nucléiques viraux agissent comme des PAMP et sont reconnus par plusieurs TLRs (les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont impliqués dans la reconnaissance des nucléotides viraux tels que l'ARN double brin, l'ARN simple brin et l'ADN). Mais jusqu'à présent, aucun TRL reconnaissant des composants spécifiques des phages n'a été décrit. [92]

Une étude a été faite sur les protéines de la capsidie du phage T4. Ils ont étudié les réponses immunitaires face aux protéines gp23, gp 24, Hoc et Soc qui forment la majeure partie de la surface de T4 et qui sont donc fortement exposées à l'environnement. Ils ont évalué la variation des taux de cytokines et des espèces réactives de l'oxygène (ERO) lorsque l'organisme est au contact avec le phage T4. Les cytokines et les ERO jouent un rôle important dans la régulation des fonctions cellulaires et dans les réponses immunitaires. De plus, leur surproduction est nocive pour les cellules et les tissus. Il a été montré que le phage T4 et ses protéines ne stimulent pas la production de cytokines, ni celle des espèces réactives de l'oxygène. [99]. [101]

Modulation de la réponse inflammatoire :

Il a été observé chez les souris que des bactériophages, préalablement fixés à la surface d'une bactérie, peuvent être phagocytés par les macrophages. Ils effectuent leur cycle lytique dans le macrophage. Ceci provoque une réduction significative du nombre de bactéries intracellulaires et réduit les dommages cytotoxiques qu'elles provoquent. Il a été montré aussi que les bactériophages pouvaient moduler la réponse immunitaire, ils peuvent diminuer la sécrétion des cytokines et des ERO

Ces observations peuvent être un argument en faveur de la phagothérapie car ils ne diminuent pas l'action des cellules immunitaires de l'individu et ne stimulent pas la réponse immunitaire. Mais ils peuvent moduler la réponse immunitaire en diminuant les effets néfastes sur les tissus et organes des substances libérées par les cellules de l'immunité.

Impact des bactériophages sur le système immunitaire :

Selon plusieurs expériences, on a observé chez l'organisme soit une immunostimulation, soit une immusuppression soit une immunotolérance du système immunitaire. Les interactions des phages avec le système immunitaire provoquent des réactions diverses. Cela est vraisemblablement dû au fait que les phages sont retrouvés en temps normal sur le revêtement cutanéomuqueux des êtres vivants et leur système digestif. Ils ont même été découverts dans le sang de sujets malades comme dans celui des sujets sains [75]. Pour certains, ils arriveraient dans l'écosystème microbien humain avec les premières tétées du nourrisson, notamment ceux participant au microbiome humain [90].

Les études métagénomiques appliquées aux virus ont mis en évidence leur prévalence dans presque tous les écosystèmes microbiens étudiés. L'observation de ces « viromes » (=ensemble des génomes d'une population virale, retrouvé dans un même organisme ou dans un même environnement) a mis en évidence l'importance des virus dans tous les écosystèmes microbiens. On a pu observer la présence des virus des trois règnes de la vie, cependant la fraction virale est essentiellement composée de virus infectant le règne des bactéries : les bactériophages [92]. L'influence des bactériophages (lytiques ou lysogènes) est assez complexe sur les écosystèmes microbiens humains. Ils peuvent avoir un impact vital dans le maintien de la diversité bactérienne en empêchant la prolifération de certaines espèces bactériennes ou des souches par rapport aux autres. Les phages aident ainsi à la constitution d'un microbiome humain sain. En effet,

des chercheurs ont découvert que la capsid des bactériophages affichait des protéines « immunoglobuline-like » qui interagissent avec la mucine (protéine intervenant dans la composition du mucus) présente dans la muqueuse gastro-intestinale. En conséquence, les bactériophages du microbiome intestinal, concentrés à la surface du mucus, se répliquent et tuent les bactéries qui se présentent. La lyse bactérienne limite la concentration locale des bactéries et protège les cellules épithéliales de la muqueuse gastro-intestinale. Il en résulte un équilibre homéostatique à la surface du mucus et fournit à l'hôte un mécanisme de défense de la muqueuse intestinale. [101]

Mais ils peuvent aussi avoir un impact négatif comme par exemple avec les phages lysogènes connus pour « armer » les bactéries avec des gènes de virulence, convertissant une souche bactérienne bénigne en une souche pathogène. L'interaction complexe entre les phages et les bactéries chez l'homme est encore largement inexplorée. Mais il en ressort que les phages ont un double rôle : ce sont des médiateurs de la santé humaine mais aussi de la maladie. On parle de « The Janus-Face of phages ».

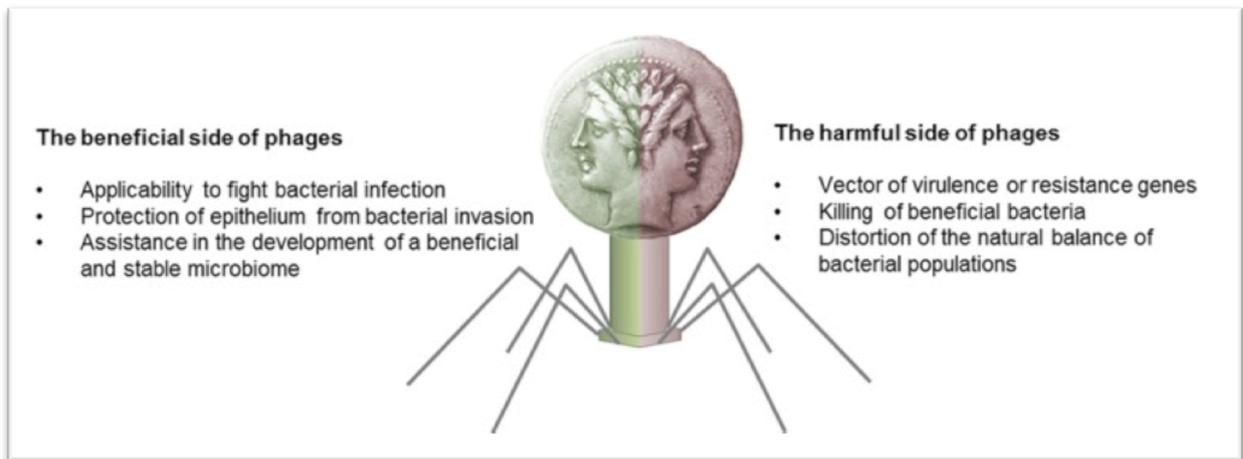


Figure 23 : « The Janus-Face of phages ». [91]

➤ Le système immunitaire acquis

Mais ils sont cependant suffisamment immunogènes, c'est à dire qu'ils ont la capacité d'induire des réponses immunitaires spécifiques, notamment la production d'anticorps dirigée contre les antigènes du phage. De plus, l'utilisation répétée d'un phage en tant qu'agent thérapeutique stimulerait les cellules mémoires et entraînerait aussi la production d'anticorps. Ces anticorps peuvent être un facteur limitant l'efficacité de la phagothérapie. Cependant, l'impact de ces anticorps sur l'efficacité des traitements, pour certains bactériophages, semble relativement modéré. Peut-être dû à la capacité des bactériophages d'échapper à l'inactivation par une modification des motifs antigéniques de leur capsid. [101]

Cependant la façon dont les phages contribuent à ces interactions avec le système immunitaire n'est pas encore élucidée. Il faudra attendre une meilleure connaissance de l'immunogénicité des phages et leurs interactions possibles avec les cellules du système immunitaire avant leurs applications chez les patients.

Les données actuellement disponibles ne permettent pas de déterminer les paramètres pharmacologiques et pharmacodynamiques des phages. La propriété du phage à s'auto-amplifier au niveau du site d'infection et à s'auto-limiter une fois la bactérie détruite, fait du phage un médicament à part.

Dans ce contexte, deux essais ont été lancés, Phagoburn et PHOSA, afin d'apporter de nouvelles connaissances dans ce domaine. L'essai Phagoburn a été lancé le 1^{er} juin 2013. C'est le premier essai clinique sur la phagothérapie répondant aux normes dans l'évaluation clinique. C'est un projet européen. Les phases I et II des essais cliniques ont été lancées en juillet 2015. Le projet évaluera deux cocktails de phages dans les infections cutanées à *Escherichia coli* et à *Pseudomonas aeruginosa* chez les grands brûlés [62]. En France, le projet PHOSA a été lancé en janvier 2015. Ce projet fut initié par la PME Pherecydes Pharma qui est l'unique entreprise française spécialisée dans la phagothérapie. Ce projet a pour objectif de mettre au point un cocktail de bactériophages lytiques efficace contre les infections ostéoarticulaires à *Staphylococcus*. [87] [88]

IV. La phagothérapie aujourd'hui

La découverte des premiers antibiotiques et leurs introductions sur le marché dans les années 40 ont permis une révolution pour combattre les infections bactériennes. Le tout premier antibactérien date de 1932 avec le Prontosil (sulfamide) et le premier véritable antibiotique, la pénicilline, a été utilisé au début des années 40. Cependant, l'utilisation massive, répétée et parfois inadaptée des antibiotiques en santé humaine et animale a favorisé le développement de souches bactériennes résistantes.

1. Résistances bactériennes

Les résistances bactériennes aux antibiotiques ont été identifiées dès leurs introductions dans l'arsenal thérapeutique.

Antibiotique	Année d'introduction	Apparition des premières résistances
Sulfamides	1936	1940
Pénicilline G	1943	1946
Streptomycine	1943	1959
Chloramphénicol	1947	1959
Tétracycline	1948	1953
Erythromycine	1952	1988
Ampicilline	1961	1973
Ciprofloxacine	1987	2006

Figure 24 : Tableau indiquant l'année d'introduction des antibiotiques sur le marché et l'année d'apparition des premières résistances [102]

Malgré l'apparition de ces résistances, ce phénomène n'était pas considéré comme important puisque de nouveaux antibiotiques étaient régulièrement remis sur le marché et permettaient ainsi de remédier à ces résistances.

Mais depuis quelques dizaines d'années, la frénésie des débuts s'est amoindrie sous l'effet des succès des antibiotiques et de la baisse des remboursements n'attirant plus les investissements dus au manque de rentabilité. Ainsi la découverte de nouveaux antibiotiques, à l'heure actuelle, est au point mort. Seules quelques molécules ont été découvertes depuis les années 2000. Cela ne suffisant plus à remédier aux résistances bactériennes, on a vu ainsi apparaître l'émergence de bactéries multirésistantes (BMR).

a. Définition BMR

Une bactérie est dite multirésistante aux antibiotiques lorsque, du fait de l'accumulation des résistances naturelles et/ou acquises, elle n'est plus sensible qu'à un petit nombre d'antibiotiques habituellement actifs en thérapeutiques. Cependant elle n'est pas plus virulente qu'une bactérie non résistante de la même espèce. La multirésistance concerne les bactéries responsables d'infections communautaires et les bactéries responsables d'infections nosocomiales (infections associées aux soins, contractées au cours d'une hospitalisation).

Les BMR sont:

- Staphylococcus aureus résistant à la métiline = SARM
- Enterobactérie productrice de betalactamase = EBLSE (Escherichia coli et Klebsielle pneumonia résistante aux céphalosporines de 3^{ème} génération)
- Entérocoque résistant à la vancomycine = ERV
- Pneumocoque à sensibilité diminuée à la pénicilline = PSDP
- Acinetobacter baumannii multirésistants = ABMR
- Pseudomonas aeruginosa multirésistants = PAMR

Il existe aussi les Bactéries Hautement Résistantes Emergentes (= BHRe). Ces bactéries sont résistantes à la plupart des antibiotiques. Elles sont responsables seulement d'infections nosocomiales. En France, les cas sont sporadiques.

Sont concernées :

- Les entérocoques résistants aux glycopeptides = ERG (exemple: *Enterococcus faecium*)
- Les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes par production d'une carbapénémase = EPC

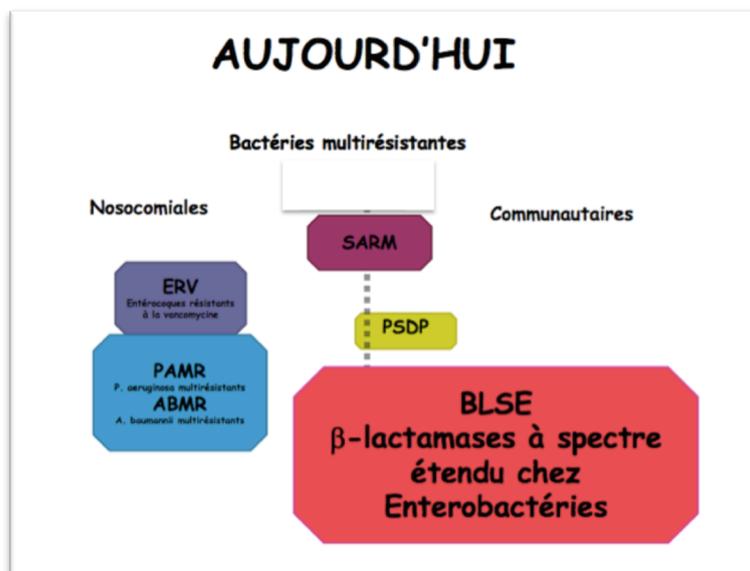


Figure 25 : Répartition des BMR en 2015 [103]

i. Epidémiologie BMR [60]

D'après l'étude Burden BMR, Le nombre annuel de cas d'infections à BMR, tous sites infectieux confondus, a été estimé à environ 158 000 cas en France en 2012, dont près de 16 000 infections invasives (bactériémies, méningites, qui sont de pronostics graves). 20 à 30% des infections aux BMR étaient liées aux soins (=infections nosocomiales).

La majorité des cas d'infections à BMR était due :

- à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline : 33%
- à *Escherichia coli* résistant aux Céphalosporines de 3^{ème} génération : 32%
- à *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes : 23%
- à *Klebsiella pneumoniae* résistant aux Céphalosporines de 3^{ème} génération : 10 %

Les sites infectés :

Les infections à SARM les plus fréquentes sont les infections de la peau, des tissus mous et des infections du site opératoire. Elles représentent 42 à 45% des infections à SARM

Concernant les infections à *Escherichia coli* résistant au C3G, les infections urinaires représentent 40 à 61 % des infections à *Escherichia coli* résistant au C3G.

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes sont majoritairement des infections respiratoires. Elles représentent 48 à 64 % des infections à *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes.

Mortalité :

Le nombre annuel de décès directement attribué à ces infections en France est estimé à 12 500, dont 2700 liés à des infections invasives. Les infections à SARM, *Escherichia coli* résistant aux C3G et *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux carbapénèmes sont responsables de 88% des décès

Conclusion du rapport Burden :

Au vu de ces chiffres, on peut mesurer que l'impact des infections aux BMR est important. De plus, ces résultats sont sous estimés car seules les BMR les plus fréquentes ont été étudiées dans ce rapport et l'étude n'incluait pas toutes les BMR. De plus, seules les infections prises en compte étaient celles diagnostiquées à l'hôpital.

b. Les plans d'actions contre les résistances bactériennes

Le phénomène de résistance aux antibiotiques, sous estimé au début, est devenu aujourd'hui un grave problème de santé publique dans le monde entier.

Dans les années 1990, un ensemble de mesures concernant la promotion du bon usage des antibiotiques et du contrôle des résistances bactériennes a été mis en place. La première résolution vient de l'Assemblée Mondiale de la Santé qui adopta en 1984 l'usage prudent des médicaments, dont les antibiotiques. [104]

A partir de cette date, des actions internationales et nationales se sont mises en place dans le cadre de la politique du bon usage des antibiotiques. Pour exemple, la France, comptait 100 millions de prescriptions d'antibiotiques par an en moyenne à la fin des années 90. Elle était l'un des plus grands consommateurs d'antibiotiques. De ce fait, la maîtrise de la diffusion des bactéries résistantes était devenue une priorité.

Elle fonde en 1997 l'ONERBA (= Observatoire National de l'Epidémiologie de la Résistance Bactérienne aux Antibiotiques) dont le seul but est de surveiller l'évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques. En 2001, la France met en place le premier plan d'action pluriannuel 2001-2005 ayant pour objectif de maîtriser la prescription des antibiotiques et donc leurs consommations tant en ville qu'à l'hôpital. [105]

Le second plan 2007-2011 poursuit les actions menées lors du premier plan et propose de nouvelles réflexions.

Le troisième plan 2011-2016 intitulé «plan national d'alerte sur les antibiotiques» met en exergue la menace majeure de santé publique face au développement grandissant des résistances bactériennes. Ces résistances peuvent mener dans certaines situations à une impasse thérapeutique.

c. La consommation des antibiotiques en France :

i. Définitions :

DDJ = Doses Définies Journalières, établie selon l'OMS. La DDJ détermine une posologie de référence pour un adulte de soixante-dix kilogrammes dans l'indication principale de chaque molécule. Cette dose moyenne ne reflète pas forcément la posologie recommandée par l'AMM ni la posologie effective. La DDJ est un indicateur de mesure permettant les comparaisons de consommations d'une substance active ou d'une classe de médicaments. Par convention, les résultats sont présentés pour mille habitants et par jour (DDJ/1000H/J)

Pour la consommation hospitalière il y a deux indicateurs soit la DDJ/1000 habitants/jour ou soit la DDJ/1000 journées d'hospitalisation. Ce deuxième indicateur permet de relier la consommation des antibiotiques à l'activité hospitalière.

ii. La consommation des antibiotiques en ville



Figure 26 : Evolution de la consommation globale d'antibiotiques en secteur de ville France, 2004-2014
Nombre de DDJ pour 1000 habitants et par jours en fonction de l'année [106]

D'après la courbe, la consommation en 2014 a diminué après trois années de hausse consécutives (2011, 2012, 2013). Malgré la diminution de la consommation globale des antibiotiques, elle est toujours importante. En effet la consommation en 2014 est supérieure à 6,7% à celle observée en 2004 (année où la consommation en France était au plus bas).

La consommation nationale était de 30,1 DDJ/1000 habitants/jour en 2013. Elle était plus élevée que la consommation moyenne au sein des pays de l'Union européenne qui était de 22,4 DDJ/1000 habitants/jour la même année, ce qui place la France au 2^{ème} rang des pays les plus gros consommateurs d'antibiotiques derrière la Grèce. [106]

iii. La consommation des antibiotiques dans les établissements de santé

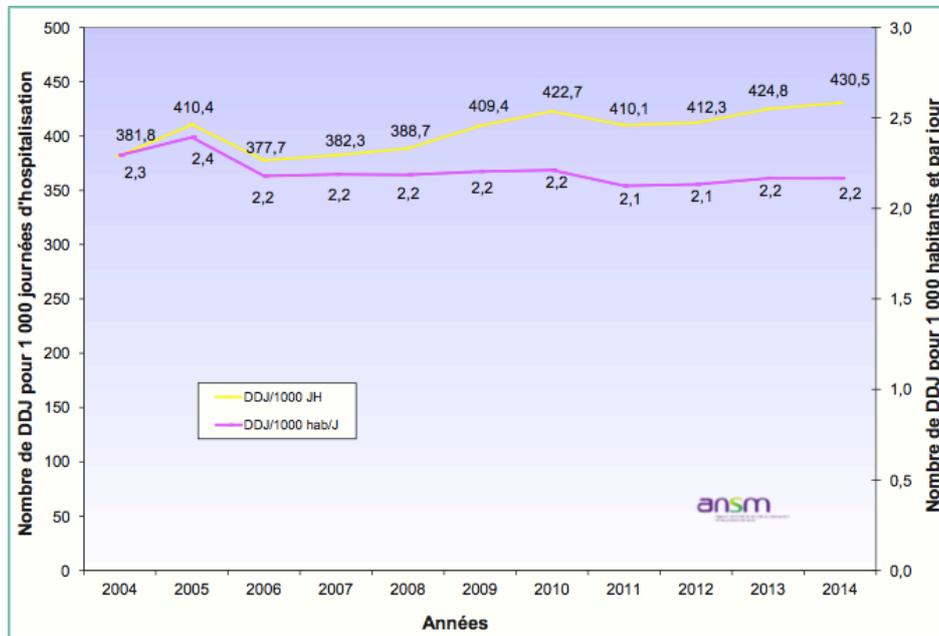


Figure 27 : Evolution de la consommation globale d'antibiotiques dans les établissements de santé. [106]

L'interprétation des courbes varie en fonction de l'indicateur utilisé. Lorsqu'on observe la courbe de la DDJ/1000 habitants/jour, la consommation paraît stable depuis 2006. Lorsqu'on observe la courbe des DDJ/1000 journées d'hospitalisation, la consommation d'antibiotique augmente.

Ceci est dû au fait que la population française augmentant chaque année, le rapport DDJ/1000 habitants/jour, par conséquent, diminue. Tandis que le nombre de journées d'hospitalisation diminue d'année en année (développement de l'hospitalisation ambulatoire), le rapport DDJ/1000 journées d'hospitalisation augmente donc.

De ce fait, on ne peut pas conclure réellement sur la baisse ou la hausse de la consommation des antibiotiques dans les établissements de santé. D'après les données de l'ESAC-NET (European Center for Disease Prevention and Control), en 2012, la France se situait au 5ème rang des pays les plus consommateurs à l'hôpital. (ESAC-NET est un réseau recueillant et analysant les données sur la consommation d'antimicrobiens de l'Union Européenne que ce soit au niveau communautaire ou dans le secteur hospitalier.) [106]

iv. L'évolution des résistances bactériennes depuis 10 ans

(Les données recueillies sont issues de prélèvement d'infections invasives)

➤ Les résistances bactériennes aux antibiotiques dans les établissements de santé

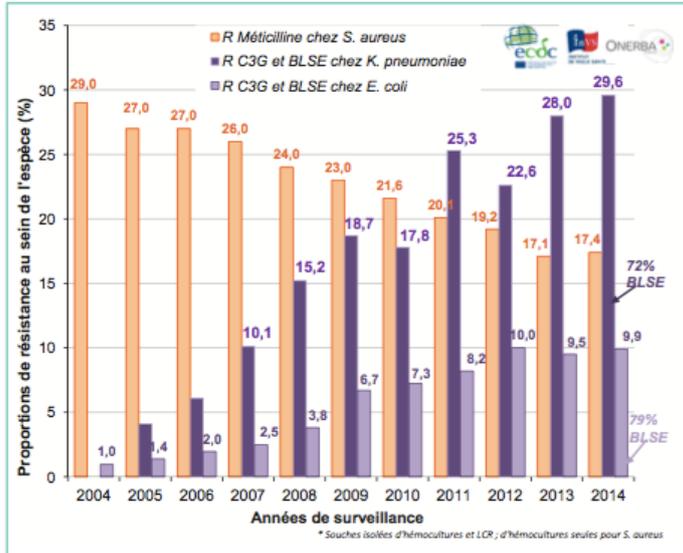
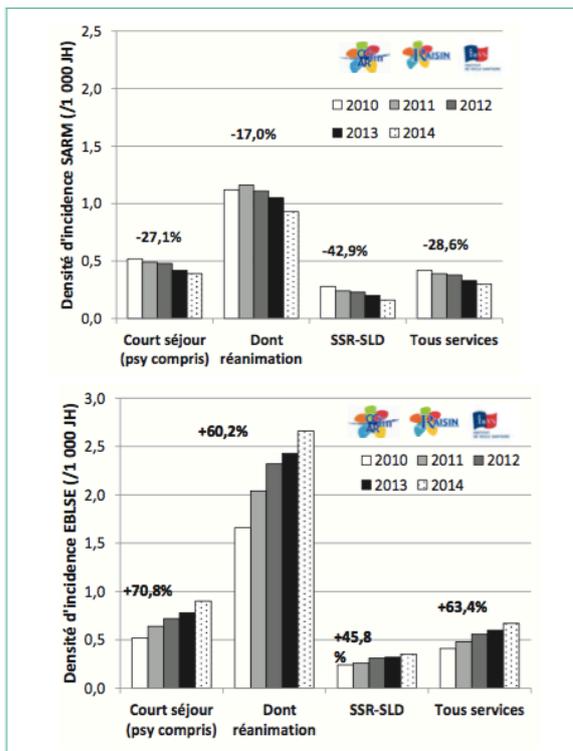


Figure 28 : Evolution de la résistance à la méticilline chez le staphylococcus aureus, et aux céphalosporines de 3^{ème} génération chez Klebsiella pneumoniae et Escherichia coli, 2004-2014, données EARS-Net France-InVS [106]

Les données montrent une diminution de la proportion des SARM dans les prélèvements d'infections invasives bien que l'on peut constater une stabilisation depuis 2014. Cette tendance se confirme aussi par une diminution de l'incidence des SARM dans tous les services.

A l'inverse, les Entérobactéries productrices de betalactamase sont en constante augmentation depuis 10 ans dans les infections invasives. Cette augmentation se retrouve aussi sur l'incidence des EBLSE, quels que soient les services. Il est à noter que les résistances sont plus importantes pour les souches Klebsiella pneumoniae que pour les souches d'Escherichia coli



JH = Journée d'hospitalisation.

Figure 29 Evolution de l'incidence des SARM et EBLSE par secteur d'activité hospitalière, France, 2010-2014, données BMR- Raisin - InVS [106]

SSR = Soins de Suite et de Réadaptation, SLD= Soins de Longue Durée

➤ Les résistances bactériennes aux antibiotiques en ville

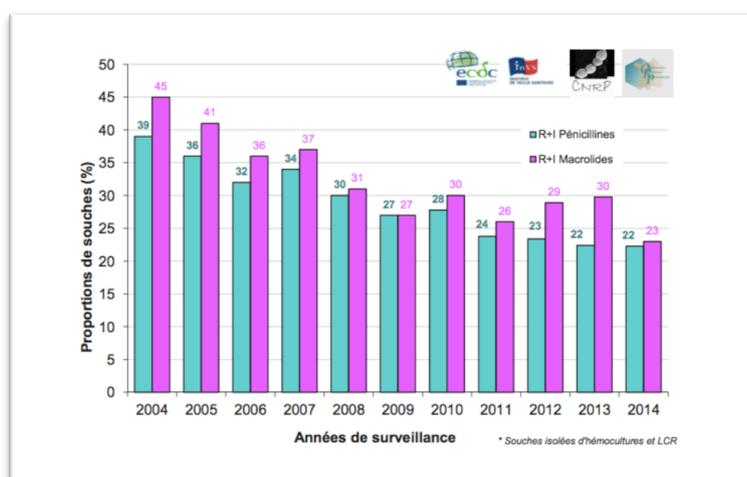


Figure 30 : Résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque en France. 2004-2014, données EARS-Net France CNRP-ONERBA. INVS [106]

La résistance aux antibiotiques chez *Streptococcus pneumoniae* est en baisse depuis 10 ans. La résistance à la pénicilline est passée de 39% en 2004 à 22% en 2014. On note cependant une stagnation des résistances depuis 2014. De plus, la résistance aux Beta-lactamines est associée dans plus de 50% des cas à la résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques (cyclines, macrolides, etc). L'étude de la résistance aux macrolides, montre, elle aussi une diminution depuis 10 ans.

Les mesures mises en place depuis les années 2000, notamment grâce à la bonne pratique des antibiotiques et la poursuite des efforts pour les mesures d'hygiène, ont contribué à la diminution de l'expansion des résistances chez certaines souches bactériennes (SARM, PSDP). Par contre, chez les entérobactéries, la diffusion des résistances augmente malgré les mesures. Cette situation favorise l'émergence de bactéries hautement résistantes pouvant mener à des impasses thérapeutiques. Les actions menées pour préserver l'efficacité des antibiotiques doivent être poursuivies, mais en parallèle, la recherche d'autres alternatives doit continuer. La phagothérapie pourrait, peut être, être l'une des solutions aux résistances bactériennes.

2. Les avantages de la Phagothérapie:

a. La spécificité des phages :

Un phage n'attaque qu'une seule espèce bactérienne et même souvent seulement certaines souches de l'espèce. Ainsi son spectre est très limité et la destruction par le phage ne concerne que la bactérie que l'on souhaite éliminer. Contrairement aux antibiotiques qui détruisent sans discerner les bactéries pathogènes de celles commensales de l'être humain, à l'origine de nombreux effets indésirables. Ainsi, l'attaque ciblée des phages permettrait d'éviter ces effets secondaires néfastes et d'épargner la flore de l'individu.

En contrepartie de cette spécificité, les pathogènes à l'origine de l'infection à traiter devront être identifiés afin de mettre en place le traitement. Cependant il existe de nombreux phages différents pour une espèce bactérienne donnée. Dans des situations d'urgences, on ne peut pas attendre les résultats d'identification des prélèvements bactériens. Pour pallier cela, il est possible d'utiliser un cocktail de bactériophages offrant un « spectre plus large » ayant des spectres d'activités complémentaires permettant d'attaquer le plus de souches de l'espèce bactérienne suspectée dans l'infection.

b. L'action bactéricide

Le cycle répliatif des bactériophages lytiques permet la destruction efficace des bactéries cibles : ils ont un effet bactéricide. De plus, leur réplication au niveau même du foyer infectieux permet leur amplification augmentant ainsi l'efficacité du traitement. Cette amplification n'est pas retrouvée avec les antibiotiques. Il est nécessaire de renouveler la dose d'antibiotique pour obtenir une concentration en principe actif suffisante pour pallier leur élimination par l'organisme. Contrairement aux phages, grâce à leur amplification au niveau du site d'infection, une seule dose devrait en théorie être suffisante, car leur élimination sera compensée par cette multiplication in situ. Pour cette raison, les phages sont qualifiés de médicaments « intelligents », autorépliquants et autolimitants, parce qu'ils ne se multiplient qu'en présence des bactéries cibles. [75]

c. Destruction du biofilm bactérien

i. Qu'est ce qu'un biofilm

Un biofilm est décrit comme « un assemblage de micro-organismes (bactéries, champignons) et les produits extracellulaires associés (EPS= Extracellular Polymeric Substance), et ordinairement attachés à une surface abiotique ou biotique » (M.E Davey et G.A O'Toole, 2000) [107]

La partie proprement microbienne du biofilm représente environ 10 à 15% de la masse et la partie EPS représente la masse la plus importante: 85 à 90%. La composition de l'EPS varie selon les micro-organismes présents, de l'environnement physico-

chimique et des substances nutritives disponibles. L'EPS est principalement composé de polysaccharides (exopolysaccharides), de protéines, d'ADN bactériens, de lipides et substances humiques (= résultat de la décomposition des matières organiques).

Les biofilms sont en règle générale mixtes, c'est à dire polymicrobiens. Les biofilms monospécifiques, c'est à dire constitués d'une seule espèce, sont rarement répandus dans la nature.

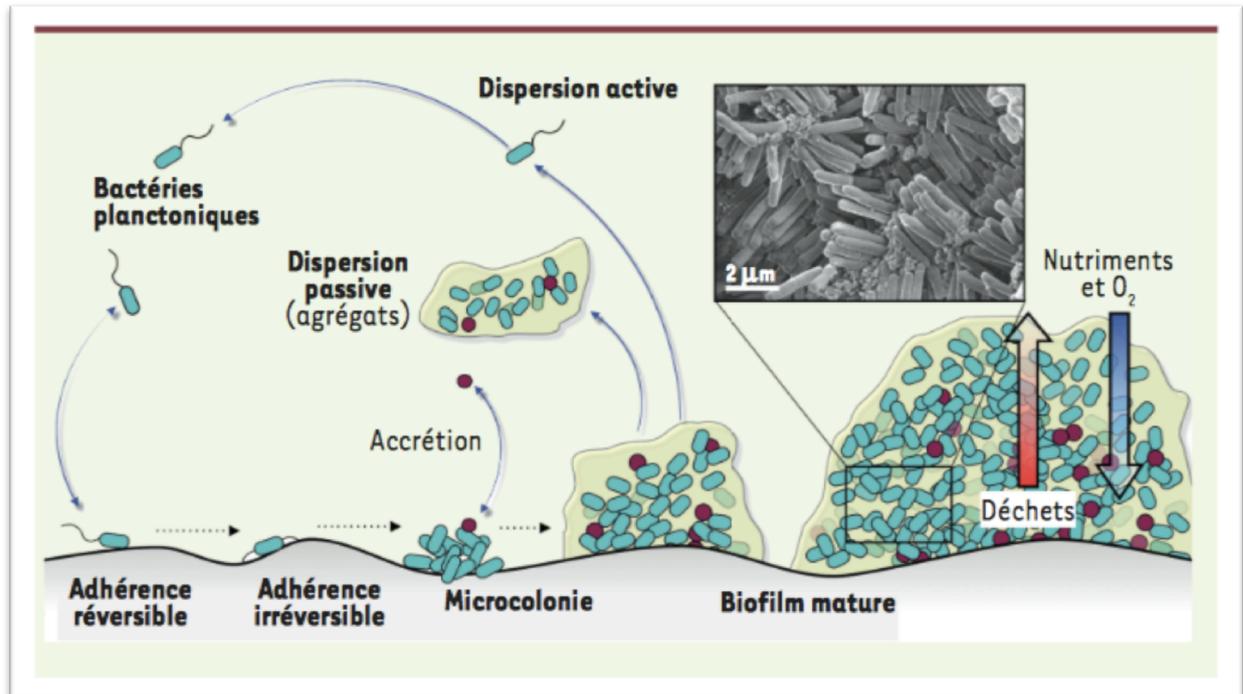


Figure 31 : Développement et structure d'un biofilm bactérien. [108]

Après les phases d'adhérence réversible puis irréversible, la bactérie fonde une microcolonie qui produit une matrice extracellulaire (en jaune) et qui peut accueillir d'autres espèces microbiennes par accrétion. Le biofilm mature est le site de gradients inverses en nutriments (flèche bleue) et en déchets (flèche rouge) définissant des niches physiques et chimiques. Il peut se disperser et libérer des bactéries mobiles (dispersion active) ou des agrégats bactériens entourés de matrice (dispersion passive). Une photographie de microscopie électronique d'un biofilm d'*E. coli* développé *in vivo* sur cathéter est présentée en insert (© Benjamin Le Quéré, unité de génétique des biofilms, institut Pasteur et Brigitte Arbeille et Claude Lebos, LBCME, faculté de médecine de Tours).

ii. Etapes de formation d'un biofilm [109]

- **Etape 1:** Adhésion réversible : A ce stade, les microbes sont faciles à éliminer.
- **Etape 2 :** Adhésion irréversible, l'ancrage devient plus fort et plus difficile à éliminer. Les microbes se regroupent en microcolonies
- **Etape 3 :** Microcolonies. Une fois bien ancrés, les microbes se différencient grâce à un type de communication appelé « Quorum Sensing ». Le Quorum Sensing (QS) est un mode de signalisation bactérien qui repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées «auto-inducteurs». Les bactéries communiquent les unes avec les autres par détection du quorum. Il s'agit d'un mécanisme important pour leur développement, leur virulence, leur motilité et la formation de biofilms. Elles commencent à agir comme des organismes multicellulaires. [110]
- **Etape 4 :** Biofilm mature. Le Biofilm grandit, il devient mature et complexe. Sa matrice grossit et forme des canaux aqueux appelés «Water filled channels» qui permettent de faire circuler l'eau, les nutriments et les déchets.
- **Etape 5 :** Dissémination. Certains microbes se séparent du biofilm et retournent à un mode de vie planctonique (une des deux formes végétatives, la deuxième étant le mode de vie en biofilm), ce qui leur permet d'aller s'adhérer sur de nouvelles surfaces vivantes ou inertes. Dans le mode de vie planctonique, les bactéries se développent séparées les unes des autres, libres et indépendantes. Ce mode de vie est rarement rencontré hors des laboratoires car les conditions de vie (commensale, saprophyte ou pathogène) sont souvent hostiles.

iii. Destruction du biofilm par les bactériophages :

Chez l'homme, les bactéries produisant un biofilm mettent en péril l'efficacité des traitements antibiotiques et leur permet d'échapper aux défenses de l'hôte. Les antibiotiques ne pouvant diffuser totalement ou de façon réduite dans le biofilm, les bactéries perdurent ainsi dans l'organisme. Les phages contrairement aux antibiotiques sont en mesure de cibler les bactéries au sein de biofilms. De plus le nombre élevé de bactéries présentes dans les biofilms, facilite l'action des bactériophages en leur permettant une infection rapide et efficace de l'hôte grâce à leur amplification suite à l'infection.

La première observation de la destruction d'un biofilm par les phages remonte à 1956 par Adams et Park. Ils ont mis en évidence que les bactériophages produisaient une enzyme (dépolymérase) capable de dégrader les polysaccharides présents dans le biofilm.

Lindberg montre en 1977, que l'enzyme se situe sur la plaque basale du bactériophage. Cependant la lyse du biofilm de la bactérie par le bactériophage ne peut se faire que si la bactérie est sensible au bactériophage et de la capacité de l'enzyme portée par le phage à dégrader les EPS du biofilm.

En effet les composants de l'EPS sont différents en fonction de l'espèce bactérienne qui les a produits. Ainsi une dépolymérase active contre les polysaccharides produits par une espèce, ne peut pas digérer ceux fabriqués par d'autres espèces bactériennes.

Les biofilms étant pour la plupart polymicrobiens, l'utilisation d'un seul type de phages ne serait pas suffisant pour dégrader le biofilm. De multiples dépolymérase seraient nécessaires pour assurer la destruction du biofilm. D'autres études ont montré que les phages sembleraient prévenir la formation de biofilm.

Cependant tous les phages ne sont pas efficaces et il faudrait vérifier in vitro dans leurs génomes qu'ils contiennent bien les gènes codants pour les enzymes capables de détruire le biofilm. On peut le vérifier grâce à un « antifilmophagogramme »

Cette capacité de destruction est un argument positif dans l'utilisation des phages en thérapeutiques, car de nombreuses bactéries rencontrées en pathologie humaine produisent des biofilms. [111], [112]

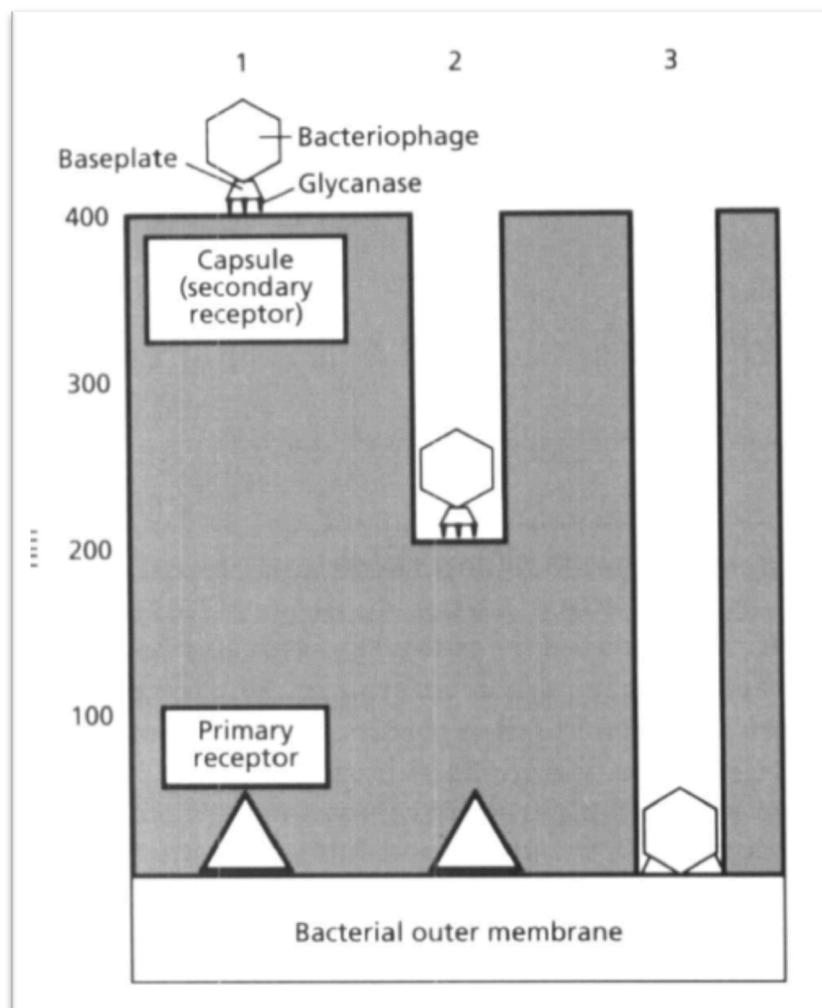


Figure 32 : Schéma de la dégradation du biofilm bactérien par une enzyme dépolymérase phagique (la glycanase). [113]

Cette dégradation se déroule en trois étapes : l'étape 1 : le phage l'enzyme (glycanase) se lie sur des récepteurs de la capsule du biofilm appelés « récepteurs secondaires », il sécrète ensuite son enzyme (ici, la glycanase) étape 2 : l'enzyme dégrade les polymères présent dans le biofilm jusqu'à la découverte de bactéries. Etape 3 : une fois la bactérie trouvée, il se fixe sur des récepteurs situés sur la surface cellulaire de la bactérie, appelés « récepteurs primaires ».

d. Le coût :

C'est l'un des arguments favorable à la phagothérapie. En effet, l'obtention facile de phages dans l'environnement et le faible coût de leur préparation font de la phagothérapie, un traitement peu onéreux en comparaison aux antibiotiques.

3. Les limites

Tous les phages ne sont pas aptes à être utilisés en phagothérapie. De plus, les phages n'ont aucune action sur les infections fongiques, parasitaires et virales. Dans la mesure où leur cible est la bactérie, seules les infections bactériennes auront une indication dans les traitements pas les phages. Les limites sont :

a. Liés au cycle d'infection du bactériophage :

Le choix des phages doit être correctement réalisé. Il est nécessaire d'utiliser que les phages lytiques qui exécuteront un cycle qui aboutira à la lyse bactérienne. Donc sont à exclure les phages lysogènes car d'une part ils ne détruisent pas les bactéries lors de leur cycle lysogénique sauf si, suite à des facteurs externes environnementaux, ils sortent de leur cycle lysogénique pour basculer vers le cycle lytique. D'autre part, ils peuvent modifier le génome des bactéries en apportant des vecteurs potentiellement dangereux pour le malade.

Seuls les phages lytiques seront utilisés dans la phagothérapie.

b. Liés à la spécificité :

La spécificité d'un bactériophage est étroite, car il est limité à la bactérie pathogène que l'on souhaite détruire. Bien que la spécificité présente des avantages, elle impose l'isolement et l'identification précise du germe et ne permet pas vraiment des traitements probabilistes.

Pour éviter d'isoler et d'identifier la souche bactérienne en cause, il faudrait pouvoir utiliser des cocktails qui seraient actifs à 100% sur la bactérie à cibler. C'est à dire sur toutes les souches pathogènes de l'espèce bactérienne que l'on souhaite détruire. Pour les traitements d'urgences, on pourrait utiliser des cocktails de bactériophages actifs contre les pathogènes suspectés dans l'infection. Cela permettrait un traitement d'attaque en attendant les résultats bactériologiques.

c. Liés à la pharmacologie et pharmacodynamique des phages.

Les contraintes pharmacologiques et pharmacodynamiques des phages nécessitent de prendre quelques précautions.

En effet, l'infection d'un bactériophage avec la bactérie se fait grâce aux collisions aléatoires entre les deux. Or, lors d'administration systémique de bactériophages, ceux-ci vont circuler dans l'organisme de manière aléatoire, il y a donc de fortes chances qu'une partie seulement des phages atteigne le lieu d'infection. C'est pourquoi il est judicieux d'apporter les bactériophages au site infecté.

Les infections affectant les tissus semblent aussi théoriquement plus difficiles à combattre que celles locales (plaie cutanée, atteinte du tractus digestif, etc.). En effet, il est admis qu'en raison de leur taille relativement importante par rapport aux antibiotiques, la plupart des bactériophages ne peuvent diffuser dans les tissus infectés. Donc les infections produites par les bactéries intracellulaires ne pourront pas être traitées par les bactériophages lytiques. En effet, le phage devrait nécessairement rentrer dans la cellule humaine pour pouvoir être au contact de la bactérie. Or, et heureusement, les cellules humaines n'ont pas de récepteurs à leur surface pouvant être reconnus par le bactériophage.

Cependant, il a été observé qu'après administration, même par voie orale, les bactériophages ont été détectés dans la circulation générale et dans les tissus (foie et rate, apportés vraisemblablement par les cellules de l'immunité, les macrophages). Néanmoins pour obtenir une bonne efficacité de la phagothérapie, il vaut mieux privilégier les traitements locaux.

Il existe aussi un risque d'inactivation par le système immunitaire du bactériophage lorsque celui-ci est injecté par voie sanguine. On peut voir aussi l'apparition d'anticorps anti-phages en réponse au système immunitaire. Cependant, si le patient prend le traitement pour la première fois, les anticorps ne se produisent pas avant une ou deux semaines. Ce qui laisse le temps pour traiter l'infection sauf si le traitement est sur du long terme ou lors d'une récurrence de la pathologie.

d. Les résistances aux bactériophages = système anti-phage

Les bactéries sont constamment infectées par les bactériophages. Ces contraintes sont à l'origine de pression de sélection et conduisent les bactéries à développer de multiples méthodes de protections. Ces mécanismes de résistances sont distincts de ceux mis en place par les bactéries lors d'antibiorésistances (l'existence de résistances des bactéries aux antibiotiques n'empêche donc pas la capacité des phages à détruire les bactéries car les mécanismes de résistances sont différents entre ces deux thérapies).

Ces méthodes de résistances bactériennes face aux phages sont : **[114]**

i. Inhibition de l'adsorption :

L'une des étapes essentielles lors d'une infection par le phage est la reconnaissance des récepteurs présents sur la surface cellulaire de la bactérie par ce dernier. Ainsi les récepteurs doivent être présents sur la surface de la cellule bactérienne mais ils doivent aussi être accessibles. Par conséquent, les stratégies de prévention de l'adsorption phagique comprennent la modification de la structure des récepteurs par mutation ou la dissimulation des récepteurs avec une barrière physique supplémentaire. Mais il est possible de pallier ces résistances en associant des phages différents actifs contre la bactérie mais dont la fixation se fait sur des sites distincts de la surface bactérienne.

ii. Bloquer l'injection du génome viral

Les bactéries peuvent utiliser les systèmes d'exclusion de type superinfection (= Sie) comme deuxième barrière de défense contre les phages. Ceux-ci sont composés de protéines qui bloquent spécifiquement l'entrée de l'ADN viral, produisant ainsi une immunité spécifique contre certains phages. La bactérie ne peut pas être nouvellement infectée par le bactériophage qu'elle contient mais peut l'être par d'autres bactériophages tempérés et devenir ainsi une bactérie polylysogène. Cette stratégie est utilisée par les prophages (phage lysogénique) afin de prévenir l'infection par un autre phage. À ce jour, peu de mécanismes Sie ont été caractérisés et beaucoup de détails restent à élucider concernant le mécanisme de ce système. Bien que rare, il existe des mécanismes Sie n'étant pas codés par des prophages. On a pu observer un Sie imm/sp d'un coliphage T4 (coliphage=type de bactériophage qui infecte *Escherichia coli*). [115]

iii. Coupure des acides nucléiques exogènes.

➤ Enzyme de restriction

Une fois l'ADN phagique dans la bactérie, cette dernière met en place un système de défense faisant intervenir les enzymes de restrictions qui vont couper l'ADN phagique. Cependant le phage s'adapte en utilisant le même moyen que la bactérie pour que son génome ne soit pas clivé par ses propres enzymes de restriction. le phage va méthyle son génome au niveau des sites de restrictions empêchant ainsi les enzymes de restrictions de couper son acide nucléique.

➤ Le système immunitaire adaptatif

Un autre système de défense est mis en place chez certaines bactéries : un système immunitaire, similaire à celui de tous les êtres vivants, capable d'identifier ses « ennemis » et de s'en souvenir. Il est appelé CRISPR pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. (Courtes Répétitions palindromiques groupées et régulièrement inter espacées). Ce système de défense immunitaire est adaptatif et il est utilisé par les bactéries et les archées. Il s'agit de la mémoire des agressions virales subies par la bactérie et ses ancêtres au cours de leur vie et ainsi acquièrent une immunité contre elles.

Le génome bactérien contient la séquence CRISPR contenant des échantillons d'ADN étranger et aussi des gènes de plusieurs enzymes nommées Cas (pour « CRISPR associées ») impliquées dans le système immunitaire. Ces enzymes permettent le stockage des fragments d'ADN étranger dans le chromosome bactérien et de leur utilisation (sous forme de copies d'ARN complémentaire) lors d'une nouvelle infection d'un virus déjà rencontré par la bactérie.

Lors d'une infection par le phage, ce dernier va éliminer une grande partie des cellules bactériennes. Certaines bactéries vont survivre et vont garder de cette attaque une partie du génome viral en mémoire afin de lui devenir résistantes.

Actuellement on connaît cinq types de système CRISPR/Cas. Le fonctionnement du système CRISPR de type II a été élucidé. Le système CRISPR II coupe l'ADN étranger en un point précis de sa séquence grâce à l'enzyme Cas9 sur une séquence spécifique de l'ADN étranger : c'est une courte séquence appelée PAM (Protospacer motif adjacent). Les séquences CRISPR de la bactérie sont dépourvues de la séquence PAM, ce qui évite leur coupure sur le chromosome bactérien, alors qu'elle est très fréquente dans l'ADN des bactériophages.

Quand une bactérie subit une agression, elle transcrit toute sa séquence CRISPR en une copie sous forme d'un long ARN contenant tous les ARN complémentaires des ADN viraux gardés en mémoire. L'ARN Tracr (séquence Tracr contenu dans l'ADN bactérie codant pour l'ARN Tracr), nécessaire à l'activité de l'enzyme Cas9, s'hybride avec ce long ARN entre les ARN viraux. Il forme ainsi des repères qui permettent à l'enzymes Cas9 de couper le long de l'ARN de CRISPR des séquences d'ARN d'origine virale. A l'issue des coupures, chaque séquence d'ARN viral est associée à une enzyme Cas9 et un ARN Tracr. Cette association se « balade » dans la bactérie et si elle trouve un bout d'ADN qui correspond à la séquence d'ARN viral, c'est qu'il appartient à un virus déjà rencontré par la bactérie et Cas9 coupera l'ADN viral. Une fois l'ADN viral détruit, il ne peut plus servir à produire de nouveaux virions. Les recherches sur le système CRISPR ont révélé qu'il est présent dans environ 50% des bactéries et dans 90% des archées connues. [93] [94]

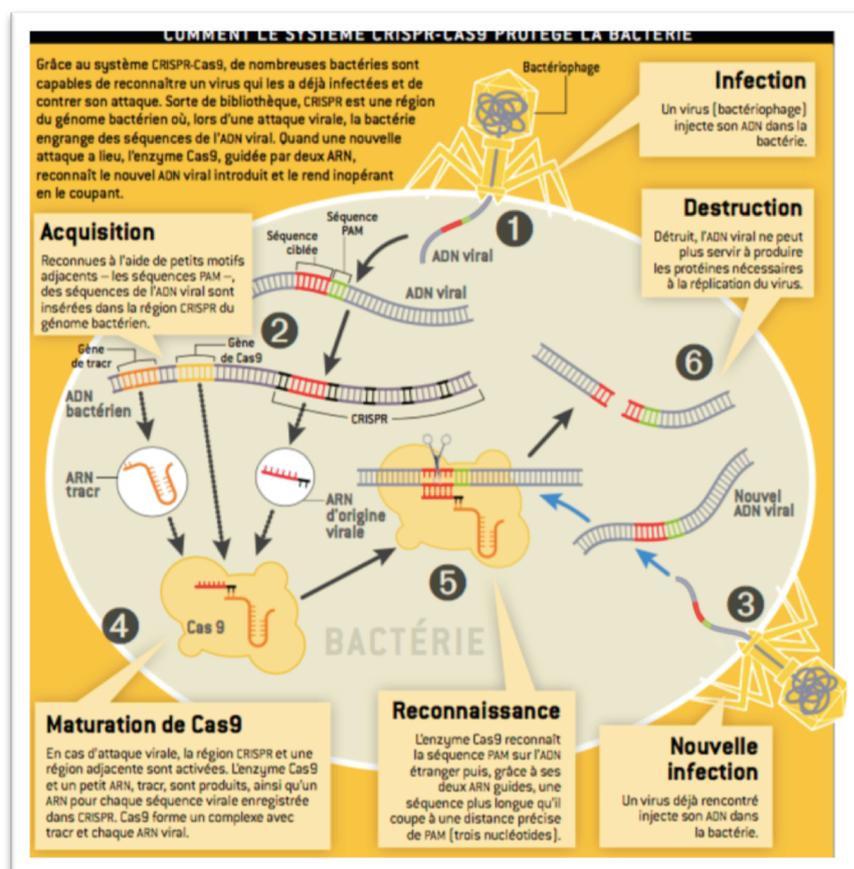


Figure 33 : Comment le système CRISPR/Cas9 protège la bactérie. [93]

Cependant il a été montré que dans le génome de certains bactériophages, il y avait le système CRISPR/Cas. C'est en étudiant des phages actifs contre la bactérie responsable du choléra que l'on a observé la présence d'un CRISPR/Cas normalement retrouvé chez certains types de bactéries ou d'archées. Les virus ne peuvent pas fabriquer leur propre système immunitaire, ils doivent « voler » ces gènes CRISPR/Cas. Ils réutilisent ainsi le système immunitaire pour le retourner contre la bactérie. Le phage entreprend son attaque en ciblant des gènes bactériens qui inhiberaient normalement l'infection de la cellule par le phage. Sans cette défense, les bactéries se remplissent rapidement des copies des particules virales et explosent. [95] [96]

L'association CRISPR-Cas 9 et phage est une voie de recherche dans la lutte des infections bactériennes. Le but étant de détruire des séquences génétiques propres aux bactéries pathogènes. La cible pouvant être localisée dans le chromosome bactérien ou dans un plasmide. Si la cible est le chromosome bactérien, l'effet est léthal pour la bactérie car elle ne pourrait pas survivre à un dommage de son ADN. Si la cible est le plasmide, le petit ADN circulaire détruit ne pourra plus être transmis d'une bactérie à l'autre, limitant ainsi la dissémination des souches résistantes. Ces bactéries pourront redevenir sensibles à l'antibiotique.

Pour que le CRISPR-Cas 9 atteigne ses cibles, les chercheurs utilisent des bactériophages rendus incapables de se répliquer, leur ADN ayant été remplacé par les CRISPR. Ils agissent ainsi comme des « antibiotiques intelligents » ne tuant que les bactéries porteuses de séquences génétiques spécifiques tout en laissant le reste du microbiote intact.

iv. Le système d'avortement de l'infection (Abi)

Malgré la panoplie de systèmes antiphages décrits, et de leur rapidité d'adaptation, les phages trouvent toujours un moyen de les contourner et de se répliquer. Pour cette raison, les bactéries possèdent également des systèmes de résistance de « dernière chance » connus sous le nom de mécanismes d'avortement de l'infection (Abi = « abortif infection system »). Une fois activé, il conduit à la destruction de la bactérie infectée.

Le système Abi est un système toxine-antitoxine qui se compose d'un ensemble de deux gènes étroitement liés (opéron) retrouvés sur le chromosome bactérien ou sur un plasmide. Il code à la fois pour une toxine (« poison », c'est une protéine) et pour une antitoxine (« antidote », c'est une protéine ou un ARN non codant). En fonction de la nature moléculaire de l'antitoxine et de son mode d'interaction avec la toxine, on peut regrouper cinq classes de systèmes toxine-antitoxine (=TA).

Le système Abi est un système TA de type III. Il a été découvert pour la première fois chez la bactérie *Pectobacterium atrosepticum* (synonyme : *Erwinia carotovora*). C'est une espèce bactérienne de la famille des *Enterobacteriaceae*, qui est un agent pathogène pour de nombreuses plantes. Elle provoque notamment « la jambe noire », une maladie de la pomme de terre.

Les systèmes toxine-antitoxine de type III sont régulés par un ARN non codant (Toxi = ToxN inhibitor) qui inhibe l'activité de la toxine (ToxN) par interaction directe avec celle-ci. La protéine toxique ToxN possède une activité endoribonucléase qui cible

des ARNm cellulaires. Son activité est inhibée par l'antitoxine. Donc la bactérie a à sa disposition un système toxine-antitoxine, elle fabrique à la fois un poison et un antidote qui le neutralise. Quand elle est attaquée par un phage, l'antitoxine se dégrade permettant à la toxine « d'empoisonner » la bactérie.

Ce geste est considéré comme « altruiste » par les biologistes car s'il mène au décès de la bactérie, elle protège la collectivité bactérienne dans la mesure où le virus ne pourra se multiplier dans la cellule morte et donc se propager : on parle donc de « suicide altruiste ».

Cependant, une étude a montré que le phage Φ TE qui infecte *Pectobacterium atrosepticum* peut contourner ce système. Dans l'étude, les chercheurs ont remarqué que ces phages mutants synthétisaient une imitation très réussie de l'antidote, ce qui empêchait la toxine d'agir. La bactérie était sauvée du suicide mais seulement le temps que le phage Φ TE se multiplie et parte ensuite infecter d'autres bactéries. [116], [117], [118]

La résistance aux phages par les bactéries semble cependant limitée. En effet, les phages et les bactéries sont dans un équilibre permanent. Lorsqu'une bactérie acquiert des résistances, le phage est susceptible à son tour de présenter des mutations lui permettant de contourner les résistances bactériennes. Cette co-évolution permet de relativiser le risque de sélection de souches bactériennes résistantes aux phages. De plus une bactérie peut être la cible de plusieurs phages différents et avec la grande abondance des phages il est relativement simple d'en isoler de nouveaux ciblant les agents pathogènes devenus résistants.

e. Effets secondaires des phages :

Les effets secondaires peuvent être dus :

i. Au phage lui-même :

A la capsid du phage lui même qui est de nature protéique. Ils sont ubiquitaires et nous en ingérons au quotidien donc notre système immunitaire est tolérant vis à vis des phages.

ii. Aux impuretés de la suspension phagique :

La production des phages nécessite la culture des bactéries dans le bouillon de culture pour pouvoir les multiplier. Cette culture va aboutir à la lyse des bactéries, qui sera à l'origine des impuretés. Mais ces impuretés résiduelles peuvent être éliminées en quasi totalité par des procédés de purifications actuels. Les préparations d'aujourd'hui ne comportent qu'une très infime quantité de résidus toxiques contrairement à celles d'autrefois.

Une étude a été réalisée sur quinze volontaires humains en bonne santé ayant reçu le phage T4 contre Escherichia coli dans leur eau potable. Tous les traitements ont été bien tolérés. Cinq événements bénins ont été signalés. Quatre étaient liés à l'intestin (douleurs à l'estomac, nausées, augmentation du péristaltisme) et le cinquième était un mal de gorge. Aucun des événements n'était suffisamment grave pour nécessiter une médication ou un arrêt de l'inoculation des phages T4. [119]

iii. Aux débris de la lyse bactérienne :

La libération de phages se fait après éclatement des bactéries qui libèrent leur contenu interne dans l'organisme. Elles libèrent des endotoxines (du grec éndon = « à l'intérieur » et toxicon = « poison »). Ces endotoxines sont situées sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Elles sont de nature LipoPolySaccharidique (=LPS). Elles ne sont libérées que lors de la lyse bactérienne. Ces produits de dégradation sont assimilés par le système immunitaire du malade à des antigènes étrangers. Le système immunitaire va alors attaquer ces antigènes. Le corps perçoit cette situation comme une attaque massive et va libérer en grande quantité des modulateurs du système immunitaire à l'origine d'effets indésirables. Cette réaction immunitaire peut même conduire à une réaction d'Herxheimer dans les cas les plus graves. Cependant ces effets indésirables sont rares et ont lieu au début du traitement et sont la conséquence de la destruction bactérienne.

Donc les effets secondaires seraient vraisemblablement dus aux débris et toxines issus de la lyse bactérienne lors de phagothérapie. Mais ce problème est aussi rencontré avec les antibiotiques bactériolytiques.

Quoiqu'il en soit, les quelques connaissances concernant la thérapie par les phages ne sont pas suffisantes pour élucider les mécanismes d'actions, de pharmacocinétiques, de pharmacodynamiques et des modifications de l'immunité innée ou acquise, sous l'influence des bactériophages. Il faudra encore attendre avant de pouvoir utiliser cette thérapie en toute sécurité chez les humains.

Cependant les techniques d'obtentions des bactériophages sont quant à elles bien établies.

4. Préparation des suspensions phagiques à usage thérapeutique

a. Où trouver des bactériophages :

Les bactériophages sont retrouvés là où il y a la présence de bactéries, donc on en retrouve partout. Cependant c'est dans les eaux usées et les égouts que l'on trouve le plus aisément les bactériophages contre les bactéries pathogènes.

Il existe aussi des collections de phages purifiés dont les propriétés sont connues. Ces collections sont appelées phagothèques.

En France, les collections n'existent plus car elles ont été détruites. Les phagothèques encore existantes sont situées à l'étranger. Au Canada, à l'université de Laval, il existe un centre d'étude et de référence pour les virus bactériens. Elle contient plus de 420 espèces de bactériophages provenant des quatre coins du monde. Il s'agit de l'une des plus importantes collections de phages. [120]

A Tbilissi en Géorgie et à Wroclax en Pologne, pays dans lesquels la phagothérapie n'a cessé d'être utilisée, on retrouve aussi des phagothèques.

b. La préparation des suspensions phagiques à usage thérapeutique

La préparation de phages à partir d'eaux usées ou d'égouts se déroule en quatre grandes principales étapes selon Alain Dublanchet. [75]. On va rechercher dans le milieu extérieur, un ou une variété de bactériophages capable de détruire la bactérie pathogène qui nous intéresse.

i. La propagation :

L'eau usée est centrifugée puis décantée afin d'éliminer les débris. On récupère le surnageant qui sera filtré avec des filtres de 0,2 microns. Le choix du filtre permet d'arrêter les bactéries. Les virus, eux, de taille inférieure ne seront pas retenus par le filtre. On obtient ainsi une préparation contenant de nombreux bactériophages.

Le filtrat contenant les potentiels bactériophages, est mis en contact avec la bactérie pathogène que l'on souhaite détruire. Pour cela, on mélange un bouillon de culture dans lequel est présent la bactérie cible avec la préparation obtenue. On incube le mélange pendant quelques heures sous agitation douce à 35°C.

Après cette incubation, s'il y a un ou plusieurs phages lytiques contre la bactérie que l'on souhaite détruire, alors ces phages se sont propagés en grand nombre. Ces phages auront en effet réalisé plusieurs cycles augmentant leurs nombres. A l'issue du processus, il suffit d'ajouter quelques gouttes de chloroforme pour détruire les bactéries résiduelles sans détruire ni dénaturer les phages.

On centrifuge de nouveau puis on filtre pour éliminer les débris bactériens dus à la lyse bactérienne par les phages. On obtient ainsi une préparation contenant un ou plusieurs bactériophages actifs contre la bactérie cible.

On pourra en vérifier l'efficacité en déposant une goutte de la préparation sur une gélose contenant un « tapis » de la bactérie à traiter. La présence d'une plage claire à l'endroit du dépôt signe la lyse bactérienne. [74]

ii. La purification :

La purification permet d'isoler le ou les bactériophages d'intérêts et obtenir ainsi des solutions pures d'un clone à partir d'une plage de lyse. Pour cela, on dilue un certain nombre de fois la préparation obtenue précédemment afin d'obtenir une dispersion des phages pour qu'ils soient isolés. Une fois diluée, on étale la préparation sur une boîte de Pétri (=gélose nutritive) sur laquelle on a ajouté au préalable la bactérie cible.

La bactérie est déposée à la surface de la gélose en un « tapis régulier ». Après incubation, les bactéries se sont multipliées, créant des colonies visibles sur toute la surface de la gélose, sauf à l'endroit où avait été déposé un bactériophage actif contre la bactérie. On observe sur la gélose une plage de lyse correspondant à un clone phagique, c'est à dire un ensemble de bactériophages tous issus du même ancêtre. Donc à chaque plage de lyse correspond un clone de bactériophages. Les plages d'aspect différent correspondent généralement à des phages différents.

On prélève ensuite une ou plusieurs plages que l'on propage chacune dans un bouillon de la bactérie cible afin d'obtenir une quantité suffisante de clones. On renouvelle deux ou trois fois cette étape afin d'exalter la virulence des clones phagiques et d'obtenir un nombre important de phages.

iii. La numérotation :

Il permet de connaître le nombre de phages actifs contenus dans la suspension obtenue. Il faut que le pouvoir lytique de la suspension soit suffisant. Par convention, il est recommandé d'utiliser des suspensions possédant un titre égale ou supérieur à 10^5 PFU par ml. Le titre exprime le nombre de particules phagiques lytiques par unité de volume. Il est exprimé en nombre de Plages Formant Unité = PFU. Il est préférable cependant d'utiliser des suspensions dont le titre est supérieur à 10^7 à 10^9 .

iv. Les contrôles

Cette étape de contrôles est faite lorsqu'on part de suspensions dont on ne connaît pas les caractéristiques, par exemple les préparations commerciales. On peut effectuer par exemple un « phagogramme » (Le phagogramme est l'équivalent des antibiogrammes mais pour les phages).

Le travail préparatoire pour obtenir une suspension de bactériophages thérapeutiques à partir des eaux sales est considérable. Il faut analyser de nombreux

échantillons d'eaux usées afin de parvenir à obtenir une suspension fiable. A titre d'exemple, d'Hérelle dans son laboratoire a étudié de nombreux bactériophages pour n'en sélectionner que quelques uns dans un but thérapeutique :

« Dysentéri-phage : environ 200 races isolées, 100 étudiées, parmi ces dernières 15 races types ont été sélectionnées ; leur ensemble est pratiquement actif sur 100% des souches de bacilles dysentériques et paradysentériques.

Typhi-phage : environ 600 races isolées, 347 étudiées et 32 choisies comme types ; l'ensemble de ces dernières est actif sur 100% des souches de bacilles typhiques, paratyphiques et salmonella typhique. » [121]

Le but étant d'obtenir des suspensions phagiques destinées à la thérapeutique. Elles doivent posséder une grande virulence pour la bactérie pathogène qu'il s'agit de détruire. Les bactériophages doivent être thermorésistants car les suspensions vont devoir subir un procédé de stérilisation, la chaleur ne doit en aucun cas altérer leurs caractères. De plus, un bactériophage thérapeutique doit pouvoir conserver son activité entière à des températures ambiantes au court du temps.

c. Mode d'emploi des bactériophages

Il existe deux modes d'emplois des bactériophages :

- « la phagothérapie probabiliste » : dans les situations d'urgences, où le traitement ne peut pas attendre les résultats bactériologiques. On administrera un cocktail de phages offrant un spectre large. On aura recours à des préparations du commerce. Par exemple, l'institut de Tbsilissi, produit le Pyophage. Le Pyophage est une suspension d'un mélange d'au moins trente phages ayant une action sur staphylocoque, sterptocoque, pyocyanique, colibacille et proteus. On parlera de phagothérapie « prêt à porter »
On pourra secondairement, isoler la bactérie afin d'adapter la thérapeutique, on parlera de « désescalade » phagique. [75]
- « la phagothérapie adaptée » : on identifie la bactérie avant d'administrer le traitement. Une fois la bactérie isolée, deux situations peuvent être envisagées :
 - soit on peut produire une préparation extemporanée de phage (préparée juste avant son emploi) spécifique de la souche à traiter, on parlera de phagothérapie « sur mesure »
 - soit on ne peut pas fabriquer de préparation extemporanée spécifique de la souche à traiter pour des raisons diverses, on utilisera un produit de commerce le plus proche possible de la souche à traiter : phagothérapie « prêt à porter » [74]

Les phages pourront donc être utilisés soit en « monothérapie », c'est à dire à l'aide d'un phage unique spécifique de la bactérie à détruire, soit sous forme de cocktails. Dans la forme cocktail, les phages pourront avoir la même spécificité antibactérienne soit être actifs sur plusieurs espèces bactériennes (Gram positif et négatif).

d. Galénique des bactériophages

Toutes les voies d'administrations sont possibles, depuis le dépôt au niveau du site d'infection jusqu'aux différentes voies injectables. Selon les voies d'administration, il a été mis au point de nombreuses formes pharmaceutiques. Classiquement les bactériophages sont amenés directement au contact des bactéries pathogènes. Par exemple, sur les plaies, ils sont appliqués sous la forme liquide soit directement, soit au cours d'interventions chirurgicales qui permettent un meilleur accès au niveau du foyer infectieux.

Cependant les formes peuvent varier en fonction des situations cliniques. Par exemple dans le cas d'infections pulmonaires, il est nécessaire de faire inhaler les bactériophages sous formes de suspensions liquides ou de poudres grâce à des sprays ou par nébulisation. Il a été envisagé aussi l'encapsulation des bactériophages dans des microsphères biodégradables afin d'atteindre les bactéries à multiplication intracellulaire. Pour les infections digestives, il a été proposé de les mettre sous forme de comprimés gastro résistants afin de les protéger de l'acidité de l'estomac.

5. Les perspectives thérapeutiques

a. Les essais cliniques

La phagothérapie n'est actuellement autorisée en médecine humaine officiellement qu'en Géorgie, Pologne et Russie. Cette thérapeutique n'a jamais été abandonnée dans les pays de l'Est. Par exemple en Géorgie, la thérapie par les phages fait partie des protocoles de soins standard. Deux formulations de D'Hérelle, le Pyophage et l'Intestiphage sont actuellement les principales utilisées en Géorgie et en Russie.

Le Pyophage cible les bactéries causant des infections purulentes à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, deux espèces de *Proteus*, et plusieurs espèces de *Streptococcus*. L'Intestiphage vise environ 23 bactéries entériques différentes, ainsi que des souches de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Dans les pays de l'Ouest tel que la France, elle n'est utilisée qu'à titre compassionnelle. Quelques médecins cependant ont continué de les utiliser en Europe. Comme par exemple en France, le chirurgien André Raiga-Clémenceau a utilisé ces préparations phagiques pendant ses 50 années d'exercices. Les centaines de cas d'infections traitées par les phages sont pour certaines décrites dans le « manuel de la phagothérapie » écrit par Paul Hervé Riche, qui n'est autre que son ancien élève. **[128]** Les connaissances empiriques acquises sur la phagothérapie en un siècle d'utilisation à l'Est permettent de voir les potentiels offerts par les phages. Néanmoins, les études cliniques, selon les normes réglementaires pharmaceutiques européennes ou américaines, n'ont jamais été réalisées et les traitements utilisés en Géorgie, Russie ou Pologne ne sont pas autorisés sur notre territoire.

De nombreuses études précliniques ont été menées dans de nombreux modèles animaux avec les phages. Notamment dès 1980 aux Etats Unis avec deux vétérinaires, Smith et Huggins, qui entreprirent des expériences rigoureuses selon les normes

réglementaires. Ils mirent en évidence l'action thérapeutique des phages chez les animaux. Cependant rares sont celles qui se sont concrétisées par des évaluations scientifiques solides chez l'homme. Depuis le regain d'intérêt de la phagothérapie, seulement trois essais humains ont été réalisés selon les normes actuelles en Europe. Ils ont montré l'efficacité et la sécurité des traitements : il s'agit :

- Le premier essai, réalisé au Royaume-Uni, concerne le traitement des otites chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* rapporté par Wright et al. en 2009. C'est le premier contrôle en double aveugle de phase I/II des essais cliniques pour un cocktail de phages sur 24 patients. Le cocktail de phages contenait six phages virulents contre des souches résistantes à *Pseudomonas aeruginosa* appelé Biophage-PA. Il a été appliqué directement dans l'oreille des patients. Des améliorations cliniques significatives ont été observées dans le groupe traité par les phages par rapport au groupe placebo et il n'a été rapporté aucun effet indésirable avec le traitement par les phages. Le premier essai clinique contrôlé d'une préparation bactériophage thérapeutique a montré l'efficacité et la sécurité dans les otites chroniques à *P. aeruginosa*. [122]
- A la même période, aux USA, un autre essai clinique de phase I a été entrepris afin d'examiner la sécurité d'une préparation de bactériophages contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* chez 42 patients souffrant d'ulcère chronique de la jambe. Les ulcères ont été traités pendant 12 semaines. A la fin de cette étude, le traitement par les bactériophages n'a révélé aucun problème de sécurité. [123]
- En Belgique, en 2009, l'équipe de Merabishvili a produit et contrôlé la qualité d'un cocktail de bactériophages exclusivement lytiques conçus pour le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Staphylococcus aureus* pour les plaies surinfectées chez les patients brûlés. La production de ce cocktail appelé BCF-1 a été produite selon les normes Européennes. Il a été montré que l'application de BCF-1 ne montrait aucun effet néfaste [124]

Les études n'ont pas dépassé le stade II des études cliniques et ne sont pas suffisantes. Pour espérer utiliser les bactériophages à des fins thérapeutiques, il convient de définir les règles d'utilisation dans le cadre des bonnes pratiques, d'établir l'aspect réglementaire permettant l'usage de la phagothérapie et d'effectuer une étude humaine respectant les bonnes pratiques scientifiques selon les normes européennes.

Ainsi les premiers essais chez l'homme avec des produits validés par les agences françaises et européennes du médicament sont en cours depuis quelques mois. C'est l'objectif du projet multicentrique européen Phagoburn. Il a été lancé en 2013 afin d'évaluer la phagothérapie pour traiter les infections cutanées bactériennes à *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients brûlés. Deux produits ont été mis au point par la société française Pherecydes Pharma : PPO121 = cocktail contre *Escherichia coli* et PP 1131 contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Phagoburn est conduit dans 3 centres de brûlés français à Clamart, Lyon et Nantes. Dans 3 centres belges à Bruxelles, à Loverval et à Liège et un centre Suisse en Lausanne.

En 2015 un autre projet est lancé, le projet PHOSA qui a pour objectif la mise au point d'un cocktail de bactériophages lytiques efficace contre les infections ostéoarticulaires (IOA) provoquées par les staphylocoques.

Les perspectives thérapeutiques sont nombreuses et les phages offrent un grand potentiel dans la lutte contre les infections bactériennes. Dès 1926, d'Hérelle dans son ouvrage « Le bactériophage et son comportement » lista les nombreuses possibilités thérapeutiques des phages »

Ils auraient une indication dans les infections digestives, pulmonaires, ostéo-articulaires et bien d'autres encore. Leur champ d'action est vaste et les perspectives sont énormes. **[125]**

b. Bactériophages et antibiotiques : une association gagnante

Les bactériophages et les antibiotiques sont deux moyens de combattre une bactérie pathogène mais ils ont des modes d'actions très différents. La phagothérapie est très souvent perçue comme une alternative à l'antibiothérapie. Cependant elle devrait être aussi envisagée comme un complément de l'antibiothérapie.

i. Le phénomène « Phage-Antibiotic Synergy » (=PAS) :

Une équipe de chercheurs français a observé lors d'une analyse de routine d'antibiogramme pour une infection urinaire à *Escherichia coli*, que les plages de lyses étaient plus grandes que la normale, à proximité des antibiotiques. Il s'est avéré que l'analyse urinaire avait été contaminée par des phages.

L'addition d'antibiotiques à faible dose à des cultures bactériennes, bloque la division cellulaire. Ce blocage induit une altération des bactéries ne pouvant plus se diviser, elles deviennent plus grosses augmentant ainsi le volume bactérien. Il en résulte une amplification plus importante du nombre de virions produits lors du cycle de réplication des phages. Cette surproduction de phages permet une lyse bactérienne encore plus efficace.

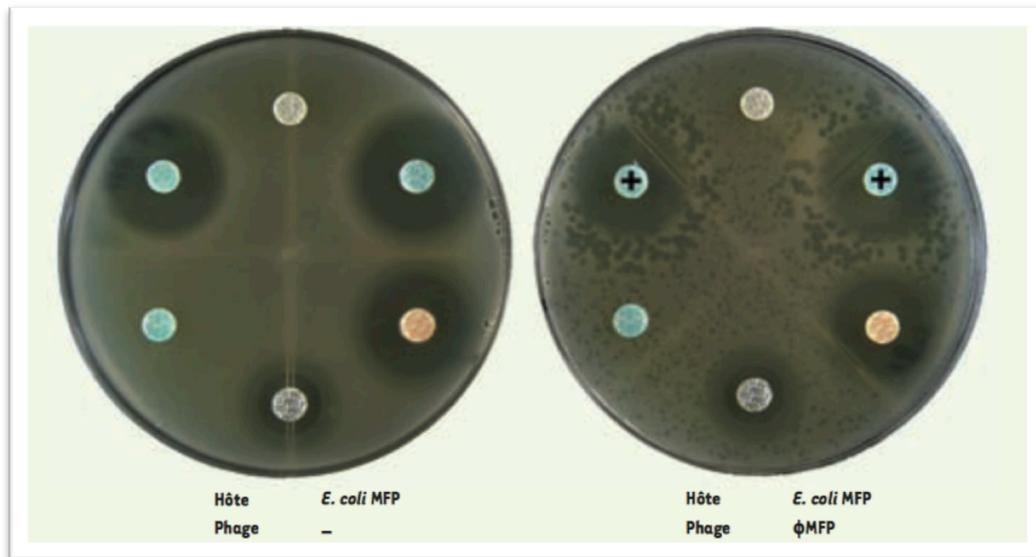


Figure 34 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques » (PAS) avec le phage ΦMFP sur *Escherichia coli* MFP. [126]

À gauche, un antibiogramme montrant la sensibilité de la souche uropathogène *E. coli* MFP à différents antibiotiques. Notez que cette souche est résistante à l'amoxicilline et la triméthoprimine/sulfaméthoxazole (absence de halo d'inhibition autour des deux pastilles). À droite, le même antibiogramme avec l'addition de plusieurs centaines de phages virulents ΦMFP dans le tapis bactérien. Les plages de lyse sont beaucoup plus grandes à proximité des antibiotiques β-lactames aztreonam et cefixime (indiqués avec les « + »). 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).

Cependant, il a été montré que sur une même bactérie, cet effet est variable selon le bactériophage et l'antibiotique utilisé. L'activité synergique du couple bactériophage-antibiotique sur une souche bactérienne peut être plus ou moins marquée, voir absente. [101]

ii. Mise en évidence in vitro de l'effet synergique [135]

Une étude in vitro a été menée pour montrer l'impact de la synergie des phages et des antibiotiques. Elle a été réalisée sur *Pseudomonas aeruginosa* à laquelle on a additionné soit un phage soit un antibiotique (streptomycine) soit phage et antibiotique. Ils ont ensuite calculé la densité bactérienne à t=0h, 14h, 45h et 70h après l'inoculation des traitements sur la bactérie.

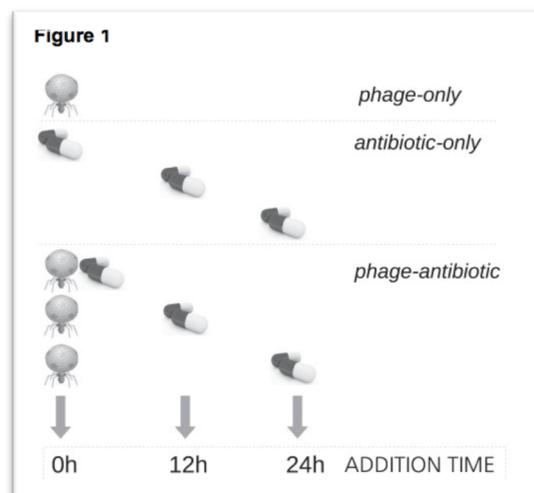


Figure 35 : Protocole des traitements simples (traitement par les phages uniquement ou traitement par l'antibiotique uniquement) et traitement combiné (phage et antibiotique).

Phage-only = traitement par les phages uniquement à t=0

Antibiotic-only = traitement par l'antibiotique à t=0, à t=12h et à t=24h

Phage-antibiotique = 3 situations = la première : phage et antibiotique à t=0, la deuxième = phage à t=0 et antibiotique à t=12h ; la dernière = phage à t=0 et antibiotique à t=24

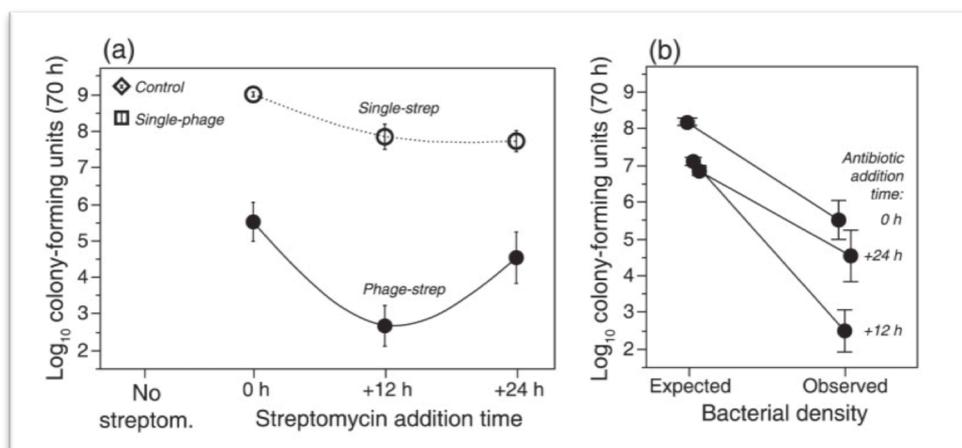


Figure 36 : Densité bactérienne après 70h

Ils ont remarqué que l'application seule du phage ou de l'antibiotique menée au sauvetage évolutif de la bactérie par apparitions des résistances et au retour à des densités importantes 70 heures après l'application du traitement.

En revanche, l'addition du phage puis de l'antibiotique induit une inhibition importante et permanente. De plus, il semble y avoir un délai optimal entre l'addition du phage et de l'antibiotique. L'ajout de l'antibiotique à 12h après l'injection du phage montre une réponse destructrice plus importante que l'ajout de l'antibiotique à 24h. Cela est probablement dû au moment où la réduction de la densité bactérienne par le phage est maximale augmentant ainsi l'impact de l'antibiotique.

L'addition simultanée de l'antibiotique et du phage montre une réponse faible de la densité bactérienne. L'antibiotique réduit rapidement la densité de bactéries diminuant le nombre d'hôtes nécessaires pour une infection par le phage.

Ces résultats montrent le rôle complémentaire des phages et des antibiotiques. Ils ont mis en évidence l'existence d'un délai optimal entre l'addition du phage et de l'antibiotique permettant une meilleure réponse antibactérienne.

iii. Intérêts

Undes intérêts de l'utilisation du duo antibiotiques/bactériophages permet de diminuer la pression de sélection exercée par les antibiotiques conduisant à l'apparition de résistances. En pratique, quand cela est possible, on nettoie le foyer bactérien avant d'administrer les antibiotiques afin de limiter cette pression de sélection. L'utilisation des bactériophages réduirait la biomasse bactérienne présente au niveau de l'infection permettant à l'antibiotique d'agir avec un risque limité de pression de sélection.

Le deuxième intérêt de ce duo est l'utilisation sur les bactéries quiescentes. Les phages ne sont pas très efficaces sur les bactéries quiescentes. Cette association permettrait dans un premier temps d'éliminer les bactéries actives au niveau du foyer infectieux par les bactériophages. Dans un deuxième temps les bactéries résiduelles, dues à leur faible multiplication, seraient éliminées par les antibiotiques.

Les études récentes sur la synergie des bactériophages-antibiotiques ne sont pas nombreuses et ne permettent pas pour le moment d'expliquer le mécanisme. Mais ce double traitement constitue un réel avantage pour combattre les bactéries, car son activité antibactérienne est supérieure à celles des phages ou des antibiotiques utilisés seuls. [101]

c. La guérison naturelle dirigée [127] [128]

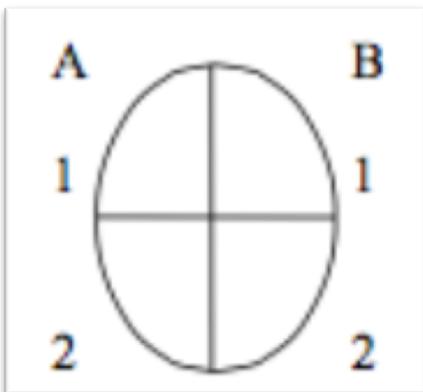
Paul-Hervé Riche ancien élève de André Raiga-Clémenceau qui lui-même était ancien élève de Felix d'Hérelle évoque la « guérison naturelle dirigée ». Pour lui, « il n'est pas nécessaire d'apporter des bactériophages de l'extérieur si auparavant on n'a pas réalisé les conditions optimales qui permettront l'action de bactériolyse par les virus. » Si les conditions optimales sont réunies, les bactériophages endogènes pourront combattre l'infection bactérienne. Trois conditions doivent être réunies :

- La première condition est de vérifier le taux de sucre dans le sang ou glycémie.

Les bactéries font fermenter le sucre. La fermentation du sucre libère des ions H⁺ qui acidifient le milieu. Nous avons vu qu'en milieu acide, l'activité du bactériophage est diminuée voir inhibée. Dès que la glycémie dépasse 1,60 g/l, le bactériophage a de grosses difficultés à pénétrer dans la bactérie. Il faut donc vérifier l'absence de diabète ou de pré-diabète (hémoglobine glyquée) par analyse de sang chez tout patient infecté.

- La deuxième condition est de vérifier le pH. Le pH doit être alcalin pour une activité optimale des bactériophages.
- La troisième condition est de supprimer les anticorps anti-phages du sérum sanguin quant ils sont présents.

La présence d'anticorps anti-phage dans le sérum sanguin est mise en évidence de manière simple en utilisant une boîte de Pétri.

	<p>Du côté A = sérum du témoin Du côté B = sérum du patient</p> <p>En haut : A₁ = dilution à 1% sérum témoin B₁ = dilution à 1% sérum patient</p> <p>En bas : A₂ = dilution à 1/1000000 du sérum témoin B₂ = dilution à 1/1000000 du sérum témoin</p>
--	---

Si les bactéries poussent en nappe côté B et sont détruites côté A, cela prouve que le sérum du patient est incapable de détruire la bactérie.

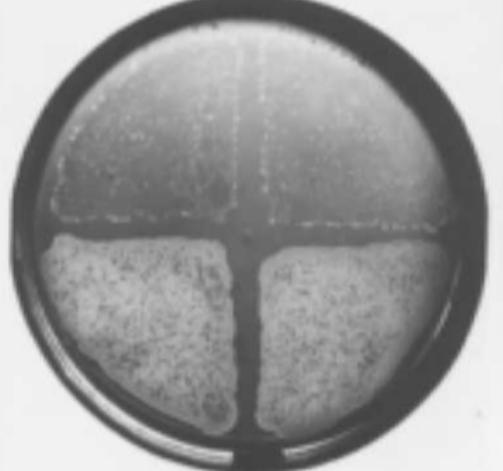
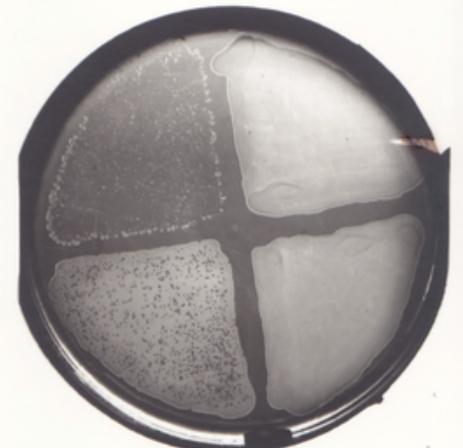
	
<p>présence de plage de lyse côté témoin et patient = absence d'anticorps anti-phage</p>	<p>Présence de plage de lyse côté témoin mais pas côté patient, la bactérie a pu se multiplier = présence d'anticorps anti-phage</p>

Figure 37 : Mise en évidence de la présence des anticorps anti-phage [127] [128]

Pour lever l'inhibition des anticorps anti-phages, il a recours à l'auto-hémothérapie

La technique consiste à prélever 18 centimètres cubes chez l'adulte de sang veineux au pli du coude et de le réinjecter dans la fesse homolatérale du patient tous les troisième et sixième jours pour les infections aiguës, tous les quatrième et huitième jours si infections chroniques. Quand la réaction de destruction bactérienne se produit, le patient présente un pic de fièvre brutal (41° C, voire 42° C) très bien supporté. Cette technique permet de lever l'inhibition par les anticorps anti-phages. Mais cela n'est pas encore démontré.

Ces trois conditions doivent être réunies pour mener à bien la phagothérapie naturelle.

Ce protocole de « guérison naturelle dirigée » a été mis en place par Hervé-Paul Riche. Il n'est cependant pas approuvé par les autorités sanitaires.

d. Phagoprophylaxie

La phagoprophylaxie est l'utilisation de bactériophages lytiques afin d'éviter l'apparition de certaines maladies infectieuses bactériennes. Le premier à l'avoir proposée et à l'avoir appliquée est Felix d'Hérelle sur les animaux. [18]. Elle a aussi été utilisée chez l'homme pour enrayer certaines épidémies dont celle du choléra en Inde.

Dans le domaine médical, par exemple, elle pourrait avoir une indication pour éliminer le portage intestinal de *Clostridium difficile* afin de prévenir la colite pseudomembraneuse suite à la prise d'antibiotique. Cependant, aucune souche de bactériophage strictement lytique pour *Clostridium difficile* n'a encore été isolée.

La phagoprophylaxie a aussi été envisagée dans le domaine agroalimentaire. Pour la première fois, en 2006, aux États-Unis, l'utilisation d'une préparation à base de bactériophages a été autorisée par l'autorité administrative (FDA) pour lutter contre la listériose due à *Listeria monocytogenes*, comme par exemple, le ListShield™ produit par Intralytix. Ce laboratoire a élargi sa gamme avec EcoShield actif contre *Escherichia coli* O157:H7 et SalmoFresh actif contre *Salmonella*.

Elle a aussi une indication dans le domaine agricole, depuis plusieurs années, un produit permet de combattre le « feu bactérien » (maladie bactérienne qui affecte certaines plantes) : Agriphage. [75]

Les indications pour la phagoprophylaxie sont nombreuses et les champs d'applications abondants.

Il y a beaucoup d'arguments qui montrent que la phagothérapie peut-être une réponse aux difficultés que rencontre l'antibiothérapie. Cependant l'un des obstacles les plus importants est sans doute le flou réglementaire autour de la phagothérapie.

6. Cadre réglementaire

a. Situation actuelle [130] [131] [75]

En France, les derniers bactériophages thérapeutiques ont été disponibles jusque dans les années 1980. Après l'abandon de cette thérapeutique, la seule option possible dans ce contexte est de l'utiliser sous l'égide de la convention d'Helsinki qui précise qu'en présence d'une situation où toutes les thérapeutiques reconnues ont échoué, le thérapeute est en droit de recourir à l'option thérapeutique qu'il estimera efficace. Ainsi, en France, grâce à l'association GEEPhage et le centre hospitalier de Villeneuve-Saint-Georges, la thérapeutique par les phages a été utilisée dans le cadre de thérapeutiques compassionnelles. Mais seuls quelques patients ont pu avoir accès à cette thérapeutique et éviter ainsi une amputation programmée grâce à des produits importés de pays de l'Est dans le service de Pathologie infectieuse de Villeneuve-Saint-Georges. Cependant cette pratique ne permet pas l'application à de nombreuses personnes. Donc un nombre croissant de patients se rend en Géorgie, au centre de phagothérapie de Tbilissi, pour recevoir un traitement, car les bactériophages n'ont jamais cessé d'être utilisés là bas (et en Russie aussi). Mais ce « tourisme médical » et la thérapeutique compassionnelle ne peuvent pas être la réponse définitive à l'absence de cadre réglementaire en Europe. Et c'est seulement en 2011, que les phages ont été considérés comme des médicaments en Europe.

Dans ce contexte un rapport rédigé par le centre d'analyse stratégique (CAS) en novembre 2012 consacrait une partie sur la phagothérapie et appelait au plus tôt à une évaluation de son potentiel. [129]

Dans ce contexte deux projets PHOSA (projet national) et PhagoBurn (projet européen) ont été lancés ayant pour but de traiter les infections ostéoarticulaires (PHOSA) et les infections des grands brûlés (PhagoBurn).

Cependant plusieurs problèmes freinent le développement à grande échelle de la phagothérapie. La nature même du phage, qui fait de lui un biomédicament, et l'absence de financement.

i. Les biomédicaments

Les médicaments de nature biologique sont appelés biomédicaments. De par leurs natures, ils entraînent une réglementation particulière en raison des paramètres et des constantes du produit plus difficiles à définir, à garantir et à maîtriser. Ils posent donc un problème de production, de reproductibilité et de stabilité plus difficile à obtenir qu'avec des médicaments classiques. Depuis quelques années, les traitements par les médicaments Biotechs sont utilisés couramment, et en ce moment sont même développés les génériques de certains médicaments biotechs. Les cadres réglementaires sont déjà adaptés à la fabrication et à la commercialisation des biomédicaments. Cependant les bactériophages de par leur coévolution avec les bactéries, nécessitent un cadre réglementaire permettant une approche « sur mesure » plutôt qu'une approche de médicament « prêt à porter ». En effet si le bactériophage thérapeutique devait suivre le

long processus de recherche et développement et des études de mises sur le marché, il est fort probable que le bactériophage ne répondrait pas ou plus aux attentes initiales. Ce concept du « sur mesure » complexifie l'élaboration d'un cadre réglementaire adapté.

Aujourd'hui, un médicament doit être conforme à des normes très strictes de Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) à fin d'obtenir le label GMP (Good Manufacturing Practice). Ces étapes doivent être validées par les autorités administratives (EMA pour l'Europe et ANSM pour la France). Or ces procédures ne sont pas adaptées à la fabrication de tels biomédicaments que sont les bactériophages. Cette étape préalable est obligatoire pour que puissent être engagées les procédures d'Autorisation de mise sur le marché (AMM). Même une ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation) nominative ne peut être délivrée, ne serait-ce qu'exceptionnellement, tant que le biomédicament n'est pas labélisé GMP.

Devant ce flou réglementaire, le 18 février 2016 s'est tenu à l'Assemblée nationale française, un colloque afin de discuter du cadre réglementaire pour réintroduire ces médicaments biologiques dans l'arsenal thérapeutique. De plus, l'utilisation des produits venant de Géorgie ou de Russie n'est pas envisageable car ils ne sont pas compatibles avec les normes européennes des médicaments.

ii. Le financement

Les phages étant des produits de la nature, ils ne sont pas brevetables. De ce fait, l'absence de profit n'intéresse pas les firmes pharmaceutiques. Cette absence de financement ne permet pas la réalisation de grands essais thérapeutiques. Seulement quelques start-up se sont lancées dans ce projet.

Il est proposé pour le futur cadre juridique de prendre en compte deux types de productions. L'une proposerait du « prêt à porter » c'est à dire des productions standard comme celle que l'on peut retrouver dans les pays de l'Est. La seconde proposerait du « sur mesure » c'est à dire adaptée à un cas particulier. Ce qui complique encore plus l'aspect réglementaire des bactériophages.

V. Conclusion

La réintroduction des phages comme agents thérapeutiques et/ou prophylactiques nécessite encore quelques réglages mais elle semble être un candidat solide et performant à l'antibiorésistance et apporte un nouvel espoir dans la lutte des résistances bactériennes. Cette thérapeutique fera appel à une médecine adaptée et personnalisée avec l'utilisation de « médicament individuel » qui impliquera des changements profonds tant au niveau du patient, du personnel médical mais aussi au niveau des entreprises pharmaceutiques.

La réhabilitation de ce « biomédicament » dans l'arsenal thérapeutique occidental devient de plus en plus une réalité. L'action bactéricide n'est plus à prouver, certains effets sont connus et étudiés à l'heure actuelle comme la modulation de l'immunité de l'hôte, la synergie avec les antibiotiques et les interactions avec le biofilm, mais nous en sommes qu'au début des recherches. En effet seul 10% des phages ont été décrits à ce jour. Les 90 autres pourcents attendent d'être découverts et de dévoiler leurs secrets. Les bactériophages n'ont pas fini de nous surprendre et ils représentent de véritables challenges tant le champ d'investigation semble vaste.

VI. Bibliographie

- [1] HANKIN, E. (1896). L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du cholera. *Annales de l'Institut Pasteur*.
- [2] GAMALEYA, N. (1898). Bacteriolysins-ferments destroying bacteria. Dans R. a. medical (Éd.), 6, pp. 607-613.
- [3] SCHUCH, R. a. (2006, Avril). Detailed genominc analysis of Wbeta and gama phages infecting Bacilles antracis : implication for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *Journal bacteriology* .
- [4] COWLES, P. (1931). A bacteriophage for B. Anthracis. Dans J. Bacteriol. (Éd.), 21, pp. 161-166.
- [5] McCLOY, E. W. (1951). Studies on a lysogenic Bacillus strain. Dans J. o. (London) (Éd.), 49, pp. 114-125.
- [6] TWORT, F. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic virus. *Lancet* .
- [7] HERELLE, F. (1911). Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique. (pp. 1414-1415). académie des sciences.
- [8] HERELLE, F. (1912, JUILLET 10). une victoire de la science française . *Le figaro* .
- [9] HERELLE, F. (1949). the bacteriophage. *Science News* , 44-59.
- BORDET, [. C. (1920). Excudat leucocytaires et autolyse microbienne transmissible. *Société de Biologie*, 83, pp. 1293-1295.
- [10] DUBLANCHET, A. (2007). the epic of phage therapy. *Canadian Journal of infectious diseases and medical microbiology* .
- [11] HERELLE, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques . (pp. 374-375). Académie des sciences .
- [12] HERELLE, F. (1918). Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). 81, pp. 1160-1162. Société de biologie.
- [13] HERELLE, F. (1921). *Le bactériophage, son rôle dans l'immunité* . Masson et compagnie .
- [14] HERELLE, F. (1918). Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysentérie bacillaire. *Académie des Sciences* , 167, pp. 970-972.

- [15] HERELLE, F. (1919). Du rôle du microbe filtrant bactériophage dans la fièvre typhoïde . *Académie des Sciences*, 168, pp. 631-634.
- [16] HERELLE, F. (1919). Sur une épizootie de Typhose aviaire. *Académie des Sciences*, 169, pp. 817-819.
- [17] HERELLE, F. (1919). Sur le rôle du microbe bactériophage dans la thyphose aviaire . *Académie des Sciences*, 169, pp. 932-934.
- [18] HERELLE, F. (1921). *Le bactériophage son rôle dans l'immunité* . Masson et compagnie .
- [19] HERELLE, F. (1921). *Le bactériophage, son rôle dans l'immunité* . Masson et compagnie.
- [20] HERELLE, F. (1921). Rôle du bactériophage dans l'immunité . *Société de Biologie* , 84, pp. 538-540.
- [21] HERELLE, F. (1921). *Le bactériophage, son rôle dans l'immunité* . Masson et compagnie.
- [22] BRUYNOGHE et MAISIN, (1921). Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage. *Société Belge de biologie*, 85, pp. 1120-1121.
- [23] BECKRERICH et HAUDUROY, (1922). Le bactériophage dans le traitement de la fièvre typhoïde . *Société Biologique* , 86, pp. 168-170.
- [24] SALIMBENI, A. T. (1920). Sur le bactériophage de d'Hérelle. 83, pp. 1545-1548. Société de biologie.
- [25] SALIMBENI, A. T. (1920). Sur la nature du bactériophage de d'Hérelle. 171, pp. 1240-1242. Académie des Sciences.
- [26] HERELLE, F. (1922). *The bacteriophage, its role in immunity*. Williams and Wilkins compagny, Baltimore USA.
- [27] HERELLE, F. (1921). Sur la nature du bactériophage (Bacteriophagum intestinale de d'Hérelle 1918). 84, pp. 339-340. Société Biologique.
- [28] KABESHIMA, T. (1920). Sur un ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature du microbe dit "microbe filtrant bacteriophage" de d'Hérelle . *Société de biologie* , 83, pp. 219-221.
- [29] HERELLE, F. (1920). Sur la nature du principe bactériophage . *Ssociété de Biologie* , 83, pp. 1320-1322.
- [30] HERELLE, F. (1921). L'ultramicrobe bactériophage . *Société de Biologie*, 85, pp. 767-768.

- [31] BORDET et CIUCA, (1920). Excudat leucocytaires et autolyse microbienne transmissible . *Société de Biologie*, 83, pp. 1293-1295.
- [32] BORDET et CIUCA, (1920). Le bactériophage de d'Hérelle, sa production et son interprétation . *Société de biologie*, 83, pp. 1296-1298.
- [33] BORDET et CIUCA, (1921). Remarque sur l'historique des recherches, concernant la lyse microbienne transmissible. *Société de biologie* , 84, pp. 745-747.
- [34] HERELLE, F. (1922). *The bacteriophage, its role of immunity*. Williams and Wilkins company Baltymore USA.
- [35] LECOQ, H. (2001). Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du Tabac, 1892 ou 1898 ? *Académie des Sciences* , (pp. 929-933).
- [36] ACKERMANN, H.-W. (2011, Juillet). The first phage electron micrographs. *Bacteriophage* , 225-227.
- [37] RUSKA, H. (1940). Visualization of bacteriophage lysis in the hypermicroscope. *Naturwissenschaften* , 28, 45-46.
- [38] PFANKUSCH E. et KANSCHÉ GA, (1940). Isolation and supre microscopic representation of a bacteriophage . *Naturwissenschaften* .
- [39] ACKERMANN, H.-W. (2011, Juillet). the first phage electron micrographes. *Bacteriophage* , 225-227.
- [40] Da Costa Cruz, J. (1924). Le traitement des dysentéries bacillaires par le bactériophage. *Société de Biologie*, 91, pp. 845-846.
- [41] SCHULTZ, E. W. (1932). Bacteriophage as a therapeutic agent in genito urinaire infections . *California and Western Medicine* , 36, 33-37.
- [42] PEITZMAN, S. J. (1969-70). *Transaction and studies of College of Physicians of Philadelphia* (Vol. 37). Waverly press, INC. Baltimore.
- [42] PEITZMAN, S. J. (1969-70). *Transaction and studies of College of Physicians of Philadelphia* (Vol. 37). Waverly press, INC. Baltimore.
- [43] HÄUSLER, T. (2007). *Viruses vs. superbugs : a solution to the antibiotic crisis*.
- [44] Martha APPLEBAUM et Margaret STRAUB (1933). Studies on commercial bacteriophage produtcs . *Journal of the Americain Medical Association* , 110.
- [45] PASTEUR et JOUBERT (1877). Charbon et septicémie. *CR de l'académie des Sciences* , T : 85, pp. 101-115.

[46] Paul VUILLEMIN (1890). Antibiose et Symbiose, association française pour l'avancement des sciences . *CR de la 18ème session, seconde partie, note et mémoire, vol 11*, pp. 525-543.

[47] Desiderio PAPP (1954). Histoire des antibiotiques. Revue d'histoire des sciences et de leurs application Tome 7 n°2, pp. 124-148

[48] Complément en ligne du livre « Microbiologie » web 18 Fiche 18.5. Collection Science Sup

[49] F. HERELLE et G. ELIAVA (1921). Le sérum antibactériophage. *CR de Société de biologie*. Tome : 84, pp. 719-721

[50] F. HERELLE et G. ELIAVA (1921). Unicité du bactériophage : sur la lysine du bactériophage. *CR de Société de biologie*. Tome : 85, pp. 701-702

[51] G. ELIAVA et POZERSKY (1921). Action destructive des sels de quinine sur le bactériophage de d'Hérelle. *CR de Société de biologie*. Tome : 85, pp. 139-141

[52] G. ELIAVA et POZERSKY (1921). Action de la température sur le bactériophage. *CR de Société de biologie*. Tome : 85, pp. 1011-1013

[53] G. ELIAVA et POZERSKY (1921). Sur les caractères nouveaux par le bacille de shiga bactériophage de d'Hérelle. *CR de Société de biologie*. Tome : 84, pp. 708-710

[54] G. ELIAVA et SUAREZ (1927). Dimension du corpuscule bactériophage. *CR de Société de biologie*. Tome : 96, pp. 460-462

[55] Monique ZAGOREC, Soaud CHRISTIEANS (2013). Flores protectrices pour la conservation des aliments. Edition Quae, collection synthèse.

[56] 9 novembre 2015. Sécurité alimentaire : des phages contre la listeria. Agro-média.fr

[57] <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK-Pv-2014-05-20.pdf>

[58] <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2013sa0111.pdf>

[59] plaquette consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable

[60] Morbidité et mortalité des infections à bactéries multi-résistantes aux antibiotiques en France 2012. Etude Burden BMR, Rapport BMR, juin 2015.

[61] Antimicrobial resistance : global report on surveillance 2014. OMS

[62] <http://www.phagoburn.eu>

[63] Rapport du groupe de travail spécial pour la préservation des antibiotiques. Ministre des affaires sociales, de la santé, et des droits des femmes. Juin 2015

- [64] MARAMOROSCH Karl and KURSTAK Edouard, *Comparative Virology*, Academic press
- [65] BRADLEY DE. (1967), *Ultrastructure of Bacteriophage and Bacteriocins*. Bacteriology Reviews. Pp :230-314 vol : 31
- [66] ACKERMANN Hans-W, *Bacteriophage taxonomy*, Microbiology Australia, May 2011
- [67] International Union of Microbiological Societies, Virology Division, *Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus*, Andrew M.Q.King, Michael J.Adams, Eric B. Carstens, Elliot J.Lefkowitz.
- [68] P. Lebaron , J.-C. Nicolas , Le virioplancton : des virus essentiels au bon fonctionnement de l'océan et au maintien de la biodiversité. *Virologie*, Volume 7, numéro 2, Mars 2003
- [69] Weinbauer M.G., Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28. 2004. Pp : 127-181
- [70] L. PAOLOZZI, J-C LIEBART, BAUDA, J BODILIS, O DUSSURGET, P FORTERRE, C GUTIERREZ, A LATIFI, G ONA-NGUEMA, C ROOSE-AMSALEG. *Microbiologie*, édition : Dunod, 2015.
- [71] https://fr.wikipedia.org/wiki/Arbre_phylogénétique
- [72] SAIB Ali. Les virus, inertes ou vivants. *Pour la science*. N° 350 décembre 2006
- [73] Les virus qui secouent l'arbre de la vie. Agence Science presse. 23 juillet 2013
- [74] RAVAT F, JAULT P, GABARD J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns fire Disasters*. 2015 mars 3 ; 28. Pp : 13-20
- [75] DUBLANCHET A. Des virus pour combattre les infections. La phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Favre. 2009
- [76] E KUTTER, A SULAKVELIDZE. *Bacteriophages. Biology and applications*. CRC Press
- [77] STOCKER. *Bacteriophage and Bacterial classification*. *Microbiology*. 12. Pp : 375-381
- [78] Ackermann, H.W., 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 2007. 152 (2)
- [79] Prescott, Klein, Willey, Sherwood, Woolverton. *Microbiologie 3^{ème} édition*. De Boeck
- [80] <http://jdleplongeur.free.fr/phaget4/>
- [81] LIEBART J-C, encapsidation des génomes viraux. Web 16 fiche 6

- [82]** BORDET J et CIUCA M. Autolyse microbienne et serum antilytique. Compte rendu de la Société biologique. 1921. T=85, pp: 280-282
- [83]** Gorski, Wazna E, Dabrowska K, Switala-Jelen K, Miedzybrodzki R. Bacteriophage translocation. FEMS Immunology and Medical microbiology. Pp: 313-319. 2006
- [84]** Abedon, Andrew J, Curtright, Stephan T. Phage Therapy : Emergent Property Pharmacology. Journal of bioanalysis and biomedicine. 2011
- [85]** Appelmans R. Le bactériophage dans l'organisme. Compte rendu de la société biologique.
- [86]** Robert J. H. Payne and Vincent A. A. Jansen. Evidence for a Phage Proliferation Threshold. J. Virology. 2002.
- [87]** Dr Irène Drogou. Les phages, une armée de virus mobilisable contre l'antibiorésistance. Le quotidien du pharmacien n 3245 jeudi 3 mars 2016
- [88]** <http://www.phosa.eu>
- [89]** Félix d'Hérelle. 1921. Le Bactériophage, son rôle dans l'immunité. Chapitre : influence du milieu. Pp : 28-30. Masson et C^{IE}, Editeurs, Libraires de l'Académie de Médecine.
- [90]** Paul-Hervé Riche - 50 ans de phagothérapie appliquée. Parcours, anecdotes, conseils. Conférence dans le cadre de la Journée des Thérapies alternatives. 2015 <https://www.youtube.com/watch?v=vVn6hjlom3w>
- [91]** Adam Wahida, Klaus Ritter, Hans-Peter Horz. The Janus-Face of Bacteriophages across human body habitats. PLOS Pathogens. June 23 2016.
- [92]** Marianne De Paepe, Marion Leclerc, Colin R. Tinsley and Marie-Agnès Petit. Bacteriophages: an underestimated role in human and animal health? Frontiers in cellular and infection microbiology. Review article published 28 march 2014
- [93]** Emmanuelle Charpentier et Pierre Kaldy. Pour la Science. CRISPR-Cas9 l'outil qui révolutionne la génétique. N°456- octobre 2015 page 24 à 32
- [94]** Dr S. Cohen-Wiesenfeld. Découverte du mécanisme du système immunitaire des bactéries. SILICONWADI. 15 avril 2015.
- [95]** Gurumed.org. Des virus volent et réutilisent le système immunitaire d'une bactérie pour le retourner contre celle-ci. 6 mars 2013.
- [96]** Kimberley D. Seed, David W. Lazinski, Stephen B. Calderwood and Andrew Camilli. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. Nature. 2013 Feb 28 ;494 :489-491.
- [97]** <https://norkinvirology.wordpress.com/2015/05/20/felix-dherelle-the-discovery-of-bacteriophages-and-phage-therapy/>

[98] Inchley, C. J. 1969. The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage. Clin. Exp. Immunol. 5:173-187.

[99] « T4 Phage and Its Head Surface Proteins Do Not Stimulate Inflammatory Mediator Production »

<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0071036>

[100] Kaur T, Nafissi N, Wasfi O, Sheldon K, Wettig S, Slavcev R (2012). Immunocompatibility of bacteriophages as nanomedicines. Journal of Nanotechnology, ID 247427,1-13.

[101] A. Dublanchet, O. Patey. « Nouveaux regards sur la phagothérapie. 1^{ère} Partie ». Feuillet de Biologie. Vol LV n°321. Novembre 2014

[102] https://fr.wikipedia.org/wiki/Résistance_aux_antibiotiques#cite_note-6

[103] Les bactéries multi-résistantes en 2015 : du SARM aux BLSE et EPC, épidémiologie, causes et conséquences. Professeur Céline Pulcini DESC MIT. Octobre 2015

[104] Plan d'action stratégique européen sur la résistance aux antibiotiques. Organisation Mondiale de la Santé, bureau régional de l'Europe. Comité régional de l'Europe. 61^{ème} session. Bakou (Azerbaïdjan), 12-15 septembre 2011. Point 6 de l'ordre du jour provisoire

[105] Campagnes de sensibilisation du grand public sur l'utilisation prudente des antibiotiques. Atelier Européen • 6-7 novembre 2008.

[106] Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. Bilan des données de surveillance, 18 novembre 2015.

[107] Luciano Paolozzi et Jean-Claude Liébart. Microbiologie Edition DUNOD. 2015. Pp = 356.

[108] David Lebeaux, Jean-Marc Ghigo. Infections associées aux biofilms. Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? Revue médecine/sciences. 2012 ;28 pp : 727-39

[109] https://www.oiiq.org/sites/default/files/uploads/pdf/l_ordre/ordres_regionaux/ORIIM/2012/biofilm_presentation_%20dr_Delorme_%2020120207.pdf

[110] <http://amgar.blog.processalimentaire.com/microbiologie-alimentaire/le-quorum-sensing-et-la-communication-des-bacteries/>

[111] Alain Dublanchet. Qu'est ce que la phagothérapie ? Hegel Vol.4 n°4. 2014

[112] David R. Harper, Helena M.R.T. Parracho, James Walker, Richard Sharp, Gavin Hughes, Maria Werthén, Susan Lehman and Sandra Morales. Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotic*. 2014 sept. Pp = 270-284.

[113] Kevin A. Hughes, Ian W. Sutherland and Martin V. Jones. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack : the role of page born polysaccharide depolymerase. *Microbiology* (1998), 144, 3039-3047.

[114] Kimberley D. Seed. Battling Phages: How Bacteria Defend against Viral Attack. *Journal : PLoS Pathogens*. 2015 Jun 11.

[115] Lu MJ and Henning U. Superinfection exclusion by T-even-type coliphages. *Trends Microbiol.* 1994 **2**:137-139.

[116] Tim R. Blower, Terry J. Evans, Rita Przybilski, Peter C. Fineran, George P. C. Salmond

Viral Evasion of a Bacterial Suicide System by RNA-Based Molecular Mimicry Enables Infectious Altruism. *Journal : PLoS Pathogens*. Octobre 18, 2012.

[117] Pierre Barthélémy. Quand un virus sauve une bactérie du suicide. *Blog : Passeurdesciences*. 25 novembre 2012
<http://passeurdesciences.blog.lemonde.fr/2012/11/25/quand-un-virus-sauve-une-bacterie-du-suicide/>

[118] Fineran PC1, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GP
The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. *PNAS = Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Jan 20; 106(3): 894–899.

[119] Anne Bruttin et Harald Brüssow, « Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy », *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 49, no 7, 1er juillet 2005, p. 2874-2878

[120] Jean Hamann. Phages à la page. Une nouvelle vie pour la collection de virus Félix d'Hérelle. *Au fil des événements*. Université LAVAL. 16 septembre 2004

[121] d'Hérelle. Preparation of Therapeutic Bacteriophages, Appendix 1 from: *Le Phénomène de la Guérison dans les maladies infectieuses*: Masson et Cie, 1938, Paris—OCLC 5784382 translated into English by Sarah J. Kuhl and Hubert Mazure *Bacteriophage* 1:2, 55-65; March/April 2011; © 2011 Landes Bioscience

[122] Wright A1, Hawkins CH, Anggård EE, Harper DR. « A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. » 23 July 2009. *Journal : clinical otolaryngology*

[123] Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans : results of a phase I safety trial. *Journal of wound care*, 18, 237–243.

[124] Maya Merabishvili, Jean-Paul Pirnay, Gilbert Verbeken, Nina Chanishvili, Marina Tediashvili, Nino Lashkhi, Thea Glonti, Victor Krylov, Jan Mast, Luc Van Parys, Rob Lavigne, Guido Volckaert, Wesley Mattheus, Gunther Varween, Peter De Corte, Thomas Rose, Serges Jennes, Martin Zizi, Daniel De vos, Mario Vaneechoutte. « Quality-Controlles Smal-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophages Cocktail for Use in Human Clinical Trials. » *Journal : PLOS/ONE*. March 20, 2009.

[125] A. Dublanchet, O. Patey. « Nouveaux regards sur la phagothérapie. 2nde Partie ». *Feuillets de Biologie*. Vol LV n°322. Janvier 2015

[126] André M. Comeau, Françoise Tétart, Sabrina N. Trojet, Marie-Francoise Prère, Henry M. Krisch. *Médecine/Science*. 2008 ; 24 : 449-74. « La « synergie phages antibiotiques » un enjeu pour la phagothérapie »

[127] Paul-Hervé Riche. Protocole : « la guérison naturelle dirigée. » Mercredi 5 juillet 2011.

[128] Philippe GARRIGUES & Dr Paul - Hervé RICHE. « Manuel de la phagothérapie » A l'usage des médecins du XXI^{ème} siècle manueldephagotherapiepratique.com

[129] Centre d'analyse stratégique (CAS). « Les Bactéries résistantes aux antibiotiques. La note d'analyse n°299. Novembre 2012

[130] <https://lesbrindherbes.org/2016/02/29/sante-connaissiez-vous-la-phagotherapie/>

[131] L'homme et les virus. Une cohabitation vitale. Colloque du 19 janvier 2016. « Sciences du Vivant et Société »

[132] André Gratia. « la lyse transmissible du staphylocoque. Sa production ;ses applications thérapeutiques . CR Séance Société Biologique. 86, 276- 8. 1922

[133] PC Flu et E. Renaux. « Le phénomène de Twort et le bactériophage ». *Annales de l'Institut Pasteur*. 1932. 48 (N°1) ; 15- 8.

[134] Biofuture, le mensuel européen de biothechnologie. « Phagothérapie. Des virus pour combattre les bactérieis résistantes. » N°373, février 2016

[135] Torres-Barceló C, Arias-Sánchez FI, Vasse M, Ramsayer J, Kaltz O, Hochberg ME. « A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages. ». *Journal : PLoS One*. 2014 Sep 26

[136] <http://www.inserm.fr/thematiques/immunologie-inflammation-infectiologie-et-microbiologie/dossiers-d-information/resistance-aux-antibiotiques>

[137] David M. Livermore, Shazad Mushtaq, Marina Warner, Jiancheng Zhang, Sunil Maharian, Michel Doumith and Neil Woodford. « Activities of NXL 104 Combinations with Ceftazidime and Aztreonam against Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. ». Journal : Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Nov 2010.

[138] « Le Danemark Volterra présente des résultats prometteurs du composé DAV-132 pour la prévention des infections sévères de diff de C. » News medical. Life science and medicine. May 13, 2014
<http://www.news-medical.net/news/20140513/6148/French.aspx>

[139] <http://www.davolterra.com/content/committed-future-antibiotics>

SUMMARY

Title : Phage therapy : « an alternative » and/or « a complementary » therapeutic solution to the problems of bacterial resistances

The steady rise of multidrug resistance bacteria and the need for new ways of fight make the phagotherapy a serious solution for the resistance to antibiotics. Thanks to the accumulation of empirical knowledge since the last century and a rigorous approach for few decades, bacteriophages seem to be convincing candidates for bacterial fight.

The history of phage therapy is rich in many ways: after a global craze, it has been removed with the emergence of antibiotics in Western medicine. But for a few decades, phagotherapy's reemergence has been observed.

This therapy uses viruses, bacteria's natural predators named bacteriophage or phage. It is the bactericidal action of lytic phage that is used in phagotherapy. They also have beneficial effects like modulating immunity, antibiotics synergy and interaction with biofilm.

However we are only at the beginning of research and phages's potential seems to be huge. The phage therapy offers new opportunities and a new hope for the fight of multidrug resistance bacteria.

DISCIPLINE : Virology

MOTS CLES : Bacteriophage, multidrug resistance bacteria, antibiotic resistance, bacteriolytic drug, phage therapy, antibacterial treatment

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques

Université de Bordeaux

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux

RÉSUMÉ

Titre : La phagothérapie : une solution thérapeutique « alternative » voir « complémentaire » aux problèmes de résistances bactériennes.

La constante augmentation des résistances bactériennes et la nécessité de disposer de nouveaux moyens de lutte, font de la phagothérapie une solution sérieuse à l'antibiorésistance. Grâce à l'accumulation des connaissances empiriques depuis un siècle et à une approche rigoureuse depuis quelques décennies, les bactériophages semblent être des candidats probants pour la lutte bactérienne.

L'histoire de la phagothérapie est riche à bien des égards : après un engouement mondiale, elle fut écartée avec l'apparition des antibiotiques dans la médecine occidentale. Mais depuis quelques décennies, on observe une renaissance de la phagothérapie.

Cette thérapeutique utilise des virus, prédateurs naturels des bactéries : appelés bactériophage ou phage. C'est l'action bactéricide des phages lytiques qui est utilisée dans la phagothérapie. Ils ont aussi d'autres effets bénéfiques comme la modulation de l'immunité de l'hôte, la synergie avec les antibiotiques et les interactions avec les biofilms.

Cependant nous sommes qu'au début des recherches et le potentiel des phages semble immense. La phagothérapie offre de nouvelles perspectives et un nouvel espoir dans la lutte des bactéries multirésistantes.

DISCIPLINE : Virologie

MOTS CLES : Bactériophage, bactéries multirésistantes, antibiorésistance, bactériolytique, phagothérapie, traitement antibactérien

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

U.F.R. des Sciences Pharmaceutiques

Université de Bordeaux

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux