



HAL
open science

La phagothérapie orale

Alizée Breton

► **To cite this version:**

| Alizée Breton. La phagothérapie orale. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02143436

HAL Id: dumas-02143436

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02143436>

Submitted on 3 Jun 2019

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.

U.F.R. D'ODONTOLOGIE

Année 2019

Thèse n°35

THESE POUR L'OBTENTION DU
**DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE
DENTAIRE**

Présentée et soutenue publiquement

Par BRETON, Alizée, Nadine, Jacqueline

Née le 7 septembre 1991 à Mont Saint Aignan

Le 17 mai 2019

LA PHAGOTHERAPIE ORALE

Sous la direction de : Johan SAMOT

Membres du jury :

Mme DUPUIS, Véronique

M. SAMOT, Johan

Mme NGUYEN, Darrène

M. BOU, Christophe

Mme LE HENAFF-LE MARREC, Claire

Présidente

Directeur

Rapporteur

Examineur

Invitée

UNIVERSITE DE BORDEAUX

Président M. TUNON DE LARA Manuel

Directeur de Collège des Sciences de la Santé M. PELLEGRIN Jean-Luc

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES

<i>Directrice</i>	Mme BERTRAND Caroline	58-01
<i>Directeur Adjoint à la Pédagogie</i>	Mr DELBOS Yves	56-01
<i>Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche</i>	M. CATROS Sylvain	57-01
<i>Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales</i>	M. LASSERRE Jean-François	58-01

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Sylvain	CATROS	Chirurgie orale	57-01
M	Raphaël	DEVILLARD	Odontologie restauratrice et endodontie	58-01
Mme	Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-01
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques - Biomatériaux	58-01
M.	Jean-Christophe	FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Cécile	BADET	Sciences biologiques	57-01
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-01
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01
M.	Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M,	Jean-Christophe	COUTANT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M,	Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Dominique	GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-01
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Adrien	NAVEAU	Prothèse dentaire	58-01
M.	Jean-François	PELI	Odontologie restauratrice – Endodontie	58-01
M.	Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02

M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Johan	SAMOT	Biologie Orale	57-01
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Noélie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-01
M.	Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

AUTRES ENSEIGNANTS

Mme	Audrey	AUSSEL	Sciences anatomiques et physiologiques	58-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01

ASSISTANTS

Mme	Mathilde	BOUDEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Wallid	BOUJEMAA AZZI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Melle	Camille	BOULÉ-MONTPEZAT	Odontologie pédiatrique	56-01
Mlle	Anaïs	CAVARE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Hubert	CHAUVEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M,	Jean-Baptiste	CULOT	Fonctions/dysfonctions, imagerie, biomatériaux	58-01
M	Pierre-Hadrien	DECAUP	Fonctions/dysfonctions, imagerie, biomatériaux	58-01
Mme	Severine	DESCAZEUX	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Julia	ESTIVALS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Cédric	FALLA	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mme	Mathilde	FENELON	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Agathe	GREMARE	Biologie orale	57-01
M	Mickaël	HYVERNAUD	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Clémence	JAECK	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Mathilde	JACQUEMONT	Parodontologie	57-01
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme	Claudine	KHOURY	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-02
Mr	Antoine	LAFITTE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M	Adrien	LASTRADE	Prothèse dentaire	58-01
M.	Emmanuel	MASSON REGNAULT	Chirurgie Orale	57-01
Mme	Marie	MÉDIO	Orthopédie dento-faciale	56-01
Mme	Aude	MENARD	Prothèse dentaire	58-01
M	Antoine	PEPELUT	Parodontologie	57-01
M	Florian	PITEU	Prothèse dentaire	58-01
Mr	Thibaut	ROULLAND	Prothèse dentaire	58-01
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-01
Mme	Rawen	SMIRANI	Parodontologie	57-01
Mme	Sophia	ZIANE	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

Remerciements

A notre Présidente de thèse

Madame le Professeur Véronique DUPUIS
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Sous-section Prothèse 58-02

Je vous remercie sincèrement de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse. Veuillez recevoir l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

A notre Directeur de thèse

Monsieur le Docteur Johan SAMOT
Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Sous-section Biologie Orale – 57-01

Je vous adresse mes chaleureux remerciements pour m'avoir fait découvrir le monde passionnant des bactériophages. Je vous remercie pour votre patience, votre gentillesse, votre disponibilité, et vos précieux conseils tout au long de la rédaction de cette thèse. Un grand merci également pour ces années de clinique à Pellegrin. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

A notre Rapporteur de thèse

Madame le Docteur Darrène NGUYEN
Ancienne Assistante Hospitalo-Universitaire – Praticien Attaché

Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération et de mes remerciements pour votre gentillesse ainsi que pour le temps consacré à ce travail.

A notre Assesseur

Monsieur le Docteur Christophe BOU

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Prévention épidémiologie – Economie de la santé - Odontologie légale 56-02

A vous qui me faites l'honneur de participer à ce jury.

Je vous remercie pour votre bonne humeur et votre pédagogie tout au long de notre formation, et particulièrement lors des enseignements optionnels d'odontologie légale.

Soyez assuré de mon profond respect.

A notre Invitée

Madame Claire LE HENNAF-LE MARREC

Professeur des Universités

Section Biologie Cellulaire 65

A vous qui me faites l'honneur de participer à ce jury.

Je vous remercie de m'avoir présenté les bactériophages avec tant de passion, et de m'avoir ainsi donné l'envie d'y consacrer cette thèse.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de ma sincère gratitude.

Remerciements

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue et qui ont cru en moi, ainsi que tous ceux qui m'apportent du bonheur au quotidien, en particulier :

Mes parents,

Papa, tu es mon modèle depuis toujours. Je te remercie de m'avoir indiqué la voie. Merci pour ton soutien et tes conseils durant toutes ces années. Je n'en serais sans doute pas arrivée là sans toi. J'espère avoir réussi à te rendre fier de moi.

Maman, je te remercie d'avoir cru en moi, de m'avoir soutenue et écoutée durant toutes ces années, et pendant tous les moments difficiles. Tu es une maman formidable et notre complicité m'a beaucoup aidé à arriver jusqu'ici.

Morgane, Axelle et Mathis,

On s'est toujours soutenus. Je suis fière d'être votre grande sœur et tellement heureuse de vous avoir dans ma vie. Je serais toujours là pour vous.

Julien,

Merci mon Doudou pour ta patience et ta compréhension. Merci pour tout l'amour et le soutien que tu m'apportes. Marius et toi faites mon bonheur au quotidien et tu me donnes l'envie d'avancer. Ca y est, cette page se tourne (enfin !) et j'espère que la suivante sera encore plus belle.

Mes grands-parents,

Mamie, Papi, Mamou, Papou, vous m'avez quittée trop tôt. Merci pour tout le bonheur que vous m'avez apporté. J'aurais tant aimé que vous soyez à mes côtés aujourd'hui. Je pense très fort à vous et suis certaine que vous auriez été très heureux pour moi.

Je remercie également Marc et Marlène, chacun pour des raisons différentes... ! Je pense que vous comprendrez.

Merci aussi à mes tatas, mes cousins/cousines, et mes amis, pour votre joie de vivre et pour tous les supers moments passés à vos côtés qui m'ont permis de déconnecter de mon travail.

Table des matières

Table des illustrations.....	9
Table des abréviations.....	10
PARTIE I : GENERALITES.....	12
I- HISTOIRE DE LA PHAGOTHERAPIE DE SA DECOUVERTE A NOS JOURS.....	12
A) LA DECOUVERTE DES BACTERIOPHAGES.....	12
1) Les premières observations.....	12
2) Les travaux de Félix d’Hérelle.....	12
B) L’ESSOR DE LA PHAGOTHERAPIE.....	13
1) La phagothérapie : source de polémique.....	13
2) Les premiers essais cliniques.....	13
a) Sur modèle animal.....	13
b) Premières applications à la médecine humaine.....	14
3) Caractérisation des bactériophages.....	14
4) Production commerciale de suspensions phagiques.....	14
C) LE DECLIN DE CETTE THERAPEUTIQUE PROMETTEUSE.....	15
1) Les déconvenues.....	15
2) L’apparition et le développement des antibiotiques.....	15
3) La seconde guerre mondiale.....	15
4) L’évolution après-guerre de la phagothérapie.....	16
a) Dans les pays de l’Est.....	16
b) Dans les pays de l’Ouest.....	16
II- DESCRIPTION DES BACTERIOPHAGES ET DE LA PHAGOTHERAPIE.....	17
A) LES BACTERIOPHAGES.....	17
1) Présentation.....	17
2) Taxonomie.....	17
3) Structure générale.....	19
4) Habitat et résistance dans l’environnement.....	20
5) Les différents cycles phagiques.....	20
a) Cycle chronique : phages filamenteux.....	20
b) Cycle lysogénique : phages tempérés.....	21
c) Cycle lytique : phages virulents.....	21
d) Cycle pseudo-lysogénique.....	22
B) LA PHAGOTHERAPIE.....	23
1) Principe.....	23
2) Préparation des bactériophages thérapeutiques.....	24

a) Obtention de suspensions contenant des phages	24
b) Propagation des phages	24
c) Purification des phages	25
d) Numération des clones.....	25
e) Contrôle.....	25
3) Pharmacologie des bactériophages	25
a) Pharmacocinétique des bactériophages	25
b) Pharmacodynamique	26
4) Les protéines phagiques d'intérêt.....	28
a) Les polysaccharides dépolymérase.....	28
b) Les lysines	30
PARTIE II : MATERIELS ET METHODES	31
I- STRATEGIE DE RECHERCHE.....	31
II- CRITERES DE SELECTION DES ARTICLES.....	31
III- EXTRACTION DES DONNEES DE SYNTHÈSE	31
PARTIE III : RESULTATS	32
PARTIE IV : DISCUSSION.....	70
CONCLUSION	74
Bibliographie	75
Annexes	84

Table des illustrations

Tableau 1 : Les principaux groupes de bactériophages et leurs caractéristiques.....	18
Figure 1 : Premières photographies des bactériophages actifs contre <i>Escherichia coli</i> publiées par Luria en 1942.....	19
Figure 2 : Structure générale d'un bactériophage caudé T4.....	20
Figure 3 : Schéma des différents cycles infectieux des bactériophages	23
Figure 4 : Distribution des différentes classes de dépolymérase sur la structure des bactériophages à queue.....	29
Figure 5 : La dégradation du polysaccharide capsulaire bactérien par une glycanase transmise par les phages	29
Tableau 2 : Nombre de résultats et d'articles sélectionnés pour chaque recherche électronique de la revue systématique.....	32
Tableau 3 : Activité sur <i>Enterococcus</i> de phages isolés ou cocktails.....	33
Tableau 4 : Activité sur <i>Streptococcus</i> de phages isolés	36
Tableau 5 : Activité sur <i>Staphylococcus</i> de phages isolés	38
Tableau 6 : Activité sur <i>Pseudomonas</i> de phages isolés ou cocktails de phages.....	42
Tableau 7 : Activité sur <i>Actinomyces</i> de phages isolés	51
Tableau 8 : Activité sur <i>Veillonella</i> de phages isolés.....	52
Tableau 9 : Activité de phages isolés sur diverses autres souches bactériennes orales.....	53
Tableau 10 : Activité de la lysine phagique ClyR sur diverses bactéries orales.....	54
Tableau 11 : Activité de la lysine LysK ou de ses dérivés sur diverses bactéries orales.....	56
Tableau 12 : Activité d'autres enzymes phagiques sur diverses bactéries orales	59

Table des abréviations

BAL : (broncho-alveolar lavages), liquide de lavages broncho-alvéolaires

BHI : (brain heart infusion), bouillon cœur-cervelle

CaOH : hydroxyde de calcium

CBD : (cell binding domain), domaine de liaison à la cellule

CF : (cystic fibrosis), fibrose kystique

CHAP : (cystein and histidine dependant amidohydrolase/peptidase), amidohydrolase/peptidase dépendante de la cystéine et de l'histidine.

ChX : gluconate de chlorhexidine

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMB : concentration minimale bactéricide

CSLM : (confocal scanning light microscopy), microscopie confocale à balayage laser

DAP : daptomycine

DIC : contraste d'interférence différentielle

DL₅₀ : dose létale médiane

DO : densité optique

DO₆₀₀ : densité optique à 600nm

DO₆₆₀ : densité optique à 660nm

EAD : (enzymatically active domain), domaine d'activité enzymatique

EDTA : éthylènediaminetétraacétique

EOP : (efficacy of placage), efficacité de lyse

EPS : exo-polysaccharide

EVA : échelle visuelle analogique

FEC : (fractional eradicating concentrations), concentrations d'éradication des fractions

FEC_{min} : concentration minimale d'éradication des fractions

HA : hydroxyapatite

hBMEC : (human brain microvascular endothelial cell), cellule endothéliale des micro-vaisseaux de cerveau humain

HuS : (human serum), sérum humain

HSF : (human synovial fluid), liquide synovial humain

IgG : immunoglobuline G

IL-6 : interleukine 6

IM : intramusculaire

IP : intrapéritonéale

IV : intraveineuse

LPS : lipopolysaccharide

LTP : lysostaphine

MAC-T : cellules épithéliales de mammifère bovin

MBEC : (minimum biofilm eradication concentration), concentration minimale d'éradication des biofilms

MBEC₉₀ : concentration minimale pour éradiquer 90% du biofilms

mOB : ostéoblastes murins

MOI : (multiplicity of infection), rapport d'infectivité

MLD : (minimum lethal dose), dose létale minimale

MRSA : (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

MSSA : (methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus* sensible à la méticilline

NaF : fluorure de sodium

NS : (normal saline), sérum physiologique

PBS : (phosphate buffered saline), tampon phosphate salin

PCNP : (polycationic nanopeptide), nonapeptide polycationique

PCR : (polymerase chain reaction), réaction de polymérisation en chaîne

PGH : peptidoglycane hydrolase

PTD : (protein transduction domain), domaine de transduction protéique

PVC : chlorure de polyvinyle

RL : (Ringer's lactate solution), lactate de Ringer

SC : sous-cutané

SCV : (small colony variants), variants de petites colonies

TOD₅₀ : temps nécessaire pour atteindre la moitié de l'absorbance de départ

TSB : (tryptic soy broth), bouillon de soja tryptique

TNF- α : (tumor necrosis factor α), facteur de nécrose tumorale α

UFC : unité formant colonie

UFP : unité formant plaque

UV : ultra-violet

VISA : (vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus* à résistance intermédiaire à la vancomycine

VRE : (vancomycin-resistant enterococci), entérocoques résistants à la vancomycine

VREF : (vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*), *Enterococcus faecalis* résistant à la vancomycine

VRSE : (vancomycin-resistant *Staphylococcus epidermidis*), *Staphylococcus epidermidis* résistant à la vancomycine

VSEF : (vancomycin-sensitive *Enterococcus faecalis*), *Enterococcus faecalis* sensible à la vancomycine

VSSE : vancomycin-sensitive *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* sensible à la vancomycine

VRSA : (vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine

VSE : (vancomycin-sensitive enterococci), entérocoques sensibles à la vancomycine

PARTIE I : GENERALITES

I- HISTOIRE DE LA PHAGOTHERAPIE DE SA DECOUVERTE A NOS JOURS

A) LA DECOUVERTE DES BACTERIOPHAGES

De nombreux débats et controverses existent autour de la découverte des bactériophages (1).

1) Les premières observations

En 1896, Ernest Hanbury Hankin, un bactériologiste britannique, effectue des travaux sur le choléra en Inde. Il remarque l'existence d'une activité antibactérienne contre *Vibrio cholerae* dans les eaux du Gange et de la Jumna, et suggère alors qu'il y existe une substance capable d'une activité bactéricide contre *Vibrio cholerae*. Cette substance, labile à la chaleur et capable de passer au travers d'un filtre de porcelaine fine de Chamberland-imperméable aux bactéries mais perméable aux virus et toxines-, limitait la diffusion de la bactérie responsable du choléra (1-5).

Dans un article publié deux ans plus tard, en 1898, dans le « Russian Archives of the Pathological and Clinical Medicine », le bactériologiste russe Nikolay Fyodorovich Gamaleya expose son observation d'un phénomène similaire : la lyse du bacille du charbon *Bacillus anthracis* dans des tubes, qu'il attribua à des ferments (1,5,6).

En 1915, Frederick William Twort, chercheur bactériologiste britannique, observe au microscope des zones vitreuses dans ses colonies de bactéries. Il tenta, en vain, de repiquer ces colonies transparentes : les bactéries de ces colonies étaient lysées. Il observa également que ce phénomène lytique était transmissible et filtrable. Son étude, publiée dans « The Lancet » en 1915 décrit donc un agent doté de propriétés antibactériennes mais ne précise pas sa nature, bien qu'il émit plusieurs hypothèses dont celle qu'il pourrait s'agir d'un virus (1,5,7).

Si la primauté de la description du principe lytique revient incontestablement à Twort, il est indubitable que celui-ci avait fait une interprétation imprécise et avait encore moins envisagé une utilisation thérapeutique. Il fallut attendre les travaux de Félix d'Hérelle pour commencer à comprendre la nature et l'importance de cette substance inconnue (5,8).

2) Les travaux de Félix d'Hérelle

Félix Hubert d'Hérelle, chercheur microbiologiste franco-canadien à l'Institut Pasteur de Paris, aurait observé pour la première fois le phénomène au cours d'un voyage au Mexique en 1910 durant lequel il étudiait une épizootie chez les sauterelles. Il isola la bactérie pathogène *Coccobacillus acridiorum* à partir des liquides diarrhéiques des insectes malades, et ensemença de grandes quantités de bouillon de culture avec cette bactérie dans le but de pouvoir répandre ensuite les bactéries incubées sur les insectes encore à l'état larvaire et ainsi, de les éliminer par maladie. Cependant, il remarqua dans plusieurs tubes de repiquage l'apparition des colonies échanrées ou des taches vierges de 2 à 3mm de diamètre. Après récupération de la surface de ces zones suspectes, qu'il nomma « taches claires », mise sur gélose et observation au microscope, il s'avéra qu'aucun élément n'était visible. Il conclut que ce qui causait la formation des zones claires devait être assez petit pour pouvoir être filtré, c'est-à-dire capable de traverser un filtre en porcelaine de type Chamberland qui retiendrait toutes les bactéries. Cependant, l'apparence de ces taches claires était inconstante ce qui l'empêcha d'étudier davantage ce phénomène (7,9).

En août 1915, de retour à Paris, d'Hérelle eut pour mission d'étudier une épidémie de dysenterie hémorragique sévère (diarrhée provoquée par la bactérie *Shigella dysenteriae*) parmi des troupes françaises placées à Maisons-Laffitte. Il analysait *in vitro* des déjections de malades atteints tout en

suyant en parallèle l'évolution de l'état des patients, et remarqua que l'évolution favorable de la maladie était précédée par l'apparition d'un principe lytique (plages claires sur des cultures en milieu solide ou éclaircissement d'un bouillon) dans les selles du malade. A l'inverse, en son absence, l'évolution était souvent mortelle. Sur ce constat, il fit l'hypothèse que ce « principe lytique » était responsable de l'issue favorable de la maladie et qu'il s'agissait d'un virus antagoniste de la bactérie pathogène (1,4,7,9). Il appela ce virus « bactériophage » à partir des mots grecs « baktéria » (« bâton », en référence à la forme des premières bactéries observées) et « phagein » (« manger ») (1,4,5,10).

Le 15 septembre 1917, le Dr Émile Roux exposa à l'Académie des Sciences une note dans laquelle d'Hérelle présentait, pour la première fois à la communauté médicale, le microbe invisible qui avait agi en tant qu'antagoniste du bacille dysentérique, et auquel il avait donné le nom de « bactériophage » (1,5,9,11).

B) L'ESSOR DE LA PHAGOTHERAPIE

1) La phagothérapie : source de polémique

À cette époque, malgré le fait qu'aucun traitement vraiment efficace n'existait contre les infections bactériennes, la crédibilité de d'Hérelle était mise en doute, notamment ses affirmations sur la nature du principe lytique qu'il avait mis en évidence. Ainsi, pendant une décennie, de nombreux auteurs parleront du « phénomène de d'Hérelle » ou du « prétendu bactériophage » en contestant la théorie virale de d'Hérelle. Beaucoup d'éléments contribuaient à une méconnaissance de la nature réelle de ce principe lytique, la virologie étant encore une science balbutiante et le microscope électronique n'existant pas encore (5).

A la fin de l'année 1920, Jules Bordet (immunologiste et microbiologiste belge, lauréat du prix Nobel de physiologie et de médecine en 1919 pour ses travaux sur les mécanismes de l'immunité) et Michael Ciuca (scientifique roumain, chercheur et enseignant dans le domaine de la bactériologie) se sont intéressés à la découverte de d'Hérelle. Ils se sont procurés et ont analysé des tubes supposés contenir des bactériophages isolés par d'Hérelle. Deux notes de Bordet et Ciuca ont contesté la nature virale du phénomène de d'Hérelle, soutenant la nature enzymatique du principe lytique (5,7,8,12-14). D'autres arguments négatifs à l'encontre de la phagothérapie trouvaient leur fondement dans les échecs de travaux entrepris et publiés. Bien que d'Hérelle ait souligné la nécessité de l'utilisation de phages réellement actifs contre la bactérie responsable de l'infection à traiter, les produits commercialisés par de nombreuses firmes ne respectaient pas cette condition essentielle (5,8).

2) Les premiers essais cliniques

Malgré les critiques, d'Hérelle poursuivit ses recherches sur le sujet. Une année seulement après la publication initiale, il envisageait avec clairvoyance une application thérapeutique de son observation.

a) Sur modèle animal

En 1919, il employa pour la première fois *in vivo* le fruit de sa découverte sur des volailles souffrant de typhose aviaire (*Salmonella*) en Europe. Il se rendit dans plusieurs élevages de volailles contaminés, et élaborait une suspension de bactériophages à partir de fèces de volailles malades. Il administra cette suspension à des animaux sains et malades. Ce traitement permit la guérison des poules infectées et l'extinction de l'épidémie. Le biologiste en conclut que sa suspension avait été efficace tant sur le plan thérapeutique que prophylactique. Il venait d'inventer la phagothérapie (8,9).

Au début de l'année 1920, lors d'un séjour en Indochine avec le bactériologiste Alexandre Yersin, d'Hérelle généralisa chez l'animal le rôle du bactériophage en tant qu'agent de guérison, sur le barbone du buffle, mais aussi sur la peste chez le rat et la flacherie chez le vers à soie. Ceci lui permit de vérifier l'efficacité de bactériophages sur des maladies non intestinales et donc de montrer qu'il s'agissait d'un phénomène général de défense (5,8).

Ses réussites thérapeutiques sur les animaux confortèrent d'Hérelle sur l'intérêt des bactériophages et le poussèrent à promouvoir la phagothérapie et à l'appliquer chez l'homme.

b) Premières applications à la médecine humaine

D'Hérelle a relaté ses toutes premières tentatives de « phagothérapie » chez des enfants à l'hôpital Necker-Enfants-Malades à Paris dans le service du Professeur Hutinel au cours de l'été 1919 (1). Pour cela, d'Hérelle a mis au point une préparation à ingérer contenant des bactériophages. Avant la première administration à un patient, d'Hérelle absorbait et faisait absorber « son » bactériophage à son entourage pour en vérifier l'innocuité. Cinq enfants atteints de dysenterie bacillaire furent traités avec succès (8). Galvanisé par ce succès, il se mit à traiter de nombreux malades et obtint d'assez bons résultats, par exemple, lors d'injections intra-ganglionnaires de phages sur des patients atteints de peste bubonique en quarantaine sur une île au large du canal de Suez ou encore lors d'une épidémie de choléra en 1927 en Inde (1,5,8,9).

3) Caractérisation des bactériophages

De nombreux chercheurs tentèrent de percer les secrets de la nature et du mécanisme d'action des phages. Les laboratoires déterminèrent ainsi leur taille, leur capacité de résistance au milieu extérieur (pH, chaleur, agents chimiques, ...), l'existence de plusieurs types de bactériophages différents, et de nombreux aspects de leurs propriétés pharmacologiques (15). Mais il fallut attendre les travaux d'Ellis et Delbrück sur la croissance en une étape des bactériophages en 1939, et l'invention de la microscopie électronique qui permit leur observation en 1940, pour que les opposants à la théorie virale cèdent du terrain (5).

4) Production commerciale de suspensions phagiques

En France, le « Laboratoire du Bactériophage » fut fondé en 1928. Il commercialisa des suspensions buvables de phages en cocktails, mélange de plusieurs phages pour étendre le spectre d'action, comme par exemple les suspensions « Bacté-pyélo-phage » pour lutter contre les pyélonéphrites et les cystites ou les suspensions « Bacté-intesti-phage » contre les entérites coliques et les diarrhées infantiles (1,5). Les cinq spécialités à base de bactériophages produites par ce laboratoire auront été parmi les dix meilleures ventes de médicaments de l'entreprise pendant les années 1930 (5,8).

En Allemagne, la société Antipiol délivrait le produit Enterofagos destiné aux infections intestinales (5). En Suisse, la petite firme pharmaceutique Saphal fabriquait et commercialisait les spécialités, « Coliphagine », « Intestiphagine », « Pyophagine » et « Staphagine », utilisables par voie orale, injectable, en pommades et sprays jusque dans les années 1960 (16). La notoriété des phages avait traversé l'Atlantique et, au début des années 30, aux Etats-Unis d'Amérique, plusieurs laboratoires se mirent à commercialiser des suspensions thérapeutiques destinées à traiter les infections humaines provoquées par *Escherichia coli*, *Staphylococcus* et *Streptococcus* ainsi que d'autres pathogènes (1).

En 1933, d'Hérelle partit en Géorgie, dans l'Union des Républiques Socialistes Soviétiques (URSS) rejoindre l'un de ses élèves, Georgyi Eliava, avec lequel il fonda dans la capitale, Tbilissi, un institut travaillant exclusivement sur les bactériophages et produisant des suspensions thérapeutiques. Cet institut, renommé Institut Eliava vers la fin des années quatre-vingt en hommage à ce dernier, mort en 1937, produit toujours activement des suspensions de phages (1,5).

Malheureusement, les phages connurent une mauvaise publicité à cause de préparations de mauvaise qualité, dues à des contrôles incomplets, voire inexistantes. Des impuretés bactériennes souillaient les préparations et certaines suspensions du commerce étaient même involontairement exemptes de phages actifs car les stabilisants utilisés par les fabricants avaient détruit les phages sans qu'aucun contrôle n'ait été mené par la suite (5,8,17,18).

C) LE DECLIN DE CETTE THERAPEUTIQUE PROMETTEUSE

1) Les déconvenues

Bien que mondialement répandue, la phagothérapie révéla de nombreux problèmes tels que l'inconstance des résultats, la qualité et la quantité des traitements disponibles (5,8).

Inquiété par ces différents points, le « Council on Pharmacy and Chemistry » (CPC) of the American Medical Association, demanda en 1934 une révision complète de l'ensemble des publications de l'époque, pour juger de la qualité, de l'efficacité et de l'innocuité des phages (1,5). Les spécialistes en charge du dossier, à savoir le microbiologiste Monroe Eaton et l'infectiologue Stanhope Bayne, conclurent qu'il n'y avait aucune preuve que la substance à la base de l'effet antibactérien soit un virus. Ils reconnurent cependant l'efficacité des suspensions de phages face à certaines infections, notamment les infections à staphylocoques (8), mais que ces dernières perdaient leur efficacité *in vivo* au contact de certains fluides corporels (5).

Ce rapport a fortement impacté négativement l'intérêt des scientifiques occidentaux sur l'utilité des phages à des fins thérapeutiques et l'enthousiasme des organismes de financement soutenant la recherche sur la thérapie phagique (1).

Sept ans plus tard, un second rapport a été publié par Albert Krueger et Jane Scribner pour faire suite au rapport d'Eaton et Bayne Jones. Celui-ci rapporta la potentielle dangerosité des phages (19). La CPC décida alors de mettre un terme à toutes les études majeures sur la phagothérapie aux Etats-Unis (1).

2) L'apparition et le développement des antibiotiques

L'évènement déclencheur de la «révolution antibiotique» fut la découverte en 1928 par Alexander Fleming que la moisissure *Penicillium notatum* synthétisait une substance antibactérienne : la pénicilline (5). Il faudra attendre 1940 pour voir le biochimiste Ernst Chain et le pharmacologiste Howard Florey purifier et développer l'utilisation de masse de la pénicilline (20).

Suite à cette découverte, d'autres antibiotiques ont vu le jour et ont suscité de nouveaux espoirs dans la lutte contre les maladies infectieuses. C'est le cas de la streptomycine, active sur les bactéries à Gram négatif, isolée en 1943 par le microbiologiste Selman Waksman à partir d'une souche d'*Actinomyces griseus* (21).

Leur développement sonna le début du déclin de la phagothérapie dans les pays occidentaux ; plus faciles d'emploi, plus stables et plus aisés à fabriquer, les antibiotiques furent produits en masse (8,14). La phagothérapie était cependant encore envisagée en ultime recours lors de l'échec des traitements consensuels en vigueur (5).

3) La seconde guerre mondiale

Lors de la première guerre mondiale, l'absence de soins antibactériens efficaces pour traiter les blessures et suites des chirurgies de guerre avait été responsable de nombreuses pertes humaines (5). Les champs de batailles devinrent donc des champs d'investigations pharmaceutiques à grande échelle.

Au sein de l'Union soviétique et des forces de l'Axe, les bactériophages ne furent pas mis tout de suite de côté, l'antibiothérapie n'étant au début de la seconde guerre mondiale que balbutiante. Les phages ont continué à être utilisés en thérapeutique, en association ou à la place des antibiotiques. Les activités de recherche et de production des phages étaient centralisées à l'institut Eliava en Géorgie (1,8). Dès le début de la guerre, les allemands s'étaient engagés dans la production à grande échelle, pour traiter la dysenterie bactérienne (5).

Dans les armées américaines et anglaises, au contraire, les recherches pharmaceutiques militaires s'orientèrent vers le développement et la production d'antibiotiques, nouvelle arme antibactérienne «miracle». La production à but militaire de sulfamide et de pénicilline, seuls antibiotiques testés au

début du conflit, devint massive et leur efficacité clinique contribua en partie à la victoire Alliée (1,14,15,22).

4) L'évolution après-guerre de la phagothérapie

a) Dans les pays de l'Est

L'URSS et le bloc soviétique ont poursuivi leurs travaux sur la phagothérapie sur une large échelle, et les infections ont, semble-t-il, continué d'être traitées avec succès (8). Plusieurs institutions de ces pays ont été très activement impliquées dans la recherche et la production de phages thérapeutiques comme par exemple l'institut HIET (Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy) fondé en 1952 en Pologne (1).

La guerre froide a interdit aux pays de l'Europe de l'Est l'accès aux antibiotiques produits par l'industrie pharmaceutique occidentale. Le contexte historique explique que l'intégralité des travaux entrepris dans les pays de l'Est n'ait pas eu le moindre écho dans les pays occidentaux. Le « Rideau de Fer » ne laissa passer aucune publication (14).

A l'heure actuelle, la Russie, la Géorgie et la Pologne utilisent encore les bactériophages à des fins thérapeutiques et ont maintenu et amélioré leurs phagothèques, notamment à l'Institut Eliava de Tbilissi en Géorgie et à Wroclaw en Pologne.

b) Dans les pays de l'Ouest

Jugée moins pratique (fabrication, conditionnement et utilisation) et moins efficace que l'antibiothérapie, la phagothérapie a été petit à petit délaissée par les pays occidentaux. Les laboratoires se sont rapidement focalisés sur l'antibiothérapie. En France, dans le Laboratoire du Bactériophage à Paris, la fabrication des spécialités de bactériophages se fit jusque dans les années 1970. Elles figuraient encore dans le dictionnaire Vidal en 1976 avant d'en être effacées. Les utilisations de ces spécialités devinrent de moins en moins fréquentes, même si il fut encore possible de s'en procurer pendant 15 ans dans deux instituts Pasteur : à Paris et à Lyon (8).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a réévalué l'efficacité des bactériophages dans la lutte contre le choléra, puis l'a comparé à celle des antibiotiques. Les conclusions de ce travail ont mis en évidence une diminution de la mortalité due au choléra, plus importante avec les antibiotiques (taux de mortalité compris entre 10% et 15%) qu'avec les bactériophages (taux de mortalité compris entre 22% et 45%) (23,24).

En France, les collections de phages initiées par d'Hérelle et autrefois perpétuées par le professeur Vieu à l'Institut Pasteur de Paris et par le professeur Guillemet à celui de Lyon sont à présent détruites (5).

Cependant, les bactériophages, délaissés en médecine, ont connu un nouvel essor avec le développement de la biologie moléculaire. Un groupe de scientifiques nommé le « Cold Spring Harbor Laboratory Phage Group », créé en 1941 aux Etats-Unis par Max Delbrück et le microbiologiste Salvador Luria, s'est intéressé aux mécanismes d'action des phages vis à vis des bactéries. Ces études ont permis de mettre en lumière le fonctionnement des phages et la mécanique des infections virales. Mieux encore, elles ont offert aux phages une seconde chance de briller en sciences en les utilisant en génétique et en biologie moléculaire. Leurs nouvelles attributions ont permis, entre autres, de confirmer que l'ADN est le support de l'information génétique, de découvrir les enzymes de restriction ou de mettre au point la technique de séquençage de l'ADN (5,17,25–27).

II- DESCRIPTION DES BACTERIOPHAGES ET DE LA PHAGOTHERAPIE

A) LES BACTERIOPHAGES

1) Présentation

Comme nous l'avons vu précédemment, le terme bactériophage proposé par Félix d'Hérelle pour désigner le virus qu'il avait découvert, signifie étymologiquement « mangeur de bactéries ». Toutefois, d'Hérelle a lui-même nuancé la signification du mot dans son premier livre publié « Le bactériophage : son rôle dans l'immunité » : il y précise que le suffixe « phage » est utilisé non pas dans le sens strict de « manger » mais plutôt dans celui de « se développer au dépens de » (5).

Les bactériophages, plus simplement appelés phages, sont des virus spécifiques des cellules procaryotes que sont les bactéries. Ils ont le mode classique de répllication des virus (ils ne peuvent se multiplier qu'aux dépens de cellules vivantes qu'ils parasitent), cependant, ils forment un groupe particulier de virus, car ils n'utilisent que les constituants des cellules procaryotes bactériennes pour se multiplier. La bactérie qui est infectée par un bactériophage est appelée « bactérie hôte ». Les bactériophages ont la propriété d'être étroitement spécifiques : ils n'attaquent qu'une espèce bactérienne précise, et souvent même, seulement quelques représentants de l'espèce. Par contre, plusieurs bactériophages différents peuvent être spécifiques d'une même bactérie (5,17).

Certains bactériophages ont la capacité de détruire les bactéries par lyse, tout en étant inoffensifs pour les cellules humaines, animales et végétales (cellules eucaryotes). D'autres s'intègrent au chromosome bactérien (5).

2) Taxonomie

La classification des virus, et donc celle des bactériophages, s'appuie sur des critères physicochimiques : la nature de l'acide nucléique (ADN ou ARN, simple ou double brin), la présence ou l'absence d'une enveloppe extérieure (péplos), ainsi que la symétrie et les particularités de la capsid (hélicoïdale, icosaédrique ou complexe) (5).

Les différents bactériophages ont une structure commune, comportant au minimum : le matériel génétique, en général contenu dans une capsid, un dispositif d'arrimage à la bactérie cible et un dispositif d'injection du matériel génétique dans la bactérie (5,14). Certains bactériophages ont une structure assez simple comparable à celle de petits virus d'animaux ou de plantes, d'autres ont une structure dite à symétrie binaire avec deux éléments principaux que sont la tête et la queue (5).

D'après la banque de données de l'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 95% des bactériophages décrits appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*. Les virus de l'ordre des *Caudovirales* présentent une structure dite « à symétrie binaire » ou « caudée », et sont partagés en trois familles : les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae*. Les 5% des phages n'appartenant pas à l'ordre des *Caudovirales* présentent une structure à symétrie non binaire qui peut être soit cubique, soit hélicoïdale, soit complexe (5).

Ordre	Famille	Morphologie	Exemples de genres	Symétrie	Acide nucléique	Particularités
C A U D O V I R A L E S	Myoviridae		T4-like viruses, P2, P1, SP01, Mu, PSB1, φH	binaire ou caudé	ADN double brin, linéaire	queue contractile
	Siphoviridae		λ-like viruses, T1, T5, L5, c2, ψM1, φC31, N15	binaire ou caudé	ADN double brin, linéaire	queue longue et non contractile
	Podoviridae		T7, φ259, P22, N4	binaire ou caudé	ADN double brin, linéaire	queue courte et non contractile
P A S D O R D R E	Corticoviridae		Corticovirus	cubique ou polyédrale	ADN double brin, circulaire super-enroulé	vésicule interne lipidique
	Tectiviridae		Tectivirus	cubique ou polyédrale	ADN double brin, linéaire	vésicule interne lipidique
	Plasmaviridae		Plasmavirus	complexe ou pléiomorphe	ADN double brin, circulaire super-enroulé	polymorphes, sans capsid, constitués uniquement d'une enveloppe (lipides) et d'une nucléoprotéine
	Inoviridae		Inovirus, Plectrovirus	hélicoïdal ou filamenteux	ADN simple brin, circulaire	filamenteux ou en forme de batonnets, symétrie hélicoïdale
	Microviridae		Microvirus, Spiromicrovirus, Bdellovibrio, Chlamydia microvirus	cubique ou polyédrale	ADN simple brin, circulaire	cubiques avec de grands capsomères
	Cystoviridae		Cystovirus	cubique ou polyédrale	ARN double brin, linéaire segmenté	enveloppe lipidique, sphériques, à génome fragmenté
	Leviviridae		Levivirus, Allovivivirus	cubique ou polyédrale	ARN simple brin, linéaire	polarité positive, non enveloppés, sphériques à symétrie cubique (filamenteux, non lytiques donc sans intérêt pour la phagothérapie)

Tableau 1 : Les principaux groupes de bactériophages et leurs caractéristiques. D'après (28,29).

3) Structure générale

Les virus ont une taille comprise entre 60 et 300 nanomètres, soit environ un centième de la taille moyenne d'une bactérie qui est de l'ordre du micron. Les bactériophages ne sont donc observables qu'au microscope électronique (5).

Les premières observations des bactériophages ont été réalisées dès 1940 par l'Allemand Ruska (5), et en 1942, Luria en publia les premières photographies (30).

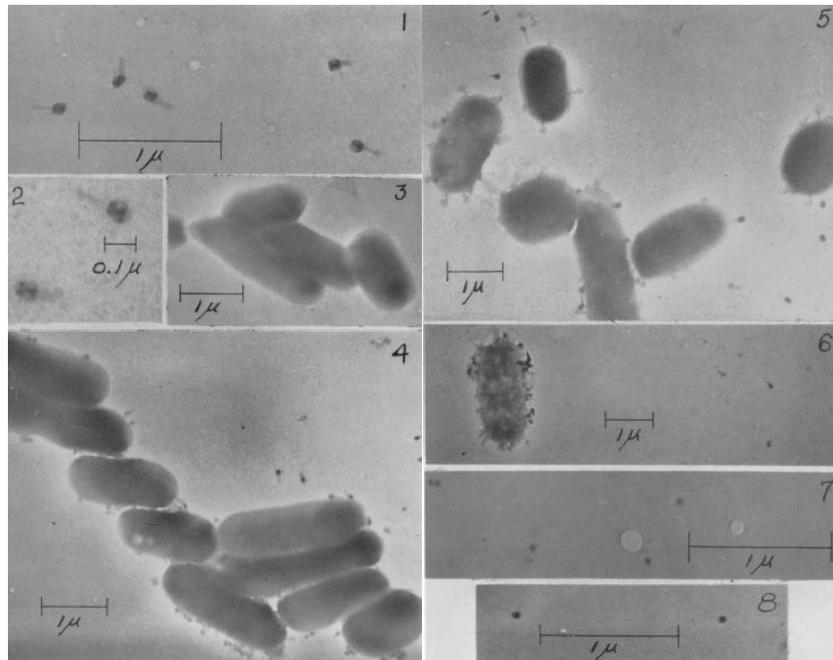


Figure 1 : Premières photographies des bactériophages actifs contre *Escherichia coli* publiées par Luria en 1942 (30).

La description morphologique suivante vaut pour l'ordre des *Caudovirales* où sont inclus la majorité des phages, notamment l'essentiel des phages présentant un intérêt pour la phagothérapie par leur caractère lytique. Elle se base sur celle du phage T4 (4). C'est l'un des phages les plus étudiés en laboratoire, appartenant à la famille *Myoviridae* et qui présente la structure à symétrie binaire correspondant aux *Caudovirales* (5). Les phages T4 font partie des plus gros phages, d'une longueur approximative de 200 nm et d'une largeur de 80 à 100 nm (4).

La tête d'un bactériophage se compose d'une capsidie protéique et du génome viral (formé chez le phage T4 d'un ADN double brin) (5). La structure de la capsidie, peu importe sa taille ou sa forme, est un rassemblement d'une ou plusieurs sous-unités protéiques appelées les protomères. La sous-unité morphologique d'une capsidie est un capsomère qui protège l'acide nucléique viral (génome) (4). La capsidie de la plupart des phages est sous forme d'un polyèdre (5).

La queue est un tube creux, entouré d'une gaine contractile, à travers lequel passe l'acide nucléique lorsque le bactériophage infecte une cellule hôte bactérienne. Certains phages ne possèdent pas de queue. Le phage T4 possède des éléments attachés à la queue qui l'aide à se fixer à une cellule bactérienne, à savoir une plaque terminale et six fibres caudales dont l'extrémité distale est composée de protéines (4,5,32).

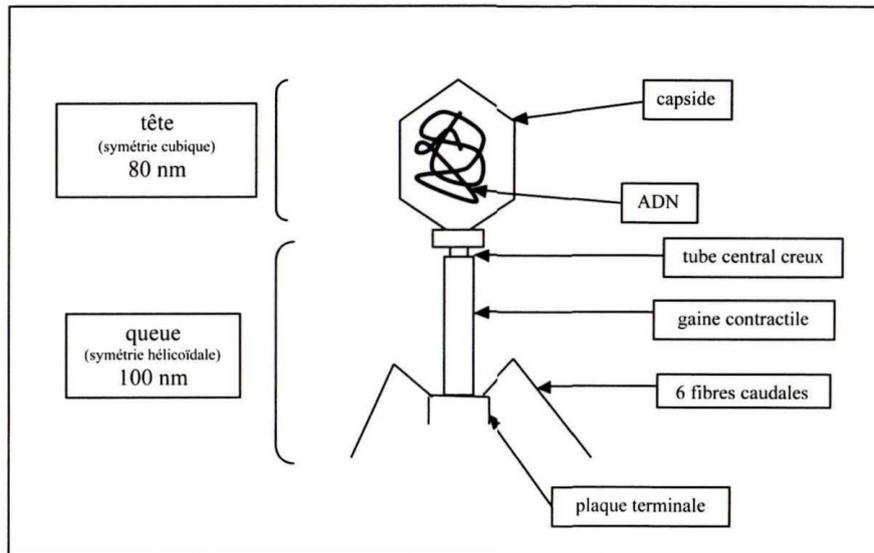


Figure 2 : Structure générale d'un bactériophage caudé T4 (5).

Les familles de phages n'appartenant pas à cet ordre, par exemple les phages filamenteux, que nous évoquerons rapidement, présentent une morphologie plus variée, qui peut être plus ou moins proche de cette description.

4) Habitat et résistance dans l'environnement

Dans la nature, les bactériophages sont extrêmement nombreux. Les phages sont présents dans tous les environnements présentant des bactéries, notamment sur le sol, dans les eaux salées ou douces, sur les surfaces cutanées et muqueuses des êtres vivants (et entre autres dans l'appareil digestif) (5,14). Dans un milieu donné, leur nombre est en général dix, voire cent fois plus élevé que la quantité de bactéries présentes (5,33). Ces virus participent activement à l'évolution des écosystèmes, en détruisant une partie des bactéries, engendrant ainsi un renouvellement de la biomasse bactérienne, ou en interagissant avec les bactéries de telle sorte que des échanges de gènes entre bactéries aient lieu (5,14,33).

Dans les premières recherches de d'Hérelle, le bactériophage qu'il étudiait pouvait survivre jusqu'à une température de 65°C, température létale pour la majorité des bactéries non sporulées, et ce bactériophage était assez difficilement détruit par des agents physiques (chaleur ou rayons ultraviolets par exemple) et chimiques (antiseptiques par exemple). Depuis, la recherche a permis de comprendre qu'il existait en fait des milliers de type de bactériophages et que chaque bactériophage possédait des caractéristiques différentes. Cependant, certaines caractéristiques sont communes à tous les bactériophages, notamment leur résistance aux milieux extrêmes, généralement meilleure que celle des bactéries (5). Nombre de ces virus peut survivre des semaines à des années dans différents milieux, aqueux ou non, et ainsi demeurer dans les milieux les plus arides tels que les déserts chauds ou froids, les sources chaudes ou les fosses marines où la pression est énorme (5,33).

5) Les différents cycles phagiques

a) Cycle chronique : phages filamenteux

Le cycle d'infection chronique est un cycle lytique sans lyse. Les particules virales produites à faible débit sont, en effet, excrétées par bourgeonnement ou extrusion et les cellules infectées continuent de se diviser, transmettant le virus à la descendance (34).

b) Cycle lysogénique : phages tempérés

Lorsqu'un phage tempéré pénètre dans une cellule bactérienne, il se produit un cycle lysogénique ou lysogénisation. Le génome du phage s'insère dans le chromosome bactérien et devient dès lors partie intégrante de celui-ci (le génome viral intégré est appelé « prophage » et la bactérie est dite « lysogène »). La réplication de ce matériel génétique a ainsi lieu en même temps que celui de la bactérie. Celle-ci, dont le chromosome bactérien a été envahi, transmet ensuite lors de sa division ce nouveau patrimoine génétique à sa descendance. Cet état «silencieux» demeure jusqu'à l'activation du cycle lysogénique en cycle lytique ; le génome du phage s'excise alors du chromosome bactérien (5,14,34). Ce changement d'état est spontané dans un cas pour cent mille phages tempérés environ, mais sa fréquence est augmentée lors d'un stress, induit par exemple par des rayons ultraviolets, des rayons X ou des substances chimiques comme des oxydants (5). Les phages tempérés possèdent des activités enzymatiques particulières assurant l'insertion de leur génome dans l'hôte bactérien (notamment des intégrases). Ces phages sont utilisés au laboratoire comme transducteurs de gènes (18).

c) Cycle lytique : phages virulents

Les bactériophages virulents possèdent la capacité de se multiplier selon leur propre rythme, et non pas au gré des divisions bactériennes. La reproduction d'un tel phage permet d'engendrer simultanément plusieurs dizaines, voire plus, de virus tous identiques à lui (5).

Un cycle lytique complet se déroule en quelques minutes à maximum une heure. Dans les conditions optimales, la réplication bactérienne ne permet de générer que deux bactéries filles toutes les demi-heures chez les espèces bactériennes à développement rapide. Cette réplication dichotomique bactérienne n'est pas en mesure de résister à une lyse par les centaines de bactériophages produits lors de leur réplication. Une colonie bactérienne entière même abondante est ainsi rapidement détruite par le nombre de bactériophages à croissance exponentielle (5).

Pour illustrer le cycle lytique, nous reprendrons l'exemple du bactériophage T4. Ce bactériophage virulent dont le cycle lytique est aujourd'hui bien décrit, semble être représentatif de la plupart des cycles lytiques que suivent les autres types de phages virulents. Ce phage, dirigé contre la bactérie *Escherichia coli*, a fait l'objet de multiples études. Sa séquence nucléotidique, complètement décryptée dans les années 1990, est accessible *via* le site internet du Centre National pour l'Information Biotechnologique (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) sous les dénominations AF158101 (au sein de la base de données GenBank) et NC_000866 (au sein de la base de données NCBI).

L'étude de ce cycle a révélé la complexité de son mécanisme consistant en une cascade événementielle impliquant de nombreux gènes régulateurs et structuraux. Le cycle lytique comporte différentes phases (14) :

Arrimage

La fixation d'un bactériophage sur la membrane plasmique d'une bactérie fait intervenir deux types de structures :

- une ou plusieurs fibres caudales du bactériophage,
- des molécules particulières situées à la surface de la membrane externe de la bactérie hôte qui vont jouer le rôle de « récepteurs » pour le virus.

Dans le cas du phage T4, par exemple, plusieurs fibres caudales longues (LTF, long tail fibers), vont venir se fixer aux lipopolysaccharides (LPS) et aux protéines membranaires C (OmpC). Cette fixation, souvent réversible, permet un rapprochement du virus et de la bactérie. S'en suit un changement de conformation des fibres qui signale au plateau situé à la base de la queue du phage que l'attachement est correctement en place. Ce plateau va alors lui aussi changer de conformation (pour le phage T4, passage d'une conformation hexagonale à une conformation en étoile). De nouvelles fibres vont s'accrocher à des molécules de surface bactériennes pour stabiliser l'attache : pour le phage T4, il s'agit de fibres caudales courtes (STF, side tail fibers) dont l'attache est irréversible. Le bactériophage est

ainsi placé sur la membrane bactérienne sur le site adéquat pour injecter le génome viral. Ces nouvelles fixations vont être à l'origine d'une contraction de la gaine contractile de la queue. Toutes ces étapes de fixation durent environ dix secondes et l'ensemble s'appelle l'arrimage (5,35–37).

Entrée du génome viral et réplication

La contraction de la gaine pousse l'axe central rigide de la queue au travers de la paroi bactérienne (37). L'extrémité de cet axe entre donc en contact avec la membrane plasmique de la bactérie et interagit avec des molécules membranaires, ce qui entraîne la perforation de la membrane bactérienne suivie de la contraction de la queue, qui s'introduit à la manière d'une aiguille dans le cytoplasme bactérien (5,37,38). Pour le phage T4, la dégradation de la paroi cellulaire est catalysée par la protéine Gp5, un lysozyme qui coupe les liaisons unissant les glucides du peptidoglycane, facilitant la pénétration du tube de la queue à travers la membrane bactérienne (37,38).

Le génome du phage se retrouve éjecté de la capsid virale vers le cytoplasme bactérien, tandis que la capsid reste à l'extérieur. Ce génome exogène détourne alors le métabolisme de la cellule hôte à son profit : une endonucléase découpe l'ADN bactérien en de nombreux fragments inactifs, puis le génome viral puise dans les réserves d'énergie de la bactérie et se sert des ribosomes hôtes pour se reproduire et pour synthétiser différentes protéines nécessaires à la formation de nouvelles particules virales. Tous ces nouveaux éléments viraux sont ensuite assemblés pour composer les nouveaux virus, tous similaires au phage infectant initial (5).

Libération des nouveaux phages

En plus des protéines utilisées dans l'assemblage des nouvelles unités virales, le phage force la synthèse d'enzymes lysozymales destinées à détruire la membrane bactérienne après la constitution d'une quantité importante de nouveaux virions. L'éclatement de la bactérie hôte permet alors la libération de dizaines de nouveaux virus qui, à leur tour, attaquent les bactéries voisines (5). Deux protéines encodées par T4 participent à la lyse d'*E. coli* : des holines perforent la membrane cytoplasmique permettant au « lysozyme de T4 » (endolysine) de se déplacer du cytoplasme vers le peptidoglycane de la cellule hôte qu'il attaque, ce qui détruit la paroi (18,38).

d) Cycle pseudo-lysogénique

Il existe un quatrième type de cycle de reproduction, nommé « pseudo-lysogénie ». Ce cycle reste encore mal compris. Il s'agit d'un intermédiaire entre les cycles lytiques et lysogéniques, au cours duquel le génome viral ne s'intègre pas au génome de la cellule hôte, et demeure latent dans le cytoplasme (15,32).

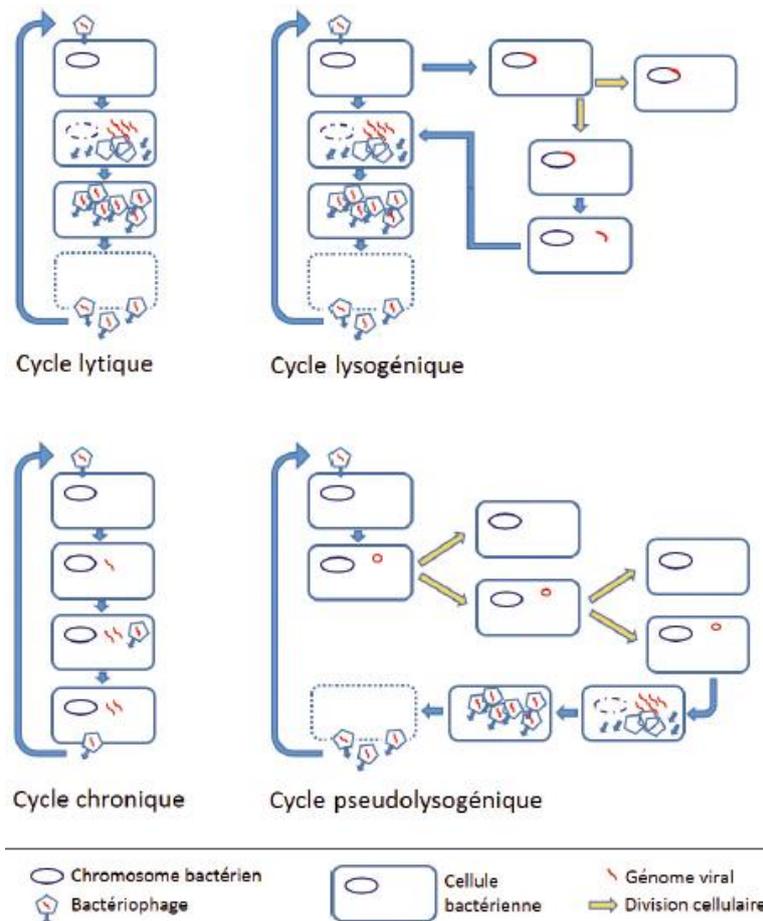


Figure 3 : Schéma des différents cycles infectieux des bactériophages (34).

B) LA PHAGOTHERAPIE

1) Principe

Le traitement d'infections bactériennes à partir de bactériophages, plus communément appelé phagothérapie, a été étudié et pratiqué très tôt après la découverte des bactériophages, même bien avant que ceux-ci soient utilisés par la recherche en biologie génétique. Cette pratique tend à utiliser leurs propriétés de prédateur naturel des bactéries pour éliminer les populations bactériennes pathogènes, en plaçant ces phages si possible au contact direct sinon au plus proche des sites d'infections (5,17,33).

En pratique, il existe trois protocoles de phagothérapie :

- A l'image des antibiogrammes pour les antibiotiques, il est possible de réaliser ce qu'Alain Dublanche nomme « phagogramme » ou « bactériophagogramme » pour cibler la bactérie incriminée et choisir le phage lui correspondant. Les bactériophages étant très spécifiques d'une espèce de bactérie, voire de seulement quelques souches dans cette espèce, utiliser un bactériophage qui ne correspondrait pas à la bactérie ciblée serait inefficace. Cette méthode, nécessitant l'isolement de la bactérie, prend du temps et peut s'avérer compliquée. Une fois isolée, la bactérie est testée *in vitro* grâce aux nombreux phages disponibles dans une collection de bactériophages nommée phagothèque. Ces phagothèques, créées dès l'époque de Félix d'Hérelle, correspondent à des bibliothèques de phages purifiés (c'est-à-dire isolés et débarrassés de potentielles impuretés) et dont les propriétés physico-chimiques et les capacités thérapeutiques sont connues. Ces phagothèques permettent de s'affranchir de toutes les

étapes de récupération, préparation et contrôle des phages, ce qui constitue des gains de temps et d'argent non négligeables. Après incubation des bactéries avec les phages, on observe les plages de lyse obtenues sur la gélose et on détermine ainsi les phages vis-à-vis desquels la bactérie s'avère sensible. Avant l'étape du traitement, il est cependant nécessaire d'adapter le phage à la bactérie pour le rendre le plus efficace possible contre elle, de produire artisanalement une quantité de phages suffisante, de créer à partir d'eux les suspensions (en ampoule de 5 ou 10 mL) et de les tester pour s'assurer de leur innocuité et de leur pureté (aucune bactérie résiduelle) via des tests bactériologiques et des inoculations à des animaux. Toutes ces étapes ne sont pas compatibles avec le traitement d'une infection aiguë, il n'est envisageable de prendre le temps de préparer ce genre de traitement que pour les infections chroniques (5,14,18,39).

- Il est possible d'administrer un cocktail de bactériophages. Les cocktails sont des mélanges bien établis et caractérisés de plusieurs bactériophages destinés à combattre les infections bactériennes les plus courantes. On distingue les cocktails selon les atteintes et les appareils pour lesquels ils sont préconisés (appareil digestif, ...). Les préparations provenant de Tbilissi sont nombreuses et variées. On peut notamment citer le cocktail « Pyophage » présentant apparemment une excellente activité entre autres contre *Staphylococcus aureus* et contre *Pseudomonas aeruginosa* (aussi nommé bacille pyocyanique), et la préparation nommée « PhagoBioDerm » associant des phages et un support autorésorbable et qui semble donner de bons résultats. Ces cocktails présentent les avantages de couvrir un large spectre, de générer peu de résistances et d'être compatibles avec une utilisation en urgence, puisque déjà prêts. Cependant, ce sont des préparations « standards » qui ne sont pas forcément les plus appropriés lors d'infections atypiques. Dans ces derniers cas, il vaut mieux privilégier une méthode plus ciblée et où les phages auront suffisamment été adaptés et seront donc plus virulents, ce qui peut impliquer la réalisation d'un phagogramme avant la fabrication d'un nouveau cocktail. D'ailleurs, d'après Stephen T. Abedon, une étude russe aurait montré que la phagothérapie serait généralement plus efficace si elle était pratiquée de façon ciblée (5,14,18,39).

- Des protéines phagiques seules sont utilisables également; par exemple la structure modulable des lysines rend possible la fabrication de lysines ayant les propriétés désirées comme une activité plus importante, ou un plus large spectre d'action (40). (Voir partie II-B)4).

2) Préparation des bactériophages thérapeutiques

La procédure de préparation de phages thérapeutiques est similaire quel que soit le type de phage.

a) Obtention de suspensions contenant des phages

Les phages sont faciles à trouver dans l'environnement car omniprésents dans la nature : ils sont partout autour de nous où il y a des bactéries. Il suffit par exemple de récupérer un échantillon d'eaux usées, riches en phages de toutes espèces et de le traiter pour n'en récupérer que les bactériophages (ces eaux usées étant également fortement chargées en autres microorganismes) (5,14).

b) Propagation des phages

L'échantillon d'eau est centrifugé et décanté, de manière à éliminer les débris, puis le surnageant de la décantation est filtré (filtre de 0,2 micron puisque les bactéries ont une taille supérieure, mais pas les virus) pour éliminer les bactéries. On obtient ainsi une préparation contenant une grande quantité de phages (5).

Il faut ensuite déterminer si le ou les bactériophages recherchés, c'est-à-dire celui ou ceux dirigés contre la bactérie pathogène, sont présents dans la préparation obtenue. Pour cela, une suspension

contenant la bactérie ciblée est ajoutée à la préparation et le mélange est incubé pendant quelques heures à 35°C (température permettant la survie de la bactérie cible) et sous agitation douce (pour la plupart des phages recherchés). À l'issue de cette incubation, si un ou plusieurs phages se sont propagés au détriment des bactéries, il s'agit alors des virus recherchés. En effet, chaque phage dirigé contre la bactérie aura réalisé plusieurs cycles de répllication, augmentant fortement le nombre de particules virales. Il faut enfin ajouter un peu de chloroforme pour détruire les bactéries résiduelles sans détruire les phages, centrifuger puis filtrer de nouveau pour éliminer les débris bactériens (5,14). A l'issue de ces étapes préliminaires, une suspension contenant un nombre inconnu de bactériophages, peut-être même de plusieurs variétés, actifs contre la bactérie cible est obtenue. Il est possible de s'en assurer en déposant une goutte de la préparation sur une gélose contenant un tapis de la bactérie : la présence d'une plage claire à l'endroit du dépôt signe la lyse bactérienne (5,14).

c) Purification des phages

De manière à isoler les bactériophages d'intérêt, il faut tout d'abord diluer un certain nombre de fois la préparation précédemment réalisée, (pour disperser les bactériophages) puis étaler les différentes dilutions en boîte de Pétri sur des géloses comportant les bactéries étudiées réparties de manière homogène en surface. Après incubation, de multiples plages de lyse vont se former sur la gélose. À chaque plage de lyse correspond un clone de bactériophage et l'aspect des plages diffère selon le bactériophage impliqué dans le processus de lyse. Une ou plusieurs plages sont prélevées puis sont propagées sur des suspensions fraîches de la bactérie, de sorte d'obtenir une quantité suffisante de clones et de bien les adapter à la bactérie étudiée ; cette étape peut être réalisée plusieurs fois (généralement 2 à 3 fois) (5).

d) Numération des clones

Cette étape permet de connaître le nombre de bactériophages actifs obtenus et ainsi d'être certain que cette quantité sera suffisante d'un point de vue thérapeutique. Le titre de phages (le nombre de phages lytiques par unité de volume) en nombre d'Unité Formant Plages (UFP) par millilitre est mesuré : il faut s'assurer d'avoir un titre supérieur ou égal à 10^7 (5).

e) Contrôle

Cette étape est surtout importante lorsqu'on est en présence d'une préparation de phages dont on ne connaît pas les caractéristiques. Elle permet de déterminer l'activité et le nombre de particules virales actives (5).

3) Pharmacologie des bactériophages

La pharmacologie est la science des médicaments. Elle comprend la pharmacodynamie qui étudie les effets des médicaments sur l'organisme, et la pharmacocinétique qui étudie le sort des médicaments dans l'organisme (41).

a) Pharmacocinétique des bactériophages

Il semble que peu d'études explore la pharmacocinétique des préparations thérapeutiques de phages (1). La pharmacocinétique se divise en quatre phases.

Adsorption

Des études ont été menées sur la possibilité d'un passage de la barrière gastro-intestinale par les phages, nommé « translocation phagique ». La durée déterminée pour ce passage varie d'une étude à

l'autre, de quelques minutes à plusieurs jours (1,43). D'après l'équipe de Górski, les travaux d'Hoffmann sur des souris en 1965 indiquent que l'administration intra-rectale de bactériophages génère des taux de phagémie aussi élevés que lors d'injection intramusculaire et qu'ils sont obtenus plus rapidement (cinq minutes en intrarectal contre quinze minutes en intramusculaire pour obtenir le même pic de phagémie) (43).

Concernant l'être humain, très peu de documents traite de l'adsorption des bactériophages. L'équipe de Górski relate une étude réalisée par Weber-Dabrowska en 1987 dans laquelle le scientifique atteste de la présence de bactériophages dans le flux sanguin de patients au bout de dix jours de traitements oraux par phagothérapie contre diverses infections (43).

Diffusion

Des études russes réalisées par Bogovazova indiquent qu'après administration orale de phages à des animaux de laboratoire, ils sont retrouvés deux à quatre heures après dans la circulation sanguine, puis dix heures après dans divers organes comme le foie, les reins ou la rate (1). Nungester et Watrous ont montré que deux heures après l'inoculation intraveineuse de phages de staphylocoques aux rats, les rates et les foies contenaient de plus grandes quantités de particules phagiques que le sang (42).

Une possible liaison entre des bactériophages et des érythrocytes est décrite par certains auteurs mais controversée par d'autres (43).

D'autre part, il a été montré, grâce aux travaux de l'équipe de Dubos, que des bactériophages injectés dans la circulation générale se disséminent vers le cerveau et, qu'il existe une multiplication des phages sur le lieu d'infection (44). Il y a donc une dissémination des bactériophages dans différents organes de l'organisme, et notamment dans les organes où se situe l'infection bactérienne ciblée.

Cependant, Skurnik et Strauch affirment que certaines parties de l'organisme ne permettraient pas une bonne diffusion des bactériophages jusqu'à la zone d'infection (45).

Métabolisation

Evans a montré, en 1933, l'inhibition *in vitro* de l'action des phages lors de mise en contact avec du sang, du pus, de la bile ou de la salive (46).

Devant la réussite des traitements généralement observée *in vivo*, certains scientifiques ont alors supposé que les réussites thérapeutiques observées n'étaient pas dues au pouvoir bactéricide des bactériophages, mais aux débris bactériens présents au sein des suspensions (les suspensions n'étant pas toujours correctement purifiées) susceptibles de stimuler le système immunitaire adaptatif ou à l'introduction de protéines (la capsid des phages étant elle-même de nature protéique) à même d'induire une réponse immunitaire innée (19).

La métabolisation des phages peut être leur inactivation, dans le cas où ils interagissent avec le système immunitaire, ou au contraire une activation s'ils se répliquent *in situ* (39).

Élimination

De nombreux travaux témoignent de l'élimination des bactériophages dans l'urine ou dans les fèces (42,47,48). Cette élimination s'effectue après une période plus ou moins longue (les phages peuvent persister au sein de l'organisme jusqu'à plusieurs jours) (1).

b) Pharmacodynamique

Effets anti-infectieux

Kasman et ses collaborateurs ont montré que l'interaction entre phage et bactérie était, comme pour tous virus, due à une collision aléatoire entre les deux éléments. Ils ont également conclu à l'existence d'un seuil de densité bactérienne nécessaire à atteindre pour la bonne prolifération des phages (49). Ainsi, débiter une phagothérapie trop tôt, c'est-à-dire alors qu'il n'y a encore qu'une faible population bactérienne au niveau du site d'infection, ne permettrait pas aux phages de se propager et ceux-ci seraient éliminés de l'organisme avant même d'avoir initié un début de thérapie.

Interaction avec le système immunitaire

Il a été établi que les phages diffusent dans l'organisme, et qu'ils sont éventuellement reconnus comme des intrus par le système immunitaire de cet organisme (33).

- Réponse immunitaire innée

- *Macrophages*

Aronow et ses collaborateurs ont montré en 1964 que l'absorption du phage par les macrophages péritonéaux de lapin se produisait après environ 7 minutes d'incubation et atteignait une intensité maximale entre 15 et 30 minutes (50). Néanmoins, des travaux menés plus récemment par l'équipe de Srivastava suggèrent que les macrophages ne joueraient pas de rôle dans l'inactivation des phages (51). Certains phages diminueraient le pouvoir de phagocytose des monocytes vis-à-vis des bactéries. La phagocytose des bactéries par les granulocytes (aussi appelés polynucléaires) se montre elle, soit inchangée, soit augmentée, soit diminuée, en fonction des phages, des bactéries et des doses employées. L'équipe de Weber-Dabrowska a remarqué que l'utilisation de phages accélérerait le renouvellement des polynucléaires neutrophiles se traduisant par une augmentation de formes immatures et en parallèle une diminution des formes matures (50).

- *Polynucléaires*

Les bactériophages sont incapables d'activer les polynucléaires. Toutefois, ceux-ci, une fois activés, seraient capables d'inactiver les bactériophages par la libération d'acide hypochloreux (50). Miedzybrodzki et son équipe ont montré qu'en présence de bactériophages, la libération de dérivés réactifs de l'oxygène par les polynucléaires, qui a lieu lors d'une infection bactérienne, était atténuée ce qui n'engendre donc pas de risque de stress oxydatif pour l'organisme (50,52).

- *Lymphocytes NK*

D'après Srivastava et ses collaborateurs, les lymphocytes NK (Natural Killer) n'auraient pas de rôle dans l'inactivation des phages (51). Leur nombre serait diminué lors d'administration intra-rectale de bactériophages après 49 à 84 jours de traitement (selon les sujets) ; en revanche, aucune modulation n'a été observée après application topique ou administration orale (50).

- *Cellules dendritiques*

L'équipe de Barfoot a démontré que les cellules dendritiques phagocytent les bactériophages relativement rapidement (53). Néanmoins, les publications de l'équipe de Górski attestent d'une diminution de l'activité phagocytaire des cellules dendritiques lors d'une administration orale, ce qui empêcherait leur activité pro-inflammatoire (43).

- Réponse immunitaire adaptative

- *Réponse immunitaire à médiation humorale*

Un hôte « naïf » peut présenter une faible concentration d'anticorps anti-phage avant même l'administration de phages, du fait de l'omniprésence des phages dans la nature donnant lieu à une exposition de l'être humain dès la naissance et au développement d'anticorps suite à cette exposition, une sorte de constante immunisation naturelle (50).

Une étude de Jerne en 1956 rapporte que les anticorps anti-phages neutralisants sont produits en titres élevés après l'administration systémique de phages à des animaux (50).

D'après Srivastava, la clairance du phage T7 dans le sang des souris est plus lente chez les animaux déficients en lymphocytes B que chez les souris de type sauvage (50,51).

Cependant, il a été démontré que cette réponse immunitaire était variable d'un phage à l'autre, et que certains phages étaient par ailleurs très peu immunogènes. La réponse humorale aux phages semble également dépendre du statut initial des patients, qui pourraient être divisés en groupes de « répondants » et de « non-répondants » (50).

- *Réponse immunitaire à médiation cellulaire*

Lors de la pénétration d'un virus dans l'organisme, une réponse immunitaire à médiation cellulaire (reposant sur les lymphocytes T) se met en place. Dans le cas des phages, peu de données existent dans la littérature sur cette immunité cellulaire (50). D'après les recherches de l'équipe de Srivastava, les lymphocytes T ne joueraient pas de rôle significatif dans l'inactivation des phages *in vivo* (50,51). L'équipe de Gorski a remarqué qu'une préparation purifiée de phages T4 inhibait l'activation et la prolifération des lymphocytes T chez l'homme (54).

Action sur l'inflammation

La production de cytokines varie également en fonction des phages testés et des infections étudiées (50,55).

Par exemple, les phages pourraient réduire l'inflammation intestinale causée par les réponses immunitaires locales à une infection bactérienne : les phages intestinaux, qu'ils soient endogènes ou exogènes (administrés à des fins thérapeutiques), pourraient réguler négativement les processus des cellules dendritiques intestinales pour prévenir leur action pro-inflammatoire (43).

Tout ce que nous venons de voir est valable pour la phagothérapie par les phages ou les cocktails de phages. Il existe une autre méthode de phagothérapie, consistant en l'utilisation des protéines des phages. Certains auteurs tel que Delisle ont envisagé leur utilisation thérapeutique dès 2001 (56).

4) Les protéines phagiques d'intérêt

Dans cette partie, ne seront développées que les deux types de protéines phagiques dont l'intérêt thérapeutique est le plus abordé dans la littérature, à savoir les lysines et les dépolymérase. Cependant, il existe d'autres protéines phagiques telles que les holines, et les lysozyme-like.

a) Les polysaccharides dépolymérase

Les bactériophages peuvent coder des enzymes capables de dégrader des substances polymères que l'on peut trouver à la surface cellulaire bactérienne, ou qui sont produites par des bactéries organisées en biofilm : ce sont les dépolymérase. Ces enzymes peuvent se présenter sous deux formes : comme un composant intégral d'une particule phagique (tailspikes ou fibre protéique attachée à l'embase le plus souvent même si certains peuvent être dans d'autres positions) ou comme une protéine soluble produite pendant la lyse bactérienne (57).

La diversité des dépolymérase de phages n'est pas encore totalement explorée (57). Selon le mode de dégradation des polymères glucidiques sur la surface de cellules bactériennes, les enzymes associées aux phages sont classées dans deux groupes principaux : celui des hydrolases et celui des lyases (58). Les glycosyl hydrolases sont des enzymes catalysant des réactions d'hydrolyse des liens glycosidiques. Parmi ces hydrolases, six groupes de dépolymérase de phages ont été trouvés : les sialidases, les levanases, les dextranases, les xylosidases, les rhamnosidases, et les peptidases. Les polysaccharides lyases sont des enzymes qui clivent les liens glycosidiques par mécanisme de bêta-élimination. Ce groupe d'enzyme contient trois groupes de dépolymérase phagiques : les hyaluronidases, les alginate lyases, et les pectin/pectate lyases (57).

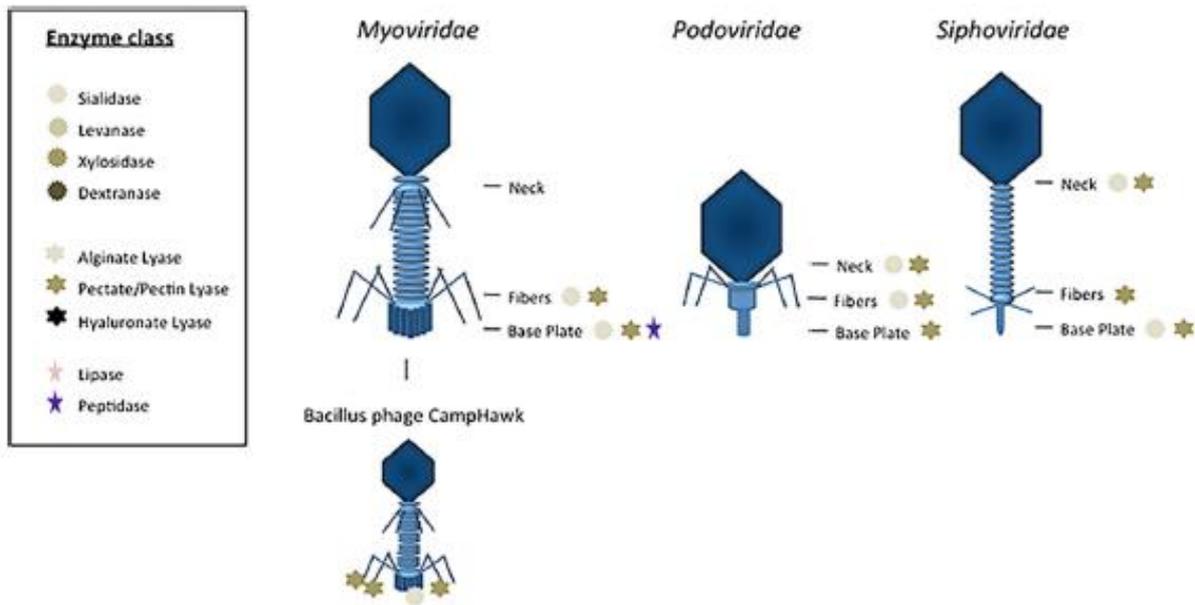


Figure 4 : Distribution des différentes classes de dépolymérase sur la structure des bactériophages à queue (57). Les lévanases, les xylosidases, les hyaluronidases, les dextranases et les lipases représentent des domaines dépolymérase rarement présents dans les phages et, par conséquent, leur localisation n'a pas été possible. CampHawk, un phage de *Bacillus subtilis*, représente le seul phage à coder pour quatre dépolymérase dans différents gènes (une sialidase et trois lyases à pectase).

Action sur les polysaccharides structuraux des bactéries

Les polysaccharides dépolymérase sont utilisés par les phages pour détruire l'enveloppe ou les polysaccharides structuraux de leur hôte bactérien lors de l'étape initiale du processus d'infection phagique (58). Les phages possédant une activité dépolymérase ont donc un accès facilité aux récepteurs des bactéries hôtes (57). En culture liquide, la dégradation du matériel capsulaire bactérien par des polysaccharides dépolymérase phagiques se fait dans un ordre défini : la dépolymérase se lie au matériel capsulaire (récepteur secondaire) et dégrade le polymère jusqu'à atteindre la surface cellulaire où il se lie à un récepteur extra-membranaire (récepteur primaire) et infecte la bactérie (59).

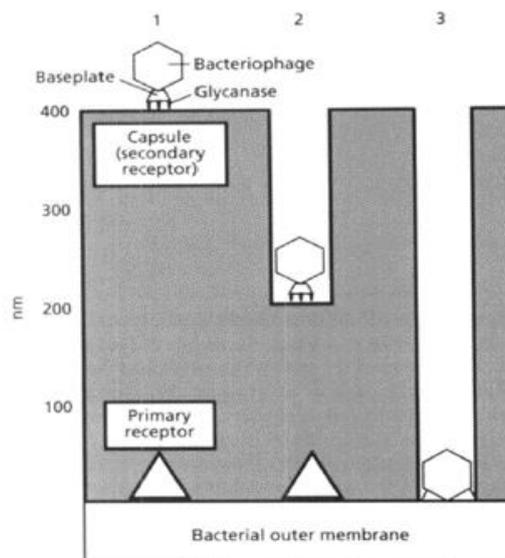


Figure 5 : La dégradation du polysaccharide capsulaire bactérien par une glycanase transmise par les phages (59). Cette dégradation se produit en trois étapes : 1 = le phage se lie au polysaccharide capsulaire (récepteur secondaire), 2 = la glycanase transmise par les phages dégrade le polymère jusqu'à ce que le phage atteigne la surface cellulaire, 3 = le phage se lie au récepteur primaire et infecte la cellule.

Action sur le biofilm

Les biofilms bactériens sont formés par des micro-organismes incorporés dans un glycocalyx qui est principalement composé d'exo-polysaccharides (56,57). Les dépolymérase pourraient faciliter l'accès des phages aux cellules bactériennes présentes dans les différentes couches de biofilm (57). En effet, le phage peut infecter et perturber un biofilm, en considérant certains facteurs : d'abord, la sensibilité des bactéries au phage et la capacité de la dépolymérase phagique à dégrader le biofilm exopolysaccharidique. La topographie et la structure du biofilm peuvent aussi influencer le taux d'infection puisqu'un phage peut se déplacer à travers des pores et des chaînes vers les couches basales où la dégradation polymérique causerait la désagrégation (« sloughing ») de tout le biofilm. Un phage peut exister comme phage libre ou comme prophage dans les bactéries. Un prophage dans un biofilm peut retourner dans un cycle lytique d'infection, en raison des changements dans la physiologie des bactéries hôtes, aboutissant à la dégradation du biofilm de l'intérieur (59).

Les cellules bactériennes dans la base du biofilm peuvent être relativement immunisées à l'action de bactériophage si elles sont dans un environnement pauvre en nutriments ou en oxygène. Les états phénotypiques différents des bactéries aux différents niveaux d'un biofilm peuvent mener à l'expression d'un récepteur primaire sur la surface cellulaire d'un membre d'une espèce, mais pas sur un autre dans une partie séparée du biofilm. Ces deux facteurs peuvent mener à la résistance aux phages selon l'emplacement dans le biofilm (59).

La synthèse d'exo-polysaccharides peut donc agir comme une bonne méthode pour protéger des bactéries contre les phages dans l'environnement naturel. La probabilité de rencontrer un phage avec une dépolymérase spécifique pour l'exo-polysaccharide de la bactérie (le récepteur secondaire) et aussi capable d'infecter au récepteur primaire sur la surface cellulaire est faible. Un bactériophage ne semble pas être approprié pour la désorganisation de biofilms mixtes. Cependant, un phage spécifique peut être utilisé pour détruire les exo-polysaccharides et lyser les cellules du biofilm d'une souche bactérienne connue (59).

b) Les lysines

Les lysines sont les enzymes de phages qui digèrent la paroi des cellules bactériennes pour libérer les particules de phages assemblés. Elles sont souvent spécifiques à l'espèce et surtout actives contre les bactéries gram-positives. Les lipopolysaccharides de la couche entourant la paroi cellulaire des bactéries gram-négatives les protègent des lysines. Les lysines sont actives à basse concentration, sur des surfaces muqueuses et contre les biofilms. Elles sont sûres, stables et relativement faciles à produire. Elles utilisent souvent comme récepteur un élément essentiel pour la viabilité bactérienne ; ainsi le risque de développement de résistance est bas (60). De façon intéressante, les lysines peuvent être plus efficaces que des antibiotiques, comme par exemple dans les modèles expérimentaux de problème de peau (61), agir en synergie avec d'autres antimicrobiens (62), ou même cibler des bactéries intracellulaires (63). Jusqu'à 10 espèces différentes de *Streptococcus* pourraient être visées par une seule lysine (60).

PARTIE II : MATERIELS ET METHODES

I- STRATEGIE DE RECHERCHE

Les bases de données électroniques Medline, Scopus et Cochrane ont été utilisées. Les mots clés suivants ont été utilisés dans les moteurs de recherche : « Bacteriophage », « Phage therapy », « Oral », « Oral infection », « Oral biofilm » et « Oral bacteria ».

Les termes « Bacteriophage » ou « Phage therapy » ont été croisés avec les termes « Oral », « Oral infection », « Oral biofilm » et « Oral bacteria » afin d'identifier les articles à analyser après exclusion. Les recherches électroniques ont été effectuées jusqu'au 16 octobre 2018.

De plus, une recherche bibliographique manuelle a été effectuée à partir de la bibliographie de toutes les publications incluses ainsi que celle des publications d'intérêt de type revue de la littérature trouvées par la recherche électronique.

II- CRITERES DE SELECTION DES ARTICLES

Ont été inclus les articles qui ont analysé l'effet d'un phage lytique ou d'une protéine phagique sur une ou plusieurs souches bactériennes orales.

Ont été exclus les articles :

- écrits dans une langue autre que l'anglais ou le français,
- ne traitant pas de l'utilisation thérapeutique des phages,
- traitant de phagothérapie sur des souches bactériennes non orales,
- concernant les phages tempérés (à l'exception de ceux génétiquement modifiés pour améliorer leur capacité lytique ou pour une utilisation thérapeutique),
- concernant des bactéries étant des hôtes non habituels ou transitoires de la cavité orale, et non impliquées dans les pathologies de la cavité orale,
- dans lesquels l'isolation de phages n'a pas été possible,
- les revues de la littérature et les cas cliniques
- les résumés seuls (sans article)
- les études sur modèle animal concernant une bactérie non présente dans la cavité orale humaine.

III- EXTRACTION DES DONNEES DE SYNTHESE

Les informations concernant les études retenues ont été extraites à l'aide d'une grille d'extraction des données réalisée à cet effet, puis elles ont été synthétisées sous forme d'un tableau. Les critères d'extraction sont les suivants : le titre et l'auteur principal de l'article, les bactéries cibles, le système modèle, le type de phagothérapie utilisé, et les résultats obtenus.

PARTIE III : RESULTATS

Les recherches électroniques à partir des mots clés ont permis de sélectionner une liste finale de 24 articles scientifiques. La recherche bibliographique manuelle effectuée a permis de sélectionner 49 articles supplémentaires. Au total, 73 articles scientifiques ont été intégrés.

S C O P U S	Bacteriophage and «oral biofilm»	Bacteriophage and «oral infection»	Bacteriophage and «oral bacteria»	Bacteriophage and oral	«Phage therapy» and «oral biofilm»	«Phage therapy» and «oral infection»	«Phage therapy» and «oral bacteria»	«Phage therapy» and oral
	4 résultats	13 résultats	14 résultats	431 résultats	1 résultat	2 résultats	2 résultats	60 résultats
	APRES LECTURE DES TITRES, RESUMES ET ARTICLES SI D'INTERET							
	0	0	1	12	0	0	0	1
APRES ELIMINATION DES DOUBLONS								
12 ARTICLES								
C O C H R A N E	Bacteriophage and «oral biofilm»	Bacteriophage and «oral infection»	Bacteriophage and «oral bacteria»	Bacteriophage and oral	«Phage therapy» and «oral biofilm»	«Phage therapy» and «oral infection»	«Phage therapy» and «oral bacteria»	«Phage therapy» and oral
	0 résultat	0 résultats	0 résultats	13 résultats	0 résultat	0 résultat	0 résultat	5 résultats
	APRES LECTURE DES TITRES, RESUMES ET ARTICLES SI D'INTERET							
	0	0	0	0	0	0	0	0
APRES ELIMINATION DES DOUBLONS								
AUCUN ARTICLE								
M E D I N E	Bacteriophage and «oral biofilm»	Bacteriophage and «oral infection»	Bacteriophage and «oral bacteria»	Bacteriophage and oral	«Phage therapy» and «oral biofilm»	«Phage therapy» and «oral infection»	«Phage therapy» and «oral bacteria»	«Phage therapy» and oral
	1 résultat	7 résultats	10 résultats	506 résultats	0 résultat	1 résultat	1 résultat	52 résultats
	APRES LECTURE DES TITRES, RESUMES ET ARTICLES SI D'INTERET							
	0	0	1	23	0	0	0	6
APRES ELIMINATION DES DOUBLONS								
23 ARTICLES								

Une nouvelle élimination des doublons a ensuite été effectuée entre les 12 articles obtenus des recherches sur Scopus et les 23 articles obtenus des recherches sur Medline.

AU FINAL : 24 ARTICLES SELECTIONNES DE LA RECHERCHE ELECTRONIQUE

Tableau 2 : Nombre de résultats et d'articles sélectionnés pour chaque recherche électronique de la revue systématique.

Tableau 3 : Activité sur *Enterococcus* de phages isolés ou cocktails.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
Targeting <i>Enterococcus faecalis</i> biofilms with phage therapy. Khalifa (64)	<i>Enterococcus faecalis</i>	[1] Cultures planctoniques. [2] Biofilm statique de 2 semaines d' <i>E. faecalis</i> V583. [3] Modèle de canal dentaire humain : dents extraites monocanaliaires contaminées avec une suspension d' <i>E. faecalis</i> et traitées endodontiquement par un protocole classique.	Phage isolé EFDG1 des effluents d'égouts	[1] EFDG1 provoque une lyse complète en culture liquide en 24h. L'efficacité dépend de la MOI. [2] EFDG1 a réduit de 5 fois la biomasse bactérienne en 7 jours et disperse un biofilm (réduction de 5log) de 600µm vieux de 2 semaines. [3] L'irrigation avec EFDG1 réduit de 7log la viabilité d' <i>E. faecalis</i> (réduction des fuites bactériennes à l'apex des racines, pas de bactéries dans les tubulis dentinaires).
Effect of a genetically engineered bacteriophage on <i>Enterococcus faecalis</i> biofilms. Tinoco (65)	<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2 et V583	Des biofilms statiques de 24h des souches <i>E. faecalis</i> JH2-2 et V583 formés sur des lamelles, ont été inoculés avec le bactériophage ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36) ^{PnisA} .	Phage tempéré ϕ Ef11 (infectant <i>E. faecalis</i>) isolé et modifié génétiquement ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36) ^{PnisA}	Diminution de 10 à 100 fois du nombre de cellules viables dans les biofilms d' <i>E. faecalis</i> (UFC/biofilm) après le traitement au phage.
<i>In vitro</i> antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212. Paisano (66)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	20 dents humaines monocanaliaires avec édification radiculaire complète, ont été instrumentées, imperméabilisées à l'extérieur, stérilisées puis placées dans des tubes en polypropylène stérilisés. Les canaux ont ensuite été infectés avec <i>E. faecalis</i> pour les besoins de l'expérience.	Lysat de phages recueillis dans un échantillon fluvial.	Aux MOI=1 et 10 : pas de croissance bactérienne après 3h d'incubation. A la MOI=0.1 : 98% de réduction du nombre d'UFC après 3h d'incubation dans 2 des 3 racines, et pas de croissance bactérienne dans la 3 ^{ème} racine. Dans les échantillons où les conditions de croissance des bactéries ont favorisé leur pénétration dans les tubules dentinaires : aucune bactérie n'est observée à 24, 48 ou 72h suite au traitement avec le lysat de phages.
Isolation and host range of bacteriophages active against human oral enterococci. Natkin (67)	<i>E. faecalis</i> et ses variants <i>zymogenes</i> et <i>liquefaciens</i> , <i>E. faecium</i> et <i>E. durans</i> (dans l'article, l'ancienne dénomination de ces souches est utilisée à savoir <i>S. faecalis</i> , <i>S. faecium</i> , <i>S. durans</i>)	Isolement d'entérocoques des cavités buccales de 42 patients dentaires. Les phages sont testés contre 55 souches d'entérocoques dont 5 souches ATCC.	11 phages virulents et 19 phages tempérés isolés à partir de 19 espèces d'entérocoques buccaux et non buccaux.	Environ la moitié des entérocoques oraux ont été attaqués par des phages tempérés ou virulents. La sensibilité à l'attaque du phage était presque complètement limitée aux souches d' <i>E. faecalis</i> et de ses variants. Certains phages pourraient attaquer des membres de plusieurs sous-groupes d' <i>E. faecalis</i> . 8 des 11 phages virulents sont actifs contre au moins une des souches orales. Aucun des phages attaquant <i>E. faecalis</i> ou ses variants n'a pu attaquer les souches d' <i>E. faecium</i> ou de <i>E. durans</i> .
*Genetic modifications to temperate <i>Enterococcus faecalis</i> phage ϕ Ef11 that abolish the establishment of lysogeny and sensitivity to repressor, and increase host range and productivity of lytic infection. Zhang (68)	<i>E. faecalis</i>	[1] Capacité de ϕ Ef11(<i>vir</i>) ^{PnisA} , par rapport à ϕ Ef11, à générer une infection productive sur les souches d' <i>E. faecalis</i> . [2] Criblage par PCR des souches d' <i>E. faecalis</i> pour détecter la présence d'un prophage, à l'aide d'amorces spécifiques de ϕ Ef11.	Phage tempéré ϕ Ef11 d' <i>E. faecalis</i> , son recombinant spontané sur <i>E. faecalis</i> JH2-2 : ϕ Ef11(Δ 61-1, ϕ FL1C39-44) et son mutant virulent : ϕ Ef11(<i>vir</i>) ^{PnisA} .	[1] ϕ Ef11 de type sauvage n'infecte de manière productive que 4 des 67 <i>E. faecalis</i> testés (6%), alors qu'une infection productive s'est produite sur 33 de ces souches inoculées avec le phage ϕ Ef11(<i>vir</i>) ^{PnisA} (49%). [2] Parmi les souches testées, 14 se sont révélées être des lysogènes ϕ Ef11. Aucune n'était sensible au ϕ Ef11 de type sauvage, mais 4 souches (GS2, GS8, GS22 et GS25) pouvaient être infectées de manière productive par ϕ Ef11(<i>vir</i>) ^{PnisA} .

*Isolation and characterization of a novel <i>Enterococcus faecalis</i> bacteriophage ϕ EF24C as a therapeutic candidate. Uchiyama (69)	<i>E. faecalis</i> (30 souches non-VRE, 4 souches VRE et <i>E. faecalis</i> ATCC19433) 10 <i>E. faecium</i> <i>S. aureus</i> SA37 et IID671 <i>Escherichia coli B</i> ATCC11303	La capacité de formation de plages du phage ϕ EF24C contre chaque souche d' <i>E. faecalis</i> a été mesurée <i>in vitro</i> en tant qu'EOP.	Phage isolé ϕ EF24C d'un échantillon d'eaux.	EOP de ϕ EF24C relativement constante pour toutes les souches sensibles. Souches sensibles : <i>E. faecalis</i> ATCC19433, 26 des 30 souches non-VRE, et les 4 souches VRE sensibles. ϕ EF24C n'a montré aucune activité de lyse vis-à-vis des bactéries testées autres qu' <i>E. faecalis</i> (10 souches d' <i>E. faecium</i> , 2 souches de <i>S. aureus</i> et 1 souche d' <i>E. coli</i>).
*In silico and <i>in vivo</i> evaluation of bacteriophage ϕ EF24C, a candidate for treatment of <i>Enterococcus faecalis</i> infections. Uchiyama (70)	<i>Enterococcus faecalis</i> EF14 et VRE2	<i>In vivo</i> : après inoculation de la dose bactérienne minimale létale d'EF14 et de VRE2 à des souris, le phage ϕ EF24C a été administré à différentes MOI pour tester son efficacité.	Phage isolé ϕ EF24C	Efficacité dose-dépendante aux MOI<0.01 sur les souris infectées avec EF14 et MOI<0.1 sur celles infectées avec VRE2. Le traitement avec ϕ EF24C a permis 100% de survie aux MOI de 10, 1, 0.1 et 0.01 pour les souris infectées avec EF14, et aux MOI de 10, 1 et 0.1 pour les souris infectées avec VRE2.
*Improved adsorption of an <i>Enterococcus faecalis</i> bacteriophage ϕ EF24C with a spontaneous point mutation. Uchiyama (71)	<i>Enterococcus faecalis</i> EF11	Evaluation <i>in vitro</i> de l'effet bactéricide du phage mutant ϕ EF24C-P2 en comparaison à celui du phage ϕ EF24C à une MOI de 0.01 : [1] milieu de TBS [2] dans du sang humain	Mutant spontané du phage ϕ EF24C d' <i>E. faecalis</i> : phage isolé ϕ EF24C-P2.	[1] Lyse des bactéries par ϕ EF24C-P2 au bout de 3h, contrairement au phage ϕ EF24C. [2] Les 2 phages ont réduit la concentration bactérienne dans le sang humain après 24h d'incubation par rapport au traitement sans phage, mais le phage mutant ϕ EF24C-P2 a montré une réduction significativement plus importante de la concentration bactérienne par rapport au phage sauvage ϕ EF24C.
Antibacterial effect of genetically-engineered bacteriophage ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36) ^{PnisA} on dentin infected with antibiotic-resistant <i>Enterococcus faecalis</i> . Tinoco (72)	<i>Enterococcus faecalis</i> JH2-2 et V583	Modèles <i>in vitro</i> de dentine infectée : 40 dents humaines monocanalisées extraites sectionnées apicalement et coronairement pour avoir des sections de racine longues de 5mm. Chaque section de racine a été étanchéifiée et fixée dans une gaine d'aiguille évidée et cimentée dans un dispositif scellable à 2 chambres. Les canaux des racines ont été élargis et débarrassés de la <i>smear layer</i> . Les dents ont été réparties en 6 groupes et infectées avec 8 μ l d' <i>E. faecalis</i> JH2-2 ou V583.	Phage tempéré ϕ Ef11 (infectant <i>E. faecalis</i>) isolé et modifié génétiquement ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36) ^{PnisA}	ϕ Ef11/ ϕ FL1C(Δ 36) ^{PnisA} réduit de 18% le titre d' <i>E. faecalis</i> JH2-2 et de 99% le titre d' <i>E. faecalis</i> V583 (8 μ l de la suspension du phage avec titre de suspension : 5,8x10 ⁹ UFP/ml).
* Isolation and characterization of a novel bacteriophage ϕ 4D lytic against <i>Enterococcus faecalis</i> strains. Parasion (73)	<i>Enterococcus faecalis</i> (32 souches dont 1 souche VRE) <i>Enterococcus faecium</i> ATCC 49032 <i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	[1] La gamme d'hôtes du phage ϕ 4D a été examinée sur les 34 souches d' <i>Enterococcus</i> . [2] Mesure de l'infectivité du phage sur <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 par détermination de la période latente et de la taille d'éclatement.	10 phages lytiques contre des souches d' <i>E. faecalis</i> ont été isolés d'échantillons prélevés dans le sol et les eaux usées. Le phage ϕ 4D (eaux usées) présentait la gamme d'hôtes la plus large.	[1] ϕ 4D a produit des plages sur presque toutes les souches : seules 5 souches d' <i>E. faecalis</i> ont été résistantes. [2] La courbe de croissance en une étape pour ϕ 4D a montré une période de latence (définie comme l'intervalle de temps entre l'adsorption et le début de l'éclatement) d'environ 25min et une taille d'éclatement moyenne d'environ 36 UFP/cellule.

<p>*Characterization of <i>Enterococcus faecalis</i> phage IME-EF1 and its endolysin. Zhang (74)</p>	<p><i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecium</i></p>	<p>Effet de du phage et de l'endolysine : [1] <i>In vitro</i> : 10 souches cliniques d'<i>E. faecalis</i>, 10 souches cliniques d'<i>E. faecium</i> et 4 souches cliniques de <i>S. aureus</i> cultivées sur gélose BHI. [2] <i>In vivo</i> sur modèle de souris infectées avec 2×10^9 UFC d'<i>E. faecalis</i> 002 (quantité létale minimale) par voie IP.</p>	<p>Phage isolé IME-EF1 d'un échantillon d'eaux usées cultivé sur <i>E. faecalis</i> 002 et son endolysine.</p>	<p>[1] Spectre d'action plus large de l'endolysine que du phage : seules 3 souches d'<i>E. faecalis</i> et 1 souche d'<i>E. faecium</i> peuvent être lysées par IME-EF1. Toutes les souches d'<i>E. faecalis</i> et 1 d'<i>E. faecium</i> testées dans cette étude peuvent être lysées par l'endolysine IME-EF1 purifiée. [2] Meilleure taux de survie des souris si administration précoce : - Si administration de IME-EF1 30min après inoculation : taux de survie = 60% - Si administration d'endolysine 30min après inoculation : taux de survie = 80% - Si administration de IME-EF1 4h après inoculation : taux de survie = 40% - Si administration d'endolysine 4h après inoculation : taux de survie faible Le phage IME-EF1 et son endolysine pourraient constituer une protection efficace contre <i>E. faecalis</i> 002 chez la souris. L'administration précoce permettait d'obtenir une meilleure efficacité.</p>
<p>* Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i>. Biswas (75)</p>	<p><i>E. faecium</i> VRE CRMEN44 <i>E. faecium</i> VSE ATCC 19950 <i>Enterococcus faecalis</i> CRMEN 19</p>	<p>[1] Effet de l'administration IP de phage ENB6 à des souris 45min après leur infection par la MLD d'<i>E. faecium</i> VRE. [2] Du sang a été obtenu par ponction cardiaque lors d'une expérience de sauvetage, afin de comparer les titres bactériens de 2 groupes de 10 souris, 20h après inoculation IP avec 3×10^9 UFC de CRMEN44. [a] 45min après l'inoculation bactérienne du 1^{er} groupe, injection IP de 300 litres de PBS (contrôle). [b] 45min après l'inoculation bactérienne du 2^{ème} groupe, les souris ont été injectées en IP avec 9×10^9 UFP du phage ENB6. [3] Effet du retard du traitement sur la capacité de la préparation du phage à sauver des souris infectées avec la MLD de la souche de CRMEN44 injectée en IP. À différents intervalles par la suite, allant de 2 à 24h, les souris ont reçu une seule injection de la dose élevée (3×10^9 UFP) du phage ENB6. L'état de santé de ces souris a été contrôlé pendant 20j après l'infection bactérienne. [4] Comparaison des capacités des 2 phages à sauver les souris rendues bactériémiques par injection IP de 3×10^9 UFC de <i>E. faecalis</i> CRMEN 19.</p>	<p>Phages ENB6 et C33, isolés des eaux d'égouts.</p>	<p>[1] A des MOI de phages de 0,3 et de 3,0 : 100% de survie des souris et seuls des signes minimes de maladie (léthargie légère) ont été observés (au cours des premières 24h). Au fur et à mesure que la dose de phage diminuait (MOI 0,003 et 0,03), les souris sont devenues gravement malades, avec des taux de survie respectifs de 40 et 60% au jour 6 et au-delà. [2][a] Le titre bactérien moyen dans le sang 20h après l'inoculation bactérienne pour ce groupe de souris était de $2,03 \times 10^7 \pm 1,10 \times 10^7$ UFC/ml. [b] Le titre bactérien moyen dans le sang 20h après l'inoculation bactérienne pour ce groupe était de $8,74 \times 10^4 \pm 6,03 \times 10^4$ UFC/ml. Le traitement par phage a entraîné une diminution de 200 fois (par rapport au groupe témoin) des titres de bactéries sanguines à 20h. Cette réduction des titres bactériens s'est traduite par une morbidité et une mortalité plus faibles dans le groupe traité. [3] Une seule injection de phage peut sauver 100% des animaux, même si le traitement est retardé jusqu'à 5h après l'infection bactérienne mortelle. Si le traitement est retardé au-delà de 5h, la morbidité augmente et la mortalité commence à apparaître. Cependant, même avec des retards de 18 et 24h, environ 50% des animaux sont sauvés et se rétablissent complètement. [4] <i>E. faecalis</i> CRMEN 19 est résistant <i>in vitro</i> au phage ENB6 mais est sensible au phage C33. ENB6 n'a montré aucune formation de plage sur CRMEN 19 contrairement à C33. Si traitement des animaux bactériémiques avec le phage C33 : taux de survie de 100% 20 jours après infection, comparé à un taux de survie de 50% des souris témoins non traitées. Le traitement par le phage ENB6 a entraîné un taux de survie de 20%, inférieur à celui des souris contrôles non traitées.</p>

Tableau 4 : Activité sur *Streptococcus* de phages isolés.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
*Diverse virulent pneumophages infect <i>Streptococcus mitis</i> . Ouennane (76)	<i>S. pneumoniae</i> R6 <i>S. mitis</i> CCRI-15019 (isolat étroitement lié à <i>S. mitis</i> B6) <i>S. mitis</i> B6	[1] Gamme d'hôtes des phages Dp-1 et SOCP. [2] Analyses de courbe de croissance en une étape à l'aide de <i>S. pneumoniae</i> R6 et de <i>S. mitis</i> CCRI-15019. [3] Evaluation de l'adsorption à la surface cellulaire pour les deux phages des deux souches. [4] Détermination de l'efficacité de la lyse (EOP) des deux phages sur les deux hôtes en propagation.	2 phages virulents SOCP et Dp-1 précédemment isolés de <i>S. pneumoniae</i> R6 et R36A.	[1] Tous 2 se répliquent sur <i>S. mitis</i> CCRI-15019, et provoquent des plages de lyse plus grandes sur <i>S. mitis</i> , que sur <i>S. pneumoniae</i> dans les mêmes conditions de culture. [2] Les phages Dp-1 et SOCP ont une période de latence (phase pendant laquelle le phage ne se réplique pas) plus courte sur <i>S. mitis</i> que <i>S. pneumoniae</i> mais aussi une quantité d'induction de l'éclatement de la cellule bactérienne plus faible. [3] Le pourcentage d'adsorption des phages Dp-1 et SOCP est plus important sur <i>S. pneumoniae</i> R6 que sur <i>S. mitis</i> B6. [4] Lorsque les phages Dp-1 et SOCP ont été amplifiés sur <i>S. pneumoniae</i> , ils ont eu des EOP de 10^{-1} et 10^{-4} sur <i>S. mitis</i> , respectivement. Lorsque Dp-1 et SOCP ont été amplifiés sur <i>S. mitis</i> , leurs EOP sur <i>S. pneumoniae</i> étaient respectivement de 10^{-1} et 10^{-3} .
*Isolation of a novel phage with activity against <i>Streptococcus mutans</i> biofilms. Dalmaso (77)	<i>S. mutans</i> DPC6143	[1] Effet du phage à différentes MOI après 18h sur une culture en croissance de <i>S. mutans</i> DPC6143. [2] Activité lytique de ϕ APCM01 contre <i>S. mutans</i> DPC6143 après 18h dans de la salive artificielle. [3] Effet du phage sur un biofilm de <i>S. mutans</i> DPC6143 après 24h de contact. [4] Effet du phage sur un biofilm de <i>S. mutans</i> DPC6143 après 48h de contact.	Phage ϕ APCM01 isolé à partir de 85 échantillons de salive de sujets sans problèmes de santé orale connus.	[1] ϕ APCM01 a empêché la croissance de <i>S. mutans</i> DPC6143 aux MOI supérieures à $2,5 \times 10^{-2}$ ou a réduit sa croissance aux MOI inférieures. [2] Résultats moins significatifs que dans le bouillon de culture : une réduction significative d'environ 3,6log UFC/ml n'a été observée qu'entre la MOI la plus élevée testée et le contrôle. [3] • <u>À des doses de 10^5 à 10^9 UFP/puits</u> : ϕ APCM01 inhibe complètement l'activité métabolique du biofilm. • <u>Aux doses de phage comprises entre 10^2 et 10^4 UFP/puits</u> : activité métabolique résiduelle de <i>S. mutans</i> : réduction de la biomasse du biofilm mais pas de perturbation complète. [4] • <u>Aux doses de phage de 10^3, 10^4 et 10^6 à 10^9 UFP/puits</u> : activité métabolique du biofilm significativement réduite par rapport à l'étape d'incubation de 24h. • Peu d'évolution du nombre de cellules bactériennes entre 24h et 48h de contact, donc ϕ APCM01 est capable de contrôler la croissance du biofilm.
* Studies on bacteriophages of hemolytic streptococci. I. Factors influencing the interaction of phage and susceptible host cell. Krause (78)	48 souches de streptocoques du groupe A (de types 1, 6, 12 ou 25) et 10 souches du groupe C	[1] Formation de plages sur des milieux de perfusion de boeuf dialysés (soutenant systématiquement une bonne croissance bactérienne et des plages phagiques distinctes). Des milieux différents ont été utilisés pour les streptocoques du groupe A et du groupe C. [2] Spécificité des phages pour les groupes et types sérologiques de streptocoques.	Phages A1, A6, A25, A12 et C1	[1] Les plages des phages A1 et A6 avaient un diamètre de 1 à 2mm et les plages des phages A12 et A25 avaient un diamètre de 2 à 4mm lorsque le milieu A était utilisé, mais aucune plage ne se formait sur le milieu C. Les plages des phages C1 faisaient 3 à 4mm de diamètre lorsqu'il est plaqué sur du milieu C. [2] Parmi les 48 souches de streptocoques du groupe A, 32 ont été lysées par des phages de type homologue et 16 souches n'ont pas été lysées. Les phages du groupe A n'étaient pas uniformément spécifiques, puisque 24 souches ont été lysées par un ou plusieurs phages hétérologues. Le phage du groupe C n'avait aucune activité sur les streptocoques du groupe A et inversement. Aucune lyse n'a été notée lorsque les 4 phages du groupe A et le phage du groupe C ont été testés sur 25 souches de divers autres types de streptocoques du groupe A, et sur plusieurs souches d'autres groupes de streptocoques.

<p>* Lytic bacteriophages of <i>Streptococcus mutans</i>. Delisle (79)</p>	<p>S. mutans (11 souches dont des souches résistantes à la streptomycine) S. cricetus AHT S. rattus BHT S. sobrinus (2 souches)</p>	<p>[1] Test de formation de plaques dans différents milieux de culture. [2] Gamme d'hôte des phages.</p>	<p>Phages lytiques M102, e10 et f1 cultivés respectivement sur les souches <i>S. mutans</i> P42-SM, LM7-SM et OMZ 175-SM.</p>	<p>[1] Chaque phage produit des plages claires sur son hôte dans tous les milieux testés. [2] Les 3 phages sont sérotype spécifiques : <u>Phage M102</u> : activité lytique sur 3 <i>S. mutans</i>, tous de serotype c, <u>Phage e10</u> : activité lytique les 4 <i>S. mutans</i> de serotype e et <u>Phage f1</u> : activité lytique sur le <i>S. mutans</i> de serotype f. En plus de ces 15 souches connues, 6 des 19 nouveaux isolats cliniques de <i>S. mutans</i> ont été sensibles à M102 mais aucun à e10 ou f1. Aucune corrélation entre la sensibilité au phage et la présence ou l'absence de plasmides dans les souches de <i>S. mutans</i> : les plasmides ne sont pas impliqués dans la détermination de la sensibilité ou de la résistance au phage.</p>
<p>* The active agent in nascent phage lysis of Streptococci. Maxted (80)</p>	<p>Streptocoques du groupe A et des autres groupes</p>	<p>(La lyse de la souche résistante lors de l'ajout du phage au mélange de cette souche avec une souche sensible au phage a été appelée "lyse naissante"). [1] Un grand nombre de souches du groupe A et certains membres de tous les autres groupes ont été testés sur un support solide pour déterminer leur sensibilité à la lyse naissante. [2] Devenir des souches résistantes du groupe A pendant la propagation du phage B563 : 2 souches de streptocoques (celle du groupe C ayant servi à la propagation du phage et une souche du groupe A) ont été incubées séparément dans un bouillon ou mélangées, dans les 2 cas avec et sans phages. Les colonies du groupe A et du groupe C ont été comptées. [3] Si la lyse naissante dépend de la formation d'un facteur lytique, il devrait être possible d'obtenir une lyse avec le filtrat de phages seul. Des suspensions de <i>cocci</i> de tous les groupes utilisés précédemment ont été mélangées avec des échantillons actifs de facteur lytique, réduites avec du thioglycollate et placées en bain-marie à 37°C. [4] Effet d'un échantillon contenant peu de facteur lytique mais une grande quantité de phages (obtenu par récupération d'un dépôt de centrifugé d'une solution de B563) ou d'un échantillon contenant une grande quantité de facteur lytiques mais peu de phages, sur des suspensions de <i>cocci</i> du groupe A. Ces suspensions étaient une suspension vivante en phase logarithmique, et une culture en bouillon de 18h testées chacune (a) non traitée, (b) tuée avec du chloroforme, (c) tuée par chauffage à 56°C, (d) tuée par chauffage à 85°C. [5] Effet des enzymes protéolytiques sur la lyse de suspensions de streptocoques tués par la chaleur.</p>	<p>Phage lytique B563</p>	<p>[1] Toutes les souches du groupe A et les 2 souches du groupe E testées ont été lysées lorsque les <i>cocci</i> du groupe C étaient présents. [2] Le phage seul n'a aucun effet sur le taux de croissance de la souche du groupe A seul. Dans le mélange de <i>cocci</i> des groupes A et C, en présence de phages, les 2 souches se sont développées au cours de la 1^{ère} heure et ont ensuite été lysées. Lorsque les échantillons étaient parfaitement clairs, ils ont été testés pour la présence de polysaccharides du groupe en les étalant sur des antisérums des groupes A et C. Dans la culture mixte avec le phage, les polysaccharides du groupe A et du groupe C étaient présents. Le liquide surnageant des cultures témoins, sans phage, n'a pas réagi avec les antisérums. Le lysat de la culture mélangée, une fois filtré, contenait un phage actif uniquement sur la souche du groupe C. Une seconde expérience avec une souche du type 24 du groupe A a donné un résultat similaire. [3] Les membres des groupes A, C et E se lysaient facilement, tandis que le groupe H s'éclaircissait plus lentement. Aucune des autres souches n'a été touchée. Un filtrat puissant de facteur lytique a produit une lyse confluyente d'une pelouse bactérienne du groupe A lorsqu'il est appliqué non dilué ou à une dilution de 1/10. Il n'y avait aucun effet dans les dilutions plus élevées. [4] Le facteur lytique était actif contre les suspensions vivantes et tuées par le chloroforme et contre les <i>cocci</i> tués par chauffage à une température de 56°C. Même lorsque la teneur en phages avait été réduite à moins de 1 particule/500 streptocoques, la lyse était encore rapide. Une suspension de phages contenant peu de facteur lytique était presque inactive. Les <i>cocci</i> chauffés à 85°C étaient presque entièrement résistants. [5] Les organismes tués par la chaleur ont été lysés par le filtrat lors de l'ajout de trypsine. La trypsine pourrait être remplacée par 0,1% de ficine, de papaine ou de protéinase du streptocoque. La trypsine, la ficine et la papaine incubées seules avec le facteur lytique ont détruit son activité. Les <i>cocci</i> chauffés ont donc été généralement prétraités avec le facteur lytique et l'agent protéolytique ajouté après 10min d'incubation.</p>

Tableau 5 : Activité sur *Staphylococcus* de phages isolés.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
* Experimental protection of mice against lethal <i>Staphylococcus aureus</i> infection by novel bacteriophage ϕ MR11. Matsuzaki (81)	72 souches de <i>S. aureus</i> (43 souches MSSA et 29 souches multi-résistantes).	[1] Effet de l'administration de ϕ MR11 purifié injecté dans la cavité péritonéale de la souris immédiatement après l'injection IP de 8×10^8 SA37 (dose tuant la plupart des souris en 6-7h après injection) à différentes MOI compris entre 0,01 et 200. [2] Efficacité de ϕ MR11 sur 4 souches cliniques multi-résistantes de <i>S. aureus</i> injectées par voie IP (8×10^8 cellules) à des souris.	Phage ϕMR11 (un des 8 phages isolés sur les cultures de 72 <i>S. aureus</i> , bactériolytique pour un large éventail d'hôtes).	[1] L'administration de ϕ MR11 à une MOI de 0,1 à 200 a protégé de manière significative les souris de la mort induite par SA37. L'administration d'une quantité importante (jusqu'à $2,0 \times 10^{11}$ PFU) de ϕ MR11 seul à 30 souris n'a pas affecté leur état physique ni leur survie pendant la période d'observation d'1 mois. Pas d'effet du phage seul sur les tissus et organes de souris tuées à 6h et à 1, 7 et 14 jours après administration. [2] Toutes les souris traitées avec ϕ MR11 ont survécu pendant 7 jours après l'injection de <i>S. aureus</i> multi-résistantes, alors qu'il y a plus de 90% de mortalité chez les souris non traitées par le phage.
* Experimental bacteriophage protection against <i>Staphylococcus aureus</i> abscesses in a rabbit model. Wills (82)	<i>S. aureus</i> 2698	[1] Etude de prophylaxie : des lapins (8 par groupe) ont reçu chacun 8×10^7 UFC de <i>S. aureus</i> 2698 et soit une suspension témoin, soit 2×10^9 UFP de LS2a. [2] Etude dose-réponse : les lapins ont reçu chacun 8×10^7 UFC de <i>S. aureus</i> 2698 et 6×10^7 , 6×10^6 ou 6×10^5 UFP de LS2a ou de suspension témoin. Un témoin phage seulement a été inclus pour chaque groupe de dose, recevant la même dose de phage mais pas de bactérie. [3] Etude de traitement différé : 21 lapins ont reçu chacun 5×10^7 UFC de <i>S. aureus</i> et soit une suspension témoin administrée immédiatement après la bactérie, soit 3×10^9 UFP de phage administré 6, 12 ou 24h après l'injection bactérienne.	Phage LS2a isolé des eaux usées.	[1] Au bout de 4 jours, seul 1 des 8 lapins traités au phage avait un abcès contre 8 lapins non traités. Les UFC bactériennes provenant des sites d'injection étaient plus faibles chez les lapins traités que chez les témoins non traités. [2] Après 4 jours, tous les lapins ayant reçu une bactérie, sauf un, ont produit des abcès; l'exception avait reçu la plus forte dose de phage. Les surfaces médianes et les numérations bactériennes dans les abcès ont augmenté de façon constante à mesure que la dose de phage diminuait. Aucune bactérie n'a été isolée du foie ou de la rate d'aucun des lapins et aucun phage n'a été isolé du foie ou de la rate des lapins non traités. Le phage a été isolé dans la rate de 2/3 témoins phages seulement, ceux ayant reçu 10^7 et 10^5 UFP, et de 4/4, 3/4 et 1/4 lapins infectés ayant reçu 10^7 , 10^6 et 10^5 UFP respectivement. [3] 4 jours après les 1 ^{ères} injections, tous les lapins avaient des abcès. Le nombre de phages au site d'infection était de 500UFP à 6h et 2000UFP à 12 et 24h chez les contrôles n'ayant reçu que des phages, ce qui est inférieur à tous les nombres chez les lapins infectés. Aucune bactérie n'a été isolée du foie ou de la rate d'aucun des lapins et aucun phage n'a été isolé du foie ou de la rate des lapins non traités.
Isolation and characterization of a novel <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophage, ϕ MR25, and its therapeutic potential. Hoshiba (83)	72 souches de <i>S. aureus</i> MSSA et MRSA utilisées pour isoler le phage ϕ MR25	Effet de l'administration IP de ϕ MR25 sur l'infection létale à <i>S. aureus</i> SA37 chez la souris.	Phage ϕMR25 , isolé à partir d'une souche de <i>Staphylococcus aureus</i> lysogène par induction à la mitomycine C.	Toutes les souris infectées avec le témoin sont mortes en 1 jour. En revanche, l'administration de ϕ MR25 a eu un effet salvateur dépendant de la dose chez les souris infectées par <i>S. aureus</i> SA37. <u>ϕMR25 à une MOI de 0,01</u> : survie de 40%. <u>ϕMR25 à une MOI de 0,1</u> : taux de survie à 80% <u>ϕMR25 à une MOI supérieure à 1</u> : survie de 100%. Administration de ϕ MR25 seul à des souris non infectées : aucun effet sur le taux de survie ou l'état général des souris.

<p>* Isolation from sewage influent and characterization of novel <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. Synnott (84)</p>	<p><i>S. aureus</i> (15 isolats issus du lait cru de vaches atteintes de mammites et ATCC 6538)</p>	<p>[1] Isolation des phages lytiques et sélection des phages ayant la gamme d'hôtes la plus large et les meilleures propriétés lytiques.</p> <p>[2] Les capacités de ϕSA012 et ϕSA039 à lyser 7 des 15 isolats de <i>S. aureus</i> coagulase- et hémolyse-positives obtenus à partir de lait de vache en mastite ont été testées à l'aide de cultures en milieu LB liquide. Les 2 phages ont été cultivés séparément et conjointement avec chaque isolat bactérien. Trois isolats positifs pour les gènes d'entérotoxine, SA019, SA020 et SA026, et quatre isolats supplémentaires, SA003, SA028, SA029 et SA031, ont été utilisés comme bactéries hôtes. La turbidité de chaque culture a été mesurée en déterminant la DO₆₆₀.</p>	<p>Phages ϕSA012 et ϕSA039, lytiques sur une large gamme d'isolats de <i>S. aureus</i> obtenus à partir de lait de mastite, sélectionnés après analyse de la gamme d'hôtes de 52 phages issus d'influenza d'égouts.</p>	<p>[1] 16/52 phages capables de former des plages sur plus de 4 isolats. Pour 14 isolats de <i>S. aureus</i> liés à la mastite, des plages claires ont été produites par plus d'un type de phage. Aucun phage n'a produit de plages claires sur l'isolat SA001 lié à la mastite (certains ont produit des plages troubles). Le phage ϕSA012, a produit la plage la plus claire sur ATCC 6538. 2 des 52 phages, ϕSA012 et ϕSA039, se sont révélés être les candidats les plus prometteurs. ϕSA012 a produit des plages claires sur 8/15 isolats de <i>S. aureus</i> liés à la mastite (53%) et des plages moins claires sur 6 autres isolats et sur ATCC 6538, mais aucune plage sur SA002. ϕSA039 a produit des plages transparentes sur 13/15 isolats de mastite (87%) et des plages troubles sur les 2 isolats restants, mais n'a pas produit de plages sur ATCC 6538. Ces 2 phages ont été utilisés pour des analyses plus poussées.</p> <p>[2] Co-culture de ϕSA012 avec les 7 souches de <i>S. aureus</i></p> <ul style="list-style-type: none"> - avec 5 des 7 isolats de <i>S. aureus</i> : diminution de l'absorbance - avec SA026 et SA029 : pas de diminution de la DO₆₆₀. - avec SA019 : d'abord un déclin immédiat puis augmentation de la DO₆₆₀ après 12h, diminution progressive après 25h et jusqu'à la fin de l'expérience. - avec SA031 : diminution DO₆₆₀ au bout de 3h à presque zéro, puis a commencé à se rétablir après 60h. - avec SA003, SA020 et SA028 : DO₆₆₀ diminuée à presque zéro juste après l'inoculation puis constante sans récupération jusqu'à la fin des expériences (plus de 65h). <p><u>Co-culture de ϕSA039 avec les 7 souches de <i>S. aureus</i></u> : diminution de l'absorbance dans tous les cas :</p> <ul style="list-style-type: none"> - avec SA003, SA026, SA029 et SA031 : augmentation initiale de la DO₆₆₀ (5 à 20h), puis diminution jusqu'à atteindre presque 0. Au bout de 10h ou moins, augmentation progressive de l'absorbance jusqu'à atteindre ou dépasser le pic précédent, mais le niveau n'a jamais été aussi élevé que celui du témoin (bactéries seules). Avec SA003, il y a eu une autre légère diminution après 52h. - avec SA019 et SA020 : diminution quasi immédiate de la DO₆₆₀ (\approx 0) suivie d'une récupération aux mêmes niveaux que ceux du témoin (bactéries seules). Récupération précoce pour SA019 (après 11h) suivie d'un déclin graduel après un pic (vers 22h). Pour SA020, récupération tardive (après 54h) sans aucune diminution ultérieure. - avec SA028 : baisse de la DO₆₆₀ débutant après 6h puis récupération à 14h. Ensuite autre diminution avant stabilisation à DO₆₆₀\approx0,17. <p><u>Co-culture simultanée des 2 phages avec chaque isolat de <i>S. aureus</i></u> : 3 tendances :</p> <ul style="list-style-type: none"> -avec SA003 et SA019 : diminution à une valeur inférieure à 0 immédiatement après l'addition du phage (aucune augmentation durant le temps de l'expérience).
---	--	--	--	--

				<p>-avec SA020, SA028 et SA031 : diminution initiale de l'absorbance, puis récupération éventuelle dans les 30h pour SA020 et SA028 et dans les 5h pour SA031.</p> <p>-avec SA026 et SA029 : double pic et aboutit à une valeur d'absorbance inférieure à la valeur que chaque phage produisait individuellement à la fin de l'expérience.</p>
<p>* Experimental phage therapy against <i>Staphylococcus aureus</i> in mice. Capparelli (85)</p>	<p>S. aureus (20 souches cliniques)</p>	<p>[1] Sélection d'un phage persistant dans le sang de la souris : 4 souris ont reçu une injection IP du phage sauvage WSa (10^8 UFP/souris) et, à intervalles de 12h, 4 doses de <i>S. aureus</i> A170 (10^7 UFC/souris); ces doses répétées de <i>S. aureus</i> A170 n'ont pas nui aux souris.</p> <p>[2] 2 souris ont reçu 10^9 UFP du phage WSa et 2 autres souris, 10^9 UFP du phage MSa. Les particules de phage présentes dans la rate, le foie et le sang ont été comptées périodiquement.</p> <p>[3] Effet du phage MSa sur les souris infectées par <i>S. aureus</i> A170 lorsque l'agent pathogène pénètre dans le sang : 4 groupes de 5 souris ont reçu une injection IV d'une dose de <i>S. aureus</i> A170 (10^8 UFC/souris) qui tue 90 à 100% des souris en 4 jours. 1 groupe a servi de témoin non traité et les 3 autres groupes ont reçu le phage MSa (10^7, 10^8 ou 10^9 UFP/souris) par voie IV immédiatement après l'infection.</p> <p>[4] Pour établir le seuil de densité de <i>S. aureus</i> A170 requis pour la réplication de MSa, des souris ont été infectées simultanément avec 10^8 UFC de bactéries et 10^9 UFP de MSa/souris. Les titres de bactéries et de phages en circulation ont été mesurés quotidiennement pendant 20 jours.</p> <p>[5] Pour déterminer si le traitement au phage, en tuant les bactéries, pourrait moduler l'inflammation, les taux d'IL-6 et de TNF-α ont été analysés 24h après l'infection IV de souris (3 souris/groupe) avec MSa seul (10^9 UFP/souris), <i>S. aureus</i> seul (10^8 UFC/souris) ou MSa (10^9 UFP/souris) et <i>S. aureus</i> (10^8 UFC/souris) simultanément. 3 souris de contrôle ont fourni les niveaux basaux moyens des gènes de cytokines.</p> <p>[6] Activité de MSa contre des souches de <i>S. aureus</i> MRSA : 2 groupes de 10 souris ont été infectés par voie IV avec <i>S. aureus</i> A352 (10^8 UFC/souris). Un groupe a servi de témoins non traités; le second groupe a reçu le phage MSa (10^9 UFP/souris) par voie IV immédiatement après l'infection.</p> <p>[7] Effets du retard du traitement par phage après l'exposition à <i>S. aureus</i> A170 : les souris ont été infectées par voie IV avec 5×10^6 UFC/souris de <i>S. aureus</i> A170 (dose la plus faible non corrigée par l'immunité innée), puis divisées en 2 groupes de</p>	<p>5 phages isolés à partir des 20 souches de <i>S. aureus</i>. Le phage WSa isolé de <i>S. aureus</i> A171 présentait la plus grande gamme d'hôtes.</p>	<p>[1] La procédure a permis d'isoler une souche de phage persistante dans le sang pendant 21 jours. Ce phage a été désigné MSa.</p> <p>[2] MSa restait dans la circulation pendant 20 à 25 jours, alors que WSa était presque complètement piégé à l'intérieur de la rate et du foie en 2 jours. La capacité acquise par le phage MSa à persister dans la circulation <i>in vivo</i> est stable et les souris n'ont pas présenté d'effets négatifs visibles à long terme.</p> <p>[3] Toutes les souris du groupe témoin et du groupe traité avec 10^7 UFP de phage/souris sont mortes dans les 4 jours (10 souris). Les souris traitées avec la dose intermédiaire de phage (10^8 UFP/souris) n'étaient que partiellement protégées (2/5 souris ont survécu). Les souris traitées avec la dose la plus élevée (10^9 UFP/souris) ont toutes été protégées contre la mort (5/5 souris). L'avantage clinique du traitement par le phage était également évident en quantifiant la charge bactérienne 4 jours après l'injection du phage : charge bactérienne élevée chez les souris infectées n'ayant pas reçu de phage mais aucune bactérie n'a été isolée chez des souris traitées par phage à 10^9 UFP/souris.</p> <p>[4] La densité de <i>S. aureus</i> A170 à laquelle la réplication du phage a commencé était d'environ 10^4 UFC/ml et était la même pour la rate, le cœur et les reins. <i>S. aureus</i> A170 n'a pas atteint ce seuil dans le sang et, en l'absence d'une densité bactérienne adéquate, il n'y a pas eu d'expansion du phage.</p> <p>[5] MSa administré en même temps que <i>S. aureus</i>, a réduit d'environ 5 fois le niveau d'expression de l'IL-6 (induit par l'infection à <i>S. aureus</i>). 24h après l'infection, le niveau d'expression du TNF-α n'a pas varié de manière significative entre les groupes expérimentaux.</p> <p>[6] Le taux de survie était de 20% (2/10) pour le groupe témoin et de 100% (10/10) pour le groupe traité.</p> <p>[7] 20 jours après l'infection à <i>S. aureus</i> (10 jours après le traitement par MSa), la rate, les reins, le cœur et le sang des souris témoins (10/10 souris) étaient toujours infectés; les mêmes organes des souris traitées avec le phage (10/10 souris) étaient stériles. Donc le traitement par phages est également efficace lorsque les phages sont administrés 10 jours après l'infection bactérienne.</p> <p>[8] Administré en même temps que des bactéries, MSa a inhibé le développement de l'abcès. Une dose unique ou des doses multiples de MSa administrées 4 jours après l'infection bactérienne n'ont pas influencé l'incidence des abcès ; cependant, le phage a réduit de manière significative à la fois la charge bactérienne et le poids des abcès. Les doses multiples étaient plus efficaces que les doses uniques pour réduire à la fois la charge bactérienne et le poids des abcès.</p>

	<p>10. Un groupe a reçu 10^9 UFP/souris de MSa à J+10. Le 2^{ème} groupe a servi de contrôle non traité.</p> <p>[8] MSa a été testé pour sa capacité à contrôler les infections locales par 3 expériences :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Efficacité du MSa administré en même temps que <i>S. aureus</i> : 2 groupes de 5 souris ont reçu soit <i>S. aureus</i> seul (10^8 UFC/souris), soit <i>S. aureus</i> (10^8 UFC/souris) et MSa (10^9 UFP/souris) immédiatement après, en SC. - Efficacité du traitement par phages une fois les abcès bien établis : MSa (10^9 UFP/souris) a été administré 4 jours après l'infection de la souris par <i>S. aureus</i> (10^8 UFC/souris). - Efficacité de doses multiples de MSa : les souris ont reçu 4 doses quotidiennes de MSa (dose individuelle, 10^9 UFP/souris) 4 jours après l'infection à <i>S. aureus</i> (10^9 UFC/souris). <p>Les paramètres utilisés pour évaluer l'efficacité du traitement par phages étaient les mêmes pour les 3 expériences : prévention de la formation d'abcès, réduction de la charge bactérienne (UFC/abcès) et du poids des abcès. Ces paramètres ont été évalués 4 jours après l'administration du phage.</p> <p>[9] Des macrophages péritonéaux de souris (10^5/puits) ont été incubés <i>in vitro</i> avec 10^4 UFC/puits de <i>S. aureus</i> A170 pendant 1h. La monocouche a ensuite été incubée avec de la gentamicine pendant 1h pour tuer les bactéries extracellulaires, lavée pour éliminer l'antibiotique en excès, puis incubée pendant 3h. Le phage MSa (10^6 UFP/puits), seul ou adsorbé sur <i>S. aureus</i>, a ensuite été ajouté aux puits individuels.</p> <p>Les puits témoins ont été laissés sans phage ni bactérie infectée par le phage.</p> <p>[10] Evolution de la résistance aux phages <i>in vivo</i> (observation des organes et du sang de plus de 50 souris infectées par <i>S. aureus</i> A170 et traitées avec le phage MSa simultanément ou 10 jours après l'infection) et <i>in vitro</i> (5 cultures bactériennes (10^8 UFC/ml) en milieu riche ont été infectées par WSa (10^9 UFP/ml) et incubées à 37°C pendant une nuit).</p>		<p>[9] Après incubation (24 à 48h), les macrophages ont été lysés et le nombre de bactéries intracellulaires survivantes a été déterminé.</p> <p>Le phage MSa seul ne peut pas pénétrer à l'intérieur des cellules. Lorsqu'il est administré à l'intérieur des cellules, MSa tue efficacement les bactéries intracellulaires à 24 et 48h. La cytométrie en flux, en mesurant directement les proportions de bactéries mortes et vivantes, a confirmé l'activité de destruction du phage MSa contre les bactéries intracellulaires. Environ 70% des bactéries intracellulaires isolées à partir de macrophages traités <i>in vitro</i> avec des bactéries infectées par un phage pendant 48h étaient mortes, tandis que les bactéries intracellulaires isolées à partir de macrophages traités avec le phage MSa seul étaient presque toutes vivantes.</p> <p>[10] Les différents organes (rate, reins et cœur) des souris se sont tous avérés stériles lorsque les animaux ont été sacrifiés à la fin de l'expérience. <i>In vivo</i>, les staphylocoques résistants aux phages pourraient être éliminés rapidement par le système immunitaire. La fréquence des bactéries résistantes aux phages a donc également été mesurée <i>in vitro</i>. La fréquence observée des bactéries résistantes aux phages était de $1,3 \times 10^{-8} \pm 4,16 \times 10^{-9}$ = c'est donc un événement rare.</p>
--	--	--	---

Les autres articles traitant de l'action de phages sur des staphylocoques sont traités ailleurs : références (69) et (74) dans le Tableau 3 et référence (86) dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Activité sur *Pseudomonas* de phages isolés ou cocktails de phages.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
* Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. Soothill (86)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3719 <i>Staphylococcus aureus</i> 6409 et M60 <i>Acinetobacter baumannii</i> AC54	<p>[1] Action de BS24, BS46 et ϕ-131 sur cultures <i>in vitro</i>.</p> <p>[2] Etude de la toxicité des suspensions de phages chez les souris en leur injectant 0,25ml de suspension (observation des signes de maladie et prise des températures).</p> <p>[3] Evaluation de l'effet protecteur de chaque souche de phage chez des souris :</p> <p>[a] Etude de la protection du phage BS46 sur 5 groupes de 5 souris infectées par injection de 5 DL₅₀ d'<i>A. baumannii</i> AC54. 4 souris de chaque groupe a reçu 0.25ml de BS46, les autres ont reçu 0.25ml de suspension contrôle.</p> <p>[b] Etudes de protection du phage BS24 après injection de 10 DL₅₀ ou de 5 DL₅₀ de <i>P. aeruginosa</i> à des souris traitées ensuite par différentes doses de phage.</p> <p>[c] Etudes de protection</p> <ul style="list-style-type: none"> - de 3x10⁸ UFP de phage ϕ-131 sur des souris infectées avec 6 DL₅₀ de <i>S. aureus</i> 6409 - de 3.7x10⁸ UFP de phage ϕ-131 sur des souris infectées avec 9 DL₅₀ de <i>S. aureus</i> M60. 	<p>Phage BS24 actif contre <i>P. aeruginosa</i>, et</p> <p>phage BS46 actif contre <i>A. baumannii</i> isolés des eaux usées,</p> <p>phage ϕ-131 actif contre <i>S. aureus</i>.</p>	<p>[1] 60 UFP du phage BS24 et 340 UFP du phage BS46 ont été nécessaires pour éliminer complètement les cultures en bouillon standard. Le phage ϕ-131 était moins actif, il a fallu 10⁶ UFP pour provoquer la clarification complète de la culture du bouillon de souche M60.</p> <p>[2] Aucune toxicité des suspensions de phage et de contrôle n'a été détectée, c'est-à-dire qu'il n'y avait aucun signe de maladie et que les températures des souris ne différaient pas de manière significative de celles des témoins.</p> <p>[3][a] Le phage a protégé les souris de manière significative par rapport aux témoins non traités.</p> <p>[b] Les doses maximales de phage BS24 ont protégé de manière significative les souris contre 10 DL₅₀ et 5 DL₅₀ de <i>P. aeruginosa</i> (lorsque la survie dans chacun des groupes recevant les doses maximales est comparée à celle des groupes équivalents recevant les doses les plus faibles).</p> <p>[c] Le phage ϕ-131, faiblement lytique <i>in vitro</i>, n'a pas permis de protéger les souris des effets létaux de deux souches de <i>S. aureus</i> (M60 et 6409) aux doses maximales disponibles.</p>
*Use of newly isolated phages for control of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 and ATCC 10145 biofilms. Pires (87)	35 souches de <i>P. aeruginosa</i> : ATCC 10145, CECT 111, PAO1, CLIN (isolat clinique), et 31 autres isolats cliniques (numérotés de 1 à 31)	<p>[1] Etude du spectre lytique des 17 phages isolés contre 35 souches de <i>P. aeruginosa</i> (pelouses bactériennes).</p> <p>[2] Effet des phages phiIBB-PAA2, phiIBB-PAC23, phiIBBPACL12 et phiIBB-PAP21 sur des cellules à croissance exponentielle et stationnaires de leurs hôtes respectifs à la MOI 1.</p> <p>[3] Effet des phages phiIBB-PAA2 et phiIBB-PAP21 de <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 et PAO1 sur des biofilms de 24h.</p>	<p>17 phages ont été isolés des effluents hospitaliers par enrichissement de 4 souches de <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145, CECT 111, PAO1, CLIN). 4 de ces phages phiIBB-PAA2, phiIBB-PAC23, phiIBBPACL12 et phiIBB-PAP21 (celui de chaque hôte ayant le plus large spectre lytique) ont été sélectionnés pour les expériences.</p>	<p>[1] La plupart des phages ont montré une activité lytique sur plusieurs isolats. Les phages isolés des souches de <i>P. aeruginosa</i> de collection (CECT 111 et ATCC 1045) se sont avérés infecter le plus grand nombre de souches dans cette étude.</p> <p>[2] Dans les 4 systèmes phage-hôte : nette différence dans les profils d'infection des cellules stationnaires et à croissance exponentielle.</p> <ul style="list-style-type: none"> • phiIBB-PAA2 et phiIBB-PAP21 ont infecté des cellules en croissance exponentielle. • phiIBBPAA2 a en plus été capable de lyser les cellules en phase stationnaire. • phiIBB-PAC23 n'a entraîné qu'une réduction mineure de la DO que ce soit pour les cellules en phase de croissance stationnaire ou exponentielle. • Le phage phiIBB-PACL12 n'a pas empêché la croissance lente mais continue de la souche <i>P. aeruginosa</i> CLIN (bien qu'il ait été isolé d'elle). <p>[3] • phiIBB-PAA2 a progressivement diminué le nombre de cellules viables présentes dans les biofilms.</p> <ul style="list-style-type: none"> • phiIBB-PAP21 a entraîné une réduction considérablement plus importante des cellules du biofilm de PAO1 après 2h d'infection par rapport à la réduction de la souche ATCC 10145 infectée par phiIBB-PAA2.

Efficacy of bacteriophage treatment on <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms. Phee (88)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	<p>[1] Biofilms de PA14 cultivés dans des microplaques pendant 24h et 96h.</p> <p>[2] Biofilms de PA14 de 24h et de 96h cultivés dans des canaux de racines préparés de 28 incisives mandibulaires monocanalaire humaines extraites.</p>	Phages JBD4 et JBD44a , isolés des souches ATCC 15524 et Env110BP de <i>P. aeruginosa</i> .	<p>[1] Réduction significative du pourcentage moyen de biomasse bactérienne. Pas de diminution supplémentaire de la biomasse bactérienne en utilisant les phages en combinaison par rapport à leur utilisation individuelle. Pas de différence significative dans le nombre de phages libérés lors de l'utilisation de JBD4 et JBD44a seuls ou combinés dans des biofilms de 24h ou de 96h.</p> <p>[2] Pas de différence notable du nombre de cellules bactériennes après 24h ou 96h de traitement par les phages seuls ou combinés mais augmentation de 100 à 1000 fois du nombre de phages présents dans la fraction planctonique du canal radiculaire à la fin de la période d'incubation.</p>
* Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Soothil (89)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3719	<p>[1] Effet de <i>P. aeruginosa</i> sur les greffes de peau sur des cobayes.</p> <p>[2] Effets du phage sur les greffes infectées par <i>P. aeruginosa</i> : 14 cobayes greffés ont été infectés avec 6×10^5 UFC de <i>P. aeruginosa</i> 3719. 7 de ces cobayes ont reçu $1,2 \times 10^7$ UFP du phage BS24 et les 7 autres ont reçu la suspension témoin sans phage.</p> <p>[3] Effets du phage et de la suspension de contrôle sur des greffes non infectées.</p>	169 phages pour <i>P. aeruginosa</i> ont été isolés. Le phage le plus efficace, BS24 , a été sélectionné pour des expériences sur des animaux.	<p>[1] <i>P. aeruginosa</i> inhibe la prise de greffe.</p> <p>[2] Le phage BS24 a protégé de manière significative le groupe de 7 greffons infectés par rapport aux 7 greffes traitées avec la suspension témoin sans phage.</p> <p>[3] Les 2 cobayes dont les greffons ont été traités respectivement avec phage ou avec suspension témoin ont semblé en bonne santé tout au long de l'étude. Les deux greffes avaient pris complètement 5 jours après les opérations.</p>
Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in mice. Watanabe (90)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> D4	<p>[1] Activité lytique de KPP10 contre <i>P. aeruginosa</i> D4 <i>in vitro</i>.</p> <p>[2] Effet de KPP10 sur la survie de souris après l'induction d'un sepsis gastrique causé par <i>P. aeruginosa</i>. Les souris ont reçu par voie orale la souche KPP10 du phage soit 1 jour avant (groupe 1), 1 jour après (groupe 2) ou 6 jours après (groupe 3) l'inoculation orale de <i>P. aeruginosa</i>.</p> <p>[3] Effet de KPP10 sur la colonisation bactérienne de l'intestin : chaque souris a été inoculée avec 1×10^{10} UFC de <i>P. aeruginosa</i> et des échantillons de selles ont été obtenus 1 jour après la fin du traitement par cyclophosphamide.</p> <p>[4] Effet du phage sur l'infection IP à <i>P. aeruginosa</i> : la souche D4 de <i>P. aeruginosa</i> a été injectée en IP simultanément au phage KPP10 à différentes MOI.</p> <p>[5] Résistance de KPP10 dans la bile, l'acidité gastrique et le sérum.</p>	Phage KPP10 isolé dans un échantillon d'eau.	<p>[1] Puissante activité lytique de KPP10 contre <i>P. aeruginosa</i> D4 : diminution progressive du nombre de bactéries viables jusqu'à 120min, puis rapide après 150min d'incubation. Le nombre de bactéries augmente ensuite progressivement après 210min d'incubation : possible émergence de souches résistantes à KPP10.</p> <p>[2] L'administration orale de phages protège les souris contre le sepsis d'origine intestinale causée par <i>P. aeruginosa</i> et l'efficacité du traitement par les phages dépend fortement du moment de l'administration du phage : la survie des souris du groupe 2 était nettement supérieure à celle du groupe témoin (66,7% contre 0%). Le taux de survie chez les souris du groupe 3 (10%) n'a que peu augmenté et aucune amélioration chez les souris du groupe 1 par rapport à celle des souris témoins n'a été observée.</p> <p>[3] Réduction significative du nombre de bactéries viables dans les matières fécales par rapport au groupe témoin chez les souris ayant reçu KPP10 un jour après (groupe 2) ou 6 jours après (groupe 3) l'administration de <i>P. aeruginosa</i>.</p> <p>[4] Le traitement par le phage protège de manière significative les souris contre la mortalité à une concentration de 19×10^6 UFC/souris de <i>P. aeruginosa</i> D4 quand l'inoculation est simultanée. L'administration du phage un jour avant l'inoculation bactérienne a eu un effet mineur (survie de 60% versus survie de 40% pour les témoins).</p> <p>[5] La bile a peu d'impact sur KPP10 contrairement aux valeurs de pH inférieures à 2.8 (résistance à l'acidité gastrique faible). Le sérum a peu d'effet sur la multiplication phagique.</p>

<p>* Antibacterial efficacy of phages against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections in mice and <i>Drosophila melanogaster</i>. Heo (91)</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1</p>	<p>[1] Activité lytique des phages MPK1 et MPK6 <i>in vitro</i>. 10⁷ UFC de cellules PAO1 ont été incubées dans un milieu contenant 2x10⁶ UFP de MPK1 ou de MPK6 dans 100µl de PBS. [2] Efficacité thérapeutique des phages MPK1 et MPK6 contre l'infection péritonéale de la souris. [a] MPK1 et MPK6 ont été injectés en IM ou IP avec différentes doses de PAO1 6h après l'infection. [b] Mesures des charges bactériennes dans les organes de la souris (rate, poumons et foie) Les échantillons d'organes ont été obtenus d'animaux vivants 24h après l'infection. [3] Efficacité antibactérienne des phages : évaluation de leurs effets protecteurs vis-à-vis de la mortalité et de la prolifération induites par PAO1 dans le modèle d'infection à <i>D. melanogaster</i>. Les phages MPK1 et MPK6 ont été administrés en superposant 5x10⁷ UFP sur un flacon contenant 50 mouches infectées par PAO1.</p>	<p>6 phages (nommés MPK1 à MPK6) potentiellement lytiques pour la souche PAO1 de <i>P. aeruginosa</i> ont été initialement isolés à partir d'échantillons d'eaux usées. MPK1 et MPK6 ont été sélectionnés pour les expériences.</p>	<p>[1] Diminution progressive du nombre de bactéries viables jusqu'à 10² UFC pour MPK1 après 30min d'incubation contre 10³ UFC pour MPK6 après 120min [2][a] La dose de 2x10⁷ UFP des 2 phages protège de manière significative les souris infectées par rapport aux souris non traitées. Aucune protection significative n'a été observée avec la dose de 2x10⁶ UFP de MPK6 administrée en IM. Meilleure efficacité de l'administration IP qu'IM pour MPK1 et MPK6. [b] Le traitement avec les 2 phages réduit considérablement les charges bactériennes (de 2 à 3logs pour MPK1 et 2logs pour MPK6) = efficacité pour contrôler la péritonite induite par <i>P. aeruginosa in vivo</i>. [3] Les 2 phages ont protégé de manière significative les mouches infectées de la mort par rapport à l'absence d'alimentation par les phages. Des niveaux d'efficacité similaires ont été observés pour les deux phages, bien qu'une meilleure pharmacocinétique de MPK1 ait été observée dans les tissus de la mouche. MPK6 et, dans une plus large mesure, MPK1 ont inhibé la prolifération bactérienne dans cette condition d'infection.</p>
<p>* Phage therapy of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection in a mouse burn wound model. McVay (92)</p>	<p><i>P. aeruginosa</i> PAO1^{Rif} (dérivé de la souche PAO1 virulente de <i>P. aeruginosa</i> résistant à la rifampine)</p>	<p>[1] Capacité des phages à prévenir les infections à <i>P. aeruginosa</i> sur un modèle de lésion thermique chez la souris. Le cocktail de phages a été administré par voie IP, IM ou SC aux animaux blessés infectés et non infectés. Pour contrôler la virulence de PAO1^{Rif}, un autre groupe de souris n'a reçu que l'inoculum bactérien (pas de phages). Pour examiner la toxicité des phages chez les animaux infectés, le cocktail de phages a été injecté aux groupes blessés mais non infectés. [2] Les animaux survivants (blessés, infectés, et ayant reçu des phages) ont été sacrifiés à 96h post-infection et le nombre d'organismes PAO1^{Rif} détectés dans les tissus d'animaux survivants a été comparé à celui des tissus des animaux morts de l'infection à <i>P. aeruginosa</i>. [3] Pour déterminer si des dérivés de PAO1^{Rif} résistants aux phages sont apparus chez les souris infectées, analyse des isolats de PAO1^{Rif} provenant des tissus de souris décédées 48h post-infection pour leur sensibilité au phage. Les nombres de phages dans le foie et la rate de ces animaux ont également été énumérés pour déterminer si les phages s'étaient multipliés.</p>	<p>Cocktails contenant ~10⁸ UFP/100µl d'inoculum des phages Pa1 (ATCC 12175-B1), Pa2 (ATCC 14203-B1), et Pa11 (ATCC 14205-B1).</p>	<p>[1] Toutes les souris blessées, non infectées par PAO1^{Rif} mais qui ont reçu le cocktail de phages ont survécu : le cocktail de phages n'est pas toxique pour les souris traumatisées. En l'absence de phages : taux de mortalité de 94% dans les premières 72h post infection chez les souris infectées blessées. Phages administrés en IM, SC ou IP : taux de mortalité réduits à 72% ,78% et 12%, respectivement. Les phages administrés par voie parentérale augmentent significativement la survie des souris infectées et blessées. Parmi les animaux blessés et infectés recevant les phages, seuls 2/17 animaux sont morts dans les 72h post-infection. [2] La numération bactérienne moyenne dans les tissus des animaux décédés était de 1,53x10⁹ UFC/g de foie et de 6,68x10⁷ UFC/g de rate. La numération bactérienne moyenne dans les tissus après le succès du traitement par phages était de 5,26x10² UFC/g de foie et de 2,93x10² UFC/g de rate. Donc la cause de la mort était le résultat d'une infection systémique à <i>P. aeruginosa</i> et une thérapie par phage réussie est corrélée à une réduction de la charge de PAO1^{Rif}. [3] Tous les isolats testés (100) étaient sensibles à chacun des phages du cocktail donc la mort de ces animaux n'était pas le résultat de l'émergence d'un variant de la souche PAO1^{Rif} résistant aux phages. Augmentation d'~ 20 fois du nombre de phages trouvés dans les organes (par rapport au nombre administré) donc multiplication des phages <i>in vivo</i>, mais pas suffisamment pour sauver l'animal.</p>

<p>* Therapy of experimental <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections with a nonreplicating genetically modified phage. Hagens (93)</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1</p>	<p>[1] Détermination du taux de survie et la DO₆₀₀ des cultures de PAO1 après infection par Pf3, Pf3R ou Pt1. [2] Traitement avec 10⁶ (MOI 10), 10⁷ (MOI 100), 10⁸ (MOI 1 000) ou 10⁹ (MOI 10 000) UFP de Pf3R ou Pt1 45min après l'infection des souris avec la MLD de PAO1. [3] Efficacité du traitement par phages après infection lorsque 3x10⁸ UFP de phages Pf3, Pf3R ou Pt1 ont été administrées 45min après l'infection avec 3 MLD de PAO1 (MOI 1 000). [4] Les souris ont été soumises l'infection par 3 MLD, puis traitées à 6h post-infection avec 3x10⁹ UFP (MOI 10 000) de PF3R ou de Pt1. [5] Les souris ont été soumises à 5 MLD (5x10⁵ UFC) de PAO1 et la survie a été contrôlée sans traitement par le phage ou après traitement avec Pf3R ou Pt1 (les 2 à 5x10⁸ UFP) 60min après l'infection.</p>	<p>Phage Pf3, phage générique Pf3R, non reproducteur, génétiquement modifié (un gène de protéine d'exportation du phage filamenteux Pf3 de <i>P. aeruginosa</i> a été remplacé par un gène d'endonucléase de restriction), phage lytique Pt1 à ARN.</p>	<p>[1] Les cultures à une DO₆₀₀ de 0,2 étaient infectées avec une MOI de 50. La croissance de la souche infectée avec Pf3 n'était que légèrement retardée par rapport à celle de bactéries non infectées. Au bout de 90min, les cultures de PAO1 infectées avec Pf3R ou Pt1 présentaient une diminution de 99% d'UFC. La DO₆₀₀ de la culture infectée par le phage Pt1 a quasiment disparu en moins de 90min. En revanche, la DO₆₀₀ de la culture infectée par Pf3R est restée constante pendant 7h : les cellules non viables sont restées structurellement intactes, alors que les bactéries infectées par Pt1 étaient presque complètement lysées. [2] Une MOI d'au moins 1000 de l'un ou l'autre des phages était nécessaire pour guérir l'infection létale. [3] Les phages Pt1 et Pf3R ont sauvé 75% des souris, alors que toutes les souris non traitées et traitées avec Pf3 sont mortes respectivement en 24 et 48h. [4] Les deux traitements ont entraîné le sauvetage de toutes les souris infectées. [5] Toutes les souris du groupe témoin négatif (n = 15) sont mortes au bout de 12h. Au bout de 24h, 95% des souris traitées avec Pf3R et 60% des souris traitées avec Pt1 ont survécu (n = 15 pour chaque groupe). Après 48h, 73 et 20% des souris traitées avec Pf3R et Pt1, respectivement, restaient viables. Aucun autre changement n'a été observé au cours des 5 jours d'observation suivants.</p>
<p>* Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> septicemia in mice. Vinodkumar (94)</p>	<p><i>P. aeruginosa</i> YFN-58 multi-résistante</p>	<p>[1] Capacité du phage à sauver des souris de la bactériémie à <i>P. aeruginosa</i> : une dose unique de phage CSV-31 (3x10⁹, 3x10⁸, 3x10⁴ ou 0 UFP) a été administrée en IP 45min après injection de la MLD de bactéries. [2] Effet du retard du traitement sur la capacité du phage à sauver des souris de la bactériémie à <i>P. aeruginosa</i> : la MLD de YFN-58 a été injectée en IP, puis à différents intervalles allant de 2 à 24h, les souris ont reçu une injection IP de 3x10⁹ UFP du phage CSV-31. L'état de santé des souris a été surveillé pendant 20 jours après l'infection bactérienne. [3] Effets du phage inactivé par la chaleur sur des souris atteintes de bactériémie à <i>Pseudomonas</i> multirésistante. [4] Du sang a été obtenu par ponction cardiaque lors d'une expérience de sauvetage afin de comparer les titres bactériens de 2 groupes de 4 souris chacun, 20h après inoculation IP avec 3x 10⁷ UFC de YFN-58. Le groupe 1 a été injecté avec 250µl de PBS en IV 45min après l'inoculation bactérienne (contrôle). Le groupe 2 a reçu 9x10⁹ UFP de CSV-31 en IP 45min après l'inoculation bactérienne.</p>	<p>Phage CSV-31 isolé des eaux d'égouts.</p>	<p>[1] Effet dose-dépendant du phage sur l'état de santé des souris infectées à 24h. A la dose de phages la plus élevée : 100% des animaux ont survécu, signes minimes de maladie (léthargie légère) observés (au cours des premières 24h). Aux doses de phages plus faibles : les animaux sont devenus gravement malades, avec des taux de survie respectifs de 40% et 60% au jour 6 et au-delà. Toutes les souris en vie et en bonne santé au jour 6 le sont restées pendant 20 jours supplémentaires (fin de l'expérience). [2] Une seule injection de phage peut sauver 100% des animaux, jusqu'à 5h après l'inoculation bactérienne mortelle. Si le traitement est retardé au-delà de ce point, la morbidité augmente et la mortalité commence à apparaître. Même avec un retard de 18 et 24h, moment auquel toutes les souris sont moribondes, environ 50% des animaux sont sauvés et complètement récupérés. [3] Souris inoculées avec un phage formant une plage : survie de 75% à 4 jours. Souris injectées avec un phage inactivé : survie de 10%. [4] Le traitement par phage a entraîné une diminution de 300 fois (par rapport au groupe témoin) des titres de bactéries sanguines à 20h. Cette réduction des titres bactériens s'est traduite par une morbidité et une mortalité plus faibles dans le groupe traité (amélioration des scores de santé). Dans les 2 groupes : corrélation entre l'état de santé des souris et la concentration de bactéries dans le sang.</p>

<p>* Bacteriophages can treat and prevent <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infections. Debarbieux (95)</p>	<p><i>P. aeruginosa</i> : souche PAK bioluminescente, 10 souches de colonisation primaire et 10 souches de colonisation chronique</p>	<p>Effet du phage PAK-P1 <i>in vivo</i> dans un modèle murin d'infection pulmonaire : des souris ont été infectées avec la souche bactérienne PAK bioluminescente puis traitées avec PAK-P1 (bactéries et phages ont été administrés par voie intra-nasale).</p> <p>[1] Quantité de phages nécessaire pour guérir complètement les souris infectées.</p> <p>[2] Effet du traitement des phages par la chaleur.</p> <p>[3] Innocuité de PAK-1 : une dose intra-nasale 10 fois supérieure à celle définie dans l'expérience [1] a été administrée à un groupe de souris, et leur comportement a été surveillé pendant 10 jours.</p> <p>[4] Vitesse à laquelle PAK-P1 est capable d'éliminer les bactéries <i>in vivo</i>, estimée en quantifiant la lumière transmise par la bactérie bioluminescente chez des animaux vivants au cours des 1^{ères} heures d'infection. Les animaux ont d'abord été inoculés avec PAK, puis avec le bactériophage PAK-P1 2h plus tard.</p> <p>[5] Charge bactérienne et quantités de phages dans les BAL des souris après 24h d'infection.</p> <p>[6] Taux de lactate déshydrogénase (enzyme libérée lorsque l'intégrité de la cellule est endommagée) dans les BAL 6h après le début de l'infection.</p> <p>[7] Réponse inflammatoire après traitement par phage : 24h après l'infection, les niveaux de 2 marqueurs inflammatoires, TNF-α et IL-6, connus pour être induits par une infection bactérienne, ont été évalués chez les souris non traitées et traitées au phage.</p> <p>[8] Moment du traitement au phage : détermination du délai maximum possible du traitement par le phage afin de maintenir un taux de survie des animaux de 100% en administrant le traitement 2, 4 ou 6 h après l'infection.</p> <p>[9] Détermination de l'efficacité de PAK-P1 contre un panel de 20 souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées chez des patients atteints de fibrose kystique (10 souches de patients présentant une colonisation primaire et 10 souches de patients présentant une colonisation chronique).</p> <p>[10] Effet d'un prétraitement par un bactériophage : capacité à prévenir une infection ultérieure. 2 groupes de souris, un groupe traité par voie intra-nasale avec 10⁸ bactériophages PAK-P1 et un groupe traité par voie intra-nasale avec un tampon, ont été infectés 24h plus tard avec 10⁷ bactéries.</p>	<p>Phage PAK-P1 isolé des eaux usées.</p>	<p>[1] Mort des souris non traitées par phages dans les 48h suivant l'inoculation avec PAK. Les souris traitées avec PAK-P1 dans un rapport phages/bactéries de 1:10 sont mortes dans les 5jours suivant l'inoculation avec PAK. Les souris traitées avec des ratios phages/bactéries plus élevés (1:1 et 10:1) ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience (12jours). Le rapport phages-bactéries de 10:1 ayant permis la survie de 100% des souris dans d'autres expériences (contrairement au rapport 1:1) a été choisi comme dose standard pour les expériences futures.</p> <p>[2] Un bactériophage actif est nécessaire pour soigner les animaux. Les souris traitées, 2h après l'infection, avec PAK-P1 tué par la chaleur sont mortes au même taux que les animaux non traités.</p> <p>[3] La solution de phages n'a aucun effet indésirable sur les souris (pas de comportement erratique, fourrure régulière, prise de poids)</p> <p>[4] La quantité de bactéries est fortement réduite chez les animaux traités avec un phage et ils peuvent survivre à une attaque bactérienne mortelle. Dans les 4 premières heures post-infection, évolution de l'infection similaire dans les groupes traité et non traité par le phage, puis au bout de 6h post-infection bactérienne, élimination rapide des bactéries par les phages (diminution de la bioluminescence des souris). 24h après le début de l'infection, aucun ou peu de points faibles de lumière chez les souris, alors que les souris non traitées étaient mortes ou fortement luminescentes.</p> <p>[5] <u>BAL de souris non traitées au phage</u> : aucun phage détecté / quantité moyenne de bactéries = 1,6x10⁸ bactéries/ml. <u>BAL de souris traitées au phage</u> : 1,5x10² bactéries/ml - 2x10⁷ bactériophages/ml. <u>BAL de souris traitées au phage non infectées</u> : 3.1x10⁶ bactériophages/ml.</p> <p>Les phages se multiplient dans les poumons des animaux traités avec le phage, infectés et non infectés.</p> <p>[6] Comparativement aux témoins (souris traitées au PBS ou au phage uniquement), les taux de lactate déshydrogénase chez les souris non traitées et traitées au phage étaient respectivement de 3,7 fois et 3,1 fois plus élevés donc après 6h : lésions pulmonaires équivalentes dans ces 2 groupes d'animaux infectés.</p> <p>[7] L'IL-6 et le TNF-α ont augmenté chez les animaux infectés par PAK par rapport aux témoins non infectés. Réduction significative des taux dans le groupe traité par phage par rapport au groupe non traité, donc la réduction du nombre de bactéries par les phages atténue la réponse inflammatoire de l'hôte. 48h post-infection, les taux d'IL-6 et de TNF-α sont revenus aux valeurs initiales dans le groupe traité au phage. Niveaux d'IL-6 et de TNF-α aussi bas chez les animaux non infectés traités avec la solution de phages que les niveaux observés chez les animaux recevant une solution de PBS donc pas de réponse inflammatoire induite par les phages.</p>
--	--	--	--	---

				<p>[8] 2h après l'infection, 100% des souris ont survécu dans le groupe traité avec les phages. A 24h, 75% des souris étaient en vie dans les groupes traités 4 ou 6h après l'infection. À 72h, la survie était de 100% pour le groupe de 2h, 75% pour le groupe de 4h, mais est tombée à 25% pour le groupe de 6h. Le traitement par phages doit être administré 2h après l'infection pour atteindre un taux de survie de 100% chez les animaux infectés.</p> <p>[9] PAK-P1 lyse 50% des souches de colonisation primaire, mais seulement 10% des souches chroniques Pas de développement d'infection chez les souris traitées au phage.</p> <p>[10] 2h après l'inoculation bactérienne : quantité de lumière émise par les souris du groupe prétraité au phage environ 5 fois inférieure à celle émise par les souris du groupe prétraité au tampon. La charge bactérienne diminue chez les animaux prétraités au phage et augmente chez ceux prétraités au tampon. 100% des souris prétraités par phage ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience (16jours), alors que 100% des animaux non traités sont morts dans les 2 jours.</p>
<p>* An <i>in vivo</i> wound model utilizing bacteriophage therapy of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilms. Basu (96)</p>	<p><i>P. aeruginosa</i> multi-résistant</p>	<p>[1] Interaction phages-bactéries <i>in vitro</i>. Des sections de cathéter avec biofilm de <i>P. aeruginosa</i> ont été infectées avec 0,5ml de solution de cocktail de 11 phages à une concentration de 10⁷UFP/ml.</p> <p>[2] Interaction phages-bactéries <i>in vivo</i>. Des souris ont été anesthésiées et 2 sections de cathéter (avec ou sans biofilm) ont été implantées dans la poche SC. Les animaux ont été répartis en 4 groupes de 6 souris. Groupe A : 10 µl de solution saline stérile injectée quotidiennement dans la poche pendant 10 jours. Groupe B : sections de cathéter non infectées dans la poche, injections de NS tous les jours. Groupe C : sections de cathéter contenant du biofilm dans la poche, injections quotidiennes de NS. Groupe D : sections de cathéter contenant du biofilm dans la poche, 10µl de cocktail de phages (10⁷UFP/mL) ont été injectés dans la poche SC. A 10 jours, exploration des poches SC et examen macroscopique des plaies (recherche signes d'infection). Analyse des sections de cathéter pour déterminer le nombre de colonies de bactéries et de phages.</p>	<p>Cocktail de 11 phages isolés à partir d'échantillons de divers plans d'eau.</p>	<p>[1] Au moment de la culture primaire sur gélose au sang, après l'action du cocktail de phages, aucune colonie n'est apparue après 24h d'incubation (nombre d'UFC initial sur les sections de cathéter autour de 10⁶ UFC/mL). Après traitement de ces sections avec solution de phages (10⁷ UFP/mL) pendant 24h : aucune croissance observée après 24h (sections étalées sur une gélose au sang).</p> <p>[2] Les nombres moyens de colonies étaient significativement plus élevés dans les groupe C et D que la valeur initiale. La numération bactérienne était également significativement plus élevée dans le groupe C que dans le groupe D. Aucun phage n'a été détecté à partir d'un cathéter explanté dans les groupes B et C. Cependant, dans le groupe D, les phages ont été détectés avec un titre allant de 10⁷ à 10⁹, ce qui était significativement plus élevé que la valeur initiale, indiquant la multiplication active des phages <i>in vivo</i>.</p>

<p>* Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Wang (97)</p>	<p><i>P. aeruginosa</i> 30 souches IMPR-Pa, résistantes à l'imipénèm</p>	<p>L'inoculation IP des souris avec la MLD (3×10^7 UFC) de la souche IMPR-Pa A392 provoque leur mort dans les 24h.</p> <p>[1] Capacité du phage à sauver des souris de la bactériémie : une dose de phage ØA392 (différentes MOI testées) a été administrée immédiatement après l'administration de la MLD bactéries.</p> <p>[2] Le phage ØA392 a été administré par voie IP à des souris à différents moments (jusqu'à 360min) après l'injection de A392. La MOI de 200 a été appliqué dans cette investigation et les suivantes.</p> <p>[3] Etude de la dynamique <i>in vivo</i> des bactéries et des phages en utilisant A392 comme cellule cible. Les souris ont été injectées par voie IP avec 3×10^7 A392 seul, avec A392 plus ØA392 (6×10^9 UFP) ou avec ØA392 seul, respectivement.</p> <p>[4] Effets du phage inactivé par la chaleur sur les souris atteintes de bactériémie à IMPR-Pa A392.</p> <p>[5] Efficacité du cocktail des 2 phages contre les infections à IMPR-Pa. Chacune des 4 souches cliniques de IMPR-Pa - 9747, 9915, 9994 ou 1613 - a été injectée par voie IP à des souris.</p> <p>[6] Réponse immunitaire au phage ØA392.</p>	<p>Phage ØA392 et Ø1093 isolés des eaux d'égouts (le phage Ø1093 a un spectre lytique inférieur, mais complémentaire à celui de ØA392).</p>	<p>[1] Effet dose-dépendant du phage sur l'état de santé des souris infectées à 24h. Aux doses les plus élevées de phages (MOI de 0,01 à 200) : 100% des souris ont survécu, léthargie légère (au cours des premières 24h). À mesure que la dose de phages diminuait (MOI de 0,0001 et 0,001), les animaux sont devenus gravement malades, taux de survie respectifs de 0 et 20% au jour 6 et au-delà. Toutes les souris en vie et en bonne santé au jour 6 le sont restées pendant 20 jours supplémentaires (fin de l'expérience).</p> <p>[2] Au bout de 6h, la plupart des souris traitées avec des phages à un moment donné étaient toujours en vie, alors que 80 à 100% des souris non traitées étaient mortes. L'efficacité thérapeutique de ØA392 était même perceptible chez les souris traitées 180min après l'injection de bactéries. Taux de survie des souris traitées par phages à un moment donné toujours supérieurs à ceux des témoins non traités.</p> <p>[3] Bactériémie (dans les 2h) puis persistance chez les souris ayant reçu l'injection de A392, quel que soit le traitement par le phage. Charges bactériennes dans le sang : significativement plus faibles chez les souris traitées au ØA392 que chez les souris non traitées. Toutes les souris injectées uniquement avec A392 sont mortes au bout de 12h, alors que les souris traitées avec ØA392 étaient invariablement sauvées (avec une disparition de la septicémie en 24h). Après l'injection de ØA392 dans la cavité péritonéale, un nombre significatif d'infections à ØA392 ont été détecté 2h plus tard dans des échantillons de sang provenant de souris infectées et non infectées par A392 aux titres respectifs de $4,8 \times 10^6$ et de $1,6 \times 10^8$ UFP/ml.</p> <p>ØA392 IP est amplifié par la bactérie cible coexistante et migre dans le sang, entraînant peut-être la dissémination systémique des phages. ØA392 en circulation est maintenu à un niveau significatif jusqu'à l'éradication des cellules cibles, ce qui contre la progression de la bactériémie.</p> <p>[4] Souris inoculées avec un phage formant une plage : survie améliorée (100% à 7 jours) - Souris ayant reçu un phage inactivé par la chaleur : 20% de survie.</p> <p>[5] Les 3 groupes de souris traitées avec le mélange de phages ont survécu pendant 7 jours après l'injection d'IMPR-Pa, contrairement à la mortalité supérieure à 90% chez les souris non traitées au phage. Seules 10% des souris du groupe 9994 ont survécu, ce qui indique que le sauvetage du phage est basé sur l'activité lytique (le cocktail de phages n'avait pas formé de plages <i>in vitro</i> sur cette souche).</p> <p>[6] Après une injection de ØA392, les titres d'IgG dirigés contre le phage ont été multipliés par 26 en 40 jours. Les taux d'anticorps contre le phage n'étaient pas significativement élevés au moment où les animaux bactériémiques étaient protégés par le phage. Les niveaux d'IgG ont diminué progressivement après 40 jours. Aucune réaction anaphylactique, modification de la température corporelle centrale ou autre événement indésirable n'a été observé chez les souris au cours de ces injections de phages.</p>
---	---	--	--	--

<p>* <i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> antibacterial activity of environmental bacteriophages against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains from cystic fibrosis patients. Olszak (98)</p>	<p><i>P. aeruginosa</i> 123 souches pour évaluation du potentiel lytique des phages : PAO1, 121 souches cliniques de patients atteints de fibrose kystique (souches CF) et 1 souches cliniques de patients non atteints : non-CF0038. + 18 souches servant d'hôtes pour la propagation des phages : PAO1, 3 CF PA et 14 non-CF PA</p>	<p>[1] Puissance lytique des 28 phages contre 121 souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i> issus de patients atteints de fibrose kystique dont 29 souches mucoïdes. [2] Variabilité de l'activité lytique des phages PA5oct, KT28 ou de l'association des 2 examinée dans 4 passages de culture bactérienne sur les souches PAO1 (souche de référence), non-CF0038, CF217; CF708, CF532 non mucoïde et CF832 mucoïde. [3] Efficacité <i>in vivo</i> (modèle larvaire) du traitement par les phages PA5oct et KT28 sur les 6 souches de <i>P. aeruginosa</i>. Les doses létales de 10UFC pour PAO1, non CF0038 et CF217 et de 10⁵UFC pour les souches restantes ont été choisies. Les résultats du traitement au phage ont été observés 8, 24, 48 et 72h après l'injection. Toutes les expériences ont été contrôlées par l'observation de larves non infectées, de larves infectées de manière simultanée, de larves recevant uniquement du lysat de phage (100% de la survie des larves) et de larves infectées mais non traitées par phage. [a] Capacité des phages inactivés par les UV à sauver des larves infectées par une dose mortelle de <i>P. aeruginosa</i>. [b] Impact de l'application des phages sur le sauvetage des larves d'une infection mortelle.</p>	<p>28 phages isolés à partir d'échantillons d'eaux (27 appelés KT et un PA5oct).</p>	<p>[1] Plusieurs phages présentaient une puissance lytique antibactérienne élevée, comme le phage PA5oct sur 55% et le phage KT28 sur 68% des isolats au total et sur 72 et 86% des isolats mucoïdes respectivement. Insensibilité de 6,4% des <i>P. aeruginosa</i>. Forte hétérogénéité de sensibilité aux phages des souches de patients atteints de CF. [2] PAO1, non-CF0038 et CF532 présentaient une sensibilité assez homogène aux phages alors que CF217, CF708, et CF832 ont montré une diversité clonale au cours des 4 passages de l'essai de traitement aux phages. PAO1 et CF532 totalement sensibles aux 2 phages. Non-CF0038 était également sensible aux phages, mais avec PA5oct, des colonies résistantes ont été détectées dans la zone de la plage de lyse. CF708 et CF832 généralement sensibles aux phages choisis mais présentaient divers profils au cours des 4 passages de traitement suggérant une forte diversité clonale. CF217 presque totalement résistant aux phages appliqués (léger effet de PA5oct et KT28 inhibiteur sur la croissance bactérienne). Cocktail des 2 phages : lyse dans les 4 passages sur toutes les souches sauf CF217. [3][a] La survie des larves était entièrement due à l'activité lytique du phage plutôt qu'à la stimulation immunitaire de l'hôte. [b] Phage KT28 plus puissant que PA5oct sur les souches de <i>Pseudomonas</i> non-CF et sur CF708. KT28 a pu sauver 20% des larves même 2 jours après l'application d'une dose létale. Une préparation de KT28 ou de PA5oct seul pour guérir l'infection à CF217 n'a pas été efficace, alors qu'un mélange des 2 (MOI = 100) a augmenté le taux de survie des larves infectées par CF217 de 30 et 20% à 24 et 48h, respectivement. Activité protectrice du cocktail de phages contre la fibrose non kystique chez les larves infectées était inférieure à celle obtenue avec l'application d'un seul phage. Pour les isolats faiblement virulents CF708, CF532, et CF832, l'application d'un phage isolé ou d'un cocktail (MOI 100) ne protégeait pas les larves de la mort, à une exception près (action de KT28 sur CF708), peut-être à cause d'un relargage massif de composés toxiques lors de la mort bactérienne.</p>
---	--	---	---	---

<p>* A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i>; a preliminary report of efficacy. Wright (99)</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistant aux antibiotiques</p>	<p>Evaluation de l'efficacité et de la sécurité de Biophage-PA chez des patients atteints d'otites chroniques : essai clinique de phase I / II randomisé, en double aveugle, contrôlé par placebo. <u>Participants</u>: 24 patients atteints depuis plusieurs années (2–58ans) d'otite chronique, due à une souche de <i>P. aeruginosa</i> résistante aux antibiotiques et sensible à un ou plusieurs des phages présents dans Biophage-PA. Les participants ont été randomisés en 2 groupes de 12 traités avec une dose unique de Biophage-PA ou un placebo et suivis 7, 21 et 42 jours après le traitement. <u>Principaux critères d'évaluation</u>: érythème - inflammation, ulcération - granulation - polypes, écoulement (quantité et type) et odeur évalués par le médecin à l'aide d'une EVA. Les patients ont signalé gêne, démangeaisons, humidité et odeur également à l'aide d'une EVA. Mesure des taux de <i>P. aeruginosa</i> et du nombre de phages prélevés sur des écouvillons à J0 et au suivi. Lors de chaque visite, les patients ont été interrogés sur les effets secondaires en utilisant un formulaire structuré.</p>	<p>Préparation thérapeutique de 6 bactériophages : Biophage-PA.</p>	<p>Par rapport au J0, les indicateurs cliniques groupés déclarés par les patients et les médecins se sont améliorés pour le groupe traité par phages par rapport au groupe placebo. La variation par rapport aux niveaux initiaux était statistiquement significative pour les données recueillies lors des jours de consultation pour le groupe traité par le phage. La variation par rapport aux valeurs initiales était statistiquement significative pour la majorité des indicateurs cliniques évalués par le patient uniquement pour le groupe traité avec les phages. Le nombre de <i>P. aeruginosa</i> n'était significativement inférieur que dans le groupe traité par phages. La réplication des 6 phages a eu lieu chez les patients traités avec Biophage-PA. Aucun événement indésirable lié au traitement n'a été rapporté.</p>
--	---	---	--	--

Tableau 7 : Activité sur *Actinomyces* de phages isolés.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
Isolation of <i>Actinomyces</i> bacteriophage from human dental plaque. Tylenda (100)	<i>A. viscosus</i> (12 souches) MG-1, T14V, PK455, PK455-2, PK1603, PK1643, PK1610, PK1623, PK1632, PK1648, PK1657, et PK1662 <i>A. naeslundii</i> (6 souches) ATCC 12104, I, PK947, PK606, PK954, PK990 <i>Actinomyces spp</i> WVa-963 VPI D33C-25 (PK1259) <i>Streptococcus sanguis</i> DL-1 2 souches issues de plaque dentaire : <i>A. viscosus</i> serovar II (CT1002) et <i>A. naeslundii</i> serovar I (CT1001)	<i>In vitro</i> : recherche de phages virulents dans 336 échantillons de plaque dentaire humaine. Recherche et analyse de zones de lyse.	10 phages (CT1 à CT10) virulents isolés d'échantillons de plaque dentaire humaine.	9 des 10 phages ont été isolés sur <i>A. viscosus</i> MG-1. CT8 (isolé sur T14V) lyse uniquement <i>A. viscosus</i> T14V et son mutant PK455-2. 8 isolats de phages infectent <i>A. viscosus</i> MG-1 mais pas T14V. CT7 infecte <i>A. viscosus</i> MG-1, T14V et PK455-2. CT1 infecte <i>A. viscosus</i> serovar II (CT1002) et MG-1. CT4 et CT5 infectent <i>A. naeslundii</i> serovar I (CT1001) et MG-1.
*Isolation of a bacteriophage for <i>Actinomyces viscosus</i> . Delisle (101)	<i>A. viscosus</i> (11 souches) <i>A. naeslundii</i> (10 souches)	Test de lyse sur les différentes souches de <i>A. naeslundii</i> et <i>A. viscosus</i> .	Phage Av-1 d' <i>A. viscosus</i> MG-1 isolé à partir d'un échantillon de plaque gingivale humaine d'un patient atteint de gingivite légère.	Av-1 provoque des plages lytiques uniquement sur son hôte <i>A. viscosus</i> MG-1. Des dilutions en série du phage Av-1 ont été étalées avec 10 autres souches de <i>A. viscosus</i> et 10 souches de <i>A. naeslundii</i> , mais aucun signe de lyse ou d'inhibition de la croissance n'a été obtenu, même lorsque différents milieux ont été utilisés.
Use of lytic bacteriophage for <i>Actinomyces viscosus</i> T14V as a probe for cell surface components mediating intergeneric coaggregation. Delisle (102)	<i>A. viscosus</i> MG-1 et ses mutants PK1603, PK1662 <i>A. viscosus</i> T14V, son dérivé T14AV, ses mutants PK455 et PK455-2 <i>A. viscosus</i> (3 souches) <i>A. naeslundii</i> (9 souches)	<i>In vitro</i> : recherche de la gamme d'hôtes par application d'une préparation phagique à titre élevé (10 ⁹ UFP/ml) sur des fonds superposés ensemencés de chaque souche. Les phages ont ensuite été titrés sur chaque hôte susceptible afin de calculer l'EOP.	Phage lytique BF307 isolé d'eaux domestiques.	BF307 n'a formé des plages que sur <i>A. viscosus</i> T14V, PK455-2, T14AV, et MG-1. Titres de BF307 après croissance sur <i>A. viscosus</i> MG-1 : 0,1 sur <i>A. viscosus</i> T14V - 0,04 sur <i>A. viscosus</i> T14AV - 4 sur PK455-2. Les phages cultivés sur les souches T14V ou T14AV présentaient également un titre relatif plus élevé sur la souche MG-1. PK455-2 avait toujours un titre plus élevé que T14V.
Relationships among <i>Actinomyces naeslundii</i> (<i>A. viscosus</i>) bacteriophages isolated from sewage and the oral cavity. Delisle (103)	<i>A. naeslundii</i> genospecie 2 (anciennement <i>A. viscosus</i>)	Purification et analyse des phages pour comparer leurs propriétés biochimiques.	13 phages isolés dans des eaux usées et dans la plaque dentaire.	Existence d'au moins 3 types distincts de bactériophages lytiques actifs contre <i>Actinomyces spp</i> .

Tableau 8 : Activité sur *Veillonella* de phages isolés.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
Studies on Veillonellophages isolated from washings of human oral cavity. Totsuka (104)	21 souches de <i>Veillonella</i> dont des <i>V. parvula</i> , <i>V. reniformis</i> , <i>V. alcalescens</i> et autres <i>Veillonella</i>	Test <i>in vitro</i> de la susceptibilité des souches de <i>Veillonella</i> aux phages.	Phages virulents isolés de lavage de bouche de 200 étudiants et divisés en 2 groupes A et B selon leur morphologie.	Groupe A de phages lyse en partie 3 souches de <i>V. parvula</i> et 3 souches de <i>V. alcalescens</i> . Groupe B lyse 5 souches de <i>V. reniformis</i> . Quelques souches ne sont lysées par aucun phage.
Isolation of bacteriophages specific for the genus <i>Veillonella</i> . Hiroki (105)	<i>Veillonella alcalescens</i> ATCC17743, 17744, 17745, 17747, 10790, 38-7, 93-19, 107-14, 150-5 <i>V. parvula</i> ATCC17746, 3-9 <i>V. reniformis</i> 76-11, 109-9, 149-5	<i>In vitro</i> : mise sur géloseensemencée de <i>Veillonella</i> de filtrats de bains de bouches enrichis avec des souches de <i>Veillonella</i> , incubées en anaérobiose à 37°C pendant 2j. Si des plages étaient observées, elles étaient purifiées par isolement successif d'une seule plage.	25 phages isolés de lavages de bouches spécifiques de souches <i>Veillonella</i> .	25 phages ont été isolés sur environ 200 lavages de bouches. 7 phages étaient actifs contre <i>V. alcalescens</i> ATCC17743 et 107-14 mais pas contre <i>V. alcalescens</i> ATCC17744, 17745, 17747, 10790 et 150-5 ni contre <i>V. reniformis</i> 76-11, 109-9 et 149-5. Ils ont produit des plages plutôt petites sur <i>V. alcalescens</i> ATCC17743 (3,5mm de diamètre). Les 18 phages restants ont produit de grandes plages claires sur <i>V. reniformis</i> 76-11, 109-9, 149-5 et <i>V. parvula</i> 3-9 étaient également sensibles à ces phages. La totalité des souches de <i>V. alcalescens</i> étaient insensibles à ces phages.

Tableau 9 : Activité de phages isolés sur diverses autres souches bactériennes orales.

Source	Bactérie cible	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
Isolation of a novel bacteriophage specific for the periodontal pathogen <i>Fusobacterium nucleatum</i> . Machuca (106)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>vincentii</i> <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> (+ voir Annexe 1)	Analyse des échantillons de salive de 25 personnes en bonne santé et de 85 patients avec une maladie parodontale pour rechercher un bactériophage. Action de Fnrφ02 sur une culture bactérienne de <i>F. nucleatum subsp. polymorphum</i> en phase exponentielle précoce à différentes MOI.	Phage Fnrφ02 isolé	De toutes les souches bactériennes (voir Annexe 1), Fnrφ02 n'infecte et ne lyse que <i>F. nucleatum</i> . <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> est plus sensible à l'infection par Fnrφ02 que <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>nucleatum</i> et subsp. <i>vincentii</i> . Dans toutes les infections : lyse lente de la culture bactérienne Pas de lyse bactérienne complète par Fnrφ02 après 80h d'incubation à aucune MOI. Lyse plus rapide de <i>F. nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i> que des autres à même MOI.
Isolation of a bacteriophage specific for a <i>Lactobacillus casei</i> from human oral material. Meyers (107)	<i>L. species NLF</i> <i>L. casei</i> (2 souches) <i>L. acidophilus</i> (4 souches) <i>L. fermenti</i> (3 souches) <i>L. salivarius</i> <i>L. helveticus</i>	<i>In vitro</i> : des échantillons de lavage de bouche ont été testés pour leur activité lytique contre 12 souches de <i>Lactobacillus</i> .	Bactériophage isolé d'un échantillon de lavage de bouche.	1 bactériophage isolé avec une activité lytique démontrée sur toutes les espèces sauf les 4 souches de <i>L. acidophilus</i> et une souche de <i>L. fermenti</i> .
Isolation of a novel <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotype b bacteriophage capable of lysing bacteria within a biofilm. Castillo-Ruiz (108)	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> serotype b (3 souches) + autres souches testées sur lesquelles le phage n'est pas actif (voir Annexe 2)	Evaluation <i>in vitro</i> de l'activité de phages contre <i>A. actinomycetemcomitans</i> . [1] Infection par Aabφ01 de cultures liquides de PAA005 en phase exponentielle précoce. [2] Infection par Aabφ01-1 de cultures liquides de PAA005 en phase exponentielle précoce. [3] Biofilms d' <i>A. actinomycetemcomitans</i> infectés avec les phages à différentes MOI.	Phage Aabφ01 isolé des eaux usées provenant du drainage d'un fauteuil dentaire et Aabφ01-1 (mutant) .	[1] Aabφ01 a provoqué l'interruption de la phase exponentielle puis une diminution continue de la DO ₆₀₀ jusqu'à stabilité, sans tuer la culture bactérienne d' <i>A. actinomycetemcomitans</i> PAA005 complètement (DO ₆₀₀ à 0.22). [2] Amélioration de la lyse cellulaire avec une diminution de la DO ₆₀₀ à 0,1. [3] Les 2 phages ont pu pénétrer dans le biofilm et provoquer la lyse du sérotype b. MOI minimum nécessaire pour obtenir la meilleure diminution du nombre d' <i>A. actinomycetemcomitans</i> : 0,1 pour le phage Aabφ01 et 0,01 pour le phage Aabφ01-1.
*Genotyping, morphology and molecular characteristics of a lytic phage of <i>Neisseria</i> strain obtained from infected human dental plaque. Aljarbou (109)	<i>Neisseria</i>	Analyse génétique, morphologique et moléculaire du phage et identification/classification de sa bactérie hôte.	Phage A2 isolé de la plaque dentaire de volontaires.	Création de plages lytiques sur son hôte, une bactérie isolée par voie orale qui a été identifiée et classée comme étant une souche de <i>Neisseria</i> .

Tableau 10 : Activité de la lysine phagique ClyR sur diverses bactéries orales.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
Effects of a chimeric lysin against planktonic and sessile <i>Enterococcus faecalis</i> hint at potential application in endodontic therapy. Li (110)	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299	[1] Cellules <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 planctoniques et sessiles <i>in vitro</i> traitées avec différentes concentrations de ClyR, ou avec 50 µg/ml de ClyR pendant différents temps. [2] Biofilm de 24h d' <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 traité avec 200µl de ClyR à des concentrations différentes. [3] Modèle dentaire <i>ex vivo</i> : des dents saines monocanalisées coupées en tranche de dentine, placées 24h sur des biofilms d' <i>E. faecalis</i> ATCC 51299 puis traitées avec ClyR, ampicilline ou CaOH.	Lysine modifiée ClyR transformée à partir d'une chiméolysine d' <i>E. coli</i> BL21 (DE3).	[1] Diminution rapide dose-dépendante de la turbidité d' <i>E. faecalis</i> avec ClyR. [2] Dégradation des biofilms d' <i>E. faecalis</i> de manière dose-dépendante avec ClyR. [3] ClyR à 50µg/ml pendant 1h : tue plus de 90% des bactéries viables dans les biofilms, ce qui est bien supérieure à l'ampicilline et similaire à une concentration élevée de CaOH.
Activity of the chimeric lysin ClyR against common Gram-positive oral microbes and its anticaries efficacy in rat models. Xu (111)	<i>S. mutans</i> MT8148 et 36 isolats provenant d'échantillons de plaque dentaire <i>S. sobrinus</i> ATCC6715 et 11 isolats provenant d'échantillons de plaque dentaire <i>S. oralis</i> ATCC10557 <i>S. salivarius</i> ATCC7073 <i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC10556	Effet de ClyR sur : [1] <i>S. mutans</i> MT8148 et <i>S. sobrinus</i> ATCC6715 planctoniques. [2] <i>Streptococcus oralis</i> ATCC10557, <i>Streptococcus salivarius</i> ATCC7073, et <i>S. sanguinis</i> ATCC10556 planctoniques. [3] 11 isolats de <i>S. sobrinus</i> provenant d'échantillons de plaque dentaire de 8 enfants atteints de caries précoces sévères et de 36 isolats de <i>S. mutans</i> provenant de 22 enfants atteints de caries précoces sévères. [4] Biofilms de <i>S. mutans</i> et <i>S. sobrinus</i> . [5] Modèles de rats <i>in vivo</i> : 36 rats divisés en 3 groupes infectés avec A = <i>S. mutans</i> MT8148 – B = <i>S. sobrinus</i> ATCC6715 – C = mélange des 2. La moitié des rats de chaque groupe a ensuite été traité avec ClyR.	Lysine modifiée ClyR	[1] Réduction dose-dépendante (doses testées 50µg/ml et 100µg/ml) de la densité optique des milieux contenant <i>Streptococcus mutans</i> et <i>Streptococcus sobrinus</i> . [2] Activité lytique mineure (bactéries orales normales et inoffensives) [3] Activités variées ClyR contre ces isolats : 3/11 des isolats de <i>S. sobrinus</i> et 33/36 des isolats de <i>S. mutans</i> très sensibles : chute importante de la DO ₆₀₀ . [4] ClyR à 50µg/ml pendant 5min : diminution significative du nombre de bactéries viables présentes dans des biofilms de 72h, ainsi que de l'épaisseur moyenne des biofilms. [5] Scores de carie, par rapport aux groupes traités au PBS : •réduction des lésions dentinaires légères : A=25% - B=25% - C=33,33% •réduction des lésions dentinaires modérées : A=55,56% - B=46,67% - C=50% •lésions de l'émail dans les 3 groupes : pas de différence significative observée
*A chimeolysin with extended spectrum streptococcal host range found by an induced lysis-based rapid screening method. Yang (112)	19 espèces de streptocoques <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Bacillus cereus</i>	[1] Détermination du profil lytique de ClyR sur de multiples souches de streptocoques (dont <i>S. suis</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. equi</i> , <i>S. agalactiae</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. uberis</i>), <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> et <i>B. cereus</i> . Les souches en suspension ont été traitées avec 20µg/ml de ClyR à 37°C pendant 20min. [2] Efficacité de ClyR dans un modèle d'infection murin avec <i>S. agalactiae</i> .	Lysine ClyR	[1] ClyR a une large activité contre streptocoques et espèces apparentées. Analyse de réduction de la turbidité : ClyR est très actif contre toutes les souches de streptocoques testées. ClyR est bactéricide contre <i>E. faecalis</i> , a une activité moindre, mais mesurable, contre <i>S. aureus</i> mais aucune activité contre <i>B. cereus</i> . [2] Survie des souris dose-dépendante de la concentration de ClyR. Peu d'effet de l'administration en une fois ou fractionnée des ClyR (aux doses testées). Production d'Ac contre ClyR mais sans impact sur son efficacité lytique.

<p>* Antibiofilm activities of a novel chimeolysin against <i>Streptococcus mutans</i> under physiological and cariogenic conditions. Yang (113)</p>	<p><i>S. mutans</i></p>	<p>[1] Effet de ClyR sur <i>S. mutans</i> planctoniques. [2] Sur biofilm de <i>S. mutans</i> ATCC 25175 en comparaison avec la pénicilline et des agents chimiothérapeutiques utilisés dans les dentifrices, les bains de bouche en prévention des caries. [3] <i>In vitro</i> : biofilms de <i>S. mutans</i> sur disques d'HA dans des conditions physiologiques normales de sucre (0,1mM de glucose) et cariogènes (1% glucose ou 5% saccharose) en comparaison avec 0,05% NaF et 0,12% ChX. [4] <i>In vivo</i> sur modèle animal : les souris ont été alimentées avec de la nourriture cariogène, infectées avec <i>S. mutans</i> MT8146 (8x10⁸UFC/souris/jour) pendant 6j puis traitées avec 5µg de ClyR/souris/jour pendant 3 semaines.</p>	<p>Lysine modifiée ClyR</p>	<p>[1] 25 à 100µg/ml de ClyR : diminution rapide de la turbidité cellulaire des <i>S. mutans</i> MT8148. Diminution de 90% de la viabilité cellulaire à 100 µg/ml de ClyR pendant 10min. 0-25µg/ml de ClyR : lyse dose-dépendante de <i>S. mutans</i> ATCC 25175. ClyR actif contre toutes les souches de <i>S. mutans</i> testées. [2] 100µg/ml de pénicilline : pas d'effet sur la biomasse bactérienne. 25 µg/ml ou plus de ClyR : biofilms sensibles. 100 µg/ml de ClyR : réduction de la biomasse supérieure à 80%, comme avec 0,05% de NaF ou 0,12% de ChX. [3] <u>Conditions physiologiques</u> : activité de ClyR dose dépendante (ChX provoque une faible destruction et NaF aucune). <u>Conditions cariogènes</u>: activité lytique de ClyR dose-dépendante jusqu'à 100µg/ml (pas d'augmentation à des doses plus élevées). ChX provoque une faible destruction et NaF une minime (glucose) voire nulle (saccharose). [4] ClyR réduit significativement le nombre moyen de cellules de <i>S. mutans</i> MT8148 par rapport au PBS sur toute la durée de l'expérience et même 2 semaines après.</p>
--	--------------------------------	--	---	--

Tableau 11 : Activité de la lysine LysK ou de ses dérivés sur diverses bactéries orales.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
Synergistic removal of static and dynamic <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase. Olsen (114)	<i>S. aureus</i> (13 souches)	<p>[1] Efficacité de LysK sur la réduction de biofilms statiques des souches de <i>S. aureus</i>.</p> <p>[2] Efficacité de LysK et DA7 sur les biofilms de <i>S. aureus</i> SA113 développés de façon dynamique (via un « Biostream flow cell system » : un bloc de silicone moulé formant une chambre d'écoulement, est scellé sur la face inférieure avec une lame de verre servant de surface pour la croissance de biofilm).</p> <p>[3] Des dépolymérase putatives de 5 souches d'<i>A. actinomycetemcomitans</i> ont été clonées et produites dans <i>E. coli</i> sous forme de protéines recombinantes marquées par 6xHis à terminaison N ou C-terminale. Leur capacité à perturber la matrice extracellulaire de <i>S.aureus</i> a été évaluée.</p> <p>[4] Détermination des effets synergiques entre LysK et DA7 sur les biofilms de <i>S. aureus</i> 113 dans un modèle statique et des conditions dynamiques.</p>	Endolysine LysK codée par un plasmide d' <i>E. coli</i> DE3 et dépolymérase codées par <i>A. actinomycetemcomitans</i> dont la poly-N-acetylglucosamine dépolymérase DA7 .	<p>[1] Sensibilité de la majorité des souches à l'action de l'endolysine. Réduction de la masse du biofilm à des concentrations basses (40 nM). Seules 2 souches présentaient un degré de récalcitrance plus élevé pour l'enzyme. Aucune des concentrations d'enzyme testée n'a réduit le biofilm de plus de 40%.</p> <p>[2] Biofilms de SA113 immergés pendant 5h dans des solutions de LysK à des concentrations diverses (de 0,31 à 1,25µM) : élimination des biofilms de la surface du verre dose-dépendante mais peu d'impact de la durée du temps d'application (temps minimum testé 2h).</p> <p>[3] Toutes les enzymes avec une étiquette His à l'extrémité C-terminale ont présenté une activité environ 2 fois plus élevée que leurs homologues portant l'étiquette His en N-terminal. Activité similaire par contre pour toutes les enzymes avec His en N-terminal entre elles ou avec His en C-terminal entre elles. DA7 (une des dépolymérase à étiquette His C terminale) a une activité élevée de perturbation des biofilms statiques et dynamiques à faible concentration.</p> <p>[4] Effet synergique des 2 enzymes à la fois sur les biofilms statiques de SA113 et les biofilms dynamiques.</p>
* Bacteriophage-derived peptidase CHAP _K eliminates and prevents Staphylococcal biofilms. Fenton (115)	<i>Staphylococcus aureus</i> DPC5246 et Xen29	<p>[1] Réduction du biofilm staphylococcique à l'aide de CHAP_K.</p> <p>[2] Prévention de la formation des biofilms par CHAP_K.</p> <p>[3] Le potentiel de CHAP_K en tant qu'agent de décolonisation de la peau a été évalué par l'incorporation de l'enzyme dans un spray. Des sections de peau de porc (25 cm²) ont étéensemencées avec 2,5×10⁵ UFC/cm² de <i>S. aureus</i> DPC5246 et vaporisées avec une solution de 200 µg/mL de CHAP_K pendant 2s. Les coupes cutanées traitées à l'eau et non traitées présentaient des valeurs d'UFC similaires lorsqu'elles étaient dénombrées après 30 minutes.</p>	CHAP _K , dérivé tronqué d'une lysine (LysK) du phage K staphylococcique.	<p>[1] A toutes les concentrations testées, le traitement par CHAP_K réduisait la formation de biofilm par rapport aux puits témoins non traités.</p> <p>[2] Le traitement par CHAP_K a entraîné une modification statistiquement significative de la formation de biofilms. Des degrés croissants de prévention des biofilms étaient évidents en présence de concentrations croissantes d'enzyme.</p> <p>[3] Réduction significative des UFC sur la peau traitée au CHAP_K, qui a reçu environ 60µg d'enzyme. Le traitement par CHAP_K a éliminé > 99% des <i>S. aureus</i> DPC5246 en 30min par rapport au traitement avec de l'eau : réduction de 3,7×10³ UFC/ml lorsque traités avec de l'eau à 1,7×10⁴ UFC/ml lorsqu'ils sont traités avec la solution CHAP_K. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque CHAP_K a été utilisé contre la souche bioluminescente <i>S. aureus</i> Xen29.</p>

<p>* Triple-acting lytic enzyme treatment of drug-resistant and intracellular <i>Staphylococcus aureus</i>. Becker (63)</p>	<p>S. aureus (souches Newman 17, Newbould 305, SA113, ALR 17, UAMS-1 et ISP479C 22 et des souches désignées par NRS suivi de numéros)</p>	<p>[1] Etude du développement de la résistance aux enzymes de fusion <i>in vitro</i> sur <i>S. aureus</i> Newman et comparaison aux enzymes mères testées individuellement ou simultanément + comparaison des enzymes de fusions à des antibiotiques de petite taille (le triméthoprim / sulfaméthoxazole (rapport 1/20)) et la streptomycine) dans des essais similaires.</p> <p>[2] Test de la puissance <i>in vivo</i> des PGH mères et chimériques dans un modèle de colonisation nasale chez le rat. Les rats ont été inoculés avec <i>S. aureus</i> ALR, traités 2 fois/jour (les jours 3, 4 et 5), puis tués au 10^{ème} jour pour des cultures quantitatives de leur tissu nasal.</p> <p>[3] LTP, LysK, K-L et L-K ont été modifiées chacune par addition de 11 séquences différentes de PTD en C-terminale, puis testées pour leur capacité à réduire <i>S. aureus</i> intracellulaire chez de multiples cellules en culture.</p> <p>Pour confirmer le transfert de protéines à travers les membranes des cellules, des cultures de cellules MAC-T ont été exposées à la PGH fluorescente K-L-PTD1 et à <i>S. aureus</i> Newman marquée et contrôlées en temps réel par microscopie confocale.</p> <p>Afin d'examiner l'absorption et l'éradication intracellulaire dans des échantillons de tissus contenant des mOB, un modèle <i>ex vivo</i> de calvaria et <i>in vivo</i> de lésion du fémur ont été testés.</p> <p>[4] Pour déterminer si la modification avec une PTD peut avoir un impact sur la clairance du biofilm, les activités antimicrobiennes des fusions K-L, K-L-PTD1 et de la vancomycine ont été testées dans un modèle de biofilm dynamique avec la souche NRS382 (MRSA).</p> <p>[5] Pour déterminer si l'ajout d'une PTD a un impact sur la capacité d'une PGH à réduire la charge bactérienne dans un modèle murin de mammite, 4 constructions ont été testées (L-PTD1, L-PTD9 et K-L-PTD1, K-L-PTD9). Les souris ont été tuées 18h après la perfusion, les glandes mammaires disséquées, et utilisées pour la détermination de la charge bactérienne et du TNFα.</p>	<p>PGH de fusion à triple action, crée par fusion de 2 PGH parents (LysK et la LTP) pour héberger 3 activités lytiques uniques.</p>	<p>[1] Après 10 cycles d'exposition sublétales en culture liquide, les enzymes de fusion K-L et L-K ont donné des cultures avec une augmentation faible de la CMI respectivement de 8 fois et 2 fois contrairement à la LysK seule (42 fois), la LTP seule (585 fois) ou le mélange équimolaire des deux (129 fois).</p> <p>Le triméthoprim / sulfaméthoxazole et la streptomycine ont donné des augmentations de la CMI de 6 et 13 fois, respectivement.</p> <p>[2] Le traitement par L-K a entraîné une diminution de 98% du nombre d'UFC/nez (identique valeur mupirocine « gold standard » pour la décolonisation nasale) comparés aux rats traités avec un tampon. En revanche, les concentrations équimolaires de LysK recombinante ou K-L n'ont pas permis de réduire significativement la charge bactérienne. Les rats traités avec 200μg de LTP ont présenté une réduction de 87% de la colonisation nasale.</p> <p>[3] Ni la LTP commerciale ni la LTP-His6 n'ont réduit les UFC intracellulaires de <i>S. aureus</i> dans une lignée de MAC-T en culture ou de hBMEC. L'ajout de PTD en C-terminale de LTP-His6 réduit significativement le nombre de <i>S. aureus</i> intracellulaires dans les deux lignées cellulaires.</p> <p>Dans les cellules MAC-T, pratiquement toutes les constructions testées présentaient cet effet, bien que l'adjonction des PTD réduisait souvent l'activité enzymatique de la plupart des constructions testées. La capacité de LysK ou L-K à éradiquer <i>S. aureus</i> en intracellulaire dans les T MAC-a été inhibée par l'ajout d'un PTD. La K-L a réduit les bactéries intracellulaires récupérées à partir de cellules MAC-T ou de mOB, et cet effet n'a pas été significativement accru avec l'ajout d'une PTD.</p> <p>La souche Newman de <i>S. aureus</i> et la K-L-PTD1 ont été co-localisées en intracellulaire au sein de cellules MAC-T.</p> <p>La K-L et K-L-PTD1 ont réduit le nombre de bactéries vivantes récupérées à partir de calvaria sectionnés et dans un modèle de plaie du fémur.</p> <p>[4] A des concentrations égales en grammes (100 μg/ml) mais concentrations molaires différentes, K-L (1,4 μM), K-L-PTD1 (1,4 μM) et la vancomycine (69 μM) ont eu un effet prononcé sur les biofilms dynamiques 60 et 120min après le traitement. Donc PGH beaucoup plus efficaces que la vancomycine.</p> <p>Par rapport aux témoins (cellules viables à 100%), la vancomycine, la fusion à triple action K-L et la K-L-PTD1 ont réduit la viabilité dans les biofilms dynamiques à 40%, 24% et 13%, respectivement, K-L-PTD1 étant significativement plus efficace que K-L.</p> <p>[5] <i>In vivo</i>, la LTP a été efficace pour réduire la charge bactérienne d'environ 4 logs par rapport aux témoins et a réduit la concentration de TNFα dans le tissu mammaire. La L-PTD1 a encore diminué la charge bactérienne moyenne et la concentration en TNFα, mais ces résultats n'étaient pas significativement différents de ceux de la LTP sans PTD. La fusion L-PTD9 fut pratiquement inactive dans l'essai de réduction de la turbidité, mais elle était capable de réduire la charge bactérienne dans les glandes mammaires de souris par rapport au témoin PBS, bien qu'elle soit significativement moins efficace L-</p>
---	--	---	--	--

				PTD1 ou L seule. Contrairement aux données <i>ex vivo</i> , la fusion à triple action K-L n'a pas été plus en mesure d'éliminer l'infection bactérienne des glandes mammaires que le tampon seul. Cependant, la clairance de <i>S. aureus</i> était significativement accrue par K-L-PTD1, donnant une clairance de la glande mammaire à un niveau équivalent à celui de la LTP seule ou de L-PTD1.
* The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant Staphylococci, including methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> . O'Flaherty (116)	<p><i>S. aureus</i> (10 souches) <i>S. epidermidis</i> DPC6010 <i>S. saprophyticus</i> DPC6011 <i>S. chromogenes</i> DPC6012 <i>S. capitis</i> DPC6013 <i>S. hominis</i> DPC6014 <i>S. haemolyticus</i> DPC6015 <i>S. caprae</i> DPC6016 <i>S. hyicus</i> DPC6017 <i>L. lactis</i> (2 souches) <i>L. rhamnosus</i> ATCC 53103 <i>L. paracasei</i> NFBC 338 <i>L. innocua</i> DPC3306 <i>B. cereus</i> DPC6087 <i>E. coli</i> (2 souches) <i>Salmonella. enterica</i> DT104</p>	<p>[1] Etude de l'activité et de l'expression de la lysine contre <i>S. aureus</i> DPC5645 (MRSA). [2] L'activité de LysK brute a été évaluée pour sa capacité à former des zones de lyse sur des staphylocoques autoclavés. [3] Les lysats de lactocoques contenant LysK ont été évalués pour leur capacité à former une lyse sur les souches de staphylocoques vivants. Des souches appartenant à d'autres genres ont été testées pour leur sensibilité à la LysK brute. L'activité lytique a été notée par le degré de clarification de la culture après une nuit d'incubation à 37°C. [4] L'effet de la LysK provenant de <i>L. lactis</i> NZ9800 a été testé contre <i>S. aureus</i> DPC5645 en phase exponentielle de croissance.</p>	<p>Lysine LysK, identifiée à partir du génome du phage K (anti-staphylococcique), cloné et surexprimé de manière hétérologue dans <i>Lactococcus lactis</i>.</p>	<p>[1] LysK est enzymatiquement active et capable de dégrader les parois cellulaires des staphylocoques. [2] Les staphylocoques coagulase-positifs et négatifs, ainsi que les souches pharmacorésistantes, ont été inhibés par un extrait de lactocoque contenant de la lysine. [3] Les lysats de lactocoques contenant LysK ont été actifs contre une grande variété de staphylocoques vivants (10 souches dont des souches de mammites bovine, des souches MRSA, des souches hétérogènes ou non résistantes à la vancomycine, ainsi que des souches résistantes à la teicoplanine). Variation des capacités lytiques vis-à-vis de ces souches de staphylocoques. L'extrait de lactocoques contenant de la lysine était incapable de lyser d'autres bactéries à Gram positif, telles que <i>Listeria innocua</i>, <i>Bacillus cereus</i>, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> et <i>Lactobacillus paracasei</i>. [4] Dans les courbes de destruction utilisant la souche de MRSA DPC5645, une réduction de 99% du nombre de cellules staphylococciques a été observée 1h après l'addition de lysats contenant LysK.</p>

Tableau 12 : Activité d'autres enzymes phagiques sur diverses bactéries orales.

Source	Bactéries cibles	Système modèle	Type de phagothérapie	Résultats obtenus
Genome sequence of the temperate bacteriophage PH10 from <i>Streptococcus oralis</i> . Van der Ploeg (117)	<i>S. oralis</i> (5 souches) <i>S. mitis</i> (3 souches) <i>S. pneumoniae</i> OMZ810 <i>S. gordinii</i> (3 souches) <i>S. sanguinis</i> (3 souches) <i>S. mutans</i> (2 souches) <i>S. anginosus</i> (2 souches) <i>S. intermedius</i> OMZ512 <i>S. constellanus</i> OMZ511 <i>S. salivarius</i> (2 souches) <i>S. agalactiae</i> OMZ1093 <i>S. pyogenes</i> OMZ1092 <i>E. faecalis</i> OMZ940	[1] Activité lytique de la protéine avec différentes espèces de streptocoques en culture liquide. [2] <i>S. oralis</i> OMZ 607, <i>S. pneumoniae</i> OMZ 810 et <i>S. oralis</i> OMZ 1038 en suspension dans du PBS (DO ₆₀₀ : 1ml de suspension cellulaire) avant l'ajout de 10µg d'enzyme purifiée.	Endolysine du phage tempéré PH10 isolé de <i>Streptococcus oralis</i> OMZ 1038.	[1] La protéine PH10 inhibe la croissance des 9 souches testées de <i>S. oralis</i> , de <i>S. mitis</i> et de <i>S. pneumoniae</i> mais n'a été active sur aucune des autres espèces de streptocoques testées (ni sur la souche d' <i>Enterococcus faecalis</i>). [2] L'ajout de l'endolysine a provoqué une diminution de l'OD ₆₀₀ dans les 3 cas. Diminution plus rapide et plus importante pour <i>S. pneumoniae</i> OMZ 810.
Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. Fischetti (118)	Streptocoques (10 souches du groupe A, 1 souche des groupes B, C, D, E, F, G, L et N, et 22 souches de divers streptocoques oraux) Pneumocoques (14 souches cliniques de <i>S. pneumoniae</i> de type capsulaire, 2 mutants de pneumocoques)	[1] Activité <i>in vitro</i> d'une lysine spécifique des streptocoques du groupe A : des souches de streptocoques représentatives ont été exposées à 250U de lysine purifiée. L'activité de la lysine pour chaque souche a été rapportée en tant que vitesse initiale de lyse. [2] Activité <i>in vitro</i> de 100U/mL de lysine Pal, spécifique de pneumocoques, pendant 30s testée sur des isolats cliniques de <i>S. pneumoniae</i> , des mutants de pneumocoques et d'autres souches de streptocoques. [3] <i>In vivo</i> : 2 modèles animaux (souris) de colonisation muqueuse ont été développés pour tester la capacité des lysines à tuer les organismes sur ces surfaces. Un modèle de colonisation orale a été développé pour les streptocoques du groupe A et un modèle nasal a été développé pour les pneumocoques.	Lysines de bactériophages contre streptocoques de groupe A et pneumocoques (Pal).	[1] Spécifiquement, la lysine tue efficacement les streptocoques du groupe A (peu d'effet sur les streptocoques des groupes C et G, et pratiquement aucun effet sur les streptocoques oraux habituels). [2] Élimination rapide de 14 types capsulaires cliniques de <i>S. pneumoniae</i> , de 2 mutants de pneumocoques et de 5 souches de streptocoques oraux. L'enzyme détruit aussi des souches de pneumocoques résistantes à la pénicilline. [3] Dans les 2 cas, lorsque les animaux ont été colonisés avec les bactéries et traitées avec une petite quantité de lysine spécifique de l'organisme colonisateur, ils se sont révélés exempts de bactéries 2 à 5h après le traitement à la lysine. • <u>Élimination de <i>S. pneumoniae</i> serotype 14 dans le modèle murin de portage nasopharyngé</u> : - après traitement avec 1400U de Pal : aucun pneumocoque n'a été retrouvé dans le lavage nasal, par rapport aux souris colonisées traitées au tampon - après traitement avec 700U de Pal : pneumocoques globalement réduits de manière significative et même complètement éliminés chez 5/8 souris colonisées. • <u>Dans le modèle de colonisation orale avec les streptocoques du groupe A</u> : la lysine est capable de nettoyer les organismes trouvés à la surface, mais incapable de tuer les organismes qui avaient initié une infection.

<p>*EC300: a phage-based, bacteriolysin-like protein with enhanced antibacterial activity against <i>Enterococcus faecalis</i>. Proença (119)</p>	<p>28 isolats d'<i>E. faecalis</i> 21 isolats d'<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> MMH594 <i>E. faecalis</i> V583</p>	<p>[1] Activité de EC300 et Lys170 en culture liquide d'<i>E. faecalis</i>. [2] Evaluation du potentiel d'inhibition de la croissance bactérienne d'EC300 (testé en 4 quantités) et de Lys170 (10µg) sur le panel de souches d'<i>E. faecalis</i> et d'<i>E. faecium</i> sur gélose double couche.</p>	<p>Lysines synthétiques EC300 et Lys170</p>	<p>[1] • Les cellules remises en suspension dans une solution tamponnée sont lysées par les 2 enzymes ; lyse plus rapide et plus étendue par EC300. • En suspensions cellulaires préparées dans un milieu de culture de TSB frais : Lys170 n'induit ni lyse ni arrêt de la croissance - EC300 provoque une lyse. [2] Pas d'effet d'EC300 sur la croissance des souches d'<i>E. faecium</i>. Inhibition de la croissance chez 97% des souches d'<i>E. faecalis</i> pour la plus grande quantité testée (10µg) d'EC300 et 40% pour la plus faible (0.37µg). Avec 10µg de Lys170 : inhibition modérée de la croissance chez 3 <i>E. faecalis</i>. 2 des 4 souches d'<i>E. faecalis</i> résistantes à la vancomycine testées (EHCP 267 et EHCP 389) semblent beaucoup plus sensibles à EC300 que les autres.</p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i> virulence attenuation and immune clearance mediated by a phage lysine-derived protein. Yang (120)</p>	<p><i>S. aureus</i> N315, T23 <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 <i>S. agalactiae</i> S12 <i>S. enteritidis</i> ATCC 14028</p>	<p>[1] Effet <i>in vitro</i> de la liaison de V12CBD à <i>S. aureus</i> N315 sur l'adhésion et l'internalisation de <i>S. aureus</i> dans les cellules épithéliales A549. [2] Evaluation <i>in vitro</i> de la spécificité de V12CBD : effets de V12CBD sur l'adhérence de <i>L. monocytogenes</i>, de <i>S. agalactiae</i> et de <i>S. enteritidis</i> aux cellules A549. [3] Effet <i>ex vivo</i> de la liaison de <i>S. aureus</i> avec V12CBD sur la phagocytose de <i>S. aureus</i> par les macrophages RAW264.7 ou par des macrophages péritonéaux de souris. [4] Un isolat de <i>S. aureus</i> T23 multi-résistant prétraité avec diverses concentrations de V12CBD a été injecté en IP à des souris à une dose finale de 2,5×10⁸ UFC/souris. [5] Examen de l'effet prophylactique du V12CBD en bloquant la virulence de <i>S. aureus</i> : dosage des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α) dans le sang et des charges bactériennes dans les organes (+ observation des modifications morphologiques). [6] Test de spécificité de l'effet préventif de V12CBD contre l'infection à <i>S. aureus</i> : une autre souche N315 de <i>S. aureus</i> multi-résistant a été testée dans un modèle murin de sepsis afin de mesurer la survie de bactéries dans les organes hôtes. [7] Effets de V12CBD sur l'expression de plusieurs cytokines de macrophages.</p>	<p>Protéine recombinante V12CBD issue du domaine de liaison à la paroi cellulaire de la lysine PlyV12.</p>	<p>[1] Adhésion réduite des cellules de <i>S. aureus</i> traitées avec V12CBD aux cellules A549 par rapport aux témoins traités avec du PBS. Nombre de <i>S. aureus</i> intracellulaires plus faible dans les puits traités au V12CBD. [2] La liaison avec V12CBD supprime spécifiquement l'adhésion et l'invasion de <i>S. aureus</i> aux cellules épithéliales. [3] Le traitement par V12CBD a provoqué une phagocytose importante de <i>S. aureus</i> par le macrophage RAW264.7 de manière dose-dépendante comme avec les macrophages péritonéaux de souris. [4] Mort des souris infectées par <i>S. aureus</i> traitées au PBS dans la journée qui a suivi l'infection, alors que les souris infectées par le <i>S. aureus</i> traité avec V12CBD présentaient des taux de survie dose-dépendante. [5] L'administration préventive de V12CBD accélère la clairance de <i>S. aureus in vivo</i> et réduit l'inflammation et les lésions provoquées par une infection à <i>S. aureus</i>. [6] Résultats observés similaires à ceux concernant l'infection à <i>S. aureus</i> T23. [7] Augmentation de l'expression de gènes codant pour un ensemble de cytokines pro-inflammatoires de façon dose dépendante à l'application de V12CBD (prétraitement de 24h sur culture macrophagique). Quand co-culture V12CBD et <i>S. aureus</i>, augmentation initiale des cytokines pro-inflammatoires puis diminution de la production de ces cytokines suggérant que les macrophages traités avec V12CBD pourraient avoir une inflammation apaisée après 24h d'infection à <i>S. aureus</i>.</p>

<p>Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. Nelson (121)</p>	<p>Streptococcus : 11 souches du groupe A et 1 souche des groupes B, C, D, E, F, G, L, N S. crista PK1408 S. intermedius PK2821 S. gordonii (4 souches) S. mitis J22 S. mutans (2 souches) S. oralis (2 souches) S. parasanguis PK2564 S. salivarius (2 souches) Bacillus pumulis BJ0050 S. aureus RN 6390 S. epidermidis BJ0018 E. coli JM83 Neisseria lactamicus P. gingivalis W83 P. aeruginosa PA01</p>	<p>[1] Activité <i>in vitro</i> de la lysine sur les streptocoques du groupe A : la viabilité des streptocoques a été déterminée en présence de différentes concentrations de lysine. [2] Spécificité bactérienne de la lysine : la lysine du phage C1 purifiée a été testée pour son activité muralytique contre 40 souches bactériennes diverses. [3] Activité de la lysine <i>in vivo</i> (modèle murin) sur les streptocoques du groupe A : [a] 1000U de lysine ou du tampon ont été pré-mélangés <i>in vitro</i> avec des streptocoques du groupe A, puis administrés par voie orale et nasale à 5 souris par groupe dans les 5min. [b] Les souris ont été prétraitées par voie orale avec une dose unique (250U) de lysine brute ou purifiée avant d'être soumises à une exposition avec 10⁷ streptocoques. [c] Une dose unique de 500U de lysine a été administrée par voie orale à 9 souris fortement colonisées pendant 4 jours.</p>	<p>Lysine purifiée du phage C1 (infectant les streptocoques du groupe C).</p>	<p>[1] Mort cellulaire complète de 10⁷ streptocoques du groupe A après une exposition à 1 000U de lysine pendant 5s. Une exposition à 100U permettait de réduire la viabilité des streptocoques d'un ordre de 3logs en 5s, 4logs en 1min et 5logs en 10min. [2] La lysine présente une activité contre les streptocoques des groupes C et E (aucune colonie viable détectée après exposition à la lysine durant 30min) bien qu'inférieure à celle observée avec les souches du groupe A. Pas de lyse des streptocoques des groupes B, D, F, G, L et N. Parmi toutes les souches testées : activité de la lysine seulement contre toutes les souches de <i>S. gordonii</i>. La lysine n'a eu aucun effet sur <i>B. pumulis</i>, <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>E. coli</i>, <i>N. lactamicus</i>, <i>P. gingivalis</i> ou <i>P. aeruginosa</i>. [3][a] Aucune des souris traitées à la lysine n'a été colonisée après 24h, alors que l'ensemble des souris traitées avec du tampon l'a été. [b] La lysine a montré un effet protecteur : réduction de l'incidence de la colonisation chez les sujets traités à la lysine. Pas de différence statistique entre la protection fournie par la lysine brute par rapport à la lysine purifiée. [c] Eradication complète des streptocoques de la muqueuse après 2h. Cependant, lorsque ces animaux ont été suivis pendant 24 et 48h supplémentaires, 2 animaux ont révélé des cultures positives et un 3^{ème} animal est mort.</p>
<p>* Synergistic killing of <i>Streptococcus pneumoniae</i> with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. Djurkovic (122)</p>	<p>Streptococcus pneumoniae (4 souches : DCC1490, DCC1476, DCC1420, 8249)</p>	<p>L'effet <i>in vitro</i> de l'utilisation simultanée de Cpl-1 et de pénicilline, de gentamicine, de lévofloxacine ou d'azithromycine contre 4 souches différentes de <i>S. pneumoniae</i> a été évalué. [1] Test de l'association du Cpl-1 et de la pénicilline ou de la gentamicine contre les 4 souches pour lesquelles les CMI de la pénicilline étaient comprises entre 0,03 et 8 µg/ml. Les interactions antibiotiques/Cpl-1 ont été évaluées par la méthode du damier avec des plaques à 96 puits. [2] Dosages chronologiques en inoculant 4x10⁶ UFC de <i>S. pneumoniae</i> avec chaque antibiotique et enzyme seuls ou en combinaison à 0,25 CMI. L'interaction a été considérée comme synergique lorsque la combinaison de 2 agents a démontré un titre final inférieur de 100 fois à celui de l'agent simple le plus efficace et à celui de l'inoculum. [3] Analyses de synergie avec la méthode du damier pour l'association du Cpl-1 et de la lévofloxacine ou de l'azithromycine.</p>	<p>Lysine Cpl-1 produite et purifiée le à partir de <i>E. coli</i> DH5.</p>	<p>[1] L'isobogramme du Cpl-1 et de la gentamicine décrit une courbe synergique pour la souche DCC1490 (CMI de pénicilline = 0.03). Avec l'augmentation de la résistance à la pénicilline (cas des autres souches) : tendance à l'abandon d'une courbe synergique idéale. Avec la combinaison de pénicilline et de Cpl-1, seule la souche 8249, pour laquelle la CMI de pénicilline est très élevée, a révélé une synergie. Les autres souches ne révèlent aucune synergie. [2] Les dosages chronologiques avec Cpl-1 et la gentamicine ont montré une activité synergique contre les souches plus sensibles, DCC1490 et DCC1476, avec un titre final plus de 1000 fois plus bas en combinaison qu'avec l'agent le plus actif seul, ainsi qu'une diminution de 100 fois par rapport au titre initial. Cette combinaison ne s'est pas révélée synergique contre les souches plus résistantes à la pénicilline, DCC1420 et 8249. Cpl-1 et la pénicilline ne révélaient aucune synergie chez les souches sensibles et intermédiaires, un titre final de plus de 100 fois inférieur chez la souche hautement résistante a été observé. Le titre final de la souche extrêmement résistante était 10000 fois plus faible qu'avec l'agent unique le plus actif et 100 fois plus faible que l'inoculum et la réaction était considérée comme synergique. [3] Aucune des deux combinaisons n'était synergique ou antagoniste.</p>

<p>Characterization of <i>Streptococcus gordonii</i> prophage PH15: complete genome sequence and functional analysis of phage-encoded integrase and endolysin. Van der Ploeg (123)</p>	<p><i>S. gordonii</i> (5 souches) <i>S. oralis</i> (5 souches) <i>S. mitis</i> (4 souches) <i>S. pneumoniae</i> OMZ810 <i>S. sanguinis</i> (2 souches) <i>S. mutans</i> (6 souches) <i>S. cricetus</i> OMZ165 <i>S. sobrinus</i> OMZ176 2 <i>S. anginosus</i> OMZ510 <i>S. agalactiae</i> OMZ1092 <i>S. pyogenes</i> OMZ1091 <i>S. constellatus</i> OMZ511 <i>S. intermedius</i> OMZ512 <i>S. salivarius</i> OMZ513 <i>S. thermophilus</i> OMZ1082 <i>E. faecalis</i> OMZ940 <i>L. lactis</i> (2 souches)</p>	<p>Pour explorer la spécificité de l'endolysine de PH15, le gène lysA (ORF55) a été cloné dans le vecteur d'expression d'<i>E. coli</i> pET28b. [1] L'activité de la protéine purifiée vis-à-vis de différentes espèces bactériennes a été évaluée par des tests ponctuels. [2] Action 5µl de l'endolysine purifiée à partir de PH15 (11mg) sur des cultures de nuit de <i>S. gordonii</i> OMZ1039, <i>E. faecalis</i> OMZ940 et <i>L. lactis</i> OMZ1041 (mesure de la densité OD₆₀₀).</p>	<p>Endolysine du phage tempéré PH15 de <i>Streptococcus gordonii</i>.</p>	<p>[1] La protéine inhibe la croissance de toutes les souches testées de <i>S. gordonii</i>, <i>S. mutans</i> et <i>S. sanguinis</i>. La protéine était également active avec les streptocoques pathogènes <i>S. pyogenes</i> et <i>S. agalactiae</i>, contre <i>S. thermophilus</i> OMZ1082 mais pas contre les souches <i>S. mitis</i>, <i>S. oralis</i> et <i>S. pneumoniae</i>. [2] L'addition de la protéine sur la culture de <i>S. gordonii</i> OMZ1039 a entraîné une diminution de plus de trois fois de la densité optique en 5 minutes. La protéine a montré une faible activité sur <i>E. faecalis</i> OMZ940, mais pas sur <i>L. lactis</i> OMZ1041.</p>
<p>* Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1. Jun (124)</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>[1] Activité antibactérienne de SAL200 <i>in vitro</i> examinée à l'aide d'un essai de réduction de la turbidité, qui mesure le TOD₅₀ après l'ajout de SAL200 à la suspension cellulaire. [2] Activité de SAL200 contre les biofilms de <i>S. aureus</i>. [3] L'activité antibactérienne de SAL200 sur 425 isolats cliniques de <i>S. aureus</i>, y compris 336 isolats de MRSA et 1 isolat de VISA, a été examinée à l'aide d'un dosage classique par recouvrement. [4] Effet thérapeutique de SAL200 évaluée <i>in vivo</i> dans un modèle murin d'infection à MRSA. 60 souris divisées en 4 groupes de 15 souris ont reçu par voie IV des inoculums d'isolats de <i>S. aureus</i> SA2 (1×10⁸ UFC/souris). 2 groupes ont reçu l'injection IV de différentes doses de SAL200 (G3 = 12,5mg/kg; G4 = 25mg/kg) à 1, 25 et 49 h après la provocation bactérienne. Les 2 autres groupes de souris étaient des témoins : dans le groupe G1, les souris infectées n'étaient pas traitées et dans le G2 elles ne recevaient que le tampon basal de SAL200.</p>	<p>L'endolysine recombinante SAL-1 contenue dans une pré-formulation en tant que principe pharmaceutique actif a été désignée par SAL200.</p>	<p>[1] SAL200 a présenté une activité antibactérienne rapide et efficace à la fois contre les cellules de <i>S. aureus</i> encapsulées et planctoniques. [2] SAL200 a efficacement dégradé les biofilms de <i>S. aureus</i>. La CMI et la CMB de SAL200 contre <i>S. aureus</i> SA1 dans du milieu TSB étaient de 0,13±0,03µg/mL et de 20±8,7µg/mL de SAL-1, respectivement. Les CMI et les CMB vis-à-vis d'autres isolats de <i>S. aureus</i> étaient similaires à ceux déterminés contre SA1. [3] Pour tous les isolats testés, une zone claire (halo de lyse) a été observée, ce qui suggère que tous les isolats de <i>S. aureus</i> testés sont sensibles à SAL200. [4] Signes cliniques : normaux pendant toute la période expérimentale chez les des groupes G3 et G4 - les souris des 2 groupes témoins (G1 et G2) ont présenté divers signes cliniques commençant 2j après provocation bactérienne (érythème de la marge de la paupière, diminution de l'activité locomotrice, perte de nourriture...). L'injection IV de SAL200 a augmenté le taux de survie. La capacité de SAL200 à éradiquer les bactéries de la circulation sanguine et du tissu splénique a été examinée 5j après la provocation bactérienne. La moyenne de CFU/mL était > 1×10⁶ dans le sérum des souris G1 et > 1×10⁵ dans le sérum des souris G2, alors qu'aucune colonie bactérienne n'a été observée chez les souris ayant reçu SAL200 (G3 et G4). La moyenne de CFU/g était > 1×10⁷ dans le tissu splénique recueilli chez des souris G1 et > 1×10⁷ dans le tissu splénique de souris G2, alors qu'aucune colonie bactérienne n'avait été observée chez les souris ayant reçu SAL200 (G3 et G4).</p>

<p>*Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens. Briers (125)</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (ATCC 15692) <i>P. aeruginosa</i> Br667, PA14 <i>Pseudomonas putida</i> G1 <i>Acinetobacter baumannii</i> 25 <i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>S. typhimurium</i> LT2 <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue MRF, TOP10, BL21(DE3)</p>	<p>[1] 14 Artilyns[®] différentes (LoGT-001 à LoGT-014) ont été produites et purifiées. Test de leur activité antibactérienne contre <i>P. aeruginosa</i> PAO1. [2] Combinaison de PCNP avec OBPgp279 et PVPSE1gp146, respectivement, pour LoGT-001 et LoGT-008, en présence de 0,5 mM d'EDTA. [3] Fusion de la balise PCNP avec 4 endolysines supplémentaires (201φ2-1gp229 et LoGT-015 à LoGT-018). Mesure de l'effet de la fusion de PCNP sur leur activité enzymatique et analyse de leur effet bactéricide sur <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et Br667, <i>E. coli</i>, <i>P. putida</i>, <i>B. pseudomallei</i>, et <i>S. typhimurium</i>. [4] Pour optimiser davantage le potentiel de l'étiquette PCNP, 31 variations associées de la même fusion avec les 2 endolysines (OBPgp279 et PVPSE1gp146) a été produite (LoGT-019 à LoGT-049). L'effet sur le rendement en protéines, l'activité enzymatique, et sur leur effet antibactérien contre <i>P. aeruginosa</i>, <i>E. coli</i>, <i>S. typhimurium</i> et <i>A. baumannii</i>, à la fois en l'absence et en présence d'EDTA 0,5mM a été analysé. [5] Evaluation de LoGT-008 contre <i>P. aeruginosa</i> dans les infections cutanées avec un modèle néonatal humain de kératinocytes du prépuce : une monocouche de kératinocytes confluente est infectée par <i>P. aeruginosa</i> PA14 (10⁵ ou 10⁷ UFC/ml). 1h après l'infection, 2M de PVP-SE1gp146 ou de LoGT-008 ont été ajoutées. La viabilité des kératinocytes et les réductions bactériennes ont été quantifiées 4h après l'infection.</p>	<p>2 endolysines OBPgp279 (provenant du phage OBP du phage de <i>Pseudomonas fluorescens</i>) et PVP-SE1gp146 (provenant du phage PVP-SE1 de <i>Salovella enterica</i> sérovar Enteritidis) modifiées en Artilyns[®] (endolysines avec des peptides déstabilisants de lipopolysaccharides).</p>	<p>[1] La fusion de chaque peptide déstabilisant les LPS avec l'endolysine PVP-SE1gp146 a entraîné une activité bactéricide accrue contre <i>P. aeruginosa</i> par rapport à la PVP-SE1gp146 de type sauvage, mais l'effet a été plus marqué pour le PCNP. La réduction la plus élevée a été obtenue avec LoGT-001 (PCNP + OBPgp279). [2] La fusion avec l'étiquette PCNP et l'ajout d'une faible concentration d'EDTA confèrent une activité antibactérienne contre <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et Br667. Réduction maximale de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 avec LoGT-001. [3] Malgré une réduction (de 52% à 94%) de l'activité enzymatique par rapport aux endolysines sauvages correspondantes, toutes les endolysines fusionnées avec le PCNP présentaient une activité antibactérienne améliorée. [4] • Si augmentation de longueur du lieur entre PCNP en N-terminal et l'endolysine : effet antibactérien légèrement plus puissant contre <i>P. aeruginosa</i> pour les Artilyns[®] dérivées d'OBPgp279, avec une réduction jusqu'à 3.41 ± 0.18 log pour LoGT-023 en absence de EDTA. • Activité antibactérienne des fusions N-terminales > celle des fusions C-terminale. • Aucune cellule de <i>P. aeruginosa</i> survivantes après incubation avec LoGT-020, LoGT-021, LoGT-022 et LoGT-023 en présence de 0,5mM d'EDTA. <i>A. baumannii</i> a également été presque complètement éradiqué. • Dans le cas d'<i>E. coli</i>, effet bactéricide amélioré pour 4 des 8 Artilyns[®] (LoGT-037, LoGT-038, LoGT-041 et LoGT-042) à double étiquette (étiquette PCNP avec un peptide hydrophobe (HPP; MW1) ou un peptide amphipathique (MW2) par rapport à l'Artilyns[®] LoGT-001 (une seule étiquette), avec des réductions allant jusqu'à 2,22 ± 0,09 log. - Pour <i>S. typhimurium</i>, pas d'amélioration avec l'approche à double marquage. [5] Les Artilyns[®] sont efficaces sur les kératinocytes humains infectés. PVP-SE1gp146 et LoGT-008 pourraient tous 2 protéger complètement (100%) la monocouche des effets cytotoxiques d'une infection à PA14 à 10⁵ UFC/ml. Cette protection est associée à une diminution drastique de la charge bactérienne. Un inoculum bactérien de 10⁷ UFC/ml cause une mortalité de 97% (en 4h). Dans ces circonstances, une seule dose de LoGT-008 sauve 27% des kératinocytes (contre 14% pour PVP-SE1gp146). Dans ce cas-là, la charge bactérienne a aussi été réduite de manière significative pour LoGT-008 comparativement à PVP-SE1gp146.</p>
---	--	--	--	---

<p>*Endolysin LysEF-P10 shows potential as an alternative treatment strategy for multidrug resistant <i>Enterococcus faecalis</i> infections. Cheng (126)</p>	<p><i>E. faecalis</i> (22 souches VREF et 14 souches VSEF) <i>E. faecium</i> (6 souches)</p>	<p>[1] LysEF-P10 (20µg/ml), LysEF-P10C (100µg/ml) et LysEF-P10B (100µg/ml) ont été ajoutés individuellement à une suspension bactérienne d'<i>E. faecalis</i> N10 (VREF) puis numération bactérienne toutes les 10min pendant 1h. [2] Activité de LysEF-P10 sur d'autres souches d'<i>E. faecalis</i> et d'<i>E. faecium</i>. [3] Traitement par LysEF-P10 de souris infectées avec 4×10⁹ cellules d'<i>E. faecalis</i> E028 (100% de létalité en 48h avec une dose ≥ 2×10⁹ UFC/souris)</p>	<p>Lysine LysEF-P10 du phage EF-P10 d'<i>E. faecalis</i> isolé d'eaux usées, LysEF-P10C (domaine CHAP unique) et LysEF-P10B (domaine de liaison putative).</p>	<p>[1] Activité bactéricide efficace de LysEF-P10 efficace contre <i>E. faecalis</i>. Pas d'activité bactéricide pour les domaines individuels LysEF-P10C et LysEF-P10B. [2] LysEF-P10 a été capable de tuer 32/36 des isolats d'<i>E. faecalis</i>, y compris 20/22 VREF mais pas d'activité bactéricide contre <i>E. faecium</i>. [3] Dose de LysEF-P10 ≥5 µg : toutes les souris ont survécu et la bactériémie a été considérablement réduite.</p>
<p>*<i>In vitro</i> characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. Larpin (127)</p>	<p><i>E. coli</i> (8 souches) <i>K. pneumoniae</i> 8354 <i>S. enterica</i> <i>P. aeruginosa</i> (3 souches) <i>A. baumannii</i> (3 souches) <i>S. aureus</i> ATCC 25913 <i>S. mitis</i> 859</p>	<p>Le spectre d'activité antimicrobienne de PlyE146 (400 µg/mL) a été testé sur 16 bactéries à Gram négatif (8 <i>E. coli</i>, 3 <i>P. aeruginosa</i>, 3 <i>A. baumannii</i>, 1 <i>K. pneumoniae</i> et 1 <i>S. enterica</i>) et 2 bactéries à Gram positif (1 <i>S. aureus</i> et 1 <i>S. mitis</i>) en phase de croissance exponentielle. Enumération des cellules viables après 2h d'incubation.</p>	<p>Lysine PlyE146, codée par un prophage d'<i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>Activité antimicrobienne de PlyE146 spécifique à la souche. PlyE146 lyse efficacement 3 <i>E. coli</i> (K12, DH5α et 8542; diminution de plus de 3,5 log₁₀ UFC/mL), mais est moins actif contre 5 autres souches (diminution d'environ 1 log₁₀ UFC/mL). Activité bactéricide contre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 et UR1156 (diminution de 3,1 à 3,9 log₁₀ UFC/mL, respectivement), mais pas contre la souche 2062. Forte activité de PlyE146 sur les 3 souches d'<i>A. baumannii</i> testées avec une diminution de 4,9 log₁₀ UFC/mL. Aucune activité observée contre les souches testées de <i>K. pneumoniae</i>, <i>S. enterica</i>, <i>S. aureus</i> et <i>S. mitis</i>.</p>
<p>* Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against staphylococci and streptococci. Dong (128)</p>	<p><i>S. aureus</i> (25 souches) <i>S. albus</i> 8799 <i>S. epidermidis</i> XJ9 <i>S. dysgalactiae</i> 35666 <i>S. agalactiae</i> WJ <i>S. suis</i> W1 <i>S. pyogenes</i> 12344 <i>E. faecium</i> 35667 <i>E. faecalis</i> MMA1 <i>L. monocytogenes</i> 19115 <i>B. cereus</i> 33018R <i>E. coli</i> TG1</p>	<p>[1] Test de lyse sur plaque pour tester l'activité lytique de la lysine chimérique Ply187N-V12C sur les souches de <i>S. aureus</i> (souches MRSA et 3 souches isolées à partir de lait produit par la vache souffrant de mammite). [2] Activité lytique des lysines sur d'autres bactéries de différents genres testée par le test de plages de lyse et le test sur microplaques.</p>	<p>Lysine chimérique Ply187N-V12C construite en fusionnant le domaine catalytique de la lysine Ply187N (spécifique à <i>S. aureus</i>) du phage Ply187 avec le domaine de liaison aux cellules (V12C) de la lysine PlyV12.</p>	<p>[1] Activité lytique de Ply187N-V12C contre toutes les souches de <i>S. aureus</i>, similaire à celle de Ply187N. Ply187N-V12C a une activité identique à celle de Ply187N contre <i>S. aureus</i> N315 mais inférieure à PlyV12 (mesure de la CMI). [2] • Ply187N a montré une activité lytique uniquement sur les staphylocoques. • Activité de PlyV12 sur toutes les souches sauf sur <i>Staphylococcus albus</i> 8799. • Ply187N-V12C a montré une activité lytique sur toutes les souches sauf sur <i>E. faecium</i> 35667 et <i>E. faecalis</i> MMA1 par le test de plages de lyse. Cependant, le test sur microplaque a montré que Ply187N-V12C a une activité lytique sur les 2 souches d'entérocoques, bien que moins actif que PlyV12. Aucune des 3 lysines n'exerce d'activité lytique contre <i>S. suis</i> W1, <i>L. monocytogenes</i>, <i>B. cereus</i> et <i>E. coli</i>.</p>
<p>* Fighting sinus-derived <i>Staphylococcus aureus</i> biofilms in vitro with a bacteriophage-derived muralytic enzyme. Drilling (129)</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> souches ATCC25923, 3 isolats cliniques dérivés du sinus : CI1 et CI2 (MSSA, résistants uniquement à la pénicilline) et 1 CI MRSA)</p>	<p>[1] Evaluation de l'activité anti-biofilm de P128 par le test MBEC et l'imagerie par CSLM. [2] Analyse MBEC : activité de la P128 vis-à-vis des cellules planctoniques en présence de biofilm. [3] Test Alamar Blue évaluant la réduction du biofilm par P128.</p>	<p>Protéine chimérique P128</p>	<p>[1] Les biofilms de <i>S. aureus</i> ATCC25923, des CI MSSA et du CI MRSA ont tous été significativement réduits. [2] Les bactéries planctoniques en présence de biofilm de tous les isolats testés ont été significativement réduites par le traitement au P128. [3] Le traitement au P128 a permis de réduire de manière significative les niveaux de biofilm de <i>S. aureus</i> pour toutes les souches testées.</p>

<p>*Characterization of lytic enzyme open reading frame 9 (ORF9) derived from <i>Enterococcus faecalis</i> bacteriophage ϕEF24C. Uchiyama (130)</p>	<p><i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Escherichia coli</i></p>	<p>[1] Incubation d'un peptidoglycane d'<i>E. faecalis</i> (STF-3) avec diverses concentrations d'ORF9-His purifié. [2] <i>E. faecalis</i> EF24 a été traitée avec diverses concentrations d'ORF9-His et le nombre de bactéries viables a été mesuré à 3h. [3] Evaluation des changements de turbidité de 35 souches d'<i>E. faecalis</i> (30 isolats cliniques, 4 isolats cliniques VRE et 1 souche ATCC), 10 souches cliniques d'<i>E. faecium</i>, 9 isolats cliniques et 1 souche de laboratoire de <i>S. aureus</i>, et la souche <i>E. coli</i> DH5 entre les traitements par ORF9-His (0,1mg/ml) et PBS.</p>	<p>Endolysine ORF9 du phage ϕEF24C d'<i>E. faecalis</i>.</p>	<p>[1] Au bout de 10min, le peptidoglycane d'<i>E. faecalis</i> traité avec diverses concentrations d'ORF9-His présentait une modification de la turbidité liée à la dose. Des concentrations de plus de 0,1mg/ml d'ORF9-His présentent une plus forte activité lytique. [2] Effet bactéricide dépendant de la dose. L'observation microscopique des cellules d'<i>E. faecalis</i> sous traitement ORF9-His a montré qu'ORF9 dégradait la paroi cellulaire bactérienne et éliminait la bactérie. [3] Le spectre lytique était de 97,1% (34/35) contre les souches <i>E. faecalis</i> et de 60% (6/10) contre les souches <i>E. faecium</i>. ORF9-His n'a montré aucune activité lytique contre aucun <i>S. aureus</i> et la souche d'<i>E. coli</i>.</p>
<p>* Effective removal of Staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. Gutiérrez (131)</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> (8 souches) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (3 souches)</p>	<p>[1][a] Evaluation de la capacité de LysH5 à éliminer des biofilms de 24h de staphylocoques sur des plaques de polystyrène à 96 puits traités avec LysH5 (0,15mM) comparativement à la LTP (0,2mM), et à tuer les cellules sessiles de 6 souches de <i>S. aureus</i> et 3 souches de <i>S. epidermidis</i> après 6h d'incubation. [b] Les cellules viables attachées ont été récupérées à partir des puits après une seule exposition à LysH5 et la capacité de formation de biofilm de ces isolats a été déterminée par coloration au cristal violet. [2] La microscopie électronique à balayage à basse température a été utilisée pour visualiser la structure des biofilms âgés de 24h avant et après le traitement avec l'endolysine LysH5. [3] Pour évaluer un effet inducteur présumé de LysH5 sur la formation de biofilm, les souches de <i>S. aureus</i> ont été cultivées en présence de LysH5 à des concentrations inférieures à la CMI et contrôlées pour la formation de biofilm. [4] Pour évaluer si le traitement des cultures planctoniques staphylococciques par LysH5 pouvait sélectionner des cellules persistantes, des cultures exponentielles de <i>S. aureus</i> 15981 ont été traitées avec des concentrations croissantes de LysH5. [5] Efficacité de LysH5 sur des cellules planctoniques persistantes de <i>S. aureus</i> SA113 isolées par traitement avec de la rifampicine ou de la ciprofloxacine.</p>	<p>Endolysine LysH5 codée par le phage vB_SauS-phiPLA88 de <i>S. aureus</i>.</p>	<p>[1][a] LysH5 a déstabilisé les biofilms de <i>S. aureus</i> et de <i>S. epidermidis</i> : réduction du nombre de bactéries attachées de 1 à 3 unités log par puits. Activité de LysH5 supérieure à celle de la LTP, sauf sur les biofilms de <i>S. aureus</i> 15981 et <i>S. aureus</i> ISP479r. LTP très inefficace contre les biofilms de <i>S. epidermidis</i>. Activité de LysH5 sur <i>S. epidermidis</i> en croissance exponentielle plutôt faible contrairement à celle sur <i>S. aureus</i>. [b] Des valeurs d'absorption identiques à celles des souches non traitées ont été observées. Ainsi, les cellules survivantes ne semblent pas avoir une capacité accrue de formation de biofilm. Il est à noter qu'un 2^{ème} traitement par LysH5 a entraîné une diminution du nombre de populations de staphylocoques à des niveaux indétectables (10 UFC/puits). Donc les cellules viables restant attachées à la surface du puits après le 1^{er} traitement par LysH5 n'étaient pas des cellules persistantes car elles restaient sensibles à l'endolysine. [2] Biofilms non structurés à la suite du traitement avec LysH5. [3] La formation des biofilms par les souches de staphylocoques est différente en présence de concentrations sous-inhibitrices de LysH5 : - inhibition pour <i>S. aureus</i> 15981, <i>S. aureus</i> 132 et <i>S. epidermidis</i> B, - réduction pour <i>S. aureus</i> ISP479r, <i>S. aureus</i> V329, <i>S. aureus</i> IPLA1 et <i>S. epidermidis</i> YLIC17, - aucune inhibition pour <i>S. aureus</i> IPLA16, <i>S. aureus</i> Newman et <i>S. epidermidis</i> DG2n. [4] Le nombre de bactéries a diminué à mesure que la concentration de LysH5 augmentait et aucune bactérie survivante n'a été détectée à 0,5mM de LysH5. [5] Aucune bactérie viable n'a été détectée après 2h d'incubation à 37°C, ce qui renforce le potentiel lytique de LysH5 vis-à-vis de cette sous-population de bactéries pouvant survivre à l'antibiothérapie.</p>

<p>* Lytic activity of recombinant bacteriophage ϕ11 and ϕ12 endolysins on whole cells and biofilms of <i>Staphylococcus aureus</i>. Sass (132)</p>	<p><i>Staphylococcus simulans</i> 22 <i>S. aureus</i> (4 souches) <i>S. epidermidis</i> O-47</p>	<p>[1] Les activités lytiques de l'endolysine ϕ11 pleine longueur et de ses variants de délétion (chacune appliquée à une concentration de 20μg/ml) ont été examinées par photométrie à 600nm en utilisant des parois cellulaires de <i>S. simulans</i> 22 jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,3. [2] Les cellules de <i>S. aureus</i> NCTC8325 ont été cultivées pendant une nuit, diluées dans du tampon d'incubation à une DO₆₀₀ d'environ 0,3 et pasteurisées pendant 10min à 80°C. Après addition de quantités équivalentes d'endolysine (20μg/ml), l'activité lytique a été déterminée comme précédemment. [3] Analyse des activités lytiques des endolysines ϕ11 et ϕ12 sur les cellules entières de plusieurs souches de staphylocoques. [4] Influence des endolysines ϕ11 et ϕ12 sur les biofilms à staphylocoques au moyen d'un dosage sur plaque de biofilm modifié.</p>	<p>Endolysines des bactériophages ϕ11 et ϕ12 de <i>S. aureus</i> NCTC8325 clonés et surexprimés de manière hétérologue chez <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>[1] L'enzyme complète a montré une lyse efficace du peptidoglycane par rapport au témoin. Les domaines endopeptidase et amidase associé au domaine de liaison à la paroi cellulaire (ϕ11endo/CBD et ϕ11 ami/CBD) étaient tous 2 actifs et capables de lyser les parois cellulaires. Cependant, l'enzyme de pleine longueur était plus active que les sous-domaines isolés et seule l'association de ϕ11endo/CBD et de ϕ11 ami/CBD (20μg/ml chacun) permettait de rétablir l'activité lytique complète. [2] Contrairement à la protéine de longueur totale, les domaines isolés d'amidase ou d'endopeptidase étaient peu actifs contre les cellules tuées par la chaleur. Les 2 domaines catalytiques de l'enzyme doivent être combinés l'un avec l'autre pour cliver la paroi des cellules intactes. L'activité lytique de l'endolysine ϕ11 sur des cellules staphylococques tuées par la chaleur a été supprimée après la délétion du domaine de liaison de la paroi cellulaire (ϕ11endo/ami). [3] L'endolysine de ϕ11 a lysé les cellules des 4 souches de <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i> O-47 et <i>S. simulans</i> 22 tuées par la chaleur. Leurs activités lytiques étaient équivalentes à celle de la LTP hautement purifiée (5μg/ml). Contrairement à l'endolysine de ϕ11, celle de ϕ12 n'était pas capable d'hydrolyser les cellules de <i>S. aureus</i> Wood 46, de <i>S. aureus</i> Cowan 1 ou de <i>S. aureus</i> Newman tuées par la chaleur. Cependant, l'addition de ϕ12 entraînait une agrégation des cellules de <i>S. aureus</i> (augmentation de la DO des cultures observée). [4] L'endolysine ϕ12 ne présentait aucune activité hydrolytique sur les biofilms de <i>S. aureus</i> NCTC8325 et de <i>S. epidermidis</i> O-47. En revanche, après l'addition de l'endolysine ϕ12 : coloration accrue des biofilms. L'endolysine ϕ11 purifiée a éliminé les biofilms de <i>S. aureus</i> NCTC8325, avec une efficacité comparable ou légèrement inférieure à celle de la LTP. Aucun effet sur les biofilms de <i>S. epidermidis</i> O-47 n'a été observé.</p>
---	---	--	---	--

<p>* Antibacterial effects of phage lysin LysGH15 on planktonic cells and biofilms of diverse staphylococci. Zhang (133)</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> (2 souches) <i>Staphylococcus epidermidis</i> (25 souches) <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (2 souches) <i>Staphylococcus hominis</i> (2 souches)</p>	<p>[1] Activité bactéricide de LysGH15 purifié sur les staphylocoques. [2] Les souches B052 de <i>S. epidermidis</i> (VRSE) et B020 de <i>S. epidermidis</i> (VSSE) ont été utilisées pour déterminer le potentiel de résistance à LysGH15. [3] Activité anti-biofilm de LysGH15. [4] Effet de différentes doses de LysGH15 contre l'infection mortelle à <i>S. epidermidis</i> chez les souris. Une injection IP de 1×10^8 UFC de <i>S. epidermidis</i> B020 par souris était suffisante pour produire 100% de mortalité en 2 jours. Après infection pendant 1h avec 2 MLD (2×10^8 UFC) de B020, les charges bactériennes ont atteint 10^6 UFC/ml dans le sang. A ce moment, les souris ont été traitées avec LysGH15 à différentes doses (5, 10 et 20µg/souris).</p>	<p>LysGH15, une lysine dérivée du phage staphylococcique GH15.</p>	<p>[1] Toutes les souches de <i>S. aureus</i>, <i>S. epidermidis</i>, <i>S. haemolyticus</i> et <i>S. hominis</i>, y compris les bactéries restantes, sont sensibles à LysGH15. Le nombre total de bactéries a diminué de 7 à ~3 log après 30min de traitement par LysGH15 (20µg/ml). Les CMI de LysGH15 vis-à-vis de ces souches allaient de 8 à 32µg/ml. [2] Lorsque les <i>S. epidermidis</i> ont été exposés à des dilutions en série de LysGH15, aucun mutant de résistance spontané n'a été récupéré. Les cellules recueillies de chaque génération ont montré des sensibilités similaires. Les CMI des souches ayant subi une sous-culture étaient les mêmes que celles des cellules mères. [3] LysGH15 empêche la formation de biofilms, mais élimine également les biofilms précédemment formés. <i>S. epidermidis</i> SE009, <i>S. haemolyticus</i> SW053, <i>S. hominis</i> SWS11 et <i>S. aureus</i> R066 ont formé les biofilms les plus puissants à 24h et à 72h parmi toutes les souches de ces 4 espèces de staphylocoques. LysGH15 a empêché la formation de biofilm par ces 4 souches à des degrés différents. Des diminutions significatives de la masse de biofilm, de 43% à 89%, ont été observées après le traitement par LysGH15 (50µg/ml). La capacité de LysGH15 à prévenir la formation de biofilm était liée à la dose. De plus, des biofilms jeunes préformés (24h) et anciens (72h) ont été traités avec différentes concentrations de LysGH15 (50µg/ml, 100µg/ml et 150µg/ml). Les biofilms jeunes et anciens des souches SE009, SW053, SWS11 et R066 ont été détruits par LysGH15. L'utilisation de la CSLM a également montré que l'épaisseur du biofilm, y compris celle produite par <i>S. epidermidis</i> SE009, B020, W039, <i>S. aureus</i> R066, <i>S. hominis</i> SWS11 et <i>S. haemolyticus</i> SW053, était significativement plus faible après traitement avec LysGH15 (150µg/ml) qu'après traitement avec une solution PBS. LysGH15 a dégradé les biofilms de toutes les autres souches à une concentration de 150µg/ml. [4] Toutes les souris traitées avec du PBS sont mortes dans les 48h. En revanche, toutes les souris traitées avec 20µg/souris de LysGH15 ont récupéré et la bactériémie a fortement diminué. La charge bactérienne dans le sang était de 3,8log après 24h de traitement, ce qui était inférieur à 7,5log après 2h dans le groupe traité au PBS. Les tissus organiques des souris traitées au LysGH15 après 48h semblaient similaires à ceux des souris normales.</p>
--	--	--	---	--

<p>* Bacteriophage lysin CF-301, a potent antistaphylococcal biofilm agent. Schuch (134)</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> <i>Coagulase negative Staphylococci</i> : <i>S. epidermis</i>, <i>S. warnerii</i>, <i>S. hominis</i>, <i>S. capitis</i>, <i>S. saprophyticus</i>, <i>S. cohnii</i>, <i>S. hyicus</i>, <i>S. lugdunensis</i>, <i>S. simulans</i>, <i>S. sciuri</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus agalactiae</i></p>	<p>[1] La MBEC du CF-301 a été déterminée à l'aide d'une gamme de staphylocoques et de streptocoques. [2] Effet de CF-301 (à la CMI de 32µg/ml) sur les biofilms de <i>S. aureus</i> BAA-42 sur des plaques de polystyrène à 24 puits en comparaison avec des antibiotiques. [3] L'activité du CF-301 contre les biofilms formés sur des lames de verre a été visualisée par microscopie. [a] Imagerie confocale pour des biofilms de la souche Newman de MSSA (exprimant la protéine fluorescente verte [GFP]) traitées pendant 1h avec du tampon ou du CF-301 à 32µg/ml. [b] Imagerie de DIC et champs de fluorescence correspondants pour les biofilms de la souche MRSA BAA-42 traitée comme précédemment. [4] La souche BAA-42 (MRSA) a été cultivée dans des cathéters en PVC pendant 3 jours avant traitement au CF-301 ou à la DAP pendant 4h. Pour visualiser l'activité antibiofilm, les cathéters traités ont été examinés en microscopie. [5] Efficacité du CF-301 contre les biofilms de cathéter formés par la souche ATCC BAA-42 de MRSA. [6] Suivi de la viabilité des cellules planctoniques intra-cathéters après un traitement à la DAP ou au CF-301. [7] Génération de biofilms mixtes : <i>S. aureus</i> BAA-42 et de <i>S. epidermidis</i> NRS 7 dans un rapport précis de 2: 1 ont été co-incubées pendant 3 jours dans des boîtes à 24 puits et pendant 6 jours dans des cathéters et un maillage chirurgical. Les biofilms résultants sont composés de <i>S. aureus</i> et <i>S. epidermidis</i> dans des rapports de 10: 1. [8] Pour générer des SCV, des biofilms de <i>S. aureus</i> BAA-42 ont été cultivés pendant 24h avec des concentrations sublétales d'antibiotiques (DAP, vancomycine et oxacilline). Pour confirmer un effet bactéricide de CF-301, nous avons déterminé l'UFC dans les fractions cellulaires adhérentes et planctoniques de biofilms cultivés avec de la DAP puis traités avec du CF-301. [9] Efficacité du CF-301 contre les cellules persistantes planctoniques de <i>S. aureus</i> MW2. [a] Des cultures en phase stationnaire ont été traitées avec 100µg/ml de DAP (100xCMI).</p>	<p>Lysine CF-301</p>	<p>[1] Les 95 souches de <i>S. aureus</i> sont sensibles au CF-301 dans l'intervalle nanomolaire. Les valeurs de MBEC₉₀ pour les staphylocoques à coagulase négative étaient plus élevées (~8 µg/ml) tandis que les valeurs de MBEC₉₀ pour <i>S. pyogenes</i> et <i>S. agalactiae</i> étaient inférieures (autour de 0,25 et 0,5µg/ml respectivement). Ces résultats contrastent avec la résistance des biofilms de staphylocoques et de streptocoques à la DAP (MBEC₉₀ = 1 024µg/ml). [2] CF-301 peut perturber les biofilms de BAA-42 en moins de 2h et empêcher la repousse en 24h. En revanche, les traitements à la DAP, à la vancomycine et au linézolide à 1000 CMI n'ont eu aucun effet antibiofilm au bout de 24h. [3][a] Alors que le traitement tampon aboutissait à un biofilm tridimensionnel intact d'une épaisseur de 20 à 25µm, le CF-301 éliminait la plus grande partie du signal fluorescent. [b] Le biofilm traité au tampon était hautement fluorescent en présence de colorant vert à la calcéine, tandis que l'échantillon traité au CF-301 était dépourvu de bactéries et de fluorescence. [4] CF-301 a perturbé toute la biomasse du biofilm, tandis que la DAP et le tampon n'avaient aucun effet. [5] Des concentrations de CF-301 allant de la CMI (32µg/ml) à 0,01xCMI (0,32 µg/ml) ont éliminé toute la biomasse de biofilm observable en moins de 4h. En revanche, la DAP a eu peu d'effet sur la biomasse. [6] La DAP a entraîné une chute de moins de 1 log₁₀ d'UFC en 2h, tandis que CF-301 a entraîné une chute en dessous du seuil de détection (diminution de plus de 4 log₁₀) au bout de 6h. [7] Les biofilms d'espèces mélangées étaient susceptibles d'être perturbés par CF-301 à des concentrations atteignant 0,032µg/ml en 24 h. Alors que la sensibilité des biofilms à une seule espèce de <i>S. aureus</i> était presque identique à celle des biofilms à espèces mixtes, les biofilms à une seule espèce de <i>S. epidermidis</i> étaient jusqu'à 100 fois plus résistants. Les biofilms de <i>S. epidermidis</i> étaient donc plus sensibles au CF-301 lorsqu'ils se formaient avec <i>S. aureus</i>. [8] CF-301 a efficacement tué les bactéries du biofilm et du plancton jusqu'à des concentrations atteignant la valeur de MBEC de 0,32 µg/ml. Les SCV étaient donc susceptibles à CF-301. Aucune résistance à CF-301 n'a été observée. [9][a] L'ajout de 160µg/ml de CF-301 (5xCMI) a tué toute la sous-population persistante en moins de 2h et a empêché la repousse de 24h. [b] L'ajout de 160µg/ml de CF-301 a éliminé toutes les cellules persistantes au bout d'1h et a empêché la repousse de 24h. [10] CF-301 est actif dans le sang humain et ses fractions : dans chaque cas, les traitements au CF-301 (mais pas le témoin) ont abouti à</p>
--	---	--	-----------------------------	---

		<p>[b] Des cultures en phase exponentielle ont été traitées avec 3µg/ml de ciprofloxacine (3xCMI).</p> <p>[10] Des biofilms de la souche BAA-42 (MRSA) se sont formés sur des cathéters en présence de 1% de HuS, de 50% de plasma inactivé par la chaleur ou de 50% de sang total. Les biofilms ont ensuite été traités avec du CF-301 (ou un témoin) dans 100% de HuS, 100% de plasma inactivé à la chaleur ou 100% de sang total, pendant 4h.</p> <p>[11] Stabilité à long terme du CF-301 en solution RL.</p> <p>[12] Des analyses en damier ont été utilisées pour évaluer la synergie entre CF-301 et la LTP contre des biofilms forts et modérés formés par 10 MSSA, MRSA, VISA et VRSA.</p> <p>[13] Analyse <i>ex vivo</i> des biofilms formés dans le HSF.</p>		<p>l'élimination complète du biofilm et/ou à la réduction des UFC à des concentrations faibles (0,32µg/ml).</p> <p>[11] À des concentrations de 320µg/ml et 3,2mg/ml, avec ou sans héparine, CF-301 est resté actif à 99,9% sur 3 semaines à 37°C. À 32µg/ml, CF-301 était actif à 99% après 1 jour et à 28,4% au bout de 3 semaines. Dans toutes les conditions, aucune modification de la clarté, de la couleur des particules, de la turbidité ou du pH de la solution n'a été observée sur une période de 3 semaines.</p> <p>[12] Les isobogrammes obtenus ont donné des courbes concaves et des valeurs de FECmin de 0,5, indiquant une synergie puissante. Les combinaisons utilisant aussi peu que 1/8 des MBEC du CF-301 et de la LTP étaient des agents antibiofilm efficaces.</p> <p>[13] Les biofilms formés par la souche BAA-42 de MRSA dans HSF étaient susceptibles d'être éliminés par le CF-301 entre 4 et 24h. La LTP seule et en association avec le CF-301 a également efficacement tué les bactéries biofilm; cependant, la DAP seule n'a eu aucun effet.</p>
<p>* Role of the pre-neck appendage protein (Dpo7) from phage vB_SepiS-phiIPLA7 as an anti-biofilm agent in staphylococcal species. Gutierrez (135)</p>	<p><i>S. epidermidis</i> (10 souches) <i>S. aureus</i> (2 souches)</p>	<p>[1] Traitement de biofilms de 24h de la souche de <i>S. epidermidis</i> F12 avec différentes concentrations de Dpo7 pendant 3h à 37°C.</p> <p>[2] Analyse au microscope optique du potentiel de dégradation du matériau extracellulaire formé par <i>S. epidermidis</i> F12 par Dpo7 dans des cultures liquides. Les cellules développées en phase exponentielle ont été incubées avec 0,15µM de Dpo7 pendant 3h à 37°C.</p> <p>[3] Spécificité de Dpo7 pour les composants des biofilms de <i>S. epidermidis</i> : test de son activité contre des biofilms de <i>S. epidermidis</i> et <i>S. aureus</i> avec différentes compositions de matrice biochimique.</p> <p>[4] Effet de Dpo7 sur la croissance planctonique des souches de staphylocoques sur des plaques de micro-puits remplies de TSB additionné de Dpo7 (0–1,5 µM) et inoculées avec des souches de staphylocoques.</p> <p>[5] Afin de prévenir la formation de biofilms sur polystyrène, des souches de staphylocoques ont également été cultivées en présence de différentes concentrations (0–1,5 µM) de Dpo7 et vérifiées pour la formation de biofilms par coloration au cristal violet.</p>	<p>Dépolymérase Dpo7 du phage de <i>S. epidermidis</i> vB_SepiS-phiIPLA7, surexprimée dans <i>E. coli</i> et purifiée.</p>	<p>[1] La perturbation maximale du biofilm (43%) a été obtenue avec 0,075µM de Dpo7. Des concentrations plus élevées n'ont pas amélioré significativement ce résultat. Le maximum d'élimination des cellules attachées (environ 1U; 92% du total) a été obtenu en traitant les biofilms avec 0,15µM de Dpo7.</p> <p>[2] Après traitement avec Dpo7, la capsule est généralement plus mince ou considérablement perturbée et l'on peut observer le matériel capsulaire restant dépourvu de bactéries.</p> <p>[3] Toutes les souches de <i>S. epidermidis</i> testées produisaient une matrice composée principalement d'EPS. Les souches <i>S. aureus</i> 15981 et <i>S. aureus</i> V329 ont formé des biofilms d'EPS et protéique, respectivement. Dpo7 réduit à 24h les biofilms de <i>S. epidermidis</i> et de <i>S. aureus</i> 15981 contrairement aux biofilms de <i>S. aureus</i> V329 (car matrice protéique du biofilm).</p> <p>[4] Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les cultures planctoniques traitées et non traitées. Des résultats ont été obtenus à 0,15µM de Dpo7, mais des concentrations plus élevées (jusqu'à 1,5µM) n'affectaient pas la croissance planctonique.</p> <p>[5] 0,15µM de Dpo7 inhibe la formation de biofilm : diminution de 27% chez <i>S. epidermidis</i> LV5RB3 et de 85% chez <i>S. epidermidis</i> Z2LDC14 de la biomasse totale adhérente au polystyrène. Des concentrations plus élevées de Dpo7 (jusqu'à 1,5µM) n'améliorent pas les résultats. La présence de Dpo7 n'a pas affecté la formation de biofilm dans les cas de <i>S. epidermidis</i> B, DG2n, LO5RB1 et de <i>S. aureus</i> V329.</p>

Un autre article traitant de l'action d'une lysine est traité ailleurs : référence (74) dans le Tableau 3.

PARTIE IV : DISCUSSION

La prolifération de souches résistantes aux antibiotiques, mis en place depuis la fin des années 1940, parmi les bactéries pathogènes a mis en exergue le besoin urgent de développer de nouvelles stratégies pour la gestion des infections bactériennes. L'une des solutions envisagées il y a près d'un siècle est la phagothérapie, ou l'utilisation de virus capables d'infecter et tuer des bactéries pathogènes (65).

On sait aujourd'hui que le biofilm est le mode d'organisation quasi constant des communautés bactériennes *in vivo*. Or le biofilm est une barrière pour les anticorps et les antibiotiques, les bactéries quiescentes n'étant pas sensibles aux antibiotiques. Le traitement antibiotique isolé ne peut donc pas guérir une infection installée (5). Un objectif majeur est donc de développer de nouveaux antimicrobiens capables de contourner les mécanismes de résistance aux biofilms (136).

Plusieurs études ont montré la lyse de bactéries orales par des bactériophages lytiques spécifiques ou par leurs protéines intrinsèques ; la nature complexe et récalcitrante des infections de la cavité buccale suggère que les bactériophages pourraient être considérés comme des outils thérapeutiques potentiels pour l'élimination des foyers infectieux (65).

Les bactériophages sont principalement de 2 types : virulents, et capables de tuer les bactéries par lyse, ou tempérés, intégrés dans le génome de leur hôte sous forme de prophage, capable de s'exciser et de produire un cycle lytique en cas de stress pour la cellule bactérienne hôte (5).

Les bactériophages virulents présentent plusieurs avantages, notamment leur capacité d'auto-réplication sur le site de l'infection (66,137) permettant ainsi à une application unique de phage de contrôler l'infection bactérienne (66), et leur spécificité à une espèce bactérienne donnée permettant de laisser la flore bactérienne commensale intacte (66,137).

Des bactériophages lytiques actifs contre de plusieurs bactéries orales (*E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *S. aureus*,...) ont été découverts. L'efficacité des phages sur les cellules planctoniques, sur biofilm, *in vitro*, sur des modèles *ex vivo* ou *in vivo*, ainsi que leur innocuité est rapporté dans plusieurs études. Les pouvoirs curatif, mais aussi préventif des bactériophages sont soulignés (64,75,86,88,90). Ainsi, l'utilisation de phages soit en association avec un traitement antibiotique, en présence de bactéries sensibles aux antibiotiques, soit en monothérapie, pour l'élimination de bactéries résistantes aux antibiotiques, est envisagée par de nombreux auteurs (64,66).

Pendant la coévolution des bactéries et des phages à court terme, les bactéries modifient leurs structures de surface et les phages ont tendance à modifier leurs molécules d'adsorption. Ainsi, les mutations sont fréquentes, et peuvent provoquer une augmentation de l'infectivité des phages, comme l'ont montré plusieurs auteurs (71,108).

Les nombreux problèmes ayant entravé les applications antérieures de la thérapie par phages trouvent aujourd'hui des solutions. Par exemple, la gamme d'hôtes relativement étroite de la plupart des phages, peut être surmontée en isolant les phages ayant une large gamme d'hôtes au sein de l'espèce ciblée (75), en utilisant des combinaisons de phages entre eux ou avec d'autres agents antimicrobiens (77,84). La réduction des débris bactériens nocifs (contenant des endotoxines et des exotoxines) souvent présents dans les préparations de phages peut être obtenue en utilisant une centrifugation par densité de chlorure de césium pour purifier les préparations de phages. De plus, certains auteurs ont montré que les anticorps produits au cours de plusieurs mois d'injections répétées ne sont pas associés à l'anaphylaxie ni à d'autres effets indésirables. Et, si les phages doivent être utilisés de manière répétée, par exemple pour des infections chroniques, il est possible d'utiliser la sélection de phages ou le « phage display » pour trouver des variants de phages moins enclins à induire une réponse immunitaire (75).

Cependant, les bactériophages lytiques contre les bactéries orales peuvent parfois être difficiles à isoler ; ainsi certains auteurs tels que Hitch et ses collaborateurs ont tenté d'isoler des bactériophages de la cavité buccale, mais n'ont isolé et purifié qu'un bactériophage lytique pour *P. mirabilis* ; et cet organisme n'est généralement pas reconnu comme une espèce commensale de la cavité buccale (138). Dans une étude, Bachrach et ses collaborateurs ont également tenté d'isoler un bactériophage lytique contre des bactéries buccales : ces auteurs ont réussi à isoler un bactériophage contre les entérocoques, un organisme parfois présent dans le système canalaire des dents (139).

D'autres auteurs comme Machuca et ses collaborateurs ont réussi à isoler un phage d'un échantillon salivaire mais n'ont pas prouvé sa nature tempérée ou lytique (106).

Des bactériophages lytiques isolés n'ont parfois été que partiellement efficaces, ne parvenant sans doute pas à pénétrer les biofilms (88). Une réduction de la lyse des cellules en phase stationnaire est également soulignée et s'explique par différents points : la présence de moins de sites d'adsorption disponible pour les phages, moins de phages produits par infection et une réduction de la lyse cellulaire en raison de l'épaisseur de la paroi cellulaire ou de la multiplication des infections non viables (87).

Pour contourner la difficulté d'isoler des phages lytiques, certains auteurs ont tenté d'apporter des modifications génétiques à des bactériophages tempérés afin de leur donner un pouvoir virulent et ont obtenu des résultats encourageants (65,68,72). Ils ont, par exemple, pu élargir la gamme d'hôtes d'un phage par rapport au virus sauvage (68).

Hagens et ses collaborateurs soulignent que des modifications génétiques des phages filamenteux pour élargir leur gamme d'hôtes sont concevables et pourraient être utile à des fins thérapeutiques. L'utilisation d'un phage génétiquement modifié, non répliquant, non lytique, pour lutter contre les infections permettrait d'éviter certains effets secondaires tels que la libération d'endotoxines et de superantigènes par des bactéries (93).

Les phages en tant qu'outils antimicrobiens, doivent, avant tout essai clinique, faire l'objet d'une analyse biologique et génétique détaillée afin d'éviter des conséquences défavorables que pourraient avoir leur utilisation. Une solution attrayante pour utiliser un produit phagique sûr d'emploi et bien caractérisé est d'utiliser la synthèse biologique pour produire et concevoir des protéines à base de phage au lieu de particules de phage complètes. Les avantages sont que ces protéines présentent un spectre antibactérien plus large, une meilleure pénétration dans les tissus, une immunogénicité plus faible et une faible probabilité de résistance bactérienne (58).

Les protéines lytiques codées par les phages, telles que les endolysines et les peptidoglycanes hydrolases associées aux virions (VAPGH), sont prometteurs en tant qu'agents antimicrobiens (136).

Les biofilms peuvent contrer les agents antimicrobiens de deux manières: via la barrière physique (la matrice extracellulaire, qui empêche la pénétration d'agents antimicrobiens dans le biofilm) et via la communication bactérienne (qui consiste à stimuler les bactéries pour qu'elles produisent des enzymes et des protéines afin de maintenir l'homéostasie dans la communauté microbienne). La concentration bactéricide des antibiotiques dans le biofilm peut être 100 à 1000 fois supérieure à celle nécessaire pour éliminer des bactéries planctoniques (111). Idéalement, un agent anti-biofilm devrait pouvoir pénétrer dans la structure du biofilm, dégrader la matrice et éliminer les bactéries(136). Dans ce contexte, les protéines codées par les phages avec l'activité « polysaccharide dépolymérase » peuvent être utilisées pour empêcher la formation ou éliminer les biofilms en raison de leur capacité à dégrader la matrice polysaccharidique de la capsule bactérienne (5,57,65,72,136).

Certains phages portent des dépolymérases d'exopolysaccharides (EPS) sous forme de pointes ou de fibres de la queue, faisant partie de la particule virale, pour leur permettre d'atteindre la paroi cellulaire bactérienne. En conséquence, les phages provoquent une dégradation des EPS de la matrice du biofilm et de la capsule bactérienne ce qui aboutit à une infection cellulaire puis une lyse, menant à une perturbation du biofilm. Le principe de dépolymérisation des EPS en tant qu'agent de déstabilisation des biofilms a été utilisé pour la première fois à l'époque pré-antibiotique: les infections

à pneumocoques potentiellement mortelles chez les lapins et les singes étaient contrôlées par l'administration de dépolymérase partiellement purifiée (137).

Plus récemment, des auteurs ont montré l'efficacité de dépolymérase sur la perturbation de biofilms ainsi que pour la prévention de la formation de biofilms staphylococciques (114,135). Olsen rapporte également une perturbation plus importante des biofilms statiques et dynamiques de *S. aureus* lors de l'utilisation synergique d'une dépolymérase et d'une endolysine (il a utilisé dans son étude une dépolymérase bactérienne) (114).

Un intérêt considérable s'est également manifesté au cours des 15 dernières années pour l'utilisation des lysines de bactériophage dans la thérapie antimicrobienne spécifique à une espèce (113). Certains auteurs ont démontré que les endolysines présentent une activité anti-biofilm et, dans certains cas, ont prouvé leur capacité à tuer les cellules persistantes (136). Une caractéristique unique des endolysines est leur spécificité (111). La spécificité des phages peut être un inconvénient, car la plupart des phages ne serait pas efficace en cas d'infection polymicrobienne (66). Cependant, certains phages présentent une large gamme d'hôtes (73), et il a été montré que l'endolysine d'un phage avait généralement un spectre lytique plus large que son phage d'origine. Par exemple, l'endolysine du phage IME-EF1 présente un spectre bactéricide plus étendu que son bactériophage parental, et est active contre 2 souches d'*E. faecalis* résistantes à la vancomycine (74).

Les lysines peuvent être créées/modifiées afin de leur conférer de nouvelles propriétés, comme améliorer ou modifier leur spectre d'activité (63,128). De nombreux auteurs ont notamment travaillé sur la lysine modifiée ClyR ayant une gamme d'hôtes étendue et une activité robuste contre la plupart des espèces de streptocoques (*S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. pneumoniae*, *S. suis*, *S. sobrinus*, mais aussi contre *S. mutans* planctoniques et en biofilm). Son efficacité a également été démontrée contre des espèces d'entérocoques telles que *E. faecalis*, et de staphylocoques (y compris des MRSA et VISA. De plus, ClyR présente l'avantage de n'avoir qu'une activité mineure contre les streptocoques oraux inoffensifs *S. sanguinis*, *S. oralis* et *S. salivarius*) (110–113). D'autres auteurs comme Dong rapporte la construction d'une lysine chimérique, à partir de 2 lysines natives, dont le spectre d'activité est plus large que celui des lysines mères (128).

Becker et ses collaborateurs ont construit une peptidoglycane hydrolase (PGH) de fusion, dégradant simultanément les parois cellulaires de *S. aureus*, au niveau de trois liaisons uniques dans la structure hautement répétitive du peptidoglycane (PG). L'attaque par une PGH au niveau de la paroi cellulaire du pathogène confère l'avantage d'éviter la plupart des mécanismes de résistance intracellulaire (par exemple, les pompes à efflux). Les PGH dérivés d'endolysines de bactériophages présentent l'avantage supplémentaire de co-évolution avec les bactéries, leur permettant de cibler des liaisons que la cellule hôte ne peut pas modifier facilement, donnant des enzymes théoriquement réfractaires au développement de résistances. Avec plusieurs domaines dégradant le PG (glycosidase, endopeptidase et amidase) dans une molécule, il existe une diversité considérable et souvent une spécificité à l'espèce de ces activités, garantissant une faible pression sélective sur les souches commensales co-résidentes, ce qui réduit encore le potentiel de développement de résistances chez des espèces non ciblées. Les PGH sont également non toxiques, biodégradables, efficaces sur les biofilms et les souches multi-résistantes, et agissent en synergie avec les antibiotiques, offrant donc un potentiel important pour le traitement des souches multi-résistantes (63).

Des lysines de chaque agent pathogène majeur à Gram positif ont été isolées et caractérisées. Des modèles d'efficacité *in vivo* correspondants ont été décrits pour plusieurs de ces enzymes (111). Les endolysines ont notamment montré une activité antibactérienne et antibiofilm *in vitro* et *in vivo* sur les streptocoques et des staphylocoques retrouvés dans la cavité buccale (117,118,121,123,124,131,132).

La structure des endolysines phagiques diffère généralement entre les enzymes ciblant les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, ce qui reflète les différences d'architecture de la paroi cellulaire entre ces principaux groupes bactériens. Les endolysines actives contre les bactéries Gram-positif utilisent

une conception modulaire dans laquelle l'activité catalytique et la reconnaissance de substrat sont séparées en deux domaines fonctionnels distincts appelés domaines de liaison à la paroi cellulaire (CBD) et domaines d'activité enzymatique (EAD). L'EAD confère le mécanisme catalytique de l'enzyme (c'est-à-dire le clivage de liaisons spécifiques au sein du PG bactérien), et le CBD sert de site de fixation de la lysine sur le peptidoglycane bactérien, et la maintient étroitement liée aux débris de la paroi cellulaire après la lyse de la cellule. Ceci empêcherait ainsi probablement la diffusion et la destruction ultérieure des cellules intactes environnantes qui n'ont pas encore été infectées par le phage (140).

Dans une étude sur *E. faecalis*, Chang et ses collaborateurs ont analysé l'efficacité isolée du domaine de liaison (CBD) et du domaine CHAP (équivalent du domaine EAD) en comparaison avec celle de la lysine mère mais n'ont pas trouvé d'effet bactéricide pour les domaines isolés (126). Cependant, d'autres auteurs rapportent une efficacité du domaine CHAP isolé de la lysine LysK (CHAP_K) sur des staphylocoques (115,141). Fenton rapporte ainsi la réduction de la formation de biofilms de *S. aureus* par CHAP_K (115). Yang et ses collaborateurs ont quant à eux montré qu'une protéine issue du CBD de la lysine PlyV12 était capable d'atténuer la virulence de *S. aureus* (120).

En revanche, les lipopolysaccharides et la lipoprotéine de Braun de la membrane externe des organismes à Gram négatif limite l'accès au peptidoglycane de l'extérieur. Les endolysines des phages infectant les hôtes à Gram négatif, sont pour la plupart de petites protéines globulaires à domaine unique, généralement dépourvues du module spécifique de la CDB (140). Les Artilylines[®] sont des lysines conçues pour obtenir une activité bactéricide élevée contre les bactéries à Gram négatif. Un peptide de déstabilisation du lipopolysaccharide est fusionné en N ou C-terminal de ces lysines, ce qui leur permet de passer à travers la membrane externe et atteindre le peptidoglycane où ils exercent leur action (142). Dans une étude récente, Briers et ses collaborateurs ont trouvé une Artilyline[®] possédant une activité antibactérienne efficace contre des souches multi-résistantes de *P. aeruginosa* (125).

En outre, des mycobactéries dont la paroi cellulaire est structurellement différente des bactéries à Gram positif et négatif, ont également été rapportées comme étant inhibées par les endolysines codées par les mycobactériophages. Les phages de mycobactéries produisent généralement deux enzymes lytiques, LysA et LysB. LysA est une peptidoglycane hydrolase, tandis que LysB coupe la liaison des acides mycoliques à la couche d'arabinogalactane et possède une activité lipolytique (142).

Dans une analyse comparative récente, Czaplowski et ses collègues ont classé les endolysines comme la classe alternative d'antibactériens présentant le potentiel le plus élevé en fonction de leur impact clinique et de leur faisabilité technique (111). Ils sont considérés comme des candidats idéaux pour plusieurs raisons: leur mode d'action et leur activité unique contre les bactéries persistantes (indépendamment du métabolisme actif de l'hôte), leur activité sélective contre les agents pathogènes Gram positifs, Gram négatifs et les mycobactéries, et le développement limité de la résistance signalé jusqu'à présent (142). Il convient cependant de rester prudent quant à leur administration car en dépit du succès démontré dans de nombreux modèles animaux, des problèmes potentiels liés à la pharmacocinétique et aux conséquences immunologiques restent à résoudre. Par conséquent, pour le développement initial de cette thérapeutique, une infection mono-espèce pour laquelle une lysine peut être appliquée par voie topique / orale est souhaitée (113).

CONCLUSION

La phagothérapie découverte il y a une centaine d'années est progressivement tombée dans l'oubli dans les pays occidentaux malgré des débuts prometteurs. Actuellement, elle suscite de nouveau l'intérêt en raison du nombre d'échecs croissant des traitements antibiotiques. Les bactériophages présentent les atouts incontestables d'être auto-répliquant et auto-limitant leur permettant de pouvoir être considérés comme des « médicaments intelligents ». De plus, le pouvoir bactéricide des phages virulents, la possibilité d'éliminer la bactérie pathogène sans altération de la flore endogène et le faible nombre d'effets indésirables observés permettent d'envisager la phagothérapie comme une alternative crédible à l'antibiothérapie ou en association avec les antibiotiques.

La réhabilitation de la phagothérapie nécessite cependant quelques étapes avant de pouvoir être effective. Les phages en tant qu'outils antimicrobiens doivent, avant tout essai clinique, faire l'objet d'une analyse détaillée en termes de biologie et de caractéristiques génétiques. Il est en effet nécessaire d'approfondir l'analyse des conséquences à long terme de la coévolution des phages administrés avec les bactéries, notamment la portée des phago-résistances et l'impact potentiel de la thérapie phagique sur l'évolution générale des bactéries, afin d'éviter des effets défavorables tels que l'augmentation de la virulence bactérienne et/ou une réponse adaptative à l'infection par le phage. D'autre part, il semble indispensable d'évaluer l'incidence des phages sur l'organisme, notamment leur interaction avec le système immunitaire à long terme. Ces explorations futures imposent de réaliser des recherches *in vitro*, et *in vivo*, chez l'animal et chez l'homme.

Grâce à la biologie synthétique et à l'ingénierie moléculaire, il est relativement facile de produire et de concevoir des protéines à base de phage. Les lysines phagiques ont montré de nombreuses propriétés intéressantes, telles qu'un spectre antibactérien plus large et une immunogénicité plus faible que leur phage d'origine, mais aussi une activité anti-biofilm, voire une capacité à tuer les cellules résistantes ou persistantes. Elles offrent également un large potentiel de modifications que l'on peut leur apporter pour leur conférer des propriétés d'intérêt. Bien qu'initialement considérées comme utiles uniquement contre les bactéries à Gram positif, les protéines phagiques ont aujourd'hui montré leur potentielle utilisation sur une plus large gamme d'hôtes (Gram -, mycobactéries), faisant d'elles des outils antibactériens très prometteurs.

La possibilité d'utilisation conjointe des différents types de phagothérapie avec des thérapeutiques plus conventionnelles comme l'antibiothérapie, permet à la phagothérapie de se positionner comme une thérapeutique prometteuse à développer durant les prochaines années.

Bibliographie

1. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Minireview Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. mars 2001;45(3):649-59.
2. Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, Mazure H. Bacteriophage prehistory. *Bacteriophage*. 2011;1(3):174-8.
3. Hankin ME. The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes. *Ann. Inst. Pasteur* 10:511-523 (1896). *Bacteriophage*. 1(3):117-26.
4. Sharma S, Chatterjee S, Datta S, Prasad R, Dubey D, Prasad RK, et al. Bacteriophages and its applications : an overview. *Folia Microbiol*. 2017;62:17-55.
5. Dublanchet A. La phagothérapie : Des virus pour combattre les infections : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Favre; 2017. 247 p.
6. Elbreki M, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, McAuliffe O, Coffey A. Bacteriophages and Their Derivatives as Biotherapeutic Agents in Disease Prevention and Treatment. *Journal of Viruses*. 2014;
7. Duckworth DH. Who discovered bacteriophage? *Bacteriological Reviews*. déc 1976;40(4):793-802.
8. Dublanchet A, Fruciano E. Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine et maladies infectieuses*. 26 sept 2008;38:415-20.
9. Dublanchet A, Bourne S. The epic of phage therapy. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. janv 2007;18(1):15-8.
10. Dublanchet A. Autobiographie de Félix d'Hérelle Les pérégrinations d'un bactériologiste. Editions médicales internationales. Tec Et Doc; 2017. 348 p.
11. Hérelle FD. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compt Rend Acad Sciences Paris*. 1917;165:373-5.
12. Bordet J, Ciuca M. Exsudats leucocytaires et autolyse microbienne transmissible. *Compt rend Soc biol*. 1920;
13. Bordet J. The theories of the bacteriophage. *Royal Society*. 1931;107(752).
14. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Annals of Burns and Fire Disasters*. mars 2015;XXVIII(1):13-20.
15. Grossi O. Evaluation de l'efficacité d'une suspension de bactériophages anti-staphylococciques. Corrélation in vivo- in vitro. Université de Nantes; 2006.
16. Häusler, T. Viruses Vs. Superbugs : A Solution to the Antibiotics Crisis? 2016. 298 p.
17. Dublanchet A. La phagothérapie au XXIe siècle. Première partie : que pourrait-elle apporter aujourd'hui ? *Antibiotiques*. 2008;(10):209-18.
18. Dublanchet A. Qu'est-ce que la phagothérapie ? *Hegel*. 2014;4(4):354-70.
19. Krueger AP, Scribner EJ. The bacteriophages : its nature and its therapeutic use. *JAMA*. 10 mai 1941;116(19):2160-7.
20. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol*. 8 déc 2010;1.

21. Gonzales J. Il y a cinquante ans naissait la streptomycine. In: Histoire des sciences médicales. 1994. p. 239-48.
22. Chanishvili N, Chanishvili T, Tediashvili M, Barrow PA. Phages and their application against drug-resistant bacteria. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 19 juin 2001;76(7):689-99.
23. Courtault J. Place de la phagothérapie dans le traitement des infections humaines bactériennes : intérêts, enjeux et limites. Université de Bordeaux; 2014.
24. Pollitzer R, Swaroop S, Burrows W, World Health Organisation. Cholera / R. Pollitzer ; with a chapter on world incidence, written in collaboration with S. Swaroop, and a chapter on problems in immunology and an annex, written in collaboration with W. Burrows. World Health Organization; 1959.
25. Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol*. 20 sept 1952;36(1):39-56.
26. Linn S, Arber W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci U S A*. avr 1968;59(4):1300-6.
27. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1977;74(12):5463-7.
28. Ackermann H-W. Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*. 1 mai 2003;154(4):245-51.
29. Faou A-LL. Précis de virologie humaine. Doin; 2012. 419 p.
30. Luria SE, Anderson TF. The identification and characterization of bacteriophages with the electron microscope. 1942.
31. Gilmore B. Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. *Expert review of anti-infective therapy*. mai 2012;10(5):533-5.
32. Yap ML, Rossmann MG. Structure and function of bacteriophage T4. *Future Microbiol*. oct 2014;1319-27.
33. Dublanchet A, Patey O. La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation). *Immuno-analyse et biologie specialisee*. 2011;4(26):165-75.
34. Dufour N, Chevallereau A, Debarbieux L. Les bactériophages : comment ces virus alliés fonctionnent-ils? *Biofutur*. févr 2016;373:31-4.
35. Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Rüger W. Bacteriophage T4 genome. *Microbiol Mol Biol Rev*. mars 2003;67(1):86-156, table of contents.
36. Washizaki A, Yonesaki T, Otsuka Y. Characterization of the interactions between *Escherichia coli* receptors, LPS and OmpC, and bacteriophage T4 long tail fibers. *Microbiologyopen*. 2016;5(6):1003-15.
37. Hu B, Margolin W, Molineux IJ, Liu J. Structural remodeling of bacteriophage T4 and host membranes during infection initiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 sept 2015;112(35):E4919-4928.
38. Prescott LM, Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. *Microbiologie*. De Boeck Supérieur; 2018. 1122 p.
39. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011;1(2):66-85.

40. Yang H, Yu J, Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Front Microbiol.* 2014;5:542.
41. Touitou Y. *Pharmacologie.* Elsevier Masson; 2011. 380 p.
42. Keller R, Frank B, Engley J. Fate of Bacteriophage Particles Introduced into Mice by Various Routes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1 juill 1958;98(3):577-80.
43. Górski A, Wazna E, Dabrowska B-W, Dabrowska K, Switała-Jeleń K, Miedzybrodzki R. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* avr 2006;46(3):313-9.
44. Dubos RJ, Straus JH, Pierce C. The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. *J Exp Med.* 1 sept 1943;78(3):161-8.
45. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol.* févr 2006;296(1):5-14.
46. Evans AC. Inactivation of antistreptococcus bacteriophage by animals fluids. *Public Health Rep.* 21 avr 1933;48(16):411-36.
47. Bruttin A, Brüssow H. Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2005;49(7):2874-8.
48. Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol.* mai 1987;133(5):1111-26.
49. Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS. Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *J Virol.* juin 2002;76(11):5557-64.
50. Górski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Dąbrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, et al. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Adv Virus Res.* 2012;83:41-71.
51. Srivastava AS, Kaido T, Carrier E. Immunological factors that affect the in vivo fate of T7 phage in the mouse. *J Virol Methods.* janv 2004;115(1):99-104.
52. Miedzybrodzki R, Switala-Jelen K, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, Przerwa A, Lusiak-Szelachowska M, et al. Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus Res.* févr 2008;131(2):233-42.
53. Barfoot R, Denham S, Gyure LA, Hall JG, Hobbs SM, Jackson LE, et al. Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph. *Immunology.* oct 1989;68(2):233-9.
54. Górski A, Kniotek M, Perkowska-Ptasińska A, Mróz A, Przerwa A, Gorczyca W, et al. Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplant Proc.* févr 2006;38(1):331-3.
55. Zimecki M, Weber-Dabrowska B, Łusiak-Szelachowska M, Mulczyk M, Boratyński J, Poźniak G, et al. Bacteriophages provide regulatory signals in mitogen-induced murine splenocyte proliferation. *Cell Mol Biol Lett.* 2003;8(3):699-711.
56. Allan L. Delisle. Bacteriophage-encoded enzymes for the treatment and prevention of dental caries and periodontal diseases. US6635238B2, 2001.
57. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* mars 2016;100(5):2141-51.

58. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Curr Med Chem*. mai 2015;22(14):1757-73.
59. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology (Reading, Engl)*. nov 1998;144:3039-47.
60. Szafranski SP, Winkel A, Stiesch M. The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J Biotechnol*. 20 mai 2017;250:29-44.
61. Pastagia M, Euler C, Chahales P, Fuentes-Duculan J, Krueger JG, Fischetti VA. A novel chimeric lysin shows superiority to mupirocin for skin decolonization of methicillin-resistant and -sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2011;55(2):738-44.
62. Vouillamoz J, Entenza JM, Giddey M, Fischetti VA, Moreillon P, Resch G. Bactericidal synergism between daptomycin and the phage lysin Cpl-1 in a mouse model of pneumococcal bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents*. nov 2013;42(5):416-21.
63. Becker SC, Roach DR, Chauhan VS, Shen Y, Foster-Frey J, Powell AM, et al. Triple-acting Lytic Enzyme Treatment of Drug-Resistant and Intracellular *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep*. 2016;6.
64. Khalifa L, Brosh Y, Gelman D, Copenhagen-Glazer S, Beyth S, Poradosu-Cohen R, et al. Targeting *Enterococcus faecalis* biofilms with phage therapy. *Appl Environ Microbiol*. avr 2015;81(8):2696-705.
65. Tinoco JM, Buttaro B, Zhang H, Liss N, Sassone L, Stevens R. Effect of a genetically engineered bacteriophage on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Arch Oral Biol*. nov 2016;71:80-6.
66. Paisano AF, Spira B, Cai S, Bombana AC. In vitro antimicrobial effect of bacteriophages on human dentin infected with *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Oral Microbiol Immunol*. oct 2004;19(5):327-30.
67. Natkin E. Isolation and host range of bacteriophages active against human oral enterococci. *Arch Oral Biol*. mai 1967;12(5):669-80.
68. Zhang H, Fouts DE, DePew J, Stevens RH. Genetic modifications to temperate *Enterococcus faecalis* phage Ef11 that abolish the establishment of lysogeny and sensitivity to repressor, and increase host range and productivity of lytic infection. *Microbiology (Reading, Engl)*. juin 2013;159(Pt 6):1023-35.
69. Uchiyama J, Rashel M, Maeda Y, Takemura I, Sugihara S, Akechi K, et al. Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C as a therapeutic candidate. *FEMS Microbiol Lett*. janv 2008;278(2):200-6.
70. Uchiyama J, Rashel M, Takemura I, Wakiguchi H, Matsuzaki S. In silico and in vivo evaluation of bacteriophage phiEF24C, a candidate for treatment of *Enterococcus faecalis* infections. *Appl Environ Microbiol*. juill 2008;74(13):4149-63.
71. Uchiyama J, Takemura I, Satoh M, Kato S, Ujihara T, Akechi K, et al. Improved adsorption of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C with a spontaneous point mutation. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e26648.
72. Tinoco JM, Liss N, Zhang H, Nissan R, Gordon W, Tinoco E, et al. Antibacterial effect of genetically-engineered bacteriophage phiEF11/phiFL1C(delta36)PnisA on dentin infected with antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis*. *Arch Oral Biol*. oct 2017;82:166-70.

73. Parasion S, Kwiatek M, Mizak L, Gryko R, Bartoszcze M, Kocik J. Isolation and characterization of a novel bacteriophage ϕ 4D lytic against *Enterococcus faecalis* strains. *Curr Microbiol.* sept 2012;65(3):284-9.
74. Zhang W, Mi Z, Yin X, Fan H, An X, Zhang Z, et al. Characterization of *Enterococcus faecalis* phage IME-EF1 and its endolysin. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e80435.
75. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun.* janv 2002;70(1):204-10.
76. Ouennane S, Leprohon P, Moineau S. Diverse virulent pneumophages infect *Streptococcus mitis*. *PLoS ONE.* 2015;10(2):e0118807.
77. Dalmaso M, de Haas E, Neve H, Strain R, Cousin FJ, Stockdale SR, et al. Isolation of a Novel Phage with Activity against *Streptococcus mutans* Biofilms. *PLoS ONE.* 2015;10(9):e0138651.
78. Krause RM. Studies on bacteriophages of hemolytic streptococci. I. Factors influencing the interaction of phage and susceptible host cell. *J Exp Med.* 1 sept 1957;106(3):365-84.
79. Delisle AL, Rostkowski CA. Lytic bacteriophages of *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol.* sept 1993;27(3):163-7.
80. Maxted WR. The active agent in nascent phage lysis of streptococci. *J Gen Microbiol.* juin 1957;16(3):584-95.
81. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H, Kuroda M, Ujihara T, Shuin T, et al. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage phi MR11. *J Infect Dis.* 15 févr 2003;187(4):613-24.
82. Wills QF, Kerrigan C, Soothill JS. Experimental bacteriophage protection against *Staphylococcus aureus* abscesses in a rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2005;49(3):1220-1.
83. Hoshiba H, Uchiyama J, Kato S, Ujihara T, Muraoka A, Daibata M, et al. Isolation and characterization of a novel *Staphylococcus aureus* bacteriophage, phiMR25, and its therapeutic potential. *Arch Virol.* avr 2010;155(4):545-52.
84. Synnott AJ, Kuang Y, Kurimoto M, Yamamichi K, Iwano H, Tanji Y. Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities. *Appl Environ Microbiol.* juill 2009;75(13):4483-90.
85. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2007;51(8):2765-73.
86. Soothill JS. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol.* oct 1992;37(4):258-61.
87. Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Res Microbiol.* oct 2011;162(8):798-806.
88. Phee A, Bondy-Denomy J, Kishen A, Basrani B, Azarpazhooh A, Maxwell K. Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Endod.* mars 2013;39(3):364-9.
89. Soothill JS. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns.* juin 1994;20(3):209-11.

90. Watanabe R, Matsumoto T, Sano G, Ishii Y, Tateda K, Sumiyama Y, et al. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* févr 2007;51(2):446-52.
91. Heo Y-J, Lee Y-R, Jung H-H, Lee J, Ko G, Cho Y-H. Antibacterial efficacy of phages against *Pseudomonas aeruginosa* infections in mice and *Drosophila melanogaster*. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2009;53(6):2469-74.
92. McVay CS, Velásquez M, Fralick JA. Phage therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in a mouse burn wound model. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2007;51(6):1934-8.
93. Hagens S, Habel A, von Ahsen U, von Gabain A, Bläsi U. Therapy of experimental pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob Agents Chemother.* oct 2004;48(10):3817-22.
94. Vinodkumar CS, Kalsurmath S, Neelagund YF. Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Indian J Pathol Microbiol.* sept 2008;51(3):360-6.
95. Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, et al. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Infect Dis.* 1 avr 2010;201(7):1096-104.
96. Basu S, Agarwal M, Kumar Bhartiya S, Nath G, Kumar Shukla V. An In vivo Wound Model Utilizing Bacteriophage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Ostomy Wound Manage.* août 2015;61(8):16-23.
97. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, et al. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Med.* févr 2006;17(2):309-17.
98. Olszak T, Zarnowiec P, Kaca W, Danis-Wlodarczyk K, Augustyniak D, Drevinek P, et al. In vitro and in vivo antibacterial activity of environmental bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. *Appl Microbiol Biotechnol.* juill 2015;99(14):6021-33.
99. Wright A, 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. *Clin Otolaryngol.* août 2009;34(4):349-57.
100. Tylenda CA, Calvert C, Kolenbrander PE, Tylenda A. Isolation of *Actinomyces* bacteriophage from human dental plaque. *Infect Immun.* juill 1985;49(1):1-6.
101. Delisle AL, Nauman RK, Minah GE. Isolation of a bacteriophage for *actinomyces viscosus*. *Infect Immun.* avr 1978;20(1):303-6.
102. Delisle AL, Donkersloot JA, Kolenbrander PE, Tylenda CA. Use of lytic bacteriophage for *Actinomyces viscosus* T14V as a probe for cell surface components mediating intergeneric coaggregation. *Infect Immun.* janv 1988;56(1):54-9.
103. Delisle AL, Donkersloot JA. Relationships among *Actinomyces naeslundii* (*A. viscosus*) Bacteriophages Isolated from Sewage and the Oral Cavity. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 1 janv 1995;8(3):121-7.
104. Totsuka M. Studies on veillonellophages isolated from washings of human oral cavity. *Bull Tokyo Med Dent Univ.* déc 1976;23(4):261-73.
105. Hiroki H, Shiiki J, Handa A, Totsuka M, Nakamura O. Isolation of bacteriophages specific for the genus *Veillonella*. *Arch Oral Biol.* 1976;21(3):215-7.

106. Machuca P, Daille L, Vinés E, Berrocal L, Bittner M. Isolation of a novel bacteriophage specific for the periodontal pathogen *Fusobacterium nucleatum*. *Appl Environ Microbiol.* nov 2010;76(21):7243-50.
107. Meyers CE, Walter EL, Green LB. Isolation of a bacteriophage specific for a *Lactobacillus casei* from human oral material. *J Dent Res.* févr 1958;37(1):175-8.
108. Castillo-Ruiz M, Vinés ED, Montt C, Fernández J, Delgado JM, Hormazábal JC, et al. Isolation of a novel *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotype b bacteriophage capable of lysing bacteria within a biofilm. *Appl Environ Microbiol.* mai 2011;77(9):3157-9.
109. Aljarbou AN, Aljofan M. Genotyping, morphology and molecular characteristics of a lytic phage of *Neisseria* strain obtained from infected human dental plaque. *J Microbiol.* juill 2014;52(7):609-18.
110. Li W, Yang H, Gong Y, Wang S, Li Y, Wei H. Effects of a Chimeric Lysin against Planktonic and Sessile *Enterococcus faecalis* Hint at Potential Application in Endodontic Therapy. *Viruses.* 29 2018;10(6).
111. Xu J, Yang H, Bi Y, Li W, Wei H, Li Y. Activity of the Chimeric Lysin ClyR against Common Gram-Positive Oral Microbes and Its Anticaries Efficacy in Rat Models. *Viruses.* 20 2018;10(7).
112. Yang H, Linden SB, Wang J, Yu J, Nelson DC, Wei H. A chimeolysin with extended-spectrum streptococcal host range found by an induced lysis-based rapid screening method. *Sci Rep.* 26 nov 2015;5:17257.
113. Yang H, Bi Y, Shang X, Wang M, Linden SB, Li Y, et al. Antibiofilm Activities of a Novel Chimeolysin against *Streptococcus mutans* under Physiological and Cariogenic Conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(12):7436-43.
114. Olsen NMC, Thiran E, Hasler T, Vanzielegem T, Belibasakis GN, Mahillon J, et al. Synergistic Removal of Static and Dynamic *Staphylococcus aureus* Biofilms by Combined Treatment with a Bacteriophage Endolysin and a Polysaccharide Depolymerase. *Viruses.* 18 2018;10(8).
115. Fenton M, Keary R, McAuliffe O, Ross RP, O'Mahony J, Coffey A. Bacteriophage-Derived Peptidase CHAP(K) Eliminates and Prevents *Staphylococcal* Biofilms. *Int J Microbiol.* 2013;2013:625341.
116. O'Flaherty S, Coffey A, Meaney W, Fitzgerald GF, Ross RP. The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* oct 2005;187(20):7161-4.
117. van der Ploeg JR. Genome sequence of the temperate bacteriophage PH10 from *Streptococcus oralis*. *Virus Genes.* déc 2010;41(3):450-8.
118. Fischetti VA. Novel method to control pathogenic bacteria on human mucous membranes. *Ann N Y Acad Sci.* avr 2003;987:207-14.
119. Proença D, Leandro C, Garcia M, Pimentel M, São-José C. EC300: a phage-based, bacteriolysin-like protein with enhanced antibacterial activity against *Enterococcus faecalis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* juin 2015;99(12):5137-49.
120. Yang H, Xu J, Li W, Wang S, Li J, Yu J, et al. *Staphylococcus aureus* virulence attenuation and immune clearance mediated by a phage lysin-derived protein. *EMBO J.* 3 sept 2018;37(17).
121. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 27 mars 2001;98(7):4107-12.

122. Djurkovic S, Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic killing of *Streptococcus pneumoniae* with the bacteriophage lytic enzyme Cpl-1 and penicillin or gentamicin depends on the level of penicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* mars 2005;49(3):1225-8.
123. van der Ploeg JR. Characterization of *Streptococcus gordonii* prophage PH15: complete genome sequence and functional analysis of phage-encoded integrase and endolysin. *Microbiology (Reading, Engl).* oct 2008;154(Pt 10):2970-8.
124. Jun SY, Jung GM, Yoon SJ, Oh M-D, Choi Y-J, Lee WJ, et al. Antibacterial properties of a pre-formulated recombinant phage endolysin, SAL-1. *Int J Antimicrob Agents.* févr 2013;41(2):156-61.
125. Briers Y, Walmagh M, Van Puyenbroeck V, Cornelissen A, Cenens W, Aertsen A, et al. Engineered endolysin-based « Artilyns » to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens. *MBio.* 1 juill 2014;5(4):e01379-01314.
126. Cheng M, Zhang Y, Li X, Liang J, Hu L, Gong P, et al. Endolysin LysEF-P10 shows potential as an alternative treatment strategy for multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* infections. *Sci Rep.* 31 août 2017;7(1):10164.
127. Larpin Y, Oechslin F, Moreillon P, Resch G, Entenza JM, Mancini S. In vitro characterization of PlyE146, a novel phage lysin that targets Gram-negative bacteria. *PLoS ONE.* 2018;13(2):e0192507.
128. Dong Q, Wang J, Yang H, Wei C, Yu J, Zhang Y, et al. Construction of a chimeric lysin Ply187N-V12C with extended lytic activity against staphylococci and streptococci. *Microb Biotechnol.* mars 2015;8(2):210-20.
129. Drilling AJ, Cooksley C, Chan C, Wormald P-J, Vreugde S. Fighting sinus-derived *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro with a bacteriophage-derived muralytic enzyme. *Int Forum Allergy Rhinol.* avr 2016;6(4):349-55.
130. Uchiyama J, Takemura I, Hayashi I, Matsuzaki S, Satoh M, Ujihara T, et al. Characterization of lytic enzyme open reading frame 9 (ORF9) derived from *Enterococcus faecalis* bacteriophage phiEF24C. *Appl Environ Microbiol.* janv 2011;77(2):580-5.
131. Gutiérrez D, Ruas-Madiedo P, Martínez B, Rodríguez A, García P. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. *PLoS ONE.* 2014;9(9):e107307.
132. Sass P, Bierbaum G. Lytic activity of recombinant bacteriophage phi11 and phi12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol.* janv 2007;73(1):347-52.
133. Zhang Y, Cheng M, Zhang H, Dai J, Guo Z, Li X, et al. Antibacterial Effects of Phage Lysin LysGH15 on Planktonic Cells and Biofilms of Diverse Staphylococci. *Appl Environ Microbiol.* 1 août 2018;84(15).
134. Schuch R, Khan BK, Raz A, Rotolo JA, Wittekind M. Bacteriophage Lysin CF-301, a Potent Antistaphylococcal Biofilm Agent. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7).
135. Gutiérrez D, Briers Y, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, Lavigne R, et al. Role of the Pre-neck Appendage Protein (Dpo7) from Phage vB_SepiS-phiPLA7 as an Anti-biofilm Agent in Staphylococcal Species. *Front Microbiol.* 2015;6:1315.
136. Gutiérrez D, Fernández L, Martínez B, Ruas-Madiedo P, García P, Rodríguez A. Real-Time Assessment of *Staphylococcus aureus* Biofilm Disruption by Phage-Derived Proteins. *Front Microbiol.* 2017;8:1632.
137. Cornelissen A, Ceysens P-J, T'Syen J, Van Praet H, Noben J-P, Shaburova OV, et al. The T7-related *Pseudomonas putida* phage ϕ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLoS ONE.* 19 avr 2011;6(4):e18597.

138. Hitch G, Pratten J, Taylor PW. Isolation of bacteriophages from the oral cavity. *Lett Appl Microbiol.* 2004;39(2):215-9.
139. Bachrach G, Leizerovici-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. Bacteriophage isolation from human saliva. *Lett Appl Microbiol.* 2003;36(1):50-3.
140. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol.* oct 2012;7(10):1147-71.
141. Horgan M, O'Flynn G, Garry J, Cooney J, Coffey A, Fitzgerald GF, et al. Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Appl Environ Microbiol.* févr 2009;75(3):872-4.
142. Gerstmans H, Rodríguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. From endolysins to Artilysin®s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochem Soc Trans.* févr 2016;44(1):123-8.

Annexes

Annexe 1 : Liste des autres bactéries utilisées dans l'article référence (106).

Fusobacterium nucleatum subsp. *polymorphum* (2 souches), *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* (2 souches dont ATCC 25586) et *F. nucleatum* subsp. *vincentii*
Fusobacterium necrophorum ATCC 25286 et *F. species*
Propionibacterium acnes
Actinomyces naeslundii
Bacteroides urealyticus et *B. vulgatus* ATCC 8482
Eubacterium limosum et *E. lentum*
Aggregatibacter actinomycetemcomitans
Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 et *P. endodontalis*
Prevotella nigrescens et *P. intermedia*
Peptostreptococcus anaerobius
Streptococcus mutans ATCC 25175, *S. sanguinis* et *S. pyogenes*
Escherichia coli DH5 α
Pseudomonas aeruginosa et *P. oxytoca*
Proteus mirabilis et *P. vulgaris*
Klebsiella pneumoniae
Salmonella enterica serovar *Typhimurium* (ATCC 14028) et *S. enterica* serovar Typhi (TY2)
Staphylococcus aureus ATCC 43330 et *S. epidermidis* ATCC 14990
Bacillus cereus

Annexe 2 : Liste des autres bactéries utilisées dans l'article référence (108).

A. actinomycetemcomitans serotype c (4 souches)
Fusobacterium nucleatum ATCC25586, *F. nucleatum* subsp. *nucleatum* (3 isolats cliniques) et *F. nucleatum* subsp. *polymorphum*
Fusobacterium necrophorum ATCC25286
Bacteroides vulgatus ATCC8482 et *B. ureolyticus*
Porphyromonas gingivalis (ATCC 33277 + 3 isolats cliniques) et *P. endodontalis*
Prevotella intermedia (3 isolats cliniques) et *P. nigrescens* (2 isolats cliniques)
Streptococcus mutans ATCC25175 et *S. sanguinis*
Propionibacterium acnes (4 isolats cliniques)
Actinomyces naeslundii
Eubacterium limosun et *E. lentum*
Streptococcus pyogenes (2 isolats cliniques) et *S. agalactiae* (2 isolats cliniques)
Staphylococcus aureus (ATCC43330 + 2 isolats cliniques)
Staphylococcus epidermidis (ATCC14990 + 3 isolats cliniques)
Escherichia coli (2 isolats cliniques)
Salmonella enterica sv. Typhi CT18 (2 isolats cliniques), *S. enterica* sv. *Typhimurium* ATCC14028s et *Salmonella Typhimurium*
Proteus vulgaris (2 isolats cliniques) et *P. mirabilis* (2 isolats cliniques)
Klebsiella pneumoniae (2 isolats cliniques) et *K. oxytoca* (2 isolats cliniques)

Collège des Sciences de la Santé

UFR des Sciences Odontologiques

Serment

En présence de mes Maîtres et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de l'art dentaire.

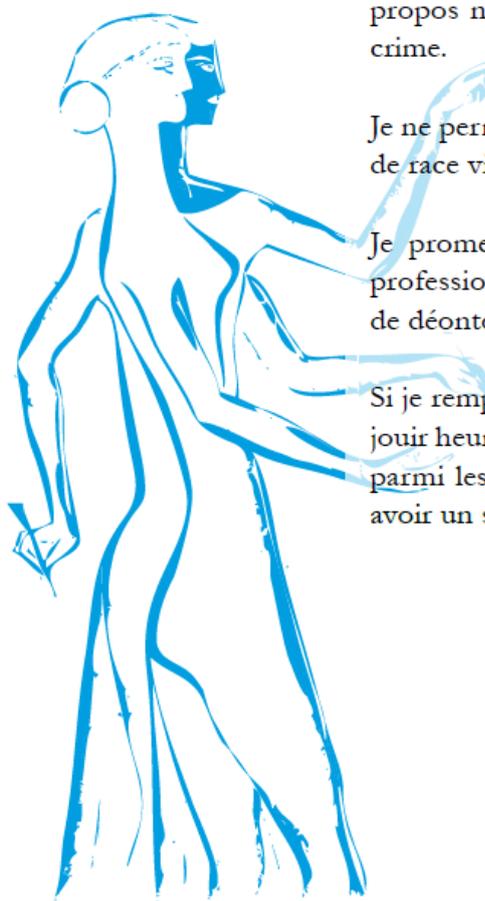
Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un honoraire au-dessus de mon travail. Ma langue taira les secrets qui me seront confiés. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Mes connaissances et mon état ne serviront ni à diffuser des propos non avérés, ni à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des conditions de croyance, de nation et de race viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je promets et je jure de conformer strictement ma conduite professionnelle aux principes et aux règles prescrites par le code de déontologie.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.



Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, la Directrice de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

Titre : La phagothérapie orale**Résumé :**

Les bactériophages sont des virus spécifiques des bactéries, découverts il y a plus d'un siècle et utilisés très rapidement en thérapeutique. Le clivage politique Est/Ouest à la fin de la seconde Guerre Mondiale a influencé les stratégies de développements médicaux dans chacun des deux « camps ». Les efforts furent alors concentrés sur les antibiotiques en occident. Mais le mésusage de ces antibiotiques comme le peu de nouvelles molécules développées par les firmes pharmaceutiques conduisirent à l'émergence de résistances. L'explosion récente du nombre de cas de bactéries résistantes aux antibiotiques actuels a justifié la nécessité de trouver des solutions thérapeutiques alternatives. Dans ce contexte, la phagothérapie revient sur le devant de la scène. De plus en plus d'essais cliniques menés à travers le monde tendent à prouver l'efficacité antibactérienne élevée des phages lytiques testés sur des modèles animaux. Le développement de la biologie moléculaire et de la biologie de synthèse a ouvert de nouvelles possibilités ; il n'est désormais plus envisagé uniquement d'utiliser les phages entiers mais aussi de concevoir des phages modifiés et des protéines recombinantes dérivées de phages. Des performances encourageantes ont été notées notamment pour les enzymes phagiques dont les plus étudiées à l'heure actuelle sont les polysaccharides dépolymérase, impliquées dans la dégradation de la capsule bactérienne et de la matrice extracellulaire du biofilm, et les endolysines, responsables de la dégradation du peptidoglycane. Bien que de nombreuses étapes restent à franchir avant de voir la phagothérapie dans l'arsenal thérapeutique disponible, cette piste est prometteuse.

Mots clés : Bactériophage, Thérapie phagique, Oral, Biofilm oral, Bactérie orale, Infection orale

Title : Oral phagotherapy**Abstract :**

Bacteriophages are viruses specific to bacteria, discovered more than a century ago and used very quickly in therapy. The East/West political divide at the end of the Second World War influenced medical development strategies in each of the two "camps". Efforts were then focused on antibiotics in the West. But the misuse of these antibiotics as well as the lack of new molecules developed by pharmaceutical companies led to the emergence of resistance. The recent explosion in the number of bacterial resistance to current antibiotics has justified the need to find alternative therapeutic solutions. In this context, phage therapy is back in the spotlight. More and more clinical trials around the world tend to prove the high antibacterial efficacy of lytic phages tested in animal models. The development of molecular and synthetic biology has opened up new possibilities; it is no longer envisaged to use whole phages but to design modified phages and recombinant proteins derived from phages. Encouraging performances have been observed in particular for phage enzymes, the most studied at present being polysaccharides depolymerases, involved in the degradation of the bacterial capsule and extracellular matrix of biofilm, and endolysins, responsible for peptidoglycan degradation. Although many steps remain to be taken before phage therapy can be seen in the available therapeutic arsenal, this is a promising avenue.

Keywords : Bacteriophage, Phage therapy, Oral, Oral biofilm, Oral bacteria, Oral infection

U.F.R. SCIENCES ODONTOLOGIQUES

Site Carreire

146 rue Léo Saignat

33076 Bordeaux