

Le bactériophage au service de notre santé: phagothérapie, production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par " Phage display " et utilisation diagnostique en tant que détecteur de bactéries

Lucie Allard

▶ **To cite this version:**

Lucie Allard. Le bactériophage au service de notre santé: phagothérapie, production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par " Phage display " et utilisation diagnostique en tant que détecteur de bactéries. Sciences du Vivant [q-bio]. 2020. dumas-02938084

HAL Id: dumas-02938084

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02938084

Submitted on 14 Sep 2020

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

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

université de BORDEAUX

UNIVERSITE DE BORDEAUX

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2020 Thèse n° 75

Thèse pour l'obtention du

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par ALLARD Lucie

Née le 31/05/1993 à SALLANCHES

Le 6 Juillet 2020 à Bordeaux

LE BACTERIOPHAGE AU SERVICE DE NOTRE SANTE :

Phagothérapie, production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par « Phage display » et utilisation diagnostique en tant que détecteur de bactéries

Sous la direction du Professeur Véronique DUBOIS

Membres du jury

Mme Véronique DUBOIS	PU-PH, Docteur en Pharmacie, Présidente du jury
Mme Océane MARTIN	MCU en microbiologie
Mr Erick TURCAT	Pharmacien titulaire, Maître de stage

REMERCIEMENTS

A notre Président du Jury et Directeur de thèse,

Madame le Professeur Véronique Dubois

Professeur des Universités à l'UFR de Pharmacie de Bordeaux
Praticien-Hospitalier
Docteur en Pharmacie

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger cette thèse et du grand honneur que vous me faites en présidant ce jury de thèse.

Je vous suis reconnaissante pour votre disponibilité et votre patience pour corriger mon travail, ainsi que pour votre pédagogie, votre gentillesse et votre bienveillance lors de mes années d'études. Je me souviendrai de la qualité de vos enseignements.

Soyez assurée de mes remerciements les plus sincères, et de ma reconnaissance.

A notre membre du jury,

Madame le Docteur Océane MARTIN

Maitre de conférences en Microbiologie Clinique associée à l'UFR de pharmacie de Bordeaux
Docteur en Pathologie, toxicologie, génétique et nutrition

Je vous suis reconnaissante de l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger au sein de ce jury.

Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

A notre membre du jury et à mon maître de stage,

Monsieur Erick TURCAT,

Docteur en Pharmacie et pharmacien titulaire

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté de siéger dans ce Jury et de m'avoir permis de réaliser mon stage de fin d'études au sein de votre officine.

Je me souviendrai de votre bienveillance à mon égard et de la bonne humeur que vous m'avez apportée tout au long de ces mois de stage.
Je vous suis reconnaissante pour tous vos conseils et vos enseignements lors de mon stage à vos cotés. Merci de m'avoir communiqué votre passion envers le métier de pharmacien.

Soyez assurée de mon estime et de mon respect.
Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Merci à l'équipe de la Pharmacie TURCAT à Carbon-Blanc,

Merci pour vos conseils, votre expérience et tous ces bons moments passés ensemble. J'en garderai un excellent souvenir.

A ma famille, mes parents et mes frères et sœurs, Clément, Hélène et ma sœur jumelle Coline,

Merci de m'avoir soutenue pendant ces 4 années de reprise d'études et d'avoir cru en moi. Merci d'être toujours là pour moi.

A Coline en particulier,

Merci d'être toujours à mes cotés malgré la distance. Merci de ton soutien sans faille et de ton écoute. Rien ne serait possible sans toi.

A Gauthier,

Merci d'avoir été à mes cotés pendants ces 4 années d'études et de me soutenir pendant mes moments de doutes. Merci d'être toujours présent pour moi.

A la Team Pharma,
Merci pour ces 4 ans de travail ensemble, mais aussi de rire, de soutien mutuel et d'amitié.

SOMMAIRE

Remerciements……2

Table des figures et des tableaux……5

Liste des abréviations……7

Introduction……8

I. PARTIE 1 : Le bactériophage 10

A. Historique et découverte des bactériophages 10

B. Structure et classification 13

1. Structure 13

2. Classification 15

C. Spécificité et reconnaissance des bactéries 16

1. Spécificité d'hôte 16

2. Reconnaissance des bactéries 16

D. Les cycles phagiques 17

1. Cycle lytique 18

2. Cycle lysogénique 20

II. PARTIE 2 : La phagothérapie, un traitement oublié en réponse à l'antibiorésistance 22

A. Historique de l'utilisation des phages en tant qu'agent antimicrobien chez l'homme 22

1. Premières utilisations chez l'homme 22

2. La phagothérapie en Europe de l'ouest 24

3. Promotion de la phagothérapie en Europe de l'est 27

B. Caractéristiques des phages en tant qu'agents antimicrobiens chez l'homme 28

1. Caractéristiques essentielles 29

2. Caractéristiques secondaires 32

C. Recherches, essais cliniques et quelques cas cliniques 36

1. Cas cliniques d'usage à titre compassionnel 36

2. Essai clinique PhagoBurn 38

3. Bactériophages génétiquement modifiés 40

D. Limites de la phagothérapie 42

1. Résistance 42

2. Risque de choc septique 44

3. Spécificité 44

4. Contact bactériophage-bactérie 45

5. Réglementation 45

III. Partie 3 : Production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par « Phage display » 46
A. Les anticorps monoclonaux 47
1. Structure d'un anticorps 47
2. Génétique d'un anticorps 49
3. Fragments variables d'anticorps 50
4. Différents types d'anticorps monoclonaux thérapeutiques 51
B. Le phage filamenteux M13 53
1. Structure du phage filamenteux 53
2. Cycle chronique du phage filamenteux 54
C. Principe de la production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par la technique du « Phage display » 57
1. Fabrication des banques de fragments d'anticorps 57
2. Sélection de fragments d'anticorps par « Phage display » et production d'anticorps monoclonaux 62
D. Anticorps monoclonaux disponibles en officine 63
1. Cibles et anticorps monoclonaux en officine 64
2. Effets indésirables et contre-indications 66
3. Prescription et délivrance 66
IV. Partie 4 : Utilisation des phages en tant que détecteurs de bactéries 67
A. Surveillance sanitaire des eaux et des produits alimentaires 68
1. Détection de bactéries pathogènes dans les eaux 68
2. Détection de bactéries pathogènes en agro-alimentaire 73
B. Les phages dans le diagnostic médical 74
1. Diagnostic de la tuberculose à l'aide de mycobactériophages 74
2. Diagnostic de la maladie de Lyme 76
Conclusion 76
Bibliographie 77
Serment de Galien 87

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : Plages de lyse d'un bactériophage virulent infectant une souche de *Pseudomonas aeruginosa* recouvrant un support gélosé(7). 11
Figure 2 : Félix D'Hérelle et ses collaborateurs, vers 1919, probablement à l'institut Pasteur, Paris. De la collection de l'auteur(11). 12
Figure 3 : Microscopie électronique des phages représentatifs de l'ordre des Caudovirales. Le phage TP901-1 de *Lactococcus lactis* (famille des Siphoviridae). Le phage KSY1 de *Lactococcus lactis* (famille des Podoviridae). Le phage T4 de *Escherichia coli* (famille des Myoviridae) et sa représentation schématique(3). 14
Figure 4 : Classification de Baltimore(21). 15
Figure 5 : schéma de la paroi d'une bactérie Gram+(24). 17
Figure 6 : schéma de la paroi d'une bactérie Gram-(24). 17
Figure 7 : Schéma du cycle lytique du phage T4(30). 20
Figure 8 : Schéma du cycle de vie du bactériophage tempéré lambda(31). 21
Figure 9 : Spécialité Bacté-Staphy-Phage® dans le dictionnaire VIDAL de 1973(37) 24
Figure 10 : Timbre-poste imprimé et commercialisé par La Poste en 2001, France : Le siècle au fil du timbre. Sciences : La pénicilline(43) 25
Figure 11 : Proportion des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération en 2009 (à gauche) et en 2017 (à droite)(45,46). 26
Figure 12 : Effets du phage fMR11 sur la survie, en fonction de la dose, contre une infection à *Staphylococcus aureus* chez la souris(51). 29
Figure 13 : Concentration d'*E. coli* et de bactériophage dans le sang (a)(52). 30
Figure 14 : Effet des phages sur la production d'ERO par des granulocytes induite par des bactéries. 34
Figure 15 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques » (PAS) avec le phage ϕMFP sur Escherichia coli MFP. 35
Figure 16 : Cicatrisation d'une infection ostéo-articulaire, avant traitement par phages (gauche) et après traitement par phages (droite)(69). 38
Figure 17 : Logo de l'essai clinique PhagoBurn(72). 39
Figure 18 : *M. abscessus* (~ 10^8 UFC ml-1 ; CFU=UFC) a été dilué en série au dixième en 11 répétitions, associant l'ajout d'aucun phage ou l'ajout de phage aux concentrations indiquées (PFU=UFP). Les cultures ont été incubées à 37 ° C pendant 24 h et des aliquotes de 3 µl ont été étalées sur un milieu solide et incubées pendant 7 jours. Ces tests ont été répétés au moins trois fois avec des résultats similaires(75). 41
Figure 19 : Fonction pulmonaire exprimée en pourcentage prévu du VEMS (bleu) et de la capacité vitale forcée (CVF; rouge)(75). 42
Figure 20 : Structure protéique d'une immunoglobuline IgG. Les sphères représentent les différents domaines des chaines légères et lourdes de l'anticorps. La spécificité de liaison est déterminée par les domaines VH et VL (Fv). Dans le zoom du domaine variable VL on observe les 3 régions hypervariables CDR(100). 48
Figure 21 : Recombinaison V(D)J : réarrangement des segments de gènes codant les domaines variables mode des chaines lourdes et légères(100). 50
Figure 22 : A) Digestion protéolytique d'un anticorps IgG par la papaïne. B) Représentation schématique des différents fragments d'anticorps variables: Fab, Fv et scFv(101,102). 51
Figure 23 : Représentation schématique des différents types d'anticorps monoclonaux. Les zones jaunes représentent les parties murines et les zones bleues les parties humaines(103). 53
Figure 24 : Microscopie électronique du phage M13(105). 53

Figure 25 : Représentation schématique du bactériophage filamenteux M13, porteur d'un chromosome à ADN simple brin (ssDNA). Le génome code 11 protéines dont 5 sont des protéines de capside (G3P, G6P, G7P, G8P et G9P)(107). 54
Figure 26 : Infection d'*Escherichia coli* par le phage M13. La protéine phagique G3P se lie à la pointe du pilus F sur *E. coli*. La dépolymérisation du pilus F transporte le phage à la surface de la bactérie, où il interagit avec le récepteur TolA, médiateur de la translocation du génome du phage(107). 55
Figure 27 : Synthèse du cycle chronique du phage M13 56
Figure 28 : Différents phages M13. Le rectangle et les sphères noirs correspondent respectivement au gène étranger et à ses protéines codées. Ici les protéines sont fusionnées soit à la protéine G3P, soit à la protéine G8P(109). 58
Figure 29 : Vecteur phagemide 59
Figure 30 : Schéma récapitulatif de la création de phages exprimant à leur surface un fragment d'anticorps(94). 60
Figure 31 : Création d'une banque combinatoire 61
Figure 32 : Etapes de la sélection de fragments d'anticorps par « Phage display » et de la production d'anticorps monoclonaux(94,107). 63
Figure 33 : Qualité de l'eau de baignade du site Saint-Michel en Loire Atlantique vu sur le site baignades.gouv.fr (138). 69
Figure 34 : Concentrations en coliphages en fonction des concentrations en coliformes (*E.coli*) dans l'ensemble des milieux hydriques(140). 71
Figure 35 : Concentrations en virus pathogènes infectieux en fonction des concentrations en coliphages(140) 71
Figure 36 : Schéma général de la détection de bactéries pathogènes dans les eaux grâce à l'outil Phagosensor(144). 73
Figure 37 : Schéma général de la détection de bactéries pathogènes avec l'outil VIDAS® UP. 74
Figure 38 : Test de détection de *M.tuberculosis* par amplification de mycobactériophages(134). 75
Figure 39 : Test de détection de *M.tuberculosis* par mycobactériophages rapporteurs(134) 76

Tableau 1 : Vue d'ensemble des différentes familles de bactériophages et leurs caractéristiques. 14
Tableau 2 : Décès survenant dans des groupes de souris infectées par voie intracérébrale avec *E.coli*, puis traitées intramusculairement soit avec le phage R(K12.K1+) actif sur la souche soit par antibiotiques(50) 28
Tableau 3 : Mortalité chez les poulets infectés par *E. coli* K11 avec et sans administration de phages(52). 30
Tableau 4 : Mortalité du poisson zèbre causée par des souches de *Flavobacterium columnare* non résistantes ou résistantes aux phages. 43

Liste des Abréviations

ACm : Anticorps monoclonal
ADN : Acide désoxyribonucléique
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messager
ARS : Agence Régionale de Santé
ATU : Autorisation temporaire d'utilisation
BPF : Bonnes pratiques de fabrication
CDR : Complementary Determining Regions
CNCPI : Compagnie Nationale des Conseils en Propriété Industrielle
CPM : Coups par minute
CSST : Comité scientifique spécialisé temporaire
CVF : capacité vitale forcée
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA : European Medicines Agency
ERO : Espèce réactives de l'oxygène
Fab : fragment antibody binding)
Fc : fragment constant
Fv : Fragment variable
Gram+ : Bactérie à coloration de GRAM positive
Gram- : Bactérie à coloration de GRAM negative
ICTV : International Commitee on Taxonomy of Viruses
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
IL : Interleukine
INSERM : Institut national de la santé et de la recherche médicale
LPS : Lipopolysaccharides
MOI : multiplicity of infection
OMS : Organisation mondiale de la santé
ORL : Oto-Rhino-Laryngée
Pb : paire de bases
ROSP : Rémunération sur Objectifs de Santé Publique
SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline
TCR: Toll like receptor
TNF-alpha : Tumor necrosis factor alpha
UFC : Unité formant colonie
UFP : Unité formant plage de lyse
UV : Ultra violet
VEMS: Volume expiratoire maximal par seconde

INTRODUCTION

Les bactériophages ou phages sont des entités particulières très peu connues du grand public, même pour de nombreux professionnels de santé. Pourtant, leur découverte remonte à la fin du XIX^{ème} siècle. Les bactériophages sont présents dans tous les environnements naturels et en grande quantité. Ce sont des virus qui ne s'attaquent qu'aux bactéries et leur diversité est exceptionnelle, tant au niveau de leur morphologie que de leur cycle d'infection. Chaque phage a la particularité primordiale d'être spécifique d'une espèce de bactérie voire d'une sous espèce de bactéries et toutes ces caractéristiques confèrent aux phages de nombreuses applications d'intérêt dans le domaine de la santé.

Les infections bactériennes, par exemple, sont un problème connu de santé publique, majoritairement traitées de nos jours par les antibiotiques, qui ont révolutionné la prise en charge de ces infections bactériennes. Cependant, la recrudescence des résistances aux antibiotiques et l'absence de nouvelles molécules dans ce domaine mettent la communauté scientifique dans l'obligation de trouver des alternatives thérapeutiques. Les bactériophages rentrent alors en scène. En effet, la phagothérapie, soit « soigner par les phages », est un traitement des infections bactériennes par ces entités. Cette thérapie à l'historique compliqué et oublié en Occident, revient ainsi au goût du jour avec de nombreuses recherches et essais cliniques que nous détaillerons.

Le rôle des phages dans la santé ne s'arrête évidemment pas là, aujourd'hui, de nombreux anticorps monoclonaux sont produits à l'aide des bactériophages. Ces anticorps, qui représentent une révolution dans la prise en charge de nombreuses pathologies, peuvent ainsi être produits par la technique du « Phage Display », un processus biotechnologique basé sur l'utilisation de phages particuliers que nous allons approfondir par la suite. De plus, parmi plus de 30 anticorps monoclonaux commercialisés en France, 16 sont disponibles en officine et le pharmacien a donc un rôle important à jouer dans la délivrance de ces spécialités que nous décrirons.

Enfin, bien que les phages possèdent de nombreuses autres applications, nous terminerons de traiter ce sujet en exposant le rôle des phages en tant que détecteurs de bactéries. La spécificité phage-bactérie permet en effet la détection d'agents pathogènes pour l'homme dans différents milieux. Nous détaillerons cette utilisation dans le domaine de la sécurité sanitaire des eaux et des aliments ainsi que dans celui de la médecine humaine pour le diagnostic de maladies.

I. PARTIE 1 : Le bactériophage

Les bactériophages, ou phages, sont des virus infectant spécifiquement les bactéries et pouvant provoquer leur destruction. Ils possèdent les caractéristiques des virus et sont donc des parasites obligatoires(1,2).

Les bactériophages sont présents dans tous les habitats où prolifèrent des bactéries.
On estime qu'ils sont les entités les plus largement distribuées et diversifiées dans la biosphère. Ils ont un rôle essentiel dans l'écologie, dans l'évolution des populations bactériennes et leurs nombreuses applications potentielles en font un outil d'intérêt(3).

A. Historique et découverte des bactériophages

La découverte des bactériophages fut une péripétie longue et mouvementée, ponctuée de rebondissements.

Tout commença en 1896, quand Ernest Hanbury Hankin observa lors de ses études en Inde qu'il existait une substance dans les eaux des fleuves de la Jumma et du Gange qui permettait de guérir du cholera. Il pensa donc que cette substance était capable de détruire le *Vibrio cholera* lorsqu'elle est ingérée. Néanmoins, à l'époque, il pensait qu'il s'agissait d'une substance chimique volatile(4).

Une vingtaine d'années plus tard, l'anglais Frederick Twort et le Franco-canadien Félix D'Hérelle firent la découverte des bactériophages indépendamment l'un de l'autre et furent considérés tout deux comme étant les scientifiques ayant révélé les bactériophages.
En 1915, le microbiologiste Frederick Twort observa un phénomène de bactériolyse dans son milieu de culture bactérienne. Il pensa alors que cette manifestation etait due à des virus(5). Malheureusement, c'est seulement après les travaux pionniers de Félix D'Hérelle que la communauté scientifique reconnut que Twort parlait en fait des bactériophages.

En 1917, le microbiologiste Félix D'Hérelle remarqua lors de ses travaux de recherches, des « taches vierges » à la surface de ses cultures bactériennes de coccobacille sur gélose(6). Ces « taches vierges » de bactéries sont des plages de lyse. Une plage de lyse est une zone circulaire de discontinuité dans un tapis bactérien, où l'on observe la destruction des bactéries poussant auparavant sur la gélose. Chaque plage de lyse correspond à l'infection des bactéries par un bactériophage lytique (Figure 1)(7).



Figure 1 : Plages de lyse d'un bactériophage virulent infectant une souche de *Pseudomonas aeruginosa* recouvrant un support gélosé(7).

Quand il travaillait au laboratoire de l'institut Pasteur (Figure 2), D'Hérelle devait isoler des souches de bacille dysentérique en raison d'une légère épidémie sévissant à l'époque. Sur les cultures sur gélose du bacille, il observa à nouveau des plages de lyse. De plus, il remarqua que les plages de lyse apparaissaient lorsque les bactéries étaient issues des fèces de patients en voie de guérison(8). Suite à cette observation, Félix D'Hérelle crut avec certitude qu'il s'agissait d'un « microbe invisible » doté de la capacité de lyser les bactéries et d'ainsi permettre la guérison de patients infectés(6,9).
Le terme de « bactériophage » a alors été inventé par D'Hérelle lui-même en 1917, et il en a donné l'explication dans ses mémoires en écrivant(10):

« J'avais vu, des bacilles dysentériques dévorés par un « microbe de microbe »… Finalement, de cette collaboration, c'est bactériophage qui sortit : mot formé de bactéria et de phagein, en grec « manger ». ».



Figure 2 : Félix D'Hérelle et ses collaborateurs, vers 1919, probablement à l'institut Pasteur, Paris. De la collection de l'auteur(11).

Cependant, son concept du bactériophage en tant que virus de bactéries n'a pas été accepté par tous. Les scientifiques de l'époque ont contesté cette vision, comme Jules Bordet, qui a reçu un prix Nobel en 1919 pour son travail sur l'effet bactériolytique de certains composants du sérum. Les chercheurs pensaient donc que l'action lytique associée au bactériophage venait en fait de l'activation d'une autocatalyse induite par des enzymes lytiques endogènes à la bactérie(12). Jules Bordet pensait même que les phages étaient des produits de la bactérie elle-même, des enzymes lytiques plutôt que des particules virales. Il défia plusieurs fois D'Hérelle, notamment en utilisant les travaux de Twort, qui pour lui appuyaient sa thèse. C'est pour cela qu'on appela cette polémique la « controverse Twort-D'Hérelle » qui dura une dizaine d'années(13).

D'Hérelle fit donc des recherches complémentaires pour contrer ces critiques et caractériser la nature biologique des bactériophages(14). Il nota que ces entités pouvaient se multiplier indéfiniment mais qu'elles avaient besoin de bactéries vivantes pour cela, et que cette multiplication était nécessaire à la lyse de la bactérie. C'étaient donc des parasites intracellulaires. Il montra également que les bactériophages avaient une spécificité d'hôte. Toutes ces recherches ont été en faveur d'une théorie particulaire virale(15).

Cette controverse cessa à la fin des années 30, quand la communauté scientifique admit la nature virale du bactériophage. Enfin, la création du microscope électronique en 1940 a rendu incontestable la théorie de D'Hérelle(14).

B. Structure et classification

1. Structure

Les bactériophages étant des virus, ils en possèdent de nombreuses caractéristiques. Ils sont constitués d'acide nucléique, de l'ADN double brin principalement, ou de l'ADN simple brin, ou de l'ARN simple ou double brin. Cet acide nucléique est enfermé dans une capside, soit une coque de protéines ou de lipoprotéines. La taille de leur génome est très variable, allant de quelques milliers de paires de bases, codant pour une douzaine de gènes, à presque 500 000 paires de bases.

En ce qui concerne leur morphologie, les bactériophages sont extrêmement hétérogènes, ils peuvent être polyédriques, cubiques, filamenteux ou encore pléomorphes. D'ailleurs, ces différentes morphologies sont l'une des caractéristiques principales des bactériophages, et sont utilisées pour leur classification comme nous le verrons plus bas. Les bactériophages avec une capside polyédrique possèdent souvent une tête, la capside elle-même, et une queue. Cette queue peut être contractile (famille des Myoviridae), longue et non-contractile (famille des Siphoviridae) ou courte et non-contractile (famille des Podoviridae). C'est cette queue qui permet aux bactériophages de se fixer aux bactéries et de les infecter(16).

Les phages virulents appartenant aux familles des Myoviridae, Siphoviridae et Podoviridae font partie de l'ordre des Caudovirales (Figure 3). L'ordre des Caudovirales est de loin le plus grand et le plus prédominant groupe de bactériophages(3,17).Les virions de l'ordre des Caudovirales comportent une capside protéique, entourant un ADN double brin linéaire et possédant une symétrie binaire (tête et queue) puisque leur tête a une symétrie cubique et leur queue une symétrie hélicoïdale.

Le phage T4 (Figure 3) fait partie de l'ordre des Caudovirales et est le principal représentant de la famille des *Myoviridae*. De ce fait, il a été largement étudié et fait partie intégrante de tout enseignement sur les bactériophages. Il mesure environ 150nm et infecte la bactérie *Escherichia coli.* Il se compose d'une capside cubique renfermant un ADN double brin et d'une queue contractile avec une plaque terminale munie de crochets et de fibres. La queue de ce phage est une gaine contractile avec un tube creux en son centre. Les crochets et les fibres permettent au bactériophage T4 de se fixer aux bactéries.

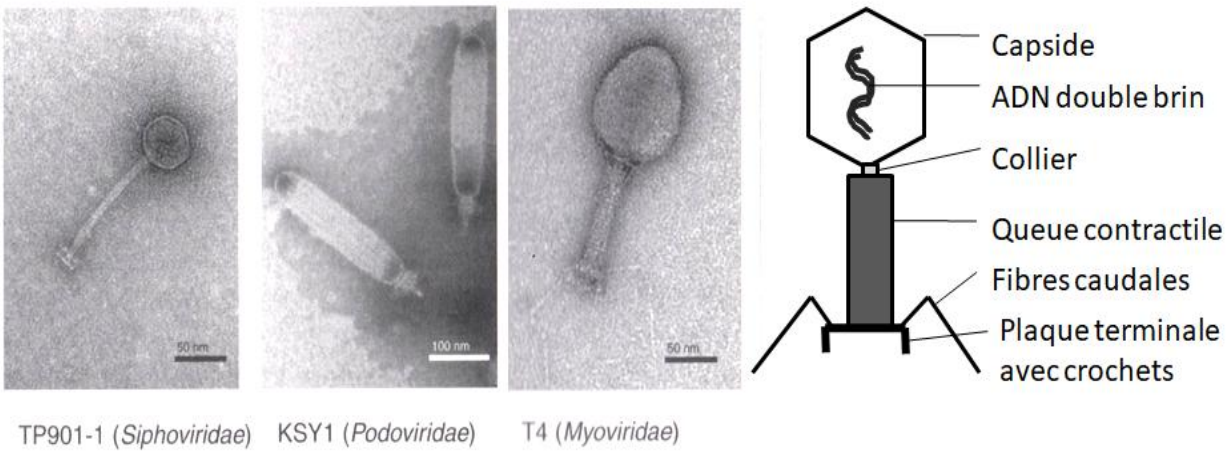


Figure 3 : Microscopie électronique des phages représentatifs de l'ordre des Caudovirales. Le phage TP901-1 de *Lactococcus lactis* (famille des Siphoviridae). Le phage KSY1 de *Lactococcus lactis* (famille des Podoviridae). Le phage T4 de *Escherichia coli* (famille des Myoviridae) et sa représentation schématique(3).

Bien que cette structure binaire soit largement représentée dans la nature, il existe d'autres structures et on retrouve ainsi quatre classes morphologiques : les bactériophages binaires, les bactériophages cubiques, les bactériophages hélicoïdaux et les bactériophages complexes (Tableau 1)(18). De plus, certains phages possèdent une enveloppe, soit une double couche lipidique responsable de leur fragilité face à un solvant organique(16).

Forme	Famille	Symétrie	Acide nucléique	Nombre
	Myoviridae	Binaire	ADN, db	1312
	Siphoviridae		ADN, db	3262
	Podoviridae		ADN, db	771
	Microviridae	Cubique	ADN, sb	38
	Corticoviridae		ADN, db	3
	Tectiviridae		ADN, db	19
	Leviviridae		ARN, ss	38
	Cystoviridae		ARN, db	3
	Inoviridae	Hélicoïdale	ADN, sb	66
	Plasmaviridae	Complexe	ADN, db	5

Tableau 1 : Vue d'ensemble des différentes familles de bactériophages et leurs caractéristiques. db=double brin ; sb=simple brin

Ainsi, ces milliers de bactériophages observés au microscope électronique ont pu être classés suivant leur morphologie : forme et dimension de la tête et de la queue, queue contractile ou non, nature de l'acide nucléique…

2. Classification

Au temps de D'Hérelle, les bactériophages étaient classés suivant leur spécificité d'hôte et leur taille, mais ce schéma fut mal accepté dans la communauté scientifique. Ce n'est que dans les années 60 qu'apparurent des systèmes de classification des virus se basant sur la **nature de l'acide nucléique**, la **morphologie** du phage (Capside plus ou moins une queue) et enfin la présence ou non d'une **enveloppe lipidique**(19).

Actuellement, il existe plusieurs types de classification des bactériophages :

- La classification principale et formelle est celle de l'***International Commitee on Taxonomy of Viruses*(ICTV)** soit le comité international de taxonomie des virus. Ce comité utilise une classification proche de celle utilisée pour les êtres vivants bien qu'il s'agisse ici de virus. Les bactériophages sont donc classés par ordre, famille, sous famille, genre et espèce(20). Cette classification est agrémentée de nouvelles familles lorsque cela est nécessaire.
- La classification de **Baltimore** (Figure 4), inventée par David Baltimore. Elle a servi de base pour la classification de l'ICTV et se base sur la nature de l'acide nucléique. Elle sépare les virus en 7 groupes : les virus à ADN simple brin, les virus à ADN double brin, les virus à ARN double brin, les virus à ARN simple brin de polarité négative, les virus à ARN simple brin de polarité positive, les rétrovirus à ARN simple brin et les rétrovirus à ADN double brin(21).

Virus à ADN
Groupe I - Virus à ADN à double brin Groupe II - Virus à ADN à simple brin
Virus à ARN
Groupe III - Virus à ARN à double brin Groupe IV - virus à ARN simple brin à polarité positive (Virus (+)ssARN ou de type ARN messager) Groupe V - virus à ARN simple brin à polarité négative
Virus à ADN ou à ARN à transcription inverse
Groupe VI - rétrovirus à ARN simple brin Groupe VII - rétrovirus à ADN double brin

Figure 4 : Classification de Baltimore(21)

La classification des bactériophages permet une identification simple et précise, et le regroupement, sous la forme d'un nom, de plusieurs données et informations relatives aux phages d'un même ordre ou d'une même famille(19).

C. Spécificité et reconnaissance des bactéries

1. Spécificité d'hôte

Tout d'abord, on a vu que les bactériophages étaient des virus spécifiques des bactéries, ils ne peuvent donc pas attaquer d'autres cellules, comme les cellules humaines.

De plus, ils ont la singularité de ne pouvoir infecter qu'une espèce bactérienne, voire la plupart du temps que seulement quelques souches de cette espèce (sous-espèces).
Néanmoins, il existe des virus infectant une large gamme d'hôtes, et pouvant réaliser des transductions non spécifiques dans l'environnement ; C'est-à-dire le transfert de matériel génétique d'une bactérie à l'autre. Cependant, on estime qu'ils ne dépassent pas 0,5% de la population totale des virus(22). Par ailleurs, il existe pour presque toutes les espèces bactériennes plusieurs bactériophages qui leurs sont spécifiques. Ceci, grâce à leur grande diversité. La bactériophagie peut donc s'appliquer aux bactéries Gram+ et Gram-,aux bactéries sporulées, acido-alcoolo résistantes, aérobies et anaérobies…(23)
Par exemple, les phages lambda et T5 appartenant à la famille des *Siphoviridae* infectent *E. coli*. Le phage P22 appartenant à la famille des *Podoviridae* infecte le genre *Salmonella*. Et enfin, le phage T4 de la famille des Myoviridae infecte également *E. coli.*

Un bactériophage ne va donc infecter qu'une bactérie qu'il reconnait et qui permet sa multiplication. On verra plus loin que cette spécificité est à la fois un avantage pour la sécurité humaine et un inconvénient pour la recherche de nouveaux phages.

2. Reconnaissance des bactéries

La spécificité d'hôte est due au fait que les bactériophages doivent se fixer à la bactérie pour pouvoir l'infecter. Cette fixation est possible grâce à la reconnaissance de motifs cibles à la surface des bactéries. Une infection est donc possible si les récepteurs bactériens nécessaires à la fixation des phages sont intègres.

Les bactériophages des bactéries Gram- ont moins de choix de potentiels sites de liaison que ceux des bactéries Gram+, qui peuvent utiliser de nombreuses structures sur la partie externe de la paroi élaborée par leurs hôtes. La plupart des bactériophages de bactéries Gram + caractérisés, semblent se fixer à l'acide téichoïque glycosilé, spécifique d'espèce, qui est intégré à la couche de peptidoglycane (Figure 5). Cet acide permet de fixer les bactériophages à la paroi bactérienne. Néanmoins, d'autres structures peuvent être utilisées, comme des éléments du peptidoglycane, l'acide lipotéichoïque ou des protéines membranaires.

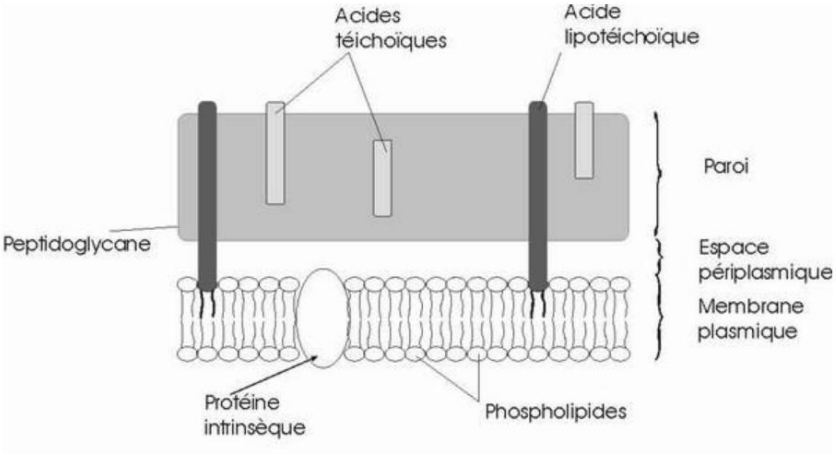


Figure 5 : schéma de la paroi d'une bactérie Gram+(24)

Les bactéries Gram- sont le plus souvent infectées par des bactériophages de l'ordre des Caudovirales, c'est-à-dire possédant une queue dotée de fibres (Figure 3). Ces infections suivent généralement le même schéma : les fibres de la queue rentrent en contact avec la membrane bactérienne et des protéines de la queue vont se fixer à un composant de la surface de la bactérie, comme la membrane externe, le flagelle, les pili, le lipopolysaccharide (LPS) ou encore les protéines membranaires (Figure 6)(25,26).

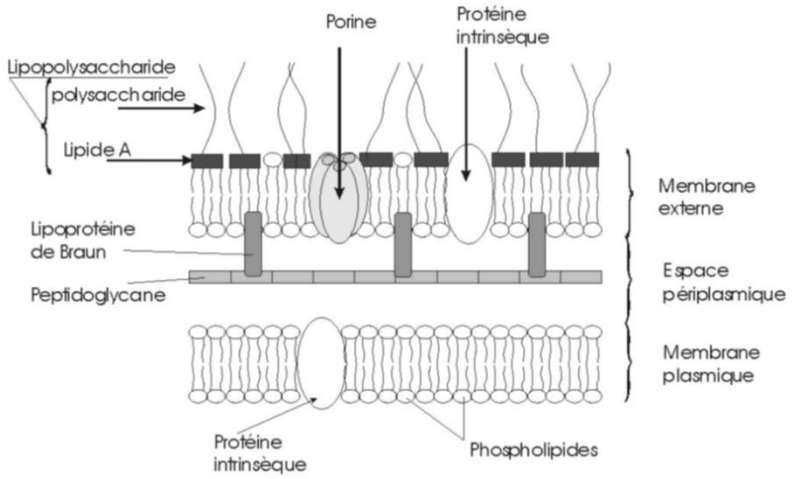


Figure 6 : schéma de la paroi d'une bactérie Gram-(24)

D. Les cycles phagiques

Les bactériophages comme tous les virus, sont des parasites obligatoires et leur multiplication dépend donc de l'infection d'une bactérie. Bien que leur génome porte toute l'information nécessaire pour réaliser leur propre multiplication, ils ont besoin de l'énergie et du matériel de leur hôte pour se reproduire : enzymes, ribosomes, nucléotides…

Il existe plusieurs types de cycle d'infection et de propagation des bactériophages. La grande majorité (90%) des bactériophages sont des phages virulents, c'est-à-dire possédant un **cycle lytique**. Les autres (10%) sont presque exclusivement des phages dit tempérés, qui possèdent un **cycle lysogénique**. Les phages lytiques sont donc considérés comme des « prédateurs », alors que les phages tempérés peuvent avoir des interactions à bénéfices mutuels avec leur hôte. Les phages lytiques seraient favorisés par une abondance de ressources en bactéries alors que la lysogénie devrait prévaloir lorsque les ressources sont rares(27).Il est aussi possible que la morphologie des phages soit liée à leur stratégie d'infection, puisque les *Siphoviridae* sont typiquement des phages tempérés, tandis que les *Myoviridae* sont majoritairement lytiques.

Nous traiterons uniquement ces deux cycles dans cette partie, bien qu'il existe de manière très marginale des phages intermédiaires, dit filamenteux, qui possèdent un cycle chronique et qui sont très utilisés dans le domaine des biotechnologies (Partie III)(23).

1. Cycle lytique

Les bactériophages lytiques ont la capacité de lyser les bactéries qu'ils infectent et donc de les tuer. Une fois qu'il a pénétré dans la bactérie, le phage va se répliquer immédiatement et terminer son cycle par une lyse bactérienne libérant des dizaines de nouveaux phages. Ces phages se multiplient avec un rythme indépendant du rythme de la bactérie (une division bactérienne par heure en moyenne), et peuvent produire en simultané des dizaines de clones de lui-même en quelques minutes. Cette multiplication exponentielle, contre une reproduction toutes les heures en moyenne pour une bactérie, mène immanquablement à une lyse bactérienne. Ces phages ne peuvent réaliser que des cycles lytiques et ne passent jamais par un modèle lysogénique. Cependant, ils ne sont pas capables de transporter des gènes et donc permettre l'échange d'information génétique entre les bactéries, à l'inverse des phages tempérés, ce qui, nous le verrons plus tard, est un avantage.

Le représentant sur lequel le plus de recherches ont été effectuées est le phage T4 (Figure 3) infectant *E.coli*. Son cycle de réplication est très bien étudié et est représentatif des cycles lytiques des autres bactériophages virulents. Son cycle peut se décomposer en cinq étapes que nous allons détailler (Figure 7)(23) :

- **Absorption**

Tout d'abord, une fibre du bactériophage va rentrer en contact par son extrémité avec la bactérie de manière aléatoire. Elle va alors se fixer aux motifs cibles spécifiques qu'elle peut reconnaitre à la surface de son hôte. Très vite, les autres fibres vont également s'ancrer fermement et permettre un arrimage du bactériophage sur la surface bactérienne(16,23,28).

❖ **Pénétration et injection du matériel génétique**

Après cette première étape d'absorption, une endolysine virale va percer un orifice dans la membrane bactérienne et permettre ainsi la pénétration de la queue du bactériophage dans le cytoplasme de la bactérie. Il y aura ensuite injection de l'acide nucléique, préalablement présent dans la capside du phage, à l'intérieur du cytoplasme bactérien par passage au travers de la queue du bactériophage(16,23,28).

❖ **Réplication**

Le génome viral va alors détourner le métabolisme bactérien à son profit. Une nucléase phagique va dégrader le génome bactérien, le rendant inutilisable. Il n'y aura donc plus de multiplication bactérienne, ni de production d'enzymes bactériennes. Le génome viral sera alors transcrit en ARNm puis traduit en protéines par les enzymes et ribosomes bactériens. Ceci grâce à la reconnaissance par les ARN polymérases de promoteurs forts du phage, qui vont permettre la transcription de gènes précoces puis secondairement leur traduction. Ces gènes précoces permettraient la protection du génome phagique et le détournement de la machinerie cellulaire de l'hôte nécessaire à la réplication de l'acide nucléique du phage. Les gènes tardifs codants pour les composants du phage seront ensuite transcrits et traduits(25). Tous le matériel phagique nécessaire à la création de nouveaux virions est ainsi créé(16,23,28).

❖ **Morphogenèse**

Il va ensuite se produire la morphogénèse, c'est-à-dire l'assemblage, des différents éléments du bactériophage : empaquetage du génome dans la capside pré-assemblée, fixation de la queue et des fibres. Cet assemblage spontané et organisé va produire des dizaines de phages identiques à celui ayant infecté la bactérie(16,23,28).

❖ **Lyse bactérienne**

Finalement, l'induction appropriée d'une endolysine soluble phagique va permettre la lyse cellulaire en détruisant la membrane bactérienne. Ces enzymes lytiques associées aux phages dégradent la couche de peptidoglycane et permettent la libération des phages nouvellement formés. La localisation de l'enzyme lytique dans le phage doit permettre un contrôle étroit de l'enzyme. En effet, une activité excessive et précoce de l'enzyme serait néfaste pour le phage, car elle pourrait affecter la viabilité globale de la cellule hôte en début d'infection. De cette façon, le phage n'aurait pas le temps de se multiplier de façon exponentielle. Les mécanismes d'induction de ces enzymes sont mal connus, il pourrait s'agir de clivages protéiques ou de réarrangements structuraux(29).

Cette lyse réalisée à un moment optimal, va libérer de façon soudaine plus d'une centaine de nouveaux phages opérationnels pour infecter de nouvelles bactéries(16,23,28).

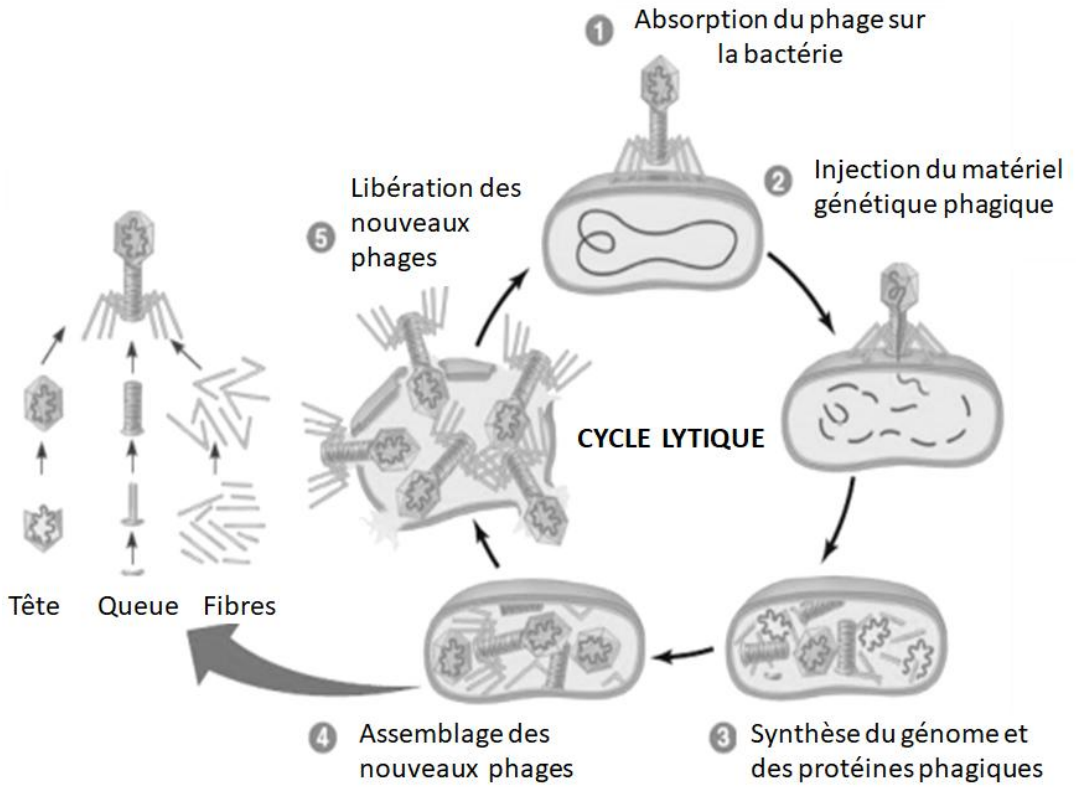


Figure 7 : Schéma du cycle lytique du phage T4(30)

Ces phages virulents avec leur cycle lytique sont ceux qui seront intéressants pour la phagothérapie, puisqu'ils conduisent à la destruction des bactéries qui leur sont spécifiques.

2. Cycle lysogénique

Comme pour le cycle lytique, le cycle lysogénique débute par la fixation d'un bactériophage sur une bactérie spécifique, la perforation de la membrane bactérienne et l'injection du matériel génétique du phage. Cependant, les bactériophages tempérés sont capables d'intégrer leur génome dans le chromosome bactérien. Ce génome phagique s'appelle alors un prophage. Ces phages possèdent donc la capacité de s'insérer dans la bactérie sans la lyser. Ce prophage va rester ainsi dans le génome bactérien et être répliqué et transmis lors des divisions cellulaires normales de la bactérie dans laquelle il est intégré (soit une division par heure en moyenne). Son cycle de multiplication est donc dépendant du cycle bactérien, à l'inverse de la réplication autonome des phages virulents.

Cette phase de lysogénie va persister jusqu'à activation du prophage de manière spontanée et rare, ou accélérée par un stimulus extérieur inducteur (UV, Rayon X, antibiotique…).

Celui-ci va alors s'exciser du chromosome bactérien et réaliser un cycle lytique comme vu précédemment (Figure 8).

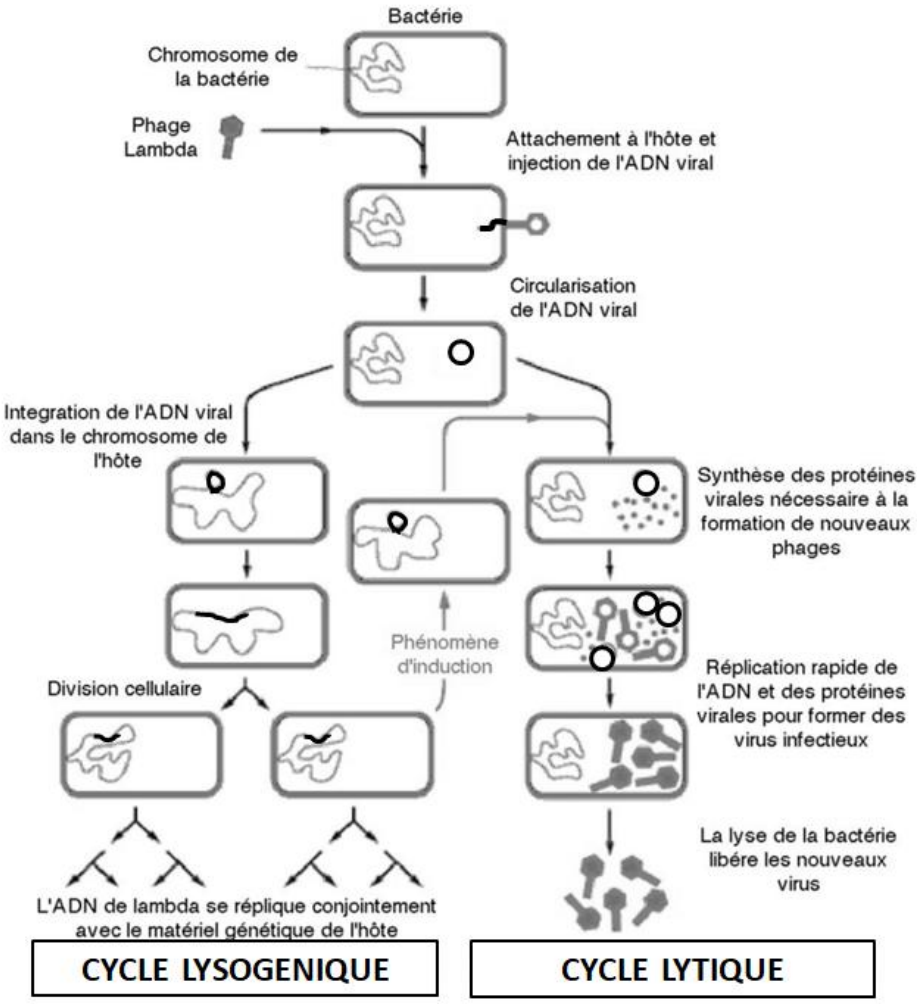


Figure 8 : Schéma du cycle de vie du bactériophage tempéré lambda(31)

Seulement, lorsque le prophage s'excise du chromosome bactérien avant d'entamer un cycle lytique, il peut amener avec lui une partie du chromosome bactérien, c'est ce que l'on appelle la transduction spécialisée. Le phage peut également emmener de l'ADN bactérien lors de son cycle lytique. En effet, après fragmentation du génome bactérien, le phage peut encapsider ses fragments lors de l'assemblage, c'est ce que l'on appelle la transduction généralisée(32). Ces phages peuvent ainsi permettre l'échange de matériel génétique entre les bactéries : c'est la transduction. Cette transduction d'ADN peut malheureusement concerner des gènes de résistance ou des gènes codant pour des facteurs pathogènes. C'est pour cela que les phages tempérés ne sont pas utilisés en phagothérapie(3,16,23,28).

Les phages tempérés réalisent donc deux cycles de multiplication : un cycle lysogène et un cycle lytique. Le représentant sur lequel le plus de recherches ont été effectuées est le phage lambda qui est très utilisé en biologie moléculaire dans les techniques de clonage.

Le bactériophage est donc une entité complexe aux multiples facettes. Sa diversité fait de lui un outil qui est utilisé dans de nombreux domaines, notamment en médecine.

II. PARTIE 2 : La phagothérapie, un traitement oublié en réponse à l'antibiorésistance

La phagothérapie, soit « soigner par les phages » en grec, est le traitement d'une infection bactérienne, par des bactériophages spécifiques de la bactérie en cause. Ainsi, ce sont les bactériophages virulents avec un cycle lytique qui sont utilisés et sont donc considérés comme des agents antimicrobiens.

En effet, ce sont les seuls à pouvoir conduire de manière rapide à la destruction de la bactérie et ils possèdent des caractéristiques très intéressantes pour cette thérapeutique. A l'inverse, les bactériophages tempérés avec un cycle lysogénique, sont en dormance à l'intérieur de la bactérie sous forme de prophage intégré au chromosome bactérien, et ils n'engendrent pas de lyse dans l'immédiat. De plus, ils peuvent être à l'origine de transduction de gènes pouvant être dangereux.

La phagothérapie est ancienne, mais l'arrivée des antibiotiques dans les années 40 a entrainé son abandon. Cependant, il y a eu, ces dernières années, un regain d'intérêt pour cette thérapie, à cause de l'émergence de résistances bactériennes aux antibiotiques, et du désintérêt des industries pharmaceutiques pour la recherche de nouveaux antibiotiques. En effet, cette situation a nécessité la recherche d'autres solutions thérapeutiques(33).

A. Historique de l'utilisation des phages en tant qu'agent antimicrobien chez l'homme

1. Premières utilisations chez l'homme

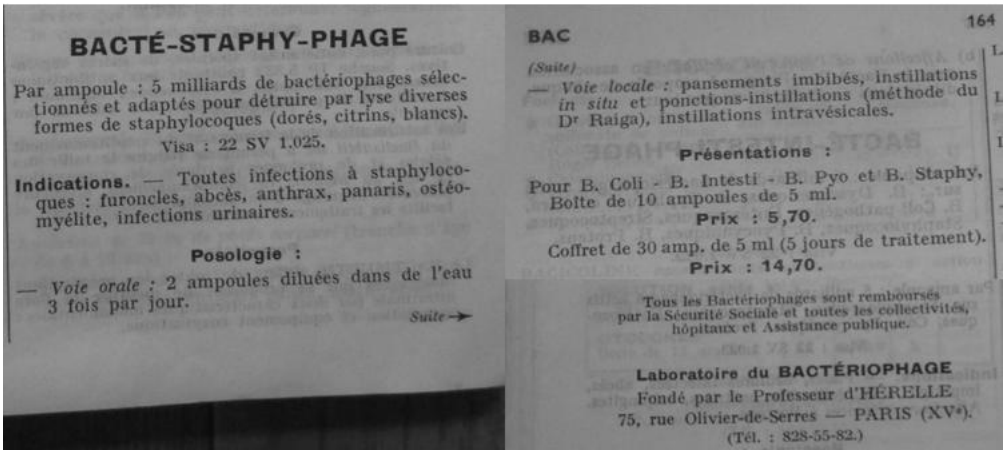
Nous avons vu précédemment que Frederik Twort et Félix D'Hérelle étaient à l'origine de la découverte des bactériophages et de leur pouvoir lytique. D'Hérelle, pendant ses expériences sur le bacille dysentérique, a ainsi observé l'action bactéricide des phages sur les bactéries. Ce fut donc une évidence pour lui d'utiliser des bactériophages spécifiques comme traitement curatif d'une infection bactérienne particulière(6).

Après avoir réalisé d'autres études sur les caractéristiques de son bactériophage et sur son innocuité (en le testant notamment sur lui-même et sur sa famille), il entreprit de traiter des enfants infectés par le bacille dysentérique à l'hôpital Necker à Paris, en 1919.

Cinq enfants furent ainsi guéris après ingestion de bactériophages(8). Puis, en Egypte, D'Hérelle isola des germes de bubons pesteux (Ganglions lymphatiques infectés par la bactérie *Yersinia pestis*) et sélectionna un bactériophage actif sur la souche en cause. L'injection de ses phages dans les bubons permit de guérir 4 pesteux.
Ces guérisons permirent l'essor de la phagothérapie et une montée d'intérêt internationale pour cette nouvelle forme de thérapie antibactérienne. Ainsi, suite à la demande de chercheurs, D'Hérelle fut impliqué en Inde pour traiter la peste bubonique et il y réalisa également une étude sur le choléra, dont les résultats furent très encourageants. Il cultivait en effet des bactériophages issus de patients en convalescence avant de les administrer aux malades(34). Cette étude nommée la « Cholera Study », mit en évidence un taux de mortalité de 8% pour les patients cholériques traités par bactériophages, contre 63% pour les non traités(35).

Cependant, l'intérêt soudain pour les bactériophages a conduit beaucoup de chercheurs de laboratoires, en Europe et même sur le continent Américain, à isoler et cultiver leurs propres bactériophages, sans vérification de leur efficacité ou dangerosité. Ceci engendra de nombreux échecs. De peur que tout cela ne discrédite la phagothérapie, D'Hérelle fonda son propre laboratoire d'études : « Le laboratoire du bactériophage » où il produisit des bactériophages actifs contre de nombreuses infections fréquentes. Il reprécisa alors dans son ouvrage « Le phénomène de la guérison dans les maladies infectieuses », qu'une préparation de bactériophages thérapeutiques demande des années d'études, pour échantillonner l'environnement, et isoler un mélange de bactériophages stables et les plus virulents possible, à l'encontre d'une espèce bactérienne donnée(36).

« Le laboratoire du bactériophage » a d'ailleurs produit et commercialisé des phages jusqu'à l'année 1978. On pouvait alors trouver en pharmacie les spécialités Bacté-Coli-Phage®, Bacté-Pyo-Phage®, Bacté-Rhino-Phage®, Bacté-Intesti-Phage® et Bacté-Staphy-Phage®. Pour exemple, la spécialité Bacté-Staphy-Phage®, dont une ampoule comportait 5 milliards de bactériophages, était utilisée pour les infections à Staphylocoques et indiquée pour le traitement des furoncles, d'abcès ou encore d'infections urinaires. L'ampoule était administrée par voie orale ou locale. Les dictionnaires Vidal de l'époque qui contenaient ces spécialités, précisaient aussi leur caractère remboursable par la sécurité sociale (Figure 9)(37).



BACTÉ-STAPHY-PHAGE

Par ampoule : 5 milliards de bactériophages sélectionnés et adaptés pour détruire par lyse diverses formes de staphylocoques (dorés, citrins, blancs).

Visa : 22 SV 1.025.

Indications. — Toutes infections à staphylocoques : furoncles, abcès, anthrax, panaris, ostéomyélite, infections urinaires.

Posologie :

— *Voie orale :* 2 ampoules diluées dans de l'eau 3 fois par jour.

Suite →

BAC 164

(Suite)

— *Voie locale :* pansements imbibés, instillations *in situ* et ponctions-instillations (méthode du Dr Raiga), instillations intravésicales.

Présentations :

Pour B. Coli - B. Intesti - B. Pyo et B. Staphy, Boîte de 10 ampoules de 5 ml.

Prix : 5,70.

Coffret de 30 amp. de 5 ml (5 jours de traitement).

Prix : 14,70.

Tous les Bactériophages sont remboursés par la Sécurité Sociale et toutes les collectivités, hôpitaux et Assistance publique.

Laboratoire du BACTÉRIOPHAGE

Fondé par le Professeur d'HÉRELLE

75, rue Olivier-de-Serres — PARIS (XV^e^).

(Tél. : 828-55-82.)

Figure 9 : Spécialité Bacté-Staphy-Phage® dans le dictionnaire VIDAL de 1973(37)

2. La phagothérapie en Europe de l'ouest

a) Perte d'intérêt pour la phagothérapie

Pendant les années 20 et les années 30, l'utilisation des bactériophages en thérapeutique s'est étendue rapidement en réponse à un besoin impératif de traitements antibactériens en Europe de l'ouest et aux Etats Unis. Cependant, avec le développement des antibiotiques au début des années 40 et leur utilisation généralisée, les premiers essais cliniques de phagothérapie furent abandonnés à l'ouest(38). En effet, quand les soldats Américains ont débarqué en France en Juin 1944, ils ont apporté avec eux les fameuses « Gommes à mâcher », les bas nylons et la pénicilline!

Le premier antibiotique s'appelait le Prontosil, fabriqué par Bayer dans les années 30 et utilisé notamment pour des infections à streptocoques et à méningocoques. C'était un sulfamide, et outre un spectre étroit, il possédait les effets indésirables de cette classe médicamenteuse de manière très marquée (allergie, pancytopénie, calculs urinaires..)(39,40).

Le premier antibiotique largement utilisé fut donc la pénicilline. Historiquement, Ernest Duchesne découvrit, à la fin du 19ème siècle, que la moisissure *Penicillium glaucum* était capable d'éliminer la bactérie *E.coli*(41). Puis, à la fin des années 20, Alexander Fleming remarqua fortuitement l'existence de zones sans colonie autour d'une contamination par un *Penicillium,* sur une culture sur gélose de staphylocoques. Il pensa donc que le champignon sécrétait une substance antimicrobienne, qu'il appela la « pénicilline »(Figure 10)(42).



Figure 10 : Timbre-poste imprimé et commercialisé par La Poste en 2001, France : Le siècle au fil du timbre. Sciences : La pénicilline(43)

Ainsi, l'arrivée de la pénicilline et d'autres molécules antibiotiques, appartenant à la même ou à d'autres familles chimiques, mirent un terme à la recherche sur la phagothérapie à l'Ouest. Ces molécules chimiques sont évidemment beaucoup plus faciles à produire, moins couteuses et plus faciles d'utilisation. Et il semblait, à l'époque, grâce à toutes les classes d'antibiotiques existantes, que tous types d'infections bactériennes pouvaient être guéries. Les bactériophages n'étaient alors plus utilisés que dans le domaine de la biologie moléculaire.

b) Regain d'intérêt pour la phagothérapie

Au cours du 20ème siècle, les antibiotiques ont été une révolution dans le traitement des infections bactériennes. Malheureusement, leur utilisation massive et parfois inadaptée, tant chez l'homme que chez l'animal, a engendré l'apparition de bactéries résistantes à ces molécules.

En effet, en France, la consommation d'antibiotiques en santé humaine a augmenté de 8,6% entre 2006 et 2016, bien que cette croissance tendait à s'inverser depuis la mise en place de la Rémunération sur Objectifs de Santé Publique (ROSP) en 2011. Selon l'INSERM, environ 700 000 personnes sont infectées par des bactéries résistantes aux antibiotiques chaque année en Europe, et 25 000 meurent à cause de ces résistances. Les résistances impliquées sont multiples, comme la résistance aux céphalosporines de 3ème génération chez *E.coli* qui à augmentée, de 2005 à 2015, de 3% en ville et de 10% en établissements de santé. Ou encore, la résistance à la méticilline chez le *Staphylococcus aureus* (SARM) et la résistance aux céphalosporines de 3ème génération chez *Klebsiella pneumoniae* qui ne cesse de se développer depuis plus de 10 ans(Figure 11)(44).

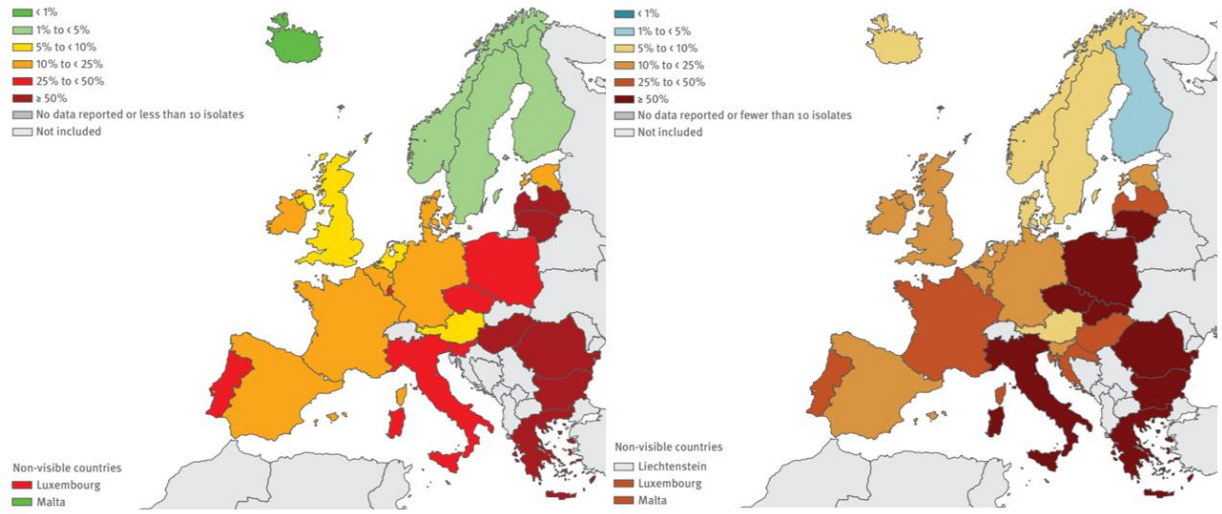


Figure 11 : Proportion des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes aux céphalosporines de 3ème génération en 2009 (à gauche) et en 2017 (à droite)(45,46)

Ainsi, avec la récente progression des résistances aux antibiotiques et le manque de recherches sur de nouveaux antibiotiques, la nécessité de trouver des nouvelles alternatives antibactériennes est devenue de plus en plus urgente. Un des objectifs est notamment de diminuer la consommation d'antibiotiques chez l'homme et chez l'animal. C'est le principe que prône l'OMS, « One health » (« Un monde, une santé »). En effet, les bactéries résistantes présentes chez les animaux d'élevage peuvent être transmises à l'homme, et les hommes, comme les animaux, par leurs déjections, peuvent également contaminer l'environnement(47). Il faut donc une vision globale du combat contre l'antibiorésistance.

Une autre des possibilités est, bien sûr, d'utiliser les bactériophages en tant qu'agents antibactériens. Cependant, la perspective d'utiliser la phagothérapie contre les infections bactériennes, et plus particulièrement celles causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques, est à nouveau un sujet de débats qui a suscité beaucoup de discussions et de controverses ces derniers temps. En effet, bien que la phagothérapie ait une longue histoire en Europe de l'est et dans l'ex Union Soviétique, les préparations phagiques doivent passer par un processus d'approbation rigoureux, par différents organismes, avant de pouvoir être commercialisées et utilisées pour soigner les humains en Occident(38).
Paradoxalement, il y a une conscience grandissante, en Europe de l'est et aux Etats Unis, du marché potentiel des bactériophages et de leur utilisation pour traiter les infections bactériennes humaines. Ainsi, des start-up américaines et roumaines en biotechnologie développent, produisent et obtiennent l'approbation réglementaire pour des préparations de phages thérapeutiques pour le traitement des infections résistantes aux antibiotiques(38).

En France, la start-up *Pherecydes Pharma* travaille depuis plus de dix ans sur des phages actifs contre les staphylocoques, *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli*, qu'elle sélectionne sur des souches multi-résistantes aux antibiotiques(48).

Ainsi, les bactériophages peuvent encore avoir un rôle important à jouer dans le traitement des infections bactériennes, dans les pays de l'Europe de l'ouest.

3. Promotion de la phagothérapie en Europe de l'est

En 1933, un ancien élève Géorgien de Félix D'Hérelle, Eliava, a créé, avec son aide, « the Eliava Institute of Bacteriophages », un centre mondial de recherche sur les phages et la thérapie par les phages à Tbilissi, en Géorgie. Ce fut donc le départ de l'engouement pour la phagothérapie dans les pays de l'Europe de l'est. Cet institut existe encore de nos jours et possède la plus grande collection de bactériophages au monde, et bénéficie d'un rayonnement mondial dans ce domaine(49).

Pendant la seconde guerre mondiale, et à cause de l'arrivée des antibiotiques à l'ouest, la phagothérapie a continué d'être utilisée et développée seulement en Europe de l'est, plus particulièrement en Union Soviétique, où les pays les plus actifs étaient la Russie, la Géorgie, la Pologne et la Roumanie.

Outre une division politique, il s'est donc opéré également un gouffre scientifique sur la manière de traiter les infections bactériennes : les antibiotiques à l'ouest et les bactériophages, plus utilisés à l'est, en complément de l'antibiothérapie.

Les bactériophages ont été utilisés avec succès dans les armées polonaise et russe pour traiter des blessures par balles infectées pendant la seconde guerre mondiale(38). Ainsi, alors que dans les pays occidentaux les phages ont été mis de côté, les pays de l'est n'ont cessé de développer la phagothérapie jusqu'à aujourd'hui(34).

Des phages actifs contre des bactéries responsables de maladies infectieuses du tube digestif (*E.coli* et *Salmonella spp.* par exemple) et de la peau (*Staphylococcus* et *Streptococcus*) peuvent ainsi être achetés dans les pharmacies russes. Ceci reflète les années de recherches effectuées dans l'ancien bloc soviétique, alors que nous avons vu qu'à l'ouest, la phagothérapie nécessite encore une évaluation définitive plus stricte. Ceci peut s'expliquer par le fait que les essais cliniques conduits dans l'Union Soviétique ont été très peu publiés dans la littérature scientifique (peut-être était-ce un secret militaire étant donné son utilisation sur les soldats ?) et que la séparation est/ouest pendant la guerre froide ne laissait guère de place à la communication scientifique(38).

A l'époque, les scientifiques de l'est insistaient donc sur le fait que les phages avaient concrètement démontré leur valeur thérapeutique, pendant que ceux de l'ouest pensaient que toutes preuves qui n'avaient pas été publiées dans des revues scientifiques de standard occidental, n'avaient pas de valeur(38).

Une certaine ignorance de l'étendue des recherches faites à l'est et des résultats positifs obtenus, teintés d'une once de rivalité ont encore plus creusé l'écart sur l'utilisation de la phagothérapie.

Ainsi, la séparation est/ouest s'est poursuivie avec la guerre froide et est encore notable de nos jours.

B. Caractéristiques des phages en tant qu'agents antimicrobiens chez l'homme

Des études précliniques ont révélé plusieurs caractéristiques importantes des phages, dans le contexte de l'utilisation de ces derniers comme agents antibactériens chez l'homme. Parmi elles nous avons : une puissante action antibactérienne contre les bactéries Gram+ et Gram-, un mode d'action associé à la destruction directe des bactéries, une sécurité apparente et une bonne distribution systémique. Une étude de Smith et Huggins (1982) a même montré qu'une dose de bactériophages était plus efficace que de multiples doses de quatre antibiotiques différents (tétracycline, ampicilline, chloramphénicol ou triméthoprime et sulphafurazole) et au moins aussi efficace que de multiples doses de streptomycine, pour traiter des souris atteintes d'une infections à *E.coli* (Tableau 2)(50). En effet, sur 32 souris infectées par une souche d'*E.coli*, plus des trois-quarts mouraient après un traitement par antibiotique contre moins d'un tiers avec un traitement unique par phagothérapie

Traitement	Nombre de décès
Extrait d'E.coli K12.K1+	31
Phage R(K12.K1+)	13
Streptomycine	18
Tétracycline	26
Ampicilline	28
Chloramphénicol	28
Triméthoprime et sulphafurazole	26

Tableau 2 : Décès survenant dans des groupes de souris infectées par voie intracérébrale avec *E.coli*, puis traitées intramusculairement soit avec le phage R(K12.K1+) actif sur la souche soit par antibiotiques(50)

Des groupes de 32 souris ont été utilisés. Le traitement a débuté 16 heures après l'infection avec environ 500 organismes viables d'*E.coli* dans 0,02 ml de sérum physiologique. Une seule dose d'extrait bactérien et une dose (3×10^8 particules viables) du phage R (K12.K1+) ont été administrées. Les antibiotiques ont été donnés, par doses de 25 mg/kg toutes les 12 heures pendant 6 jours.

1. Caractéristiques essentielles

a) Activité antibactérienne contre les bactéries Gram+ et Gram-

La caractéristique majeure des bactériophages, qui ayant permis l'invention de la phagothérapie, est bien sûr leur action bactéricide. En effet, les bactériophages exercent une activité antibactérienne *in vivo*, dans des infections causées par différentes espèces de bactéries, aussi bien Gram+ que Gram-.

(1) Activité antibactérienne contre les bactéries gram+

Dans la multitude de bactériophages existant dans la nature, il existe des phages ayant une action bactéricide sur les bactéries Gram+.
Par exemple, l'effet de bactériophages contre les infections à *S.aureus* a été étudié chez les souris, notamment dans une étude menée par Shigenobu Matsuzaki *et al.* En 2003(51). Parmi les phages de *S.aureus* isolés dans l'étude, un a été utilisé pour tous les tests, car son spectre d'hôtes était le plus large et il ne transportait aucun gène connu de toxines ou de résistances aux antibiotiques. Des injections intrapéritonéales de *S. aureus*, y compris résistants à la méticilline, ont provoqué une bactériémie et la mort éventuelle chez les souris. En revanche, l'administration intrapéritonéale ultérieure de phages purifiés a supprimé la létalité induite par *S. aureus*, même à des concentrations faibles (Figure 12)(51).

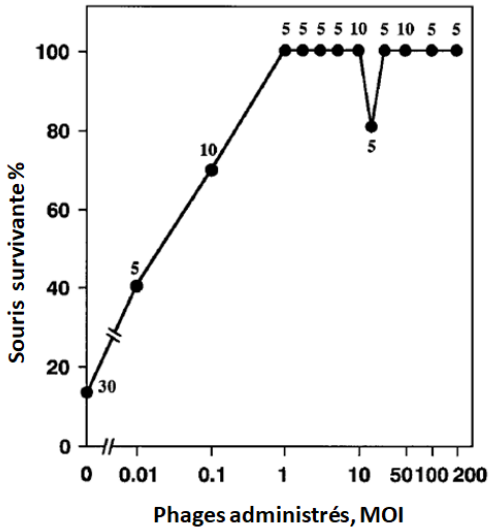


Figure 12 : Effets du phage fMR11 sur la survie, en fonction de la dose, contre une infection à *Staphylococcus aureus* chez la souris(51)**.**

Après injection de *S.aureus SA37*, le phage fMR11 a été injecté dans le péritoine de souris avec différentes multiplicités d'infections (MOI). Les chiffres adjacents aux cercles indiquent le nombre de souris examinées. Des souris ayant reçu uniquement une injection de bouillon vierge utilisé pour préparer les suspensions de phages, ont servi de souris de contrôle et sont représentés par des cercles à un MOI de 0. Il existe une différence statistiquement significative dans les taux de survie entre les souris traitées avec des phages à un MOI de 0,1 et les souris témoins non traitées (MOI de 0).

(2) Activité antibactérienne contre les bactéries gram-

De la même manière, il existe dans la nature des bactériophages ayant une action bactéricide sur les bactéries Gram-.

Par exemple, l'effet de bactériophages contre des infections à *E.coli* a été étudié chez les poulets et les veaux, dans une étude menée par Paul Barrow *et al*. En 1998(52). Pour cette étude, un bactériophage lytique actif sur *E.coli* a été préalablement isolé des eaux usées. Ce phage a ensuite été utilisé pour prévenir des septicémies et des méningites, causées par une souche d'*E.coli* chez les poulets. La protection a été obtenue même lors de l'administration retardée du phage, jusqu'à l'apparition de signes de la maladie. Par ailleurs, plus la dose de phages injectée était importante, plus la mortalité baissait (Tableau 3).

Inoculation intramusculaire		Inoculation intracrânienne	
Dose de phage (UFP)	Mortalité*	Dose de phage (UFP)	Mortalité*
10^6	0/5	10^8	0/5
10^4	0/5	0	5/5
10^2	2/5		
0	5/5		

Tableau 3 : Mortalité chez les poulets infectés par *E. coli* K11 avec et sans administration de phages(52)

*** Nombre de poulets morts / nombre infecté.UFP : Unité Formant Plage**

Ensuite, le phage fut testé chez des veaux nouveau-nés privés de colostrum, ayant été infectés oralement par *E.coli*. Ainsi, l'inoculation intramusculaire du phage a retardé l'apparition de la bactérie dans le sang et a prolongé la durée de vie des veaux (Figure 13)(52).

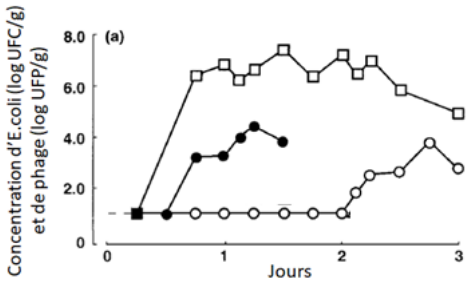


Figure 13 : Concentration d'*E. coli* et de bactériophage dans le sang (a)(52).

●, *E. coli* chez les animaux témoins (non traités); ○, *E. coli* chez les animaux à qui des phages ont été administrés par voie intramusculaire 8 h après l'infection à *E. coli*; □, dénombrement des bactériophages chez les animaux traités par phagothérapie.

Ces résultats montrent l'efficacité de la phagothérapie contre les infections à bactéries Gram+ et Gram- chez l'homme, bien que d'autres études montrent le contraire...

b) Destruction directe des bactéries

Les bactériophages lytiques, utilisés en phagothérapie, ont un mode d'action entrainant la destruction directe des bactéries, par lyse, suite à l'induction d'une endolysine phagique.

Ainsi, les phages ont un mode d'action complètement différent de celui exercé par les antibiotiques. Il est alors possible qu'ils présentent également une activité contre les souches bactériennes résistantes aux antibiotiques.

c) Sécurité apparente

Alors que les effets indésirables des antibiotiques sont connus, fréquents et variés suivant les classes médicamenteuses, la phagothérapie semble ne pas présenter tous ces désavantages. L'Homme est en contact avec les bactériophages depuis sa naissance, par la nourriture qu'il ingère et l'eau qu'il boit, et aucun effet indésirable n'a été observé dans les différentes études réalisées : pas d'augmentation des transaminases, pas de signes d'inflammation, ni d'allergie. De plus, aucune réponse immunitaire contre les phages n'a été observée(53,54).

Ensuite, comme vu précédemment, les bactériophages ne peuvent infecter qu'une cellule bactérienne. Il n'y a donc aucun risque d'infection et de destruction des cellules humaines. Après la lyse des bactéries, les phages sont ainsi rapidement éliminés par voie hépatique et urinaire(53).

L'une des critiques émises par les opposants à la phagothérapie, est le risque de transduction de gènes dangereux. Certains phages lytiques sont capables de transduction généralisée, mais les phages utilisés en phagothérapie sont des phages lytiques incapables de transmettre des gènes dangereux (gène codant pour des toxines ou gènes de résistance aux antibiotiques).(53).

d) Distribution systémique

Une autre caractéristique importante des bactériophages, est leur bonne distribution systémique. Leur capacité à pénétrer dans les organismes supérieurs détermine l'activité potentielle des phages dans le traitement des infections bactériennes.

En effet, certains bactériophages sont connus pour être actifs contre de nombreuses espèces bactériennes, mais leur effet ne peut avoir lieu que si ces derniers atteignent le site de l'infection.
De nombreuses études ont montré la capacité des bactériophages à diffuser dans le corps humain.

Ces études ont montré qu'après administration de phages par différentes voies, ceux-ci étaient retrouvés rapidement et à des concentrations notables dans le sang et différents tissus et organes (tractus urinaire, système lymphatique, poumons, foie, rate, rein et même le cerveau). Par exemple, des bactériophages injectés dans le péritoine de souris ont pu être détectés dans le cerveau de ces dernières dès une heure après l'administration. Les phages ont donc la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique(33,55).

2. Caractéristiques secondaires

a) Immunomodulation induite par les bactériophages

Tous les agents antibactériens peuvent avoir un effet immunomodulatoire. Il en est de même pour les bactériophages, qui peuvent avoir des interactions avec notre système immunitaire comme tous les virus. Ces interactions sont, d'après plusieurs études, soit une stimulation du système immunitaire, soit une suppression, soit une tolérance envers celui-ci(34). Elles ont été observées dans de nombreuses expériences, mais l'explication de ces phénomènes reste parfois encore floue.

(1) Immunostimulation

Après la lyse d'une bactérie, une multitude de particules immunogènes est libérée dans le corps humain et active une réponse immunitaire chez l'hôte. Il est bien connu que les produits de cette lyse provoquent une immunostimulation, notamment la production de lymphocyte T effecteurs(56). Il n'est donc pas surprenant de voir que les lysats de phages exercent aussi une immunoactivation(33).

Esber montre ainsi dans une étude que l'injection concomitante de lysats de phages actifs contre le staphylocoque et d'antigènes staphylococciques induit un renforcement de la réponse immunitaire primaire des souris, reflétée par la production spécifique d'hétéroanticorps anti-staphylocoques. Des taux d'anticorps significativement plus élevés dans les groupes de tests ont été observés par rapport aux animaux témoins, les titres d'anticorps ayant atteint leur maximum 21 jours après la provocation antigénique. De plus, le lysat de phages administré sans l'antigène associé a provoqué une élévation du taux d'immunoglobulines sériques chez la souris pendant plus de 14 jours après l'injection. Cet accroissement de la synthèse des immunoglobulines et d'hétéroanticorps démontre que le lysat de phages est non seulement un immunomodulateur de l'immunité à médiation cellulaire, mais également un immunoadjuvant efficace de la réponse humorale de l'hôte(33,57).

Toutes ces données montrent que les lysats de phages exercent une action stimulatrice sur le système immunitaire, ce qui pourrait contribuer aux effets bénéfiques de la phagothérapie.

(2) Immunossuppression

Les bactériophages interagissent avec les lymphocytes de l'hôte et peuvent moduler la réaction immunitaire par cet intermédiaire. Les données montrent que l'injection de bactériophages entiers engendre plutôt une Immunossuppression à l'égard de lymphocytes T et B, à l'inverse des lysats de phages. Une injection concomitante d'un bactériophage entier et d'un antigène spécifique, entrainerait la diminution de la production d'anticorps contre cet antigène(34).

De plus, les bactériophages semblent inhiber l'activation du NF-Kappa B, engendrée par la liaison du TCR au récepteur de costimulation. Le NF-Kappa B est un régulateur de transcription de gènes codant pour des cytokines inflammatoires(58). Ceci peut être en lien avec l'observation faite par Weber et Dabrowska d'une normalisation du taux de TNF-alpha et d'IL-6 chez 50 patients traités par phagothérapie. Ainsi, on observait une diminution de la production de TNF-alpha ou d'IL-6 chez les patients dont le taux était élevé, et une augmentation de la production de ces deux cytokines chez les patients dont le taux était bas(59). Les bactériophages semblent donc avoir une action anti-inflammatoire lorsqu'une inflammation est présente.

Les bactériophages ont aussi un rôle sur la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les ERO jouent un rôle majeur dans les fonctions antibactériennes des cellules phagocytaires. Cependant, une production excessive peut causer un stress oxydatif et des lésions tissulaires.
Une étude de Gorski montre que les phages homologues (actifs contre la bactérie incriminée, ici le phage T4 spécifique d'*E.coli*), mais pas les phages hétérologues (non spécifiques de la bactérie incriminée), inhibent de manière dose-dépendante, la production d'ERO par les phagocytes suite à une infection par *E.coli* (Figure 14). Ainsi, à partir d'une concentration de phage T4 de 10^9/ml, on observe une diminution statistiquement significative de la production d'ERO par les granulocytes en présence d'*E.coli*, par rapport à la production d'ERO en présence d'*E.coli* seul(60).

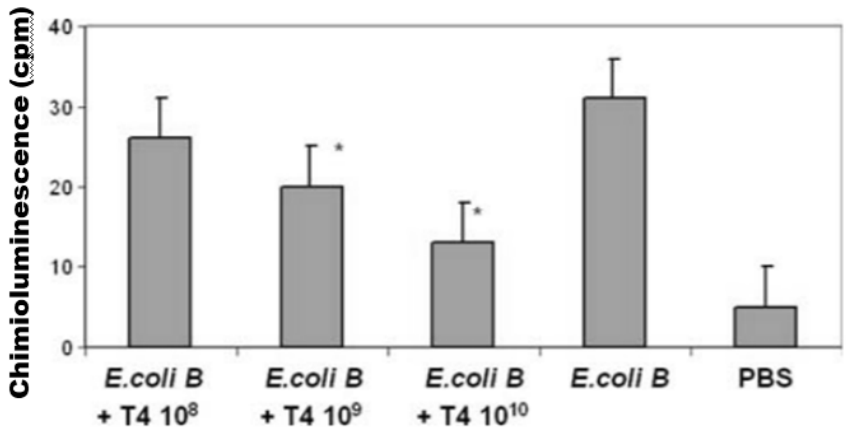


Figure 14 : Effet des phages sur la production d'ERO par des granulocytes induite par des bactéries. **Mesure de la production d'ERO par chimioluminescence en cpm (coups par minute). Cellules PBS traitées avec du tampon PBS (cellules témoins), cellules *E. coli* B traitées par *E. coli* B (10^7 cellules / ml), cellules *E. coli* B + T4 10^8 traitées par *E.coli* B (10^7 cellules / ml) et phage T4 (10^8 UFP / ml), cellules *E. coli* B + T4 10^9 traitées avec *E. coli* B (10^7 cellules / ml) et phage T4(10^9 UFP / ml), cellules *E. coli* B + T4 10^{10} traitées avec *E. coli* B (10^7 cellules / ml) et phage T4 (10^{10} UFP / ml)(60)**

Tous ces effets immunosuppresseurs pourraient potentiellement être utilisés pour éviter les rejets de greffe par exemple.

b) Synergie d'action avec les antibiotiques

Un nouveau phénomène a récemment été observé, c'est la synergie entre les bactériophages et les antibiotiques. L'antibiothérapie et la phagothérapie sont deux techniques bien différentes qui ont partagées l'Europe dans la période d'après-guerre, mais aujourd'hui il semble qu'elles soient complémentaires.

L'ajout de faibles doses d'antibiotiques bloquant les divisions cellulaires des bactéries induit une augmentation de la multiplication de phages dans une culture bactérienne. Par exemple, l'ajout de céfotaxime à une culture d'*E.coli* infectée par le phage ϕMFP, a permis de multiplier par sept la production de ce phage. Ce phénomène a été observé sur des cultures sur gélose solide (Figure 15). On observe ainsi l'augmentation de la taille et du nombre de plages de lyse au contact de certains antibiotiques. Il existe donc une « synergie phage-antibiotique » observée actuellement seulement pour les antibiotiques des familles des β-lactamines et des quinolones.
Cette étude menée par Comeau *et al.*, montre que ce phénomène serait dû au « stress » des bactéries occasionné par l'attaque d'un antibiotique. L'arrêt de la division cellulaire induite par ces antibiotiques, entraine un accroissement de la taille des bactéries et donc un espace plus grand permettant une production accrue de phages par cycle à l'intérieur de celle-ci et une lyse plus précoce de la bactérie(61).

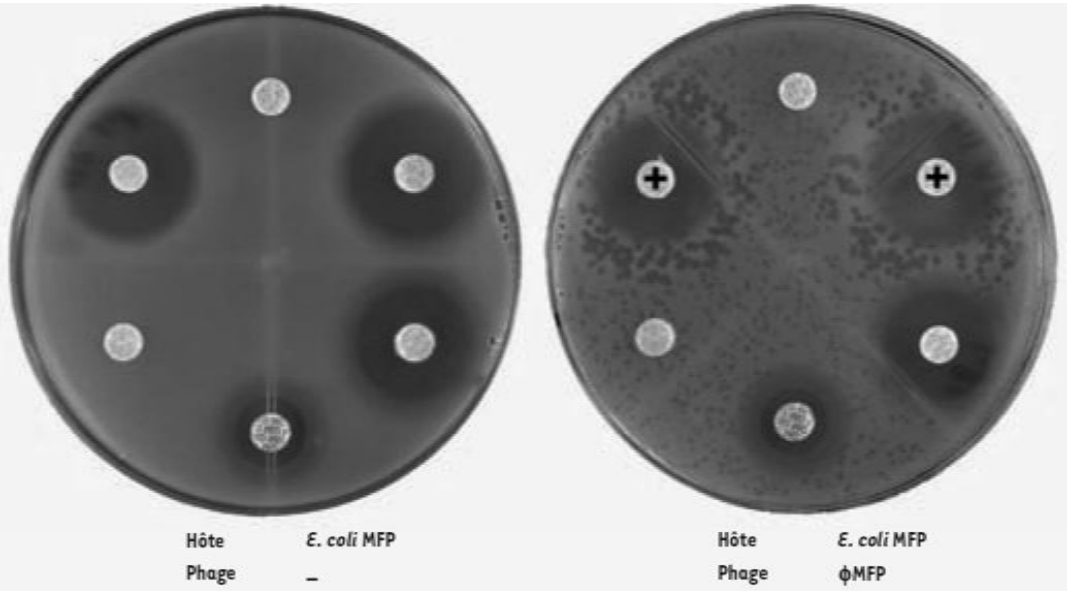


Figure 15 : Le phénomène de « Synergie Phages-Antibiotiques » (PAS) avec le phage ϕMFP sur Escherichia coli MFP.

Antibiogramme montrant la sensibilité de la souche *E. coli* MFP à différents antibiotiques (Gauche). Le même antibiogramme avec l'addition de phages virulents ϕMFP dans le tapis bactérien (Droite). Les plages de lyse sont plus nombreuses et plus grandes autour des antibiotiques marqués par de « + » (aztreonam et cefixime)**(61)**

c) Action sur les biofilms

Un biofilm est un assemblage complexe de micro-organismes en adhésion sur une surface. C'est un mode de vie courant et transitoire de ces micro-organismes qui sont immobilisés dans une matrice de substances polymériques qu'ils sécrètent (exopolysaccharides). Cette matrice leur permet de réaliser de nombreuses interactions et de les protéger(62).

Plusieurs études montrent que lorsque les phages entrent en contact avec des biofilms, d'autres interactions se produisent, dépendant de la sensibilité des bactéries du biofilm au phage et de la disponibilité des sites récepteurs. Mais ce qui confère aux phages leur réelle action contre les biofilms, est le fait qu'ils sont nombreux à posséder des enzymes dégradant les polysaccharides (polysaccharide dépolymérases ou polysaccharide lyases) et peuvent donc dégrader la matrice extracellulaire et ainsi avoir accès aux bactéries. En effet, les phages peuvent porter à leur surface des enzymes qui dégradent les polysaccharides bactériens. Ces enzymes sont très spécifiques et agissent rarement sur plus de quelques polysaccharides étroitement liés en structure, et donc produits par des souches bactériennes de même espèce(63,64).

La destruction du biofilm par les bactériophages est une combinaison de la dégradation des exopolysaccharides par des dépolymérases et l'infection, puis la lyse cellulaire effectuée par les phages. L'intégrité du biofilm peut ainsi rapidement être altérée.

C. Recherches, essais cliniques et quelques cas cliniques

Alors que la recherche sur les bactériophages et leur utilisation en phagothérapie n'a pas cessé dans l'Europe de l'Est, la recherche portant sur l'usage thérapeutique des bactériophages était très rare en Europe de l'Ouest. De ce fait, la phagothérapie est autorisée seulement dans certains pays de l'Est (Pologne, Russie et Géorgie). Les préparations de bactériophages à usage thérapeutique n'étant plus disponibles dans les pharmacies Françaises depuis 1978, un patient ne peut en bénéficier que par procédure compassionnelle(34). Ainsi, l'ANSM a permis une vingtaine d'administrations de bactériophages à titre compassionnel pour une quinzaine de patients en impasse thérapeutique, depuis 2016(65).

Dans le même temps, l'essai clinique Européen PhagoBurn, dont nous parlerons par la suite, a été réalisé de 2013 à 2017 et d'autres essais cliniques devraient être initiés d'ici fin 2020 en France(66). En effet, deux Programmes Hospitaliers de Recherche Clinique (PHRC) avec essais cliniques multicentriques seront mis en place en France dans les prochains mois. Ces recherches permettront d'apporter des données d'efficacité de la phagothérapie, qui manquent aujourd'hui(67). De plus, de nouvelles possibilités voient le jour avec le développement de phages artificiels génétiquement modifiés.

1. Cas cliniques d'usage à titre compassionnel

a) Etat des lieux

Depuis 2016, l'ANSM a permis l'utilisation de bactériophages à titre compassionnel. En effet, l'article 83 du règlement (CE) N°726/2004 du Parlement Européen du 31 Mars 2004 permet aux états membres de l'Union Européenne de mettre à disposition, à titre compassionnel un médicament qui n'est pas encore sur le marché. Cependant, les conditions requises sont que le médicament en question fasse l'objet d'une demande d'AMM auprès de l'EMA (European Medicines Agency), ou qu'il soit en cours d'essais cliniques. Ces dispositions sont possibles, toujours selon l'article 83 de règlement (CE), pour un patient ou un groupe de patients atteint d'une « maladie invalidante, chronique ou grave, ou d'une maladie considérée comme mettant la vie en danger » pour lesquels aucune thérapeutique autorisée n'est efficace(68). Les phages sont assimilés à des préparations magistrales et sont produits transitoirement de façon non industrielle, mais avec une qualité compatible avec un usage clinique. Ces usages à titre compassionnel sont sous la seule responsabilité du médecin prescripteur et du pharmacien hospitalier, bien qu'ils soient, en France, soutenus par l'ANSM(66).

Ainsi, en 3 ans, seulement 11 patients ont bénéficié de la phagothérapie à titre compassionnel, bien qu'il y ai eu une augmentation des demandes d'utilisation clinique de bactériophages auprès de l'ANSM (45 depuis 2016). En effet de nombreux paramètres peuvent rendre impossible l'acceptation de la demande (Décès du patient, non disponibilité de phages actifs, guérison du patient…).

Sur les 11 patients traités, six présentaient des infections ostéo-articulaires que nous détaillerons plus loin, un souffrait d'une endocardite infectieuse à *P.aeruginosa*, un avait une infection neuro-méningée à *S.aureus*, deux présentaient des infections vasculaires (notamment un pied diabétique) et un enfant atteint de mucoviscidose était colonisé par *Achromobacter xylosoxidans*. Les bactéries le plus souvent incriminées étaient *P.aeruginosa* et *S.aureus,* et l'administration se faisait le plus souvent localement. Les résultats sont restés mitigés, car sur les 11 patients traités, 3 sont décédés, 2 se sont surinfectés avec d'autres bactéries que celles visées par la phagothérapie, un est toujours colonisé, un a dû être amputé et seulement 4 ont eu une évolution favorable(66). Tous ces cas montrent la complexité d'un traitement par phages.

b) Cas des infections ostéo-articulaires

Comme nous l'avons vu précédemment, les infections ostéo-articulaires représentent la majorité des demandes de phagothérapie à titre compassionnel. Les 6 patients concernés ont tous été traités aux Hospices Civils de Lyon(66). La majorité (4 sur 6) concernait des infections sur prothèse, les 2 autres étaient des ostéites chroniques. A la suite du traitement, un patient est décédé à la suite d'une autre pathologie grave, deux ont présentés des surinfections et 3 ont eu une évolution favorable(66).

Les deux premiers patients traités aux Hospices Civils de Lyon ont cicatrisé et l'infection a été contrôlée rapidement (Figure 16). Les phages ont été sélectionnés par la société Pherecydes Pharma (dont nous parlerons plus loin) à partir d'un Phagogramme, qui teste l'activité des phages à l'encontre de la bactérie présente sur le site d'infection. La pharmacie de l'hôpital a ensuite fabriqué des préparations magistrales, qui ont été appliquées topiquement. Ces résultats positifs ont également montré une très bonne tolérance. En conséquence, les Hospices Civils de Lyon, en partenariat avec Pherecydes Pharma, participent au programme PHOSA qui regroupe deux projets de recherche clinique, le projet , dont le but est de traiter les infections ostéo-articulaires et les infections des ulcères du pied diabétique(69).

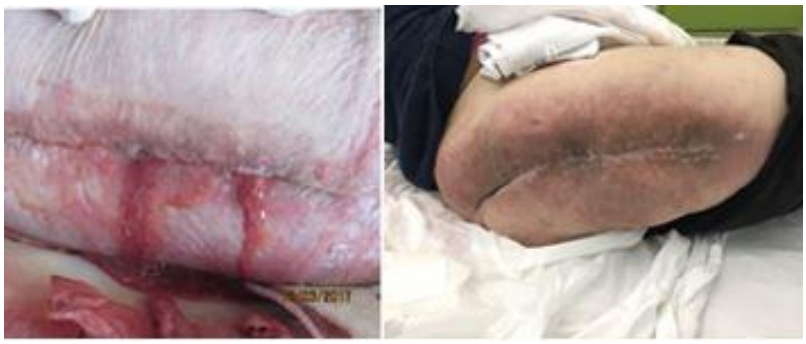


Figure 16 : Cicatrisation d'une infection ostéo-articulaire, avant traitement par phages (gauche) et après traitement par phages (droite)(69).

Un retour d'expérience a donc été demandé par le comité scientifique spécialisé temporaire « Phagothérapie-Retour d'expérience et perspectives ». Le comité a conclu qu'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP) était nécessaire pour la prise de décision de traitement par phage de cette catégorie de patients, afin d'évaluer l'intérêt et les modalités du traitement(66). Le problème du délai d'obtention des bactériophages qui retarde la prise en charge thérapeutique du patient, a aussi été abordé(66).

2. Essai clinique PhagoBurn

a) Présentation

PhagoBurn était un essai clinique de phases 1 et 2 ; ce fut la première étude multicentrique au monde évaluant la phagothérapie chez des grands brûlés. Cet essai a été dirigé par la société Pherecydes Pharma et coordonné par le Service de Santé des Armées français. Pherecydes Pharma est une société française de biotechnologie, qui développe des traitements antibactériens à base de bactériophages naturels. Leur objectif est de développer « la phagothérapie de précision » pour vaincre les infections bactériennes, notamment celles dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques. Pherecydes Pharma produit des phages actifs contre *P.aeruginosa*, *S.aureus* et *E.coli*(70).

L'étude PhagoBurn (Figure 17), qui s'est étalée de Juin 2013 à Janvier 2017, était un projet collaboratif Européen financé par la Commission Européenne. Elle a été réalisée de concert avec l'Hôpital d'Instruction des Armées Percy (France), l'Hôpital Militaire Queen Astrid (Belgique) et l'Hôpital Universitaire de Lausanne (Suisse). L'étude a évalué l'efficacité et la tolérance de la phagothérapie dans le traitement des infections cutanées à *P.aeruginosa* chez les grands brûlés (Brûlure au troisième degré)(71). L'étude devait initialement durer 27 mois, mais un problème de stabilité des phages anti-*P.aeruginosa* utilisés, a obligé l'arrêt de l'essai pendant plusieurs mois en 2016, réduisant la durée de l'étude à 13 mois. Les patients inclus dans l'essai venaient de centres de grands brûlés, en France, en Belgique et en Suisse. Ils présentaient tous une brûlure surinfectée par *P.aeruginosa* (prouvé biologiquement).

Au final, 27 patients ont été inclus dans l'essai clinique et parmi eux, 25 présentaient des données exploitables(72).



Figure 17 : Logo de l'essai clinique PhagoBurn(72)

Dans cette étude en double aveugle, une comparaison a été faite entre le traitement par application journalière de bactériophages (conçus et qualifiés par Pherecydes Pharma) et un traitement par antibiotique, la sulfadiazine d'argent en crème à 1%, qui est le traitement de référence pour ces infections cutanées.
Les deux traitements ont été administrés en topique quotidien pendant 7 jours, avec 14 jours de suivi. Le traitement par phages s'est fait avec un cocktail de 12 phages actifs contre 90% des souches de *P.aeruginosa,* avec une concentration finale de 10^6 PFU/ml. Ces phages sont des phages lytiques naturels appartenant à la famille des *Podoviridae* et des *Myoviridae*. Les participants se sont vu attribuer au hasard (1:1) l'un des deux traitements. Ainsi, sur les 25 patients, 12 ont bénéficié de la phagothérapie et 13 ont été traités par sulfadiazine(73). Cependant, le titre du cocktail de bactériophages a diminué après la fabrication, du fait de la non stabilité des phages, et les participants ont donc reçu une concentration de phages inférieure à celle prévue(74).

b) Résultats

Les résultats de l'essai clinique PhagoBurn ont été publiés en Octobre 2018 dans la revue The Lancet (Lancet Infect Dis 2019; 19: 35–45)(74).
Le critère d'évaluation principal choisi par les chercheurs était le délai médian de réduction durable par moitié de la charge bactérienne par rapport au jour J0, évaluée à l'aide de prélèvements quotidiens sur toute la surface de la brûlure, chez tous les participants. Ce délai a été mesuré à l'aide d'une méthode semi-quantitative. Les prélèvements ont ainsi été ensemencés sur boite de Pétri. Après incubation, une détermination visuelle du nombre de colonies a été effectuée avec cinq niveaux de concentration (Nombre incalculable, nombreuses, intermédiaire, bas, rare ou pas de colonies)(74).

Ce critère d'évaluation principal a été atteint dans un délai médian de 144 h dans le groupe traité par phages, par rapport à un délai médian de 47 h dans le groupe du traitement standard. Ce délai était donc significativement plus long dans le groupe traité par phages par rapport au groupe de soins standards.

Au final, l'étude montre également, qu'au bout de 7 jours de traitement, le critère principal d'évaluation a été atteint pour un pourcentage plus faible de patients du groupe traité par phages (50%) par rapport à ceux du groupe de traitement standard (85%)(74).

En ce qui concerne l'évaluation de l'innocuité de la phagothérapie, elle s'est faite par le référencement des événements indésirables dans les deux groupes de patients. Les résultats étaient les suivants : dans le groupe traité par bactériophages, 23% (3 patients) des 12 participants ont présenté des effets indésirables, par rapport à 54% (7 patients) des 12 participants du groupe de traitement standard. De plus, un seul effet indésirable grave s'est produit dans le groupe traité par phages contre 4 dans le groupe de traitement standard. Enfin, un participant de chaque groupe est décédé au cours du suivi du traitement, et il a été déterminé que les décès n'étaient pas liés à ce traitement(74).

Ainsi, l'effet des bactériophages était plus lent que celui du traitement standard par sulfadiazine. Néanmoins, le cocktail de phages a permis de réduire considérablement la charge bactérienne pour 50% des patients, bien que la dose administrée ait été plus faible que prévue. D'ailleurs, l'une des raisons de ces résultats moins spectaculaires qu'attendus est peut-être liée à la grande diminution de la concentration des bactériophages dans la préparation. Les chercheurs ont donc réalisé une étude ancillaire, qui a montré que les bactéries isolées des patients en échec du traitement par phages, étaient résistantes aux faibles doses de phages administrées, probablement du fait du problème de stabilité des phages(72).

Par ailleurs, ce cocktail de bactériophages a montré une très bonne tolérance. En effet, les complications septiques (choc septique et complications infectieuses) ont été deux fois moins fréquentes dans le groupe traité par phages que dans celui de traitement standard(74).
Les résultats de cette étude sont donc contrastés. Mais l'amélioration de la stabilité des phages et la production de phages personnalisés, vis-à-vis desquels la bactérie est sensible, pourraient permettre d'obtenir des résultats encore plus satisfaisants à l'avenir.

3. Bactériophages génétiquement modifiés

Aujourd'hui, la communauté scientifique a les moyens de modifier génétiquement des phages, dans le but de personnaliser et d'augmenter l'efficacité d'un traitement par phagothérapie. Ainsi, en 2018, une première mondiale a été réalisée à Londres : une patiente de 15 ans atteinte de mucoviscidose et surinfectée par la bactérie *Mycobatérium abcessus,* a été traitée par des phages génétiquement modifiés(75).

La jeune fille avait reçu une greffe de poumons bilatérale en 2017, mais quelques semaines après la greffe et malgré un traitement antibio-prophylactique, des complications sont apparus. Sept mois plus tard, une infection mycobactérienne disséminée a été diagnostiquée.

Les médecins ont isolé la bactérie responsable, *Mycobactérium abcessus,* afin d'identifier des phages potentiellement actifs, à partir de la collection du Science Education Alliance Phage Hunters Advancing Genomics and Evolutionary Science (SEA-PHAGES) program(76). Le criblage a permis d'identifier un phage (appelé Muddy) qui tuait efficacement la bactérie. Un deuxième phage a aussi été identifié, mais son efficacité contre la bactérie était plus faible. Les chercheurs ont alors mis au point un dérivé purement lytique de ce phage par ingénierie génétique, en ôtant avec précision le gène répresseur du passage au cycle lytique. Ce phage (appelé ZoeJΔ45) tuait ainsi efficacement la bactérie. Le troisième phage isolé était aussi peu efficace contre la bactérie, mais son dérivé lytique (fabriqué de la même manière que ZoeJΔ45), était également peu efficace. Cependant, les chercheurs ont isolé un mutant de ce dernier phage lytique, efficace contre la bactérie (appelé BP33ΔHTH-HRM10)(75).

Le cocktail de ces 3 phages était capable *in vitro* d'infecter et de détruire la bactérie incriminée, même à des concentrations faibles et en présence d'une forte concentration de bactéries, même si, les phages ZoeJΔ45 et BP33ΔHTH-HRM10 seuls n'étaient pas efficaces à faibles concentrations et en présence de fortes concentrations de bactéries (Figure 18)(75).

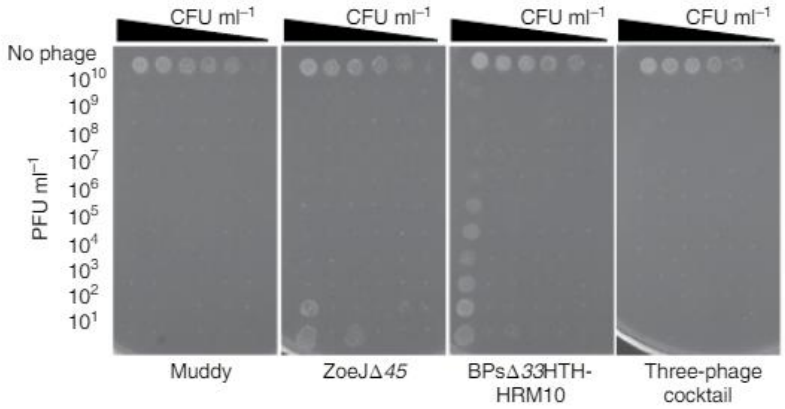


Figure 18 : *M. abscessus* (~ 10^8 UFC ml-1 ; CFU=UFC) a été dilué en série au dixième en 11 répétitions, associant l'ajout d'aucun phage ou l'ajout de phage aux concentrations indiquées (PFU=UFP). Les cultures ont été incubées à 37 ° C pendant 24 h et des aliquotes de 3 µl ont été étalées sur un milieu solide et incubées pendant 7 jours. Ces tests ont été répétés au moins trois fois avec des résultats similaires(75)**.**

Suite à ces tests in vitro, un traitement par voie intraveineuse a été initié avec le cocktail de phages (10^9 UFP de chaque phage par dose), toutes les 12 heures, en Juin 2018(77). Le traitement par phage intraveineux a été bien toléré et associé à une amélioration clinique significative. Dès les premiers jours, la charge bactérienne a été réduite, et au bout d'un mois, l'amélioration des signes cliniques a débuté et s'est poursuivie pendant les 6 mois de traitement.

Il a notamment été noté une amélioration de la fonction pulmonaire, significative depuis le début du traitement par phages (Figure 19). En effet, il a été observé une augmentation rapide et durable du VEMS (Volume expiratoire maximal par seconde) et de la capacité vitale forcée qui ont progressé aux alentours de 80% des valeurs normales.

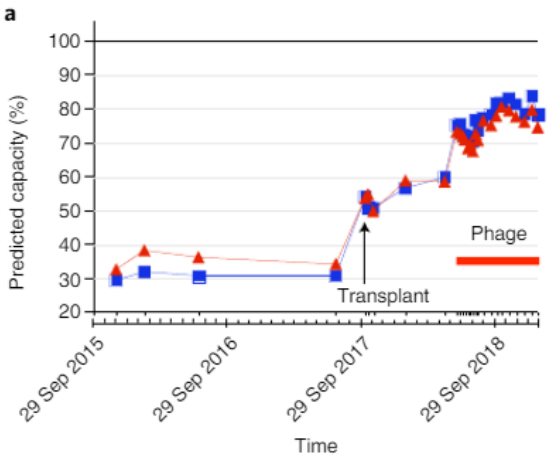


Figure 19 : Fonction pulmonaire exprimée en pourcentage prévu du VEMS (bleu) et de la capacité vitale forcée (CVF; rouge)(75).

Cette étude est une illustration d'une utilisation sûre et efficace de bactériophages génétiquement modifiés. Ainsi, avec l'aide du génie génétique, de nouvelles possibilités pourraient voir le jour, afin de personnaliser les traitements par bactériophages, notamment pour les infections dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques.

D. Limites de la phagothérapie

1. Résistance

a) Résistance aux phages

Tout comme la résistance aux antibiotiques, il existe chez les bactéries des résistances aux bactériophages. Ces mécanismes de résistance sont multiples, ils peuvent jouer sur l'absorption du bactériophage à la surface de la bactérie (mutation ou absence de motifs cibles reconnus par le phage) ou bien par clivage du génome phagique préalablement rencontré, par le système CRISPR-Cas par exemple(23,78).

Cependant, il existe une probabilité de développer une résistance, mais il y a tellement de bactériophages hétérogènes dans la nature, qu'il est peu probable de ne pas réussir à isoler un nouveau phage actif sur une bactérie devenue résistante. L'utilisation de « cocktail » de phages actifs sur une même espèce, diminue d'autant plus le risque de survenue de ces résistances(33,79).

De plus, une étude montre qu'une bactérie devenue résistante à un phage, l'est au détriment de sa virulence.
Dans un élevage de salmonidés (poisson zèbre), la virulence de la bactérie *Flavobacterium columnare* a été étudiée, après développement de la résistance de cette bactérie à un phage, qui lui était spécifique. L'infection des salmonidés par les bactéries non résistantes a été associéé à un taux de mortalité beaucoup plus élevée que pour les salmonidés infectés par les bactéries résistantes aux phages, qui perdent leur virulence et leur motilité (Tableau 4)(80).

	Mortalité des salmonidés	
Souches	Non résistantes	Résistantes
B67	100%	0%
B185	100%	12,5%
B245	50%	0%
OsO6	25%	0%

Tableau 4 : Mortalité du poisson zèbre causée par des souches de *Flavobacterium columnare* non résistantes ou résistantes aux phages.

Le poisson zèbre (n = 8) a été testé individuellement pour chaque morphotype(80).

Les interactions entre les bactéries pathogènes et leurs phages parasites, peuvent ainsi favoriser une faible virulence bactérienne dans des conditions naturelles. Ceci peut se traduire par une diminution de sa capacité de division ou un changement dans ses récepteurs par exemple(81).

b) Résistance aux antibiotiques

Comme nous l'avons vu précédemment, bien que les bactériophages utilisés en phagothérapie soient exclusivement lytiques, il existe de nombreux facteurs environnementaux qui peuvent induire l'intégration de prophage dans le chromosome bactérien. Il pourrait donc y avoir l'émergence d'une résistance aux antibiotiques(34).

La contribution des phages à la propagation de ces résistances n'a pas été pleinement explorée. Des découvertes récentes suggèrent toutefois que les phages pourraient jouer un rôle plus important dans l'émergence et la propagation de résistance que précédemment attendu. Ces données sont toutefois à nuancer car la probabilité qu'un phage strictement lytique passe dans un état tempéré est très faible et les outils génétiques actuels sont capables de détecter l'absence de matériel permettant une intégration de gène dans le génome bactérien par le phage(34,82). De plus, un phage restera toujours actif sur les bactéries résistantes aux antibiotiques.

2. Risque de choc septique

La lyse bactérienne entraine un relargage de différents composants pro-inflammatoires de la paroi et de la membrane bactérienne. Ceci peut induire des complications comme des chocs septiques ou des défaillances d'organes. Un choc septique est une diminution soudaine de la circulation sanguine, accompagnée d'une hyperthermie, suite à une infection bactérienne. Ce choc est dû à la présence de toxines bactériennes (endotoxines) dans le sang entrainant un dysfonctionnement cardiaque (hypotension systolique, tachycardie, tachypnée, oligurie et acidose métabolique)(83).

Récemment, l'utilisation de bactériophages déficients en lyse (LyD) a été proposée comme une alternative intéressante pour diminuer le risque de relargage rapide d'endotoxines pendant la phagothérapie. En effet, une étude de Matsuda *et al.* A montré qu'un traitement par un bactériophage déficient en lyse, diminuait la libération d'endotoxine et de médiateurs inflammatoires et améliorait la survie, dans un modèle de péritonite murine. Des souris ont été infectées par *E.coli* et traitées par voie intrapéritonéale avec LyD. La libération d'endotoxine, de TNF-alpha et d'IL-6, a été mesurée et des numérations bactériennes ont été effectuées. Les résultats ont montré que les souris traitées par LyD ont présenté une survie significativement supérieure à celle des autres groupes. Les taux d'endotoxine étaient significativement plus faibles et les taux de TNF-alpha et d'IL-6 étaient inférieurs à ceux des souris du groupes témoin(84).

3. Spécificité

Nous avons vu précédemment que la spécificité des bactériophages envers les bactéries était un avantage. Cette spécificité permet de ne pas détruire toute la flore bactérienne digestive, comme le ferait un antibiotique, et ainsi d'éviter les troubles digestifs secondaires. De plus cela assure une intégrité des cellules humaines qui ne seront jamais attaquées par un bactériophage.

Cependant, cette spécificité est également un inconvénient. En effet, cette spécificité étroite vis-à-vis d'une espèce ou d'une sous-espèce, impose l'isolement et l'identification de la bactérie responsable de l'infection, afin de trouver le phage qui lui est spécifique. Il est donc quasi impossible de mettre en place des traitements probabilistes par bactériophages comme cela se fait avec les antibiotiques, dont les plus utilisés sont à large spectre. Les prélèvements à visée diagnostique sont donc inévitables, ce qui, suivant la localisation, de l'infection peut s'avérer compliqué et long, dans un contexte de dernière chance(34).

4. Contact bactériophage-bactérie

La phagothérapie repose sur un élément essentiel, la mise en contact des bactériophages avec les bactéries incriminées. Or, mis à part pour des sites d'infection directement accessibles (plaies, brûlures), il n'existe aucun moyen de garantir qu'une administration de bactériophages, par voie orale ou injectable par exemple, va permettre à ces derniers d'atteindre le site d'infection, bien que nous ayons vu que les phages présentaient une bonne distribution systémique. De plus, ce contact devient impossible dans le cas de bactéries intracellulaires(34).

5. Réglementation

Jusqu'à peu, le cadre réglementaire entourant la phagothérapie était inexistant ou très flou. Les réglementations strictes et complexes de la France et de l'Europe ne prévoyaient pas explicitement l'autorisation de la phagothérapie. Les phages ne sont, ni un médicament, ni un biomédicament. De plus, les phages naturels ne sont pas brevetables. La CNCPI (Compagnie Nationale des Conseils en Propriété Industrielle) précise que « La vie en tant que création n'est pas protégeable »(85).

Les lois actuelles concernant les essais cliniques sont également inadaptées à la phagothérapie, et particulièrement pour les cocktails de phages. De plus, les procédures d'obtention d'une AMM sont adaptées pour des molécules fixes et invariables, ce qui n'est pas le cas d'une préparation de bactériophages(86). Ainsi, par manque de données cliniques, il n'existe pas, d'AMM pour des bactériophages.
Le 1er Février 2019, l'ANSM a donc décidé de mettre en place un Comité Scientifique Spécialisé Temporaire (CSST) « Phagothérapie - Retour d'expérience et perspectives », qui succède au premier CSST« Phagothérapie » mis en place en 2016. Ce comité est en charge d'effectuer un retour d'expérience sur l'utilisation des bactériophages et de discuter sur les perspectives de développement et d'élargissement de l'accès aux bactériophages en France. Les membres de ce CSST sont des personnes compétentes dans des domaines qui intéressent la phagothérapie (microbiologie, maladies infectieuses, biologie…) et peuvent être des professionnels de santé ou des représentants d'associations d'usagers du système de santé(87).
Le premier comité a permis l'utilisation de bactériophages à titre compassionnel, c'est-à-dire l'utilisation de la phagothérapie hors cadre réglementaire(88).
Le second comité a mis en place un cadre permettant l'utilisation des bactériophages sous forme d'Autorisations Temporaires d'Utilisation (ATU) nominatives. Une ATU est l'usage exceptionnel de spécialités pharmaceutiques n'ayant pas encore obtenu d'AMM et ne faisant pas l'objet d'essais cliniques(89). Ces autorisations ne concernent que des phages répondant à des standards de qualité et de production industrielle (Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)).

Ainsi, seule la société Pherecydes Pharma est en mesure de mettre à disposition en France et en Europe des phages produits industriellement. En effet, la société reçoit des financements de la Commission Européenne depuis novembre 2018 pour mettre en place une unité de production pharmaceutique de bactériophages : c'est le projet PhagoPROD. Ce projet va permettre à l'entreprise d'obtenir le statut d'« établissement pharmaceutique » par l'ANSM pour leur site de fabrication BPF(90).
Cependant, cette mise aux standards de qualité par Pherecydes Pharma (dont les préparations de bactériophages étaient fabriquées de manière non industrielle jusqu'à présent) s'effectuera à la fin de l'année 2020. De plus, Pherecydes Pharma ne pourra produire industriellement que des phages anti-*Staphylococcus aureus* et anti-*Pseudomonas aeruginosa* pour le moment, mais cela est déjà une grande avancée en France(66).

Ainsi, la phagothérapie est un traitement antibactérien ancien avec une histoire riche d'essais, de réussites mais aussi de controverses. Après une perte d'intérêt, son actualité ambitieuse nous montre qu'elle revient au cœur de recherches scientifiques pertinentes. La phagothérapie pourrait, à mon sens, se positionner en tant que véritable alternative à l'antibiothérapie, dont l'action est compromise par l'émergence de résistances. Cependant, son usage est aujourd'hui destiné aux soins de dernier recours, lorsque qu'aucune autre alternative n'est envisageable. Ceci est dû au fait qu'il existe peu d'essais cliniques récents et peu de phages dont la qualité répond aux exigences européennes. Ce manque de données de sécurité et de recul en occident freine le développement de cette thérapie pourtant prometteuse. A l'avenir, une évolution de la réglementation, des connaissances et de la pratique permettrons, je l'espère, de voir naître une thérapie antibactérienne efficace et sûre.

III. Partie 3 : Production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par « Phage display »

Aujourd'hui, les anticorps monoclonaux (Acm) présentent un intérêt majeur dans le traitement de nombreuses pathologies, notamment en oncologie, hématologie, rhumatologie, ophtalmologie et également dans le traitement des maladies auto-immunes. Issues des biotechnologies, 34 immunoglobulines ont obtenu une AMM en France(91). Ces anticorps peuvent être de différentes natures et être plus ou moins immunogènes, comme nous allons le voir dans cette partie. La technique de « Phage display » est une biotechnologie permettant la production d'anticorps monoclonaux, grâce à des bactériophages filamenteux, présentant des fragments d'anticorps à leur surface(34).

Cette technique a été découverte par Georges Smith en 1985, il remarqua alors fortuitement dans ses travaux, qu'un segment d'ADN, codant une protéine, fusionné à un gène phagique, codant pour une protéine exprimée à la surface du phage, permettait la présentation de cette première protéine à la surface d'un phage tout en restant lié au virion(92). Dans les années qui suivirent, on comprit l'importance de cet outil pour permettre la production de biomédicaments, comme les anticorps monoclonaux(93,94). En effet, c'est une méthode robuste, facile à réaliser et peu coûteuse par laquelle des liants d'antigènes spécifiques sont sélectionnés, parmi de grandes bibliothèques, combinatoires contenant des milliards de fragments d'anticorps.
Le premier anticorps monoclonal humain, et le plus célèbre, produit par « Phage display » est l'Adalimumab dont nous reparlerons plus tard(95).

A. Les anticorps monoclonaux

Les anticorps font partie intégrante du système immunitaire humain, ils apparaissent en réponse à la présence d'un antigène. Leur rôle est de protéger le corps humain en se liant avec une haute affinité et spécificité à l'antigène et en le neutralisant. Ils sont le produit de la réponse immunitaire adaptative.

Les anticorps sont de très grosses molécules, (environs 150kDa), qui possèdent une demi-vie plasmatique longue (jusqu'à 3 semaines pour les IgG) et dont la stabilité est grande. Ils peuvent être produits en grande quantité par des cellules de mammifères et présentent donc un intérêt considérable en thérapeutique(96).

Ce sont des immunoglobulines, c'est-à-dire des protéines sécrétées par les lymphocytes B activés par un antigène donné. Ces lymphocytes B vont alors subir une expansion clonale et se différentier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques. Chaque anticorps sera donc sécrété par une population de cellules issu d'un seul lymphocyte activé, appelé clone. Les anticorps monoclonaux sont donc des anticorps produits par un même clone de lymphocyte, et sont tous identiques entre eux. Les anticorps sécrétés seront alors tous spécifiques de l'antigène qui a déclenché leur production(97).

1. Structure d'un anticorps

Les anticorps, ou immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines solubles complexes. La majorité des anticorps se composent de quatre chaines d'acides aminés, deux chaines dites « légères » (L pour Light) identiques, et deux chaines dites « lourdes » (H pour Heavy) identiques. Ces quatre chaines polypeptidiques sont reliées entre elles par des ponts disulfures intra et inter chaines(98).

Les chaines légères se composent d'environs 230 acides aminés. Il existe deux isotypes de chaines légères : κ ou λ (représentant respectivement 60% et 40%). Chaque chaine légère se compose de deux domaines, un domaine variable (VL) et un domaine constant (CL).
Les chaines lourdes se composent de 450 à 600 acides aminés. Il existe cinq isotypes de chaines lourdes : μ, γ, α, ε et δ. Chaque chaine lourde se compose généralement d'un domaine variable (VH) et de trois domaines constants (CH1, CH2 et CH3), sauf les pour les IgM et les IgE qui possèdent quatre domaines constants(Figure 20)(95,96,98).

Les molécules d'anticorps se composent de deux chaines lourdes et de deux chaines légères. Chaque anticorps dispose d'une partie constante Fc (fragment constant) regroupant les domaines CH2 et CH3 des deux chaines lourdes, et deux parties variables Fab (fragment antibody binding) regroupant les domaines VL et CL de la chaine légère et les domaines VH et CH1 de la chaine lourde. Dans la partie variable, l'association des domaines variables de la chaine légère (VL) et de la chaine lourde (VH), appelé Fv, compose le site de liaison à l'antigène(98).

Chaque domaine variable VL et VH comporte trois régions hypervariables appelées CDR1, CDR2 et CDR3 (Complementary Determining Regions). Il y a donc six CDR (3 pour le domaine VL et 3 pour le domaine VH) qui composent le paratope de l'anticorps, c'est à dire le site de liaison à l'antigène qui reconnait une partie d'antigène appelé épitope (Figure 20)(99).

Il existe 5 types d'immunoglobulines (Ig) chez l'homme, définis selon l'isotype de la chaine lourde : IgM (chaine lourde μ), IgG (chaine lourde γ), IgA (chaine lourde α), IgE (chaine lourde ε), et IgD (chaine lourde δ). Ces chaines lourdes sont associées à l'un des deux isotypes de chaines légères.
Les deux isotypes les plus présents sont les IgM généralement issues de la réponse immunitaire primaire et les IgG généralement issues de la réponse immunitaire secondaire et qui sont donc plus spécifiques et affines(99).

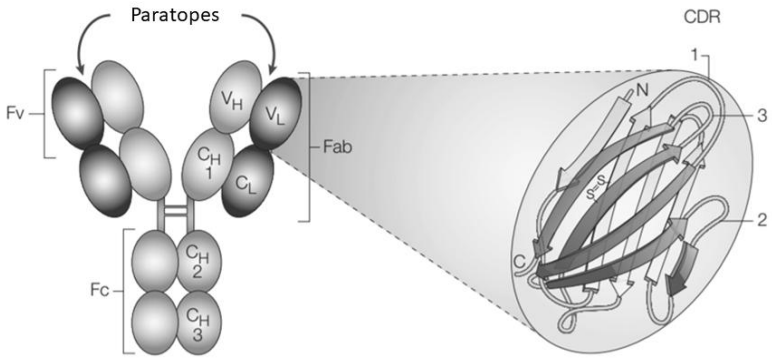


Figure 20 : Structure protéique d'une immunoglobuline IgG. Les sphères représentent les différents domaines des chaines légères et lourdes de l'anticorps. La spécificité de liaison est déterminée par les domaines VH et VL (Fv). Dans le zoom du domaine variable VL on observe les 3 régions hypervariables CDR(100).

2. Génétique d'un anticorps

Les immunoglobulines sont codées par plusieurs locus de gènes se trouvant sur trois chromosomes différents : les gènes codant pour les chaines lourdes se trouvent sur le chromosome 14 et les gènes codant pour les chaines légères se trouvent sur les chromosomes 2 et 22.
La diversité des immunoglobulines réside dans un mécanisme appelé recombinaison V(D)J (Figure 21). Cette recombinaison aléatoire a lieu entre les différents gènes codant pour les domaines variables des chaines lourdes et légères (VH et VL). Le domaine variable des chaines légères est codé par 2 types de gènes : les gènes V (Variable) et les gènes J (Joining). Le domaine variable des chaines légères est codé par 3 types de gènes : les gènes V (Variable), les gènes D (Diversity) les gènes J (Joining). Il y a donc un réarrangement entre les gènes V et J pour les chaines légères et un réarrangement entre les gènes V, D et J pour les chaines lourdes (Figure 20). Cette recombinaison a lieu dans la moelle osseuse lors du développement des cellules B(99).

Des multitudes d'immunoglobulines différentes sont ainsi crées. Ces immunoglobulines sont d'abord des IgM membranaires, exposées à la surface des lymphocytes B qui n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique. Ensuite, un signal en cascade va activer le lymphocyte B, si ses IgM membranaires reconnaissent leur antigène spécifique. Une expansion clonale de ce lymphocyte va alors se produire(99).
Une partie de ces clones va se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps IgM solubles : c'est la réponse immunitaire primaire. L'autre partie va subir 2 événements génétiques supplémentaires : une hypermutation somatique et une commutation isotypique. L'hypermutation somatique est un ensemble de mutations se produisant au sein des régions hypervariables (CDR) dans les organes lymphoïdes secondaires. Ce phénomène a pour but d'augmenter l'affinité et la spécificité de l'immunoglobuline envers son antigène. La commutation isotypique correspond au passage d'un isotype à un autre (généralement de l'isotype IgM à IgG) grâce à un mécanisme génétique qui permet un changement dans la chaine lourde des anticorps. Ces 2 mécanismes font partie de la réponse immunitaire secondaire qui améliore la réponse primaire. Les lymphocytes B modifiés vont alors proliférer et se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgG le plus souvent(99).

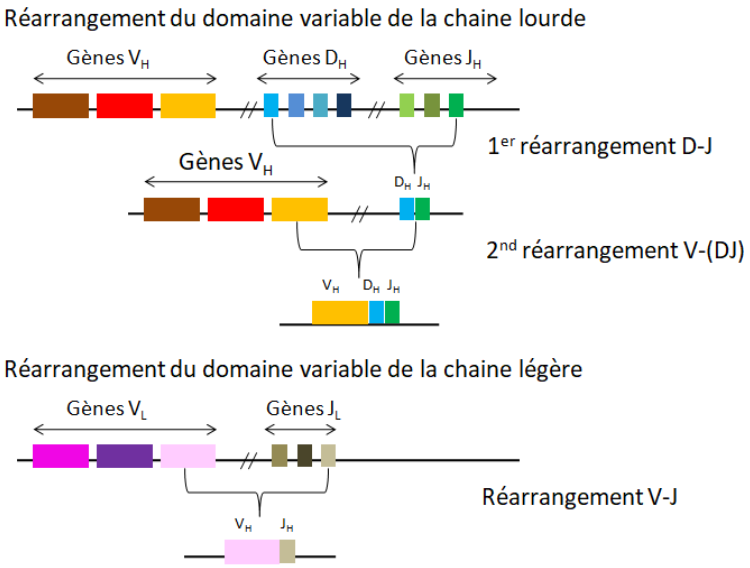


Figure 21 : Recombinaison V(D)J : réarrangement des segments de gènes codant les domaines variables mode des chaines lourdes et légères(100).

3. Fragments variables d'anticorps

L'utilisation des anticorps en thérapeutique repose sur leur capacité à se lier à un antigène et à le neutraliser. Comme nous l'avons vu précédemment, ce sont les fragments variables des anticorps qui possèdent cette capacité. Ainsi, seule cette partie est nécessaire à l'ingénierie de nouveaux anticorps thérapeutiques par « Phage display ». De plus, la technologie du « Phage display » ne permet pas de présenter des peptides trop grands et encombrants, et encore moins un assemblage de plusieurs chaines peptidiques comme les immunoglobulines. Il est donc impossible de présenter des anticorps entiers à la surface des bactériophages, seuls des fragments d'anticorps le pourront. De ce fait, la technique du « Phage display » est restreinte à l'utilisation et à la présentation par phage display de fragments d'anticorps variables très manipulables et modifiables.

Il existe plusieurs types de fragments variables : les fragments Fab (antigen-binding fragment), les fragments Fv (Fragment variable), les fragments scFv (single chain fragment variable) et d'autres dont nous ne parlerons pas ici (Figure 22).

On a vu que les fragments Fab étaient composés des domaines VL et CL de la chaine légère (25kDa) et des domaines VH et CH1 de la chaine lourde (25kDa). Les segments VL-CL et VH-CH1 sont liés par un pont disulfure. Ces fragments sont obtenus soit par protéolyse d'anticorps naturels par la papaïne (Figure 21), soit par génie génétique. La papaïne est une enzyme protéolytique qui lyse un anticorps en 3 parties : une partie Fc et 2 parties Fab. Lorsqu'ils sont obtenus par génie génétique, ces fragments recombinants sont des assemblages de segments VL-CL et VH-CH1.

Généralement, les fragments Fab conservent leur activité de liaison lors de la conversion en anticorps thérapeutiques (IgG le plus souvent), ce qui en fait un élément de choix pour la construction de banques(95,96).

Les fragments Fv se composent du domaine VL de la chaine légère et du domaine VH de la chaine lourde. Cependant, les deux domaines ne sont pas liés de façon covalente et sont donc peu stables et se dissocient rapidement. Ces fragments sont donc très peu utilisés pour la technique du « Phage display »(94).

Les fragments scFv sont les fragments d'anticorps les plus utilisés. Un segment scFv est un segment Fv recombinant où les domaines VL et VH sont liés par une courte chaine peptidique (environ 15 acides aminés) appelé « linker ». Ce segment est plus petit que les Fab (25kDa) et est produit par génie génétique. Le « linker » est utilisé pour stabiliser la connexion VL-VH et pour assurer la formation correcte du site de liaison à l'antigène. Ces fragments ont été exprimés sur la surface du phage sans perte d'affinité, mais l'activité de liaison peut parfois être perdue ou modifiée lors de la conversion du scFv en anticorps contrairement au Fab. Cependant, les scFv sont exprimés à des niveaux plus élevés que les Fab dans *E.coli*(96,101).

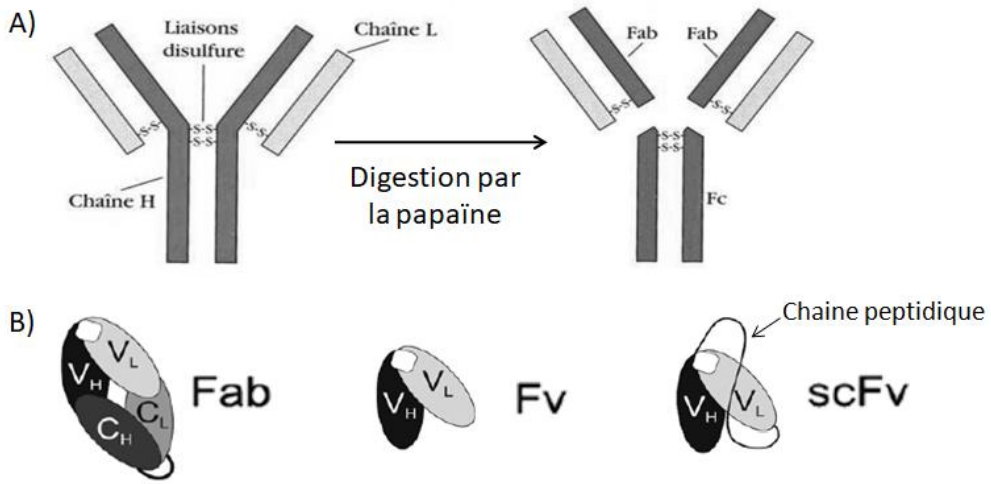


Figure 22 : A) Digestion protéolytique d'un anticorps IgG par la papaïne. B) Représentation schématique des différents fragments d'anticorps variables: Fab, Fv et scFv(101,102).

4. Différents types d'anticorps monoclonaux thérapeutiques

Comme vu précédemment, les anticorps monoclonaux (ACm) sont des anticorps tous identiques entre eux, car ils sont issus du même clone de plasmocyte. Ils reconnaissent donc le même épitope (partie de l'antigène reconnue par l'anticorps).

Depuis les années 70, ce sont succédés plusieurs type d'ACm : les ACm murins, chimériques, humanisés et humains(100) (Figure 23).

Les ACm murins (nom de molécules se terminant par OMAB) sont les premiers à avoir été produits grâce à la technique simple des hybridomes mis au point par Milstein et Kohler. Cette technique consiste à immuniser une souris avec un antigène donné afin qu'elle produise des anticorps contre cet antigène. Une splénectomie est ensuite réalisée afin d'isoler les lymphocytes B de la souris. Ces lymphocytes sont alors fusionnés avec des cellules immortelles de myélome pour obtenir des hybridomes. Les hybridomes sont alors des cellules immortelles capables de produire des anticorps. Un criblage de ces hybridomes est ensuite réalisé afin d'isoler l'hybridome qui produit les ACm spécifiques de l'antigène pour lequel la souris a été immunisée. Cependant, les ACm murins ont été peu utilisés car ce sont des xénoantigènes pour l'homme, qui conduisent à la production d'anticorps anti-anticorps murins. De plus, leur demi-vie est courte et ils ne peuvent se fixer aux récepteurs de la partie constante des anticorps humains (R-Fc) permettant la réponse effectrice des anticorps(96,100,103).

Pour diminuer l'immunogènicité des ACm, l'ingénierie génétique a été utilisée pour produire des ACm chimériques (nom de molécules se terminant par XIMAB). Un anticorps chimérique est la fusion entre les domaines constants d'un anticorps humain (IgG) et les domaines variables VH et VL d'un ACm murin, obtenu par immunisation d'une souris avec un antigène donné. Ces ACm sont à 70% humains et 30% murins. Ils s'obtiennent en fusionnant les gènes des parties constantes d'IgG avec les gènes de parties variables de l'ACm murin. Ce gène de fusion est alors transformé dans des bactéries afin qu'elles produisent cet ACm en grande quantité. Bien que ces anticorps soient moins immunogènes, des réponses immunitaires anti-anticorps chimériques ont été observées(96,100,103).

Pour limiter encore plus l'immunogènicité, on diminue d'avantage les parties murines de l'ACm pour obtenir un ACm humanisé (nom de molécules se terminant par ZUMAB)(104). Le principe est le même que pour les ACm chimériques, sauf qu'ici seules les parties CDR1, CDR2 et CDR3, qui composent l'épitope de l'ACm murin, sont insérées dans une IgG humaines. Ces ACm sont à 95% humains et 5% murins(96,100,103).

Enfin les ACm humains ne comportent aucune partie murine et ne sont donc pas censés être immunogènes. Ils sont produits soit par la technique du « Phage display » dont nous allons parler ultérieurement, soit à l'aide de souris transgéniques humanisées. Ces souris ont été génétiquement modifiées et possèdent les gènes nécessaires à la production d'anticorps humains, tandis que leurs gènes codant des anticorps murins ont été inactivés.
L'immunisation d'une telle souris avec un antigène donné donne lieu à une réponse immunitaire produisant des anticorps humains, et à partir de laquelle des hybridomes produisant des anticorps humains peuvent être générés(96).

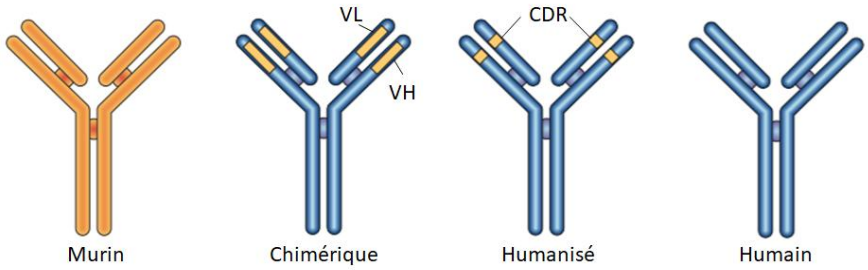


Figure 23 : Représentation schématique des différents types d'anticorps monoclonaux. Les zones jaunes représentent les parties murines et les zones bleues les parties humaines(103).

B. Le phage filamenteux M13

1. Structure du phage filamenteux

Les phages utilisés pour réaliser la technique dite du « Phage display » sont majoritairement des phages filamenteux, appartenant à la famille des *Inoviridae*. Il existe un certain nombre de phages filamenteux infectant des bactéries Gram- (*E.coli* notamment). Ces bactériophages ne possèdent pas de symétrie binaire comme les caudovirales, et ne se composent donc pas d'une tête et d'une queue mais seulement d'une longue capside hélicoïdale. Leur génome est un ADN simple brin circulaire, encaissé dans une longue capside cylindrique d'environ 7nm de diamètre et de longueur comprise entre 900 et 2000nm suivant la taille du génome. Le phage représentatif de cette classe est le phage M13 qui infecte les souches d'*E.coli* qui expriment le pilus F (Figure 24). En effet, l'absorption du phage sur la bactérie nécessite la liaison d'une protéine du manteau du phage, à l'extrémité du pilus F. C'est le phage le plus utilisé pour réaliser la technique du « Phage display » ces trente dernières années. Ce phage sauvage mesure environ 6,5 nm de diamètre et 930nm de long(105).



Figure 24 : Microscopie électronique du phage M13(105).

Le génome du phage M13 mesure 6407 pb et contient 11 gènes qui codent pour des protéines aux multiples fonctions : réplication de l'ADN, assemblage et composition de la capside.

Les gènes II, V et X codent pour des protéines cytoplasmiques impliquées dans la réplication de l'ADN (G2P, G5P et G10P). Les gènes I, IV et XI codent pour des protéines nécessaires à l'assemblage du phage mais qui ne font pas partie intégrante de la particule phagique (G1P, G4P et G11P). Enfin, les gènes III, VI, VII, VIII et IX codent pour les protéines constituant la capside du phage M13 (G3P, G6P, G7P, G8P et G9P) (Figure 25). Ces protéines sont intéressantes pour réaliser la technique du « Phage display ». La protéine G8P est le monomère composant le long cylindre flexible de la capside (Environ 2700 monomères de G8P sont nécessaires) et est la protéine majeure de la capside. A l'une des extrémités de ce cylindre, on trouve environ 5 molécules de chacune des protéines G7P et G9P, ce sont des protéines membranaires mineures de la capside. A l'autre extrémité on trouve environ 5 molécules de chacune des protéines G3P et G6P(105). Ces protéines membranaires intégrales sont des protéines mineures de la capside qui forment une cape distale et sont nécessaires à la stabilité de la particule phagique. De plus, la protéine G3P permet l'entrée du phage dans la cellule hôte(106).

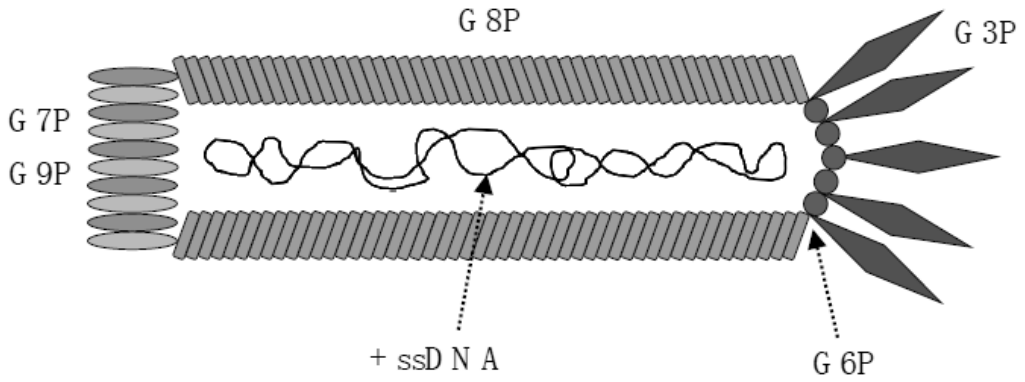


Figure 25 : Représentation schématique du bactériophage filamenteux M13, porteur d'un chromosome à ADN simple brin (ssDNA). Le génome code 11 protéines dont 5 sont des protéines de capside (G3P, G6P, G7P, G8P et G9P)(107).

2. Cycle chronique du phage filamenteux

Les bactériophages utilisés pour la technique du « Phage display » sont donc très différents des phages de l'ordre des caudovirales utilisés pour la phagothérapie. Ces différences se trouvent au niveau de leur morphologie, comme nous venons de le voir, mais également au niveau de leur cycle d'infection et de réplication, et c'est cette différence qui les rend très intéressants ici.

Nous avons vu dans la première partie que la majorité des phages présentait un cycle lytique qui conduisait à la destruction de la bactérie (90%), ou un cycle lysogénique dans lequel le génome phagique s'intégrait au chromosome bactérien (10%).

Mais il existe aussi un nombre très restreint de bactériophages qui présentent un cycle de type « intermédiaire » dit chronique. Le terme chronique vient du fait que le phage ayant infecté une bactérie reste en équilibre avec celle-ci, et est fabriqué et libéré par la bactérie sans que cette dernière ne soit détruite, à l'inverse du cycle lytique(34).

En effet, le matériel génétique de cette famille de phages n'est encapsidé, pour devenir une particule phagique mature, qu'au moment où elle est extraite de la bactérie. Ce processus permet de préserver l'intégrité de la membrane cellulaire de l'hôte(108). La libération des phages se poursuit ainsi pendant des périodes prolongées tandis que les cellules se développent. Néanmoins ce phénomène se produit lentement(3).

Le cycle d'infection d'*E.coli* par le phage M13 comporte au moins deux étapes.
Tout d'abord, la première étape du cycle chronique commence par l'interaction spécifique d'une extrémité du phage avec celle du pilus F de la bactérie : c'est l'absorption. C'est la protéine G3P, à une extrémité du bactériophage, qui est impliquée dans cette reconnaissance. Un de ses domaines N-terminal appelé N2 va se fixer au pilus. Il s'ensuit une probable dépolymérisation du pilus F, amenant l'extrémité du phage à la surface de la membrane bactérienne. La seconde étape implique l'intégration de la protéine majeure de la capside, G8P, dans la membrane interne, et la translocation de l'ADN phagique dans le cytoplasme de la bactérie. Cette translocation nécessite au préalable la liaison du domaine N-terminal N1 de la protéine G3P, à une protéine particulière appelée protéine TolA, qui fonctionne comme un co-récepteur à la surface de la bactérie. Le mécanisme précis de cette translocation n'est pas encore connu(Figure 26) (105,107).

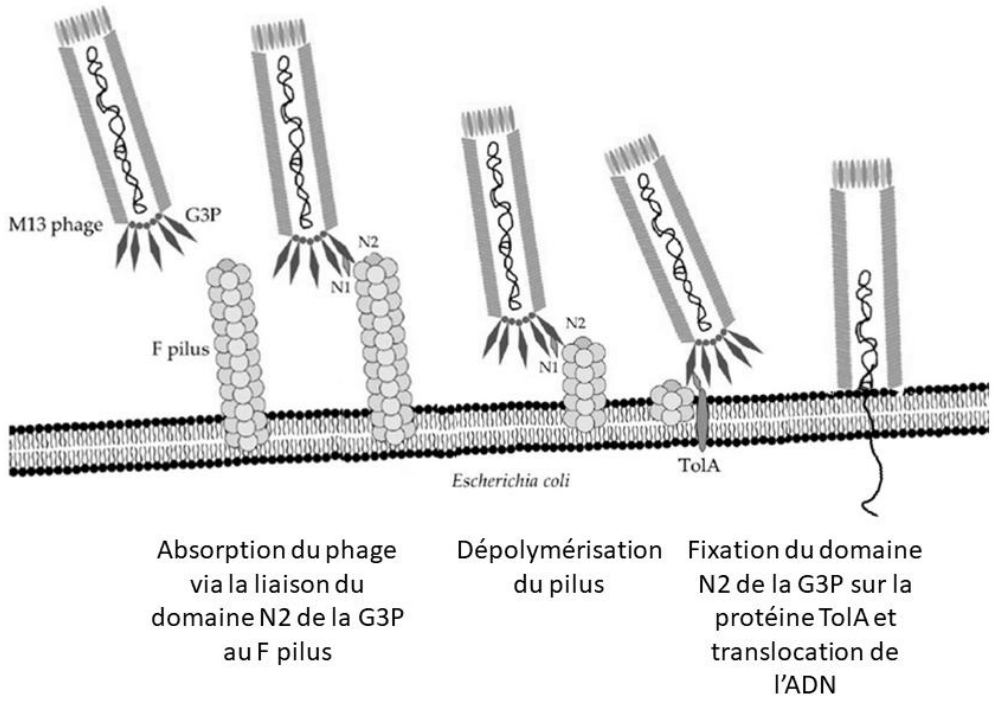


Figure 26 : Infection d'*Escherichia coli* par le phage M13. La protéine phagique G3P se lie à la pointe du pilus F sur *E. coli*. La dépolymérisation du pilus F transporte le phage à la surface de la bactérie, où il interagit avec le récepteur TolA, médiateur de la translocation du génome du phage(107).

Une fois l'ADN phagique injecté dans le cytoplasme de la bactérie, la machinerie cellulaire de l'hôte va synthétiser un brin d'ADN simple brin négatif complémentaire au brin d'ADN simple brin positif du phage M13, donnant ainsi un ADN double brin surenroulé.

Cette molécule d'ADN double brin va alors servir pour la production des différentes protéines de la particule phagique via les mécanismes de transcription et de traduction de la bactérie : c'est la phase précoce de l'infection. Elle permet aussi la production d'enzyme phagique permettant la synthèse d'ADN phagique simple brin. Le retour à la forme simple brin va permettre la production de nouveaux ADN double brin servant à la synthèse des protéines. Cette forme simple brin va aussi servir pour la formation de nouveaux virions après encapsidation de cet ADN : C'est la phase tardive de l'infection(105–107).

Ensuite, les protéines de la capside et les protéines nécessaires à l'assemblage de la particule phagique vont être intégrées dans l'enveloppe cellulaire. L'ADN simple brin va alors être séquestré dans une chape protéique composée de monomères de protéines G5P et transporté vers la membrane, et c'est à cette localisation que l'assemblage aura lieu. Les protéines de la capside vont alors s'assembler autour de l'ADN, en remplaçant les monomères de G5P, pendant que celui-ci est excrété au travers de l'enveloppe par un pore formé par d'autres protéines phagiques (G4P, G1P et G11P). L'assemblage commence par une phase d'initiation, qui consiste en la formation de l'extrémité composée des protéines G7P et G9P. Ensuite, la phase d'élongation se produit avec l'assemblage du long cylindre formé d'une multitude de protéines G8P. Enfin, la terminaison de cet assemblage consiste en l'association des protéines G3P et G6P. La particule phagique est alors libérée dans l'environnement (Figure 27) (105–107).

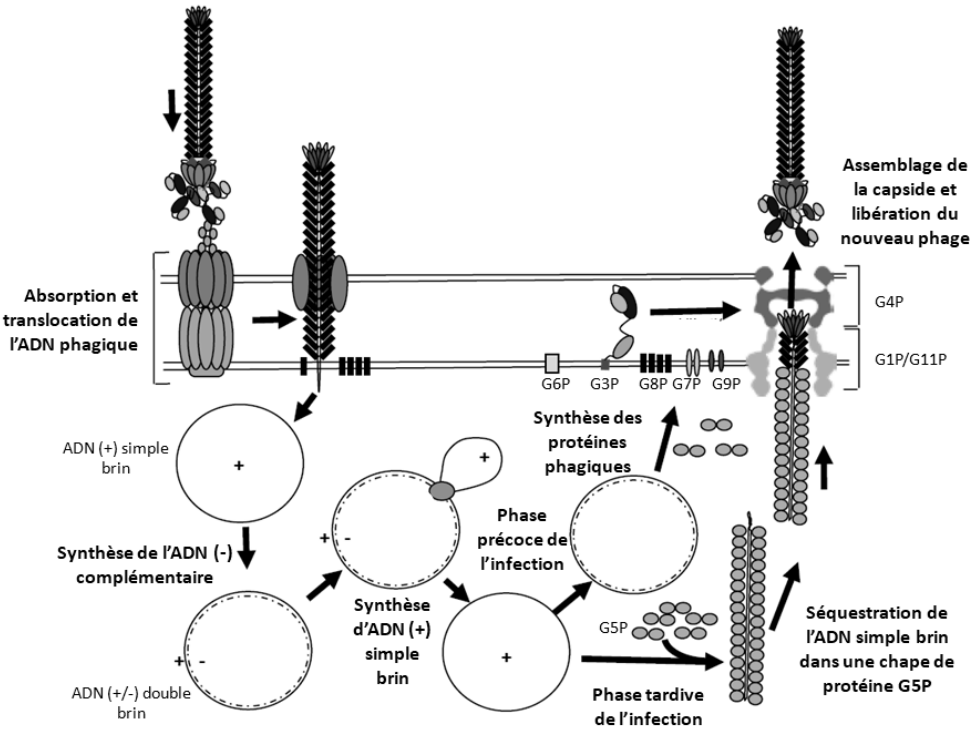


Figure 27 : Synthèse du cycle chronique du phage M13
ADN positif simple brin : (+) ; ADN négatif simple brin : (-) ; ADN double brin : (+/-)(106)

C. Principe de la production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par la technique du « Phage display »

L'application la plus spectaculaire de la technique de phage display se trouve dans le domaine de la production d'anticorps humains, donc moins immunogènes. Cette technique se caractérise par la présentation, par un bactériophage, de peptides à sa surface, comme des fragments d'anticorps dans notre cas. Pour cela, il faut cloner le gène de cette protéine dans le génome du phage, en fusion avec un gène d'une protéine de la capside. Cette protéine de fusion est alors exprimée à la surface du phage. Les phages pourront ensuite être exposés à une cible, ici un antigène, dans le but de sélectionner et d'isoler une population monoclonale de phages se liant à cette cible. Cette méthode permet de lier directement une protéine (phénotype) à son gène apparenté (génotype) via un phage.

Nous allons maintenant voir les différentes étapes de cette technologie plus en détail(34,38).

1. Fabrication des banques de fragments d'anticorps

La technologie du « Phage display » commence par la création de banques de phages présentant à leur surface différents fragments d'anticorps. Ces fragments correspondent à des parties variables d'anticorps (scFv, Fab ou Fv), qui sont les régions permettant la liaison spécifique de l'anticorps à un antigène.
Ainsi, en clonant un grand nombre de gènes codant pour des fragments d'anticorps, de larges banques de phages peuvent être générées à partir desquelles de nombreux anticorps peuvent être sélectionnés. Ces banques sont un mélange hétérogène de plusieurs milliers de phages portant un segment d'ADN étranger différent et présentant donc à leur surface des fragments d'anticorps différents(109,110).

a) Création de phages exprimant à leur surface des fragments d'anticorps

Le but de cette première étape est de créer des phages dont le génome comporte un gène de fusion, entre un gène codant pour une protéine de la capside, et un gène de fragment d'anticorps variable. Les protéines de la capside les plus utilisées sont la G3P et la G8P. La G3P est la protéine la plus fréquemment utilisée, car elle permet de présenter des peptides de plus grande taille, car il y a moins de contraintes géométriques lors de l'assemblage de ce monomère. Ainsi, de nombreux peptides pourront alors être présentés sur différents endroits du phage : soit à une extrémité, si le peptide est fusionné au domaine N-terminal de la G3P (phage de type 3), ce qui est majoritairement utilisé, soit le long du cylindre de la capside si le peptide est fusionné à la G8P (phage de type 8) (Figure 28)(96,109).

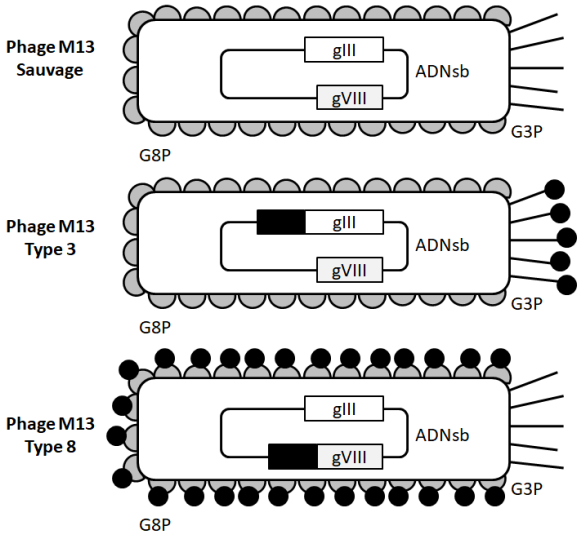


Figure 28 : Différents phages M13. Le rectangle et les sphères noirs correspondent respectivement au gène étranger et à ses protéines codées. Ici les protéines sont fusionnées soit à la protéine G3P, soit à la protéine G8P(109).

ADNsb: ADN simple brin ; gIII: gène phagique codant pour la G3P ; gVIII: gène phagique codant pour la G8P

Pour créer ces phages, une technique complexe est majoritairement utilisée. Cette méthode nécessite l'intervention d'un vecteur phagemide et d'un phage M13 auxiliaire appelé phage « helper ».

Un phagemide est un vecteur combinant les caractéristiques d'un plasmide et d'un phage. Un plasmide est une molécule d'ADN bicaténaire, circulaire, pouvant se répliquer de manière indépendante, dans une bactérie, grâce à une origine de réplication bactérienne. Le phagemide est donc un plasmide qui contient en plus de son origine de réplication bactérienne, d'*E.coli* le plus souvent (ColE1 ori), une origine de réplication phagique (M13 ori). Un phagemide a donc la capacité d'être répliqué comme un plasmide, et empaqueté dans la capside d'un phage.

Les phagemides utilisés pour créer les banques contiennent également différents gènes de protéine de fusion [G3P-fragment d'anticorps], et un marqueur de sélection bactérienne (gène de résistance à un antibiotique) (Figure 29). Plus la diversité des fragments d'ADN (codant pour des parties variables d'anticorps) clonés dans les vecteurs phagemides est grande, plus l'isolement d'anticorps sera optimum lors de l'étape suivante. Des bactéries *E.coli* sont alors transformées avec ces plasmides, c'est-à-dire qu'ils sont insérés dans leur cytoplasme. Les bactéries ayant intégré un phagemide sont ensuite sélectionnées sur un milieu de culture contenant l'antibiotique correspondant au gène de résistance inséré dans le phagemide, ainsi seules les bactéries ayant intégré un phagemide survivront sur le milieu(96,107,109).

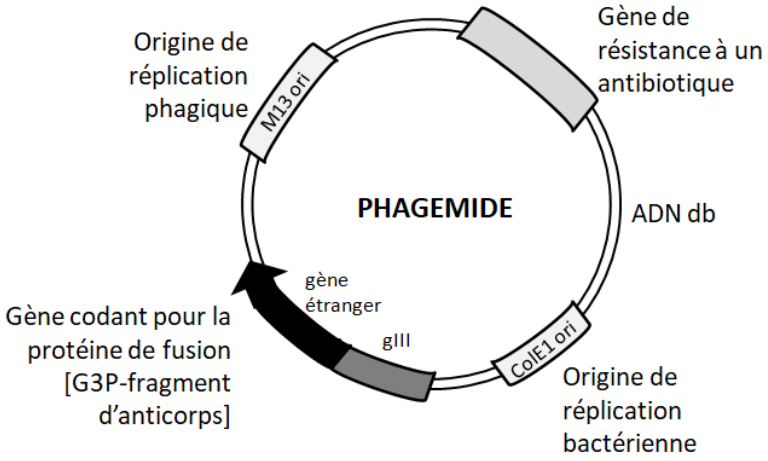


Figure 29 : Vecteur phagemide
gIII : Gène codant pour la protéine G3P, ADN db : ADN double brin

Ces bactéries sont ensuite infectées par un phage « helper ». Un phage « helper » est un phage qui comporte tous les gènes nécessaires à la formation de la capside et à la libération de nouveaux phages dans le milieu, mais dont l'origine de réplication est défaillante. En effet, les cellules d'*E.coli* transformées ne possèdent pas les gènes nécessaires pour l'assemblage de nouveaux phages, excepté le gène de la G3P présent dans le phagemide. Le phage « helper » ayant une origine de réplication défaillante, seul le phagemide est répliqué de manière abondante dans la cellule. Ainsi, le phagemide est préférentiellement encapsidé dans les nouveaux phages(96,111). Comme le phage « helper » contient une copie sauvage du gène de la G3P, il y a production dans la cellule de protéines G3P sauvages exprimées depuis l'ADN du phage « helper », et de protéines de fusion [G3P-fragment d'anticorps] exprimées depuis le phagemide.
Ainsi, les phages sécrétés transportent le phagemide et disposent à leur surface d'un mélange de protéines G3P sauvages et de protéines de fusion [G3P-fragment d'anticorps](111). Toutes les étapes précédemment décrites sont résumées dans le schéma ci-dessous (Figure 30).
Les protéines de fusion présentées à la surface du phage sont donc diluées avec les protéines G3P sauvages, amenées par le phage « helper » (en général une copie de protéine de fusion est présentée). Ceci est un avantage, car seules les protéines G3P sauvages permettent d'infecter d'autres bactéries. De plus, cette diminution de la valence de protéines fusionnées permet de présenter des peptides de plus grande taille sans avoir de gêne stérique, et favorise la sélection de ligands de haute affinité(94,109,111).

En réalisant cette méthode de manière répétée avec de nombreux gènes codant pour différentes parties variables d'anticorps, il est ainsi possible de créer de grandes banques de fragments d'anticorps.

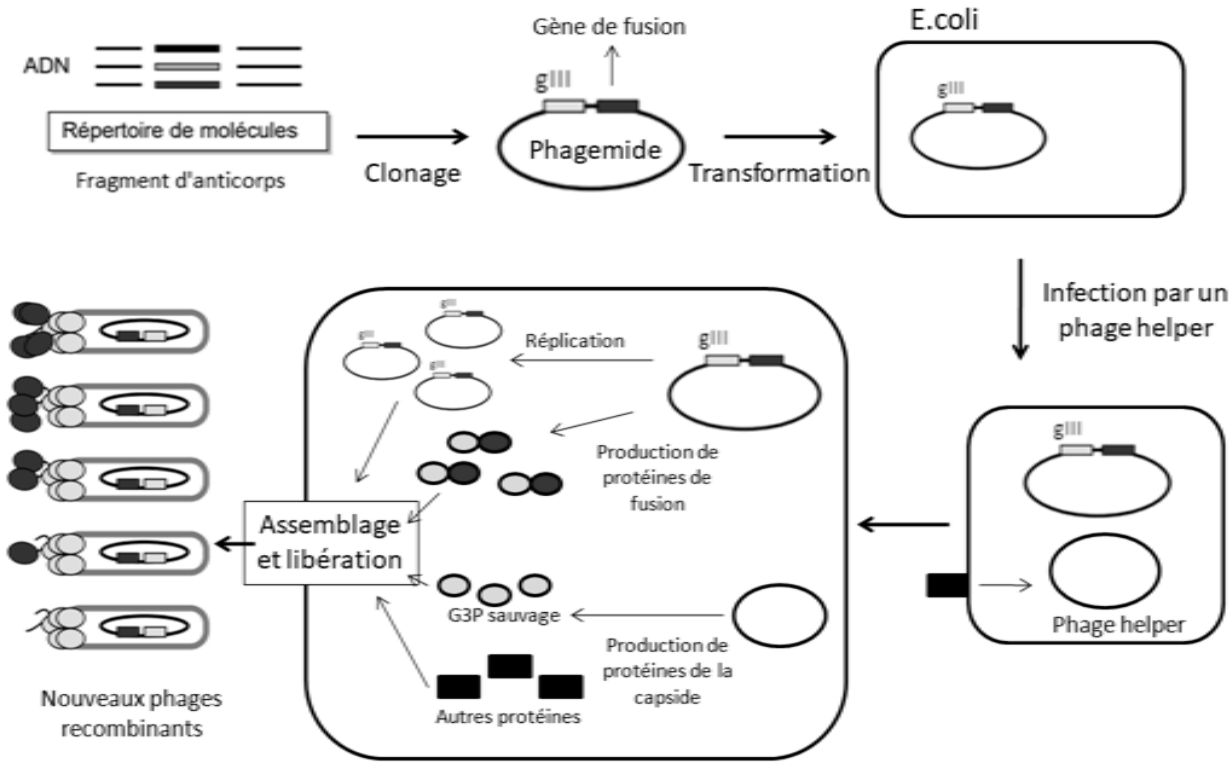


Figure 30 : Schéma récapitulatif de la création de phages exprimant à leur surface un fragment d'anticorps(94).

b) Les différentes banques de fragments d'anticorps

Il existe quatre types de banques de fragments d'anticorps, qui se différencient suivant l'origine des gènes des parties variables d'anticorps qui les composent : les banques naïves, les banques immunisées, les banques combinatoires et les banques synthétiques et semi-synthétiques.

(1) Les banques naïves

Les banques de fragments d'anticorps naïves sont construites à partir de gènes de parties variables, VH et VL d'IgM de lymphocytes B d'humains non immunisés, c'est-à-dire n'ayant pas été en contact avec l'antigène ciblé. Ces lymphocytes sont extraits de tissus tels que la rate, la moelle épinière, le sang ou les amygdales.
Les banques naïves sont de très bonnes sources d'anticorps humains. Elles peuvent être utilisées pour permettre la liaison à une large gamme d'antigènes, bien que les fragments d'anticorps qui les composent présentent généralement de plus faibles affinités, que des fragments d'anticorps issus d'une source immunisée. Ainsi, elles nécessitent d'avoir une taille considérablement plus grande que les banques d'anticorps immunisés, afin d'augmenter la probabilité de générer des ligands spécifiques de la cible (plus de 10^9 clones)(96,101,107,111).

(2) Les banques immunisées

Les banques de fragments d'anticorps immunisées sont construites à partir de gènes de parties variables, VH et VL d'IgG de lymphocytes B d'humains immunisés, c'est-à-dire ayant été en contact avec l'antigène ciblé (de manière naturelle). Ces lymphocytes sont généralement extraits de la rate de patients immunisés.
L'avantage de ce type de banques, est que la maturation de l'affinité des fragments variables de l'anticorps, a déjà eu lieu dans le corps humain immunisé, et que les anticorps isolés ont donc une affinité et une spécificité élevées vis-à-vis de l'antigène qu'ils reconnaissent. Une banque immunisée n'a donc pas besoin d'être aussi grande qu'une banque naïve, parce que le répertoire immunisé est déjà très enrichi en ligands spécifiques de la cible. Cependant, certaines limitations existent, dont la nécessité de construire une nouvelle banque pour chaque antigène. Cela engendre un coût élevé et un processus long. De plus, il est nécessaire de recenser des patients naturellement immunisés contre une pathologie, car l'éthique actuelle ne permet évidemment pas d'immuniser volontairement un patient contre un antigène donné(96,101,107,111).

(3) Les banques combinatoires

Les banques combinatoires sont construites avec des gènes réarrangés de VH et VL. En effet, in vivo les gènes VH résultent d'un réarrangement combinatoire des gènes V-D-J et les gènes VL résultent d'un réarrangement des gènes V-J. Ces gènes réarrangés VH et VL issus de lymphocytes B peuvent être amplifiés séparément et réassemblés de manière aléatoire avant d'être clonés dans des phagemides pour créer des banques combinatoires(Figure 31)(94,96).

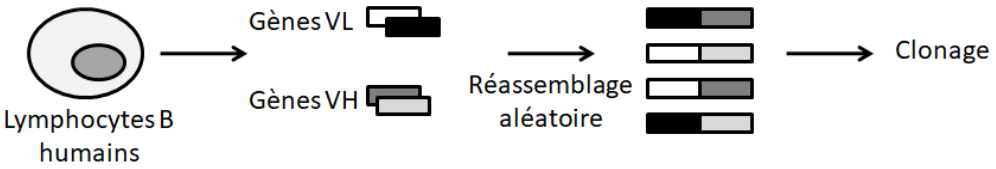


Figure 31 : Création d'une banque combinatoire

(4) Les banques synthétiques et semi-synthétiques

Les banques de fragments d'anticorps semi-synthétiques et synthétiques sont construites à partir de gènes de parties variables VH et VL dans lesquels une modification des parties CDR a été introduite. Les 6 parties CDR d'un anticorps sont des régions hypervariables formant le paratope de cet anticorps, c'est-à-dire le site de liaison à l'antigène. On peut ainsi créer une grande diversité. D'abord, des banques semi-synthétiques sont construites grâce à une substitution d'acides aminés dans un ou plusieurs CDR, créant ainsi des CDR aléatoires diversifiés.

Par la suite, des banques entièrement synthétiques ont été créés par introduction de 6 CDR aléatoires entièrement construits par synthèse avec des oligonucléotides(96,101,111).

2. Sélection de fragments d'anticorps par « Phage display » et production d'anticorps monoclonaux

Une fois les banques de fragment d'anticorps créées, on peut procéder à la sélection par « Phage display ». Le protocole de sélection de fragments d'anticorps se compose de plusieurs étapes (Figure 32).

La première étape consiste à immobiliser l'antigène d'intérêt sur une surface (au fond d'un puits d'immunotubes ou de plaques ELISA le plus souvent). Ensuite, la banque de phages souhaitée est additionnée dans le puits où l'antigène est immobilisé. Il se produit ensuite la liaison des phages, présentant les fragments d'anticorps avec la plus haute affinité, à l'antigène. Après un lavage permettant d'éliminer les phages présentant des fragments d'anticorps non liés à l'antigène, le processus se poursuit par l'élution des phages fixés à l'antigène. Ces phages sont ensuite amplifiés dans des bactéries *E.coli* à l'aide de phage « helper » comme vu précédemment, et de nouveau sélectionné sur l'antigène immobilisé.

Cependant, il se peut que des liaisons non spécifiques se produisent, ainsi, pour accumuler des phages présentant des fragments d'anticorps ayant une forte affinité pour l'antigène cible, ces étapes sont réitérées plusieurs fois (1-3 fois). Enfin, vient l'étape de screening : les phages sélectionnés à la précédente étape sont isolés et le phage ayant la plus forte affinité avec l'antigène est sélectionné grâce à différentes techniques telle que l'ELISA(101,107,111).

Le concept de base du « Phage display » étant la liaison du phénotype de la protéine de fusion au génotype intégré dans le génome du phage, on a donc accès aux séquences d'ADN codant les fragments variables d'anticorps hautement spécifiques de l'antigène. Ces séquences d'ADN de parties variables d'anticorps sont alors fusionnées aux séquences d'ADN de parties constantes d'anticorps humain de type IgG par génie génétique. Le tout est alors cloné dans une cellule capable de produire des anticorps en grande quantité(95).

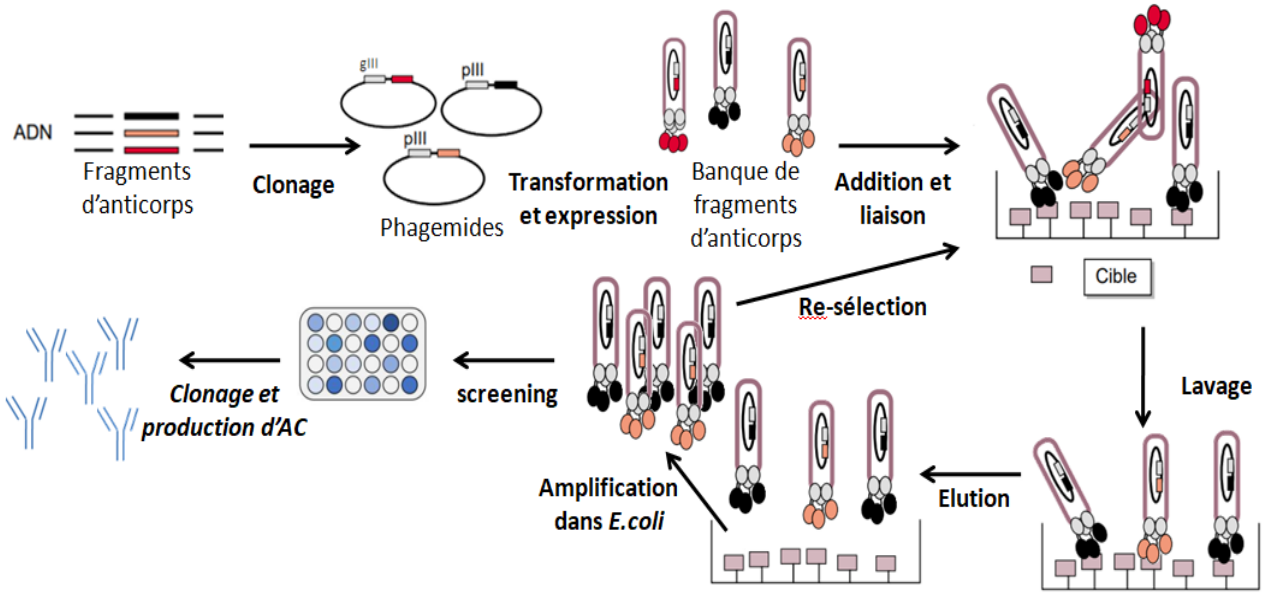


Figure 32 : Etapes de la sélection de fragments d'anticorps par « Phage display » et de la production d'anticorps monoclonaux(94,107).

D. Anticorps monoclonaux disponibles en officine

Les anticorps monoclonaux sont des biomédicaments et sont donc produits grâce aux biotechnologies comme nous l'avons vu. En effet, ils sont définis dans l'*article L5121-1 du Code de la santé publique* comme des médicaments biologiques, soit « tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle »(112). Cette catégorie de médicaments est en plein essor avec de nouvelles AMM chaque année. Actuellement, plus de 30 anticorps monoclonaux sont commercialisés en France et plusieurs centaines sont en cours d'essais cliniques. Parmi ces ACm, 16 sont disponibles en officine(91).

Le premier anticorps monoclonal ayant eu une AMM est le muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®), en 1986. C'est une IgG murine anti-CD3. Le CD3 est une molécule associée au récepteur TCR des lymphocytes T humains, nécessaire à la transduction du signal d'activation des lymphocytes après reconnaissance de l'antigène par le TCR. Cet ACm a été utilisé comme immunosuppresseur dans les rejets de greffes jusqu'à l'abrogation de son AMM en 2013 car cette molécule était très immunogène(113).

1. Cibles et anticorps monoclonaux en officine

a) Anti-TNFα

Le TNFα (facteur de nécrose tumorale alpha) est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires notamment auto-immunes. L'Adalimumab (HUMIRA®) est le premier ACm anti-TNFα à avoir été commercialisé, mais c'est également le premier ACm humain à avoir été produit par la technique du « Phage display » en 1994. Aujourd'hui, l'Adalimumab possède de nombreux biosimilaires (AMGEVITA®, HULIO®, HYRIMOZ®, IMRALDI®, IDACIO®). Un médicament biosimilaire est défini par l'ANSM comme un « similaire d'un médicament biologique de référence qui a déjà été autorisé en Europe ». L'efficacité et la sécurité du biosimilaire doivent être équivalentes au biomédicament de référence, et il doit posséder les mêmes propriétés biologiques. Ceci nécessite la mise en place d'essais précliniques et cliniques contrairement à ce qui est nécessaire pour les génériques. Par la suite, d'autres ACm anti-TNFα ont vu le jour, le Certolizumab pegol (CIMZIA®) et le Golimumab (SIMPONI®)(114).

L'Adalimumab est indiqué dans de nombreuses pathologies inflammatoires : polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, rectocolite hémorragique, spondylarthrite ankylosante, rhumatismes psoriasiques, psoriasis, arthrite juvénile idiopathique, uvéite et hidrosadénite suppurée(115).
Le Certolizumab est indiqué dans la polyarthrite rhumatoïde, la spondyloarthrite axiale et les rhumatismes psoriasiques(116).
Le Golimumab est indiqué dans la polyarthrite rhumatoïde, la rectocolite hémorragique, les rhumatismes psoriasiques et la spondylarthrite ankylosante(117).

b) Anti-interleukine

Les interleukines sont des molécules de l'immunité essentielles à la communication entre les cellules immunitaires. Elles régulent ou stimulent les réponses immunitaires. Un dérèglement dans leur production peut donc être à l'origine de pathologies(118). Il existe 5 ACm anti-interleukine disponibles en officine.

L'Ustekinumab (STELARA®) est un ACm anti-IL-12 et anti-IL-23, En effet, il se lie à une sous unité commune de ces deux interleukines. L'Ustekinumab diminue donc la réaction inflammatoire en inhibant l'action de l'IL-12 et de l'IL-23 qui permettent l'activation des cellules NK (Natural Killer) et la différentiation de lymphocytes TCD4+. Cet ACm est indiqué dans le psoriasis en plaque et dispose d'une RTU (recommandation temporaire d'utilisation) pour la maladie de Crohn(119,120).
L'Ixekizumab (TALTZ®) et le Secukinumab (COSENTYX®) sont des ACm anti-IL-17A, interleukine impliquée dans la prolifération et l'activation des kératinocytes.

L'Ixekizumab est indiqué dans le psoriasis et le Secukinumab est indiqué dans le psoriasis, les rhumatismes psoriasiques et la spondylarthrite ankylosante(121,122).
Le Mépolizumab (NUCALA®) est un ACm anti-IL-5, interleukine impliquée dans la croissance, la différenciation et l'activation des éosinophiles. Il est indiqué dans l'asthme(123).
Enfin, le Canakinumab (ILARIS®) est un ACm anti-IL-1β, interleukine pro-inflammatoire activant la synthèse de médiateurs de l'inflammation. Il est indiqué dans l'arthrite goutteuse, le syndrome périodique associé à la cryopyrine et l'arthrite juvénile idiopathique systémique(124).

Le Tocilizumab (ROACTEMRA®) est un ACm anti-IL-6R. Les IL-6R sont les récepteurs de l'interleukine 6, qui est une interleukine pro-inflammatoire. Il est indiqué dans l'arthrite juvénile idiopathique systémique et la polyarthrite rhumatoïde(125).

Le Benralizumab (FASENRA®) est un ACm anti-IL-5R. L'IL-5R est le récepteur de l'interleukine 5, présent à la surface des éosinophiles et basophiles. Il est indiqué dans l'asthme(126).

c) Anti-VEGF

Le Ranibizumab (LUCENTIS®) est un ACm anti-VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor-A). Le VEGF est un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire humain impliqué dans la prolifération des cellules endothéliales et entrainant donc une néovascularisation. Cdt ACm est indiqué dans des pathologies ophtalmiques telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la néovascularisation choroïdienne et les œdèmes maculaires(127).

d) Autres anticorps monoclonaux disponible en officine

L'Omalizumab (XOLAIR®) est un ACm anti-IgE humaine. Les IgE sont des immunoglobulines qui, une fois fixées à leur récepteur (FcεR1), déclenchent des réactions allergiques. Il est indiqué dans l'asthme et dans les urticaires(128).
Le Denosumab (PROLIA® et XGEVA®) est un ACm anti-RANKL. RANKL est le ligand du récepteur RANK des ostéoclastes, qui entraine une résorption osseuse. Il est indiqué dans l'ostéoporose et la perte osseuse liée à certains cancers.
Le Bélimumab (BENLYSTA®) est un ACm anti-BLyS, dirigé contre Blys qui est un facteur de survie des lymphocytes B. Il est disponible en officine depuis peu et est indiqué dans le lupus érythémateux(129,130).
L'Evolocumab (REPATHA®) et l'Alirocumab (PRALUENT®) sont des ACm anti-PCSK9. Le PCSK9 est une molécule qui se fixe aux récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LDL-R) des hépatocytes et entraine sa dégradation. En présence des ACM-PCSK9, il y a donc une augmentation de ces récepteurs, qui permettent une diminution du LDL cholestérol sérique.

L'Evolocumab est indiqué dans l'hypercholestérolémie et les dyslipidémies mixtes. L'Alirocumab est indiqué dans l'hypercholestérolémie primaire, les dyslipidémies mixtes et les pathologies cardiovasculaires(131,132).

2. Effets indésirables et contre-indications

a) Effets indésirables communs

Comme tous les médicaments, les anticorps monoclonaux sont pourvoyeurs de nombreux effets indésirables. Tout d'abord, les réactions aux points d'injection sont très fréquentes et provoquent des douleurs, saignements, œdèmes, hématomes et érythèmes. Il existe ensuite un risque d'immunogènicité avec l'apparition d'anticorps anti-ACm, surtout si ces ACm ne sont pas humains. Ceci entraine une efficacité moindre et un risque de chocs anaphylactiques. Ils peuvent aussi être à l'origine d'immunosuppression, puisqu'ils sont presque tous spécifiques d'une molécule impliquée dans l'immunité. Cette immunosuppression peut être à l'origine d'infections (bactériennes ou virales). Ces infections se développent majoritairement dans les voies respiratoires hautes et basses, au niveau cutané ou urinaire. Ces immunossupressions augmentent également le risque de cancers cutanés. Des leucopénies (neutropénie et agranulocytose) sont fréquentes avec les ACm anti-TNFα. D'autres manifestations ont été rapportées comme des troubles cardiovasculaires, hépatiques ou gastro-intestinaux. Il existe, bien sûr, des effets indésirables spécifiques de chaque anticorps monoclonal(91).

b) Contre-indications communes

La première contre-indication absolue à la prise d'un ACm est bien évidemment l'hypersensibilité à l'anticorps en question qui nécessite l'arrêt immédiat du traitement. La seconde contre-indication est la présence de foyers infectieux actifs car la majorité des ACm sont immunosuppresseurs. Il existe également une contre-indication en cas de tuberculose latente avec les anti-TNFα. Dans la majorité des cas, il n'existe pas de contre indications documentées avec la grossesse et l'allaitement. Cependant, en l'absence de données cliniques, ces traitements sont majoritairement non recommandés dans ces circonstances et la mise en place d'une contraception efficace est demandée. Enfin, les vaccins vivants sont contre indiqués avec les biomédicaments(91).

3. Prescription et délivrance

Tous les ACm sont des médicaments d'exception, du fait de leur prix élevé, appartenant à la liste I. Ils suivent des règles particulières pour la prescription et la délivrance.
Ces ACm sont des médicaments à prescription initiale hospitalière annuelle (PIH), et des médicaments dont la prescription est réservée à certains spécialistes (PRS).

Le renouvellement peut être réservé aux spécialistes (à l'hôpital ou en ville), ou peut être réalisé par un médecin généraliste sur présentation de l'ordonnance originale hospitalière. La prescription médicale doit être rédigée sur une ordonnance d'exception quatre volets(114).

La délivrance à l'officine nécessite aussi une attention particulière. Le pharmacien d'officine doit s'assurer des connaissances du patient sur son traitement, et lui donner les conseils essentiels. Le patient doit connaitre les modalités de respect de la chaine du froid, les différents effets indésirables graves, et particulièrement savoir reconnaitre les premiers signes d'une infection, afin d'en avertir au plus vite les professionnels de santé qui l'accompagnent. Lors de la délivrance, le pharmacien d'officine doit s'informer auprès du patient de la tolérance du traitement et vérifier qu'il n'y a aucun signe d'infection, notamment pulmonaire (fièvre, toux, gêne respiratoire…). Pour limiter les risques d'infections, le pharmacien doit éduquer le patient, pour limiter les portes d'entrées infectieuses, en préconisant une bonne hygiène dentaire, corporelle et génitale. Il faut également vérifier le calendrier vaccinal du patient, et lui conseiller de se vacciner contre la grippe saisonnière(91,133).

IV. Partie 4 : Utilisation des phages en tant que détecteurs de bactéries

Comme nous l'avons vu précédemment, les bactériophages sont spécifiques d'une espèce de bactérie voire d'une sous-espèce. Ils sont donc un potentiel moyen d'identification de leur bactérie cible. En effet, grâce à cette qualité primordiale, à leur facilité d'utilisation et à leur production aisée, ils permettent leur utilisation en tant que détecteurs de bactéries.

Par conséquent, des recherches approfondies ont été menées pour accélérer leur utilisation dans la détection d'agents pathogènes humains dans différents domaines, tels que la médecine ou la sécurité sanitaire. Néanmoins, très peu de diagnostics sont réalisés à l'aide de phages, bien que leurs attributs permettent une détection sensible et hautement spécifique(134).

A. Surveillance sanitaire des eaux et des produits alimentaires

1. Détection de bactéries pathogènes dans les eaux

En France, la qualité de l'eau du robinet et des eaux de baignade est régulièrement contrôlée et fait l'objet d'un suivi sanitaire obligatoire.

a) Qualité des eaux de consommation

Une mauvaise qualité de l'eau de boisson engendre des risques à court terme pour son consommateur. En effet, la présence de virus, parasites ou bactéries dans ces eaux, quel qu'en soit leurs origines (Protection insuffisante des sources, mauvais entretien des dispositifs de captage, dysfonctionnements dans le système de désinfection ou contaminations externes), peut entrainer des symptômes gastro-intestinaux bénins au sein de la population générale, mais potentiellement graves pour les personnes sensibles (nourrissons, personnes âgées, immunodéprimés…)(135).

Cette surveillance est réalisée par les responsables de la production et de la distribution de l'eau, et par des contrôles sanitaires mis en place par l'Agence Régionale de Santé (ARS). Elle se fait par l'intermédiaire d'analyses d'échantillons d'eau prélevés en différents points du système de production et de distribution.
L'évaluation de la qualité de l'eau se base sur des paramètres microbiologiques, physico-chimiques ou radiologiques, dont les exigences sont inscrites dans le Code de la santé publique. Ces exigences sont de deux types en France :

- des limites de qualité, dont le dépassement entraine des risques pour la santé. Cela concerne majoritairement les paramètres microbiologiques.
- des références de qualité, qui reflètent l'état des installations, sans danger direct pour les consommateurs(136).

Toutes ces informations sont disponibles, commune par commune, sur le site du ministère des solidarités et de la Santé (https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/eaux/eau#La-qualite-microbiologique-de-l-eau-du-robinet(136) ou affichées en Mairie.

En France, la qualité de l'eau du robinet et très bonne dans l'ensemble. En effet, en 2018, 97,6% des français avaient accès à une eau respectant les limites de qualité pour les paramètres microbiologiques, 90,6% avaient accès à une eau respectant les limites de qualité pour les pesticides et 99,3% avaient accès à une eau respectant les limites de qualité pour les nitrates(137). Les zones les plus à risque de dépassement des limites de qualité sont les zones rurales avec des réseaux de distribution alimentant moins de 500 habitants.

b) Qualité des eaux de baignade

Les eaux de baignade (eau douce et eau de mer) sont aussi régulièrement contrôlées en France en période de saison balnéaire, afin de les classer parmi quatre catégories : excellente, bonne, suffisante ou insuffisante. Ces résultats reposent sur l'analyse de paramètres microbiologiques, car la présence de certaines bactéries pathogènes peut engendrer des risques infectieux de types gastro-entérites, conjonctivites, voire de la sphère ORL (Oto-Rhino-Laryngée).

En effet, plus de 3000 sites sont analysés par l'ARS dans le cadre de ce contrôle sanitaire. Ces contrôles sont satisfaisants puisqu'en 2018, 94% des sites de baignade étaient conformes aux limites de qualité et étaient classés comme sites de baignade d'excellente qualité (80%) ou de bonne qualité (14%).

Toutes ces informations sont disponibles sur le site du ministère des solidarités et de la Santé (baignades.gouv.fr) (Figure 33) ou dans les mairies des zones de baignade concernées(138).



Figure 33 : Qualité de l'eau de baignade du site Saint-Michel en Loire Atlantique vu sur le site baignades.gouv.fr (138)

c) Utilisation des phages

Dans cette partie, nous allons nous intéresser plus particulièrement à la recherche de bactéries dans les eaux de consommation et de baignade. Ces recherches permettent de mettre en évidence une éventuelle contamination fécale des eaux.

La recherche de micro-organismes pathogènes est un processus long et compliqué. En effet, la plupart des pathogènes d'origine fécale sont des virus dont la recherche est très complexe et onéreuse. L'analyse des paramètres microbiologiques se base donc sur la recherche de deux types de bactéries principales : Les coliformes totaux, dont fait partie *Escherichia coli,* et les entérocoques intestinaux, excrétés simultanément avec les autres micro-organismes fécaux dans l'environnement. En effet, ces bactéries sont des témoins de la contamination fécale des eaux. Elles ne représentent pas, à elles seules, un risque pour les usagers mais leur détection, révélatrice d'une contamination fécale, peut potentiellement indiquer la présence de bactéries et virus fécaux pathogènes pour l'homme(135).

Ces bactéries, dites indicatrices de contamination fécale, sont présentes en grande quantité lorsqu'elles sont excrétées, et leur recherche est techniquement facile. Ce sont les indicateurs actuellement utilisés, et la bonne qualité de l'eau dépend de leur absence lors des analyses. En effet, une ancienne étude de 1997 montre le lien entre la présence d'*E.coli* non pathogènes dans l'eau, et l'apparition de troubles digestifs chez des triathlètes en contact direct avec cette eau lors de l'épreuve de natation(139).
Cependant, de nombreuses études montrent qu'*E.coli* n'est pas un bon indicateur de contamination virale des eaux. En effet, cette bactérie est beaucoup moins résistante dans un environnement défavorable que les virus entériques(140).

Nous savons que les bactériophages possèdent une grande spécificité envers leur bactérie cible, et leur présence est donc souvent associée à celle de leur hôte. Ainsi, la présence d'un phage infectant *E.coli* est associée à celle de la bactérie elle-même. En effet, plus la concentration en coliphages augmente, plus la concentration en *E.coli* est grande. (Figure 34). De plus, la structure des phages avec leur capside, et leur absence d'enveloppe, les rend plus résistants dans l'environnement qu'*E.coli* ou les entérocoques. Or, les virus entériques pathogènes sont également très résistants dans l'environnement(141).

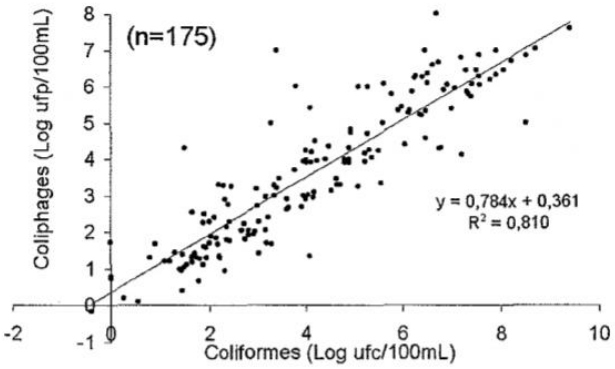


Figure 34 : Concentrations en coliphages en fonction des concentrations en coliformes (*E.coli*) dans l'ensemble des milieux hydriques(140)

Les phages utilisés en tant qu'indicateurs de contamination fécale ont donc un comportement similaire à celui des virus entériques infectant l'humain. Ils sont présents en grande quantité en cas de contamination fécale, et leur absence implique presque toujours l'absence de virus pathogène. Enfin, leur détection est simple, peu onéreuse et plus rapide que la détection de bactéries (8h contre 24h pour *E.coli*).

Ces phages sont, généralement, des coliphages infectant *E.coli*, et sont donc utilisés pour révéler la présence de cette bactérie, elle-même révélatrice de contamination fécale, avec présence de virus entériques. Une étude de Skraber *et al.* réalisée en 2004, sur 90 échantillons de rivières, montre en effet une corrélation entre le pourcentage d'échantillons où la présence de génome de virus entérique a été détectée, et la concentration en coliphages dans ces mêmes échantillons(Figure 35)(142).

De plus, leur résistance, comparable à celle de ces virus, permet une corrélation plus fiable entre la présence de coliphages et de virus entériques, par rapport à la corrélation entre la présence d'*E.coli* et de virus entériques. Cependant, ces phages, tout comme la bactérie *E.coli*, ne sont pas spécifiques d'une contamination fécale d'origine humaine, et ils sont retrouvés aussi bien dans des selles humaines que des selles animales(143).

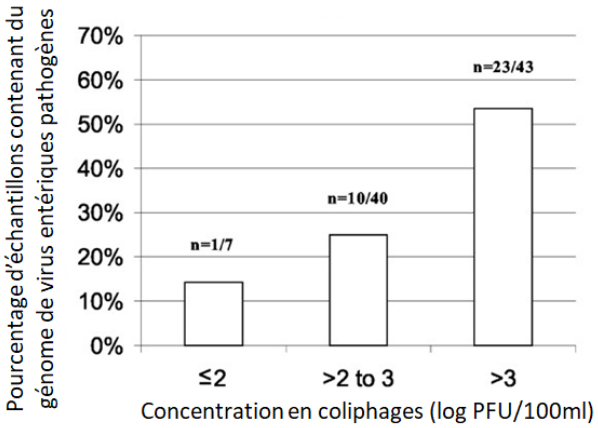


Figure 35 : Pourcentage d'échantillons de rivière contenant du génome de virus entériques pathogènes en fonction des concentrations en coliphages(142)

D'autres phages, spécifiques de *Bacteroides fragilis,* montrent une forte corrélation entre la présence de *Bacteroides fragilis* et celle d'entérovirus infectieux. Les phages de *B. fragilis* sont aussi résistants que les entérovirus et les rotavirus, et sont de très bons indicateurs de contamination fécale. De plus, une des souches de *B. fragilis (B. fragilis* HSP40) n'est associée qu'à des phages présents uniquement dans les selles humaines, et permet donc d'établir l'origine humaine de la contamination(143).

Dans ces études, la détection et la numération des phages sont réalisées par la technique des plages de lyse. Les phages sont cultivés sur une culture confluente tapis de la bactérie dont il est spécifique, puis les plages de lyse sont énumérées et rapportées au volume mis en incubation(140).

Récemment, une équipe du Laboratoire de chimie bactérienne de Marseille (UMR 7283), a mis au point l'outil Phagosensor, qui permet de détecter des germes pathogènes animaux ou humains dans l'eau, à l'aide de phages génétiquement modifiés. Un phage spécifique d'*E.coli* a été modifié génétiquement, afin d'exprimer de manière précoce et importante, lorsqu'il infecte sa bactérie cible, de la GFP (green fluorescent protein), une protéine fluorescente verte issue de la méduse Aequorea victoria. En effet, comme vu précédemment, l'expression des gènes d'un phage n'est possible qu'après infection. Ainsi, si un prélèvement est mis en contact avec ces phages, et s'il y a infection, donc la présence de la bactérie cible, les phages produisent de la GFP et émettent une fluorescence. Cette fluorescence est ensuite analysée grâce à une analyse par cytométrie en flux(Figure 36) (144,145). La cytométrie en flux est une technique qui permet de compter, une à une, des particules en suspension (cellules, bactéries…) et de mesurer pour chacune d'elle des caractéristiques, telles que la taille, la forme ou la fluorescence dans notre cas. Une à une, chaque particule est excitée par un faisceau laser et des détecteurs captent et analysent les signaux lumineux émis par cette particule(146).

Cet outil est rapide (2 heures), spécifique et sensible (détection à partir de 10 bactéries/ml). Il permet donc une utilisation des échantillons sans concentration préalable, contrairement à la technique de plages de lyse. Cet outil performant pourrait donc être également utilisé pour le diagnostic médical avec des fluides biologiques, bien que cela nécessiterait une multitude de phages de spécificités différentes(144,145).

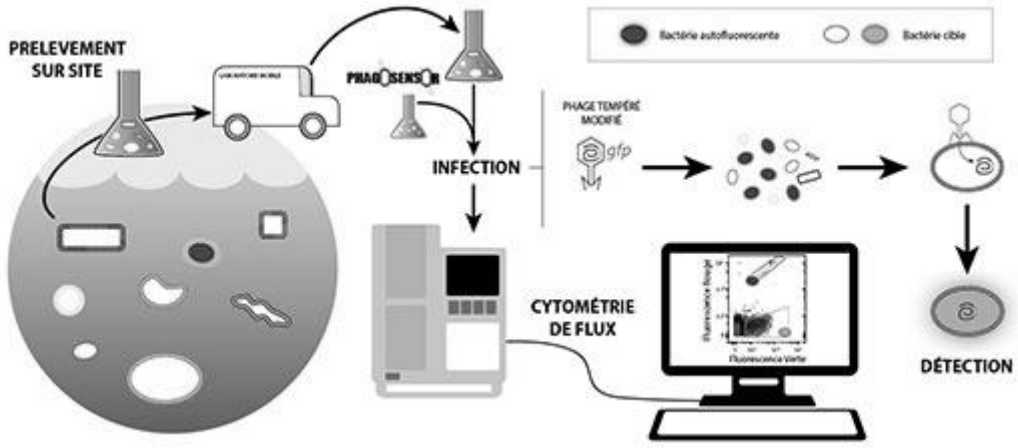


Figure 36 : Schéma général de la détection de bactéries pathogènes dans les eaux grâce à l'outil Phagosensor(145)

2. Détection de bactéries pathogènes en agro-alimentaire

L'utilisation des phages en tant que détecteurs de bactéries a aussi fait ses preuves en sécurité alimentaire. Les infections alimentaires sont certes peu fréquentes en France mais elles le sont beaucoup plus dans les pays émergents. La mondialisation permettant l'échange de denrées alimentaires, la sécurité alimentaire est donc devenue un enjeu majeur très réglementé.

C'est pourquoi il est nécessaire de réaliser des tests de détection microbiologique de bactéries pathogènes. En 2009, 2011 et 2012, la société Française BioMérieux a lancé respectivement trois tests de détection alimentaire d'*E.coli* O157, *Salmonella et Listeria.* Cette technologie, brevetée VIDAS® UP, se base sur l'utilisation de protéines recombinantes de phages, qui sont donc spécifiques de la bactérie ciblée, et permettent une détection même à de faibles concentrations. Ces protéines recombinantes de phages sont certainement des protéines de crochets ou de fibres, qui permettent la fixation des phages aux bactéries. Ces protéines sont spécifiques d'antigènes somatiques, comme l'antigène O présent sur la paroi des entérobactéries, ou d'antigènes flagellaires, comme l'antigène H présent sur les flagelles des entérobactéries mobiles(147).

C'est une méthode en deux étapes, d'abord la fixation de la protéine recombinante de phage à sa bactérie cible, puis la fixation secondaire sur cette protéine phagique d'un anticorps monoclonal, combiné à une enzyme fluorescente. L'intensité de la fluorescence est alors analysée(Figure 37) (148,149).

Cette technique sensible permet la détection de ces trois bactéries dans les denrées alimentaires et l'eau, et augmente ainsi la sécurité alimentaire. C'est la première technologie de détection microbiologique en sécurité alimentaire utilisant les phages.

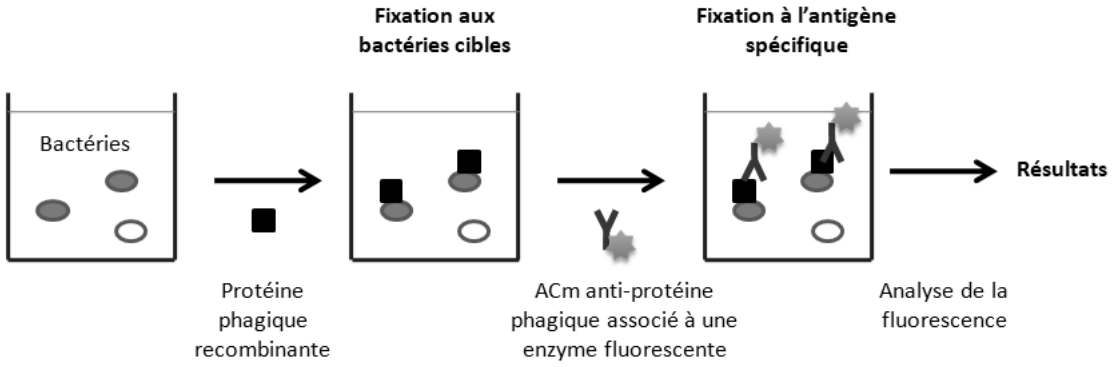


Figure 37 : Schéma général de la détection de bactéries pathogènes avec l'outil VIDAS® UP

B. Les phages dans le diagnostic médical

Cette capacité de diagnostic dont sont dotés les phages, peut, bien évidemment, avoir une application des plus intéressantes dans le diagnostic médical. Plusieurs laboratoires travaillent donc sur le développement de bactériophages, ou de produits dérivés des bactériophages, pour permettre une détection plus rapide et sensible d'agents pathogènes humains. Il existe déjà des tests de détection par les phages pour de nombreux pathogènes tels que *Brucella, Clostridium, Enterococcus, Salmonella, Shigella, Listeria, E.coli, Campylobacter, Bacillus cereus, Vibrio cholerae, Mycobacterium tuberculosis, Proteus, Yersinia* ou encore *Staphylococcus*. Mais ces tests demandent le maintien en stock d'un grand nombre de phages, limitant ainsi leur utilisation à quelques laboratoires de référence. Par conséquent, ces tests ne sont pas utilisés pour l'identification de ces agents pathogènes bactériens dans un contexte clinique. Le gold standard pour l'identification bactérienne, reste donc, le test traditionnel basé sur la culture bactérienne en milieu adapté(134).

Néanmoins, cette capacité est d'autant plus utile dans l'aide au diagnostic de maladies difficile à prouver cliniquement, ou de bactéries dont la culture sur milieu est complexe, comme c'est le cas pour les agents pathogènes de la tuberculose ou de la maladie de Lyme.

1. Diagnostic de la tuberculose à l'aide de mycobactériophages

La tuberculose est une maladie infectieuse encore fréquente et mortelle, causée par le bacille *Mycobacterium tuberculosis*. C'est l'une des dix premières causes de mortalité au monde. Cette maladie est particulièrement présente dans les pays en développement (Asie et Afrique pour 85% des cas), et cette maladie n'a toujours pas disparu dans les pays occidentaux. L'OMS estime que le diagnostic et le traitement par antibiotique ont sauvé environ 58 millions de malades entre 2000 et 2018(150).

Malheureusement, la tuberculose est sous diagnostiquée dans le monde du fait de la complexité, du coût, et du temps d'obtention des résultats pouvant aller jusqu'à 4 semaines (pour la culture du germe sur milieu et la réalisation d'antibiogramme pour détecter les souches résistantes aux antibiotiques)(151). En effet, malgré de nombreux programmes nationaux de lutte contre la tuberculose, de nombreux pays en développement ont de faibles taux de détection des cas, et de nombreux faux négatifs. Ces problèmes sont encore aggravés par l'émergence et la propagation de la tuberculose multirésistante (TB-MR) et de la tuberculose ultrarésistante (TB-XDR). Les Nations Unies ont donc défini une nouvelle cible à atteindre : garantir l'accès mondial au diagnostic et aux soins vis-à-vis de la tuberculose d'ici 2022(150).

Par conséquent, un diagnostic rapide, précis, et peu coûteux de la tuberculose pulmonaire est essentiel pour garantir l'initiation rapide et appropriée d'une antibiothérapie, pour empêcher toute transmission ultérieure, et diminuer la mortalité causée par cette maladie(134). Dans les années 40, il a été identifié pour la première fois le mycobactériophage, et son potentiel pour la détection de *M. tuberculosis,* dans le cadre d'un diagnostic médical, a tout de suite été reconnu. Ces tests de détection basés sur les phages sont rapides, simples, et peu couteux, ce qui les rend très intéressants. Il existe deux types de test : un test d'amplification des phages, après infection des bacilles et détection des phages par plages de lyse, et un test de détection de la lumière produite par un phage rapporteur, génétiquement modifié, produisant une luciférase après infection de *M. tuberculosis*. Ces deux approches exploitent la spécificité de l'interaction phage-bactérie, et nécessitent donc des bacilles viables, pour permettre la réplication du phage, ou l'expression du gène rapporteur(134).

Le premier test consiste à mettre en contact des mycobactériophages avec un liquide biologique potentiellement contaminé par *M. tuberculosis*. Si le bacille est présent, le phage se multiplie à l'intérieur de la cellule et est libéré par lyse de cette dernière. Ces phages libérés sont alors détectés après infection de tapis bactériens de souches indicatrices, non pathogènes. Des plages de lyse apparaissent alors sur le tapis bactérien, ce qui permet une quantification du bacille selon le nombre de plages de lyse (Figure 38). Ce test permet d'obtenir des résultats spécifiques et sensibles dans les 48 heures suivant la réalisation du prélèvement de l'échantillon(134).

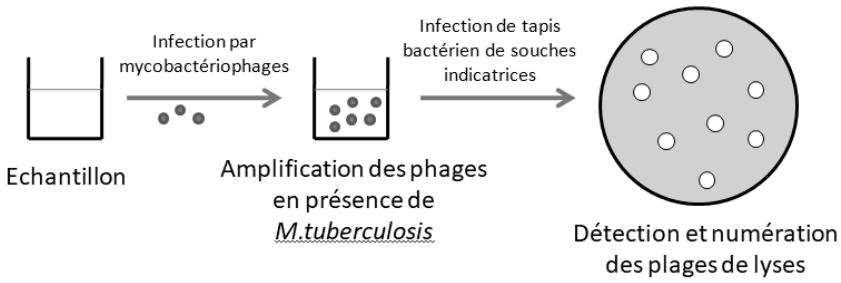


Figure 38 : Test de détection de *M.tuberculosis* par amplification de mycobactériophages(134)

Le deuxième test se base sur l'utilisation de phages recombinants comme vu précédemment. Un mycobactériophage a donc été génétiquement modifié pour produire une luciférase après infection de sa bactérie cible. La luciférase est une enzyme bioluminescente qui émet des photons détectables par un luminomètre. Ainsi, la luminescence observée sera directement liée à l'expression du gène par les bactériophages uniquement en cas d'infection de leur bactérie cible, et donc de sa présence dans l'échantillon (Figure 39). Ce test permet d'obtenir des résultats spécifiques et sensibles dans les 2-3 heures après la réalisation du prélèvement de l'échantillon(134).

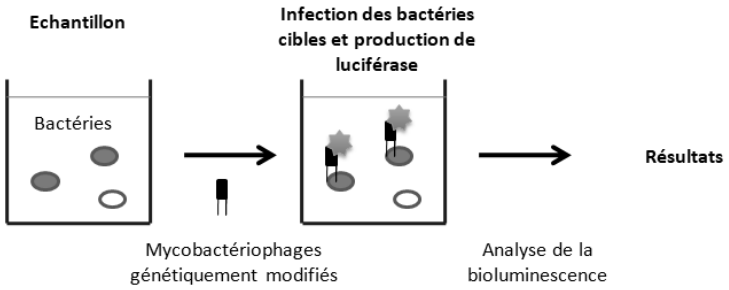


Figure 39 : Test de détection de *M.tuberculosis* par mycobactériophages rapporteurs(134)

2. Diagnostic de la maladie de Lyme

La maladie de Lyme ou borréliose de Lyme est une maladie due à l'infection du corps humain par la bactérie *Borrelia burgdorferi*. Cette pathologie est transmise à l'homme via la piqure d'une tique infectée. En France, c'est la maladie transmise par les tiques la plus fréquente avec 50 000 cas diagnostiqués et 800 hospitalisations par an(152).

Les symptômes cliniques de la maladie de Lyme sont souvent peu spécifiques, c'est pourquoi le diagnostic clinique doit toujours être confirmé par un test biologique. Le diagnostic biologique repose sur une sérologie (recherche d'anticorps) ou la recherche d'ADN de la bactérie (réservée à certains laboratoires). Les tests sérologiques réalisés en routine se réalisent en deux temps et se composent d'un test ELISA suivi d'une confirmation par Western-Blot(152).

Ces tests nécessitent une spécificité de 90% pour détecter la borréliose de Lyme. Malheureusement, ils sont souvent peu précis et de faux négatifs sont fréquents, du fait de la faible sensibilité du test. Des faux positifs sont également possibles à cause du manque de spécificité du test, notamment si le patient présente des anticorps contre des antigènes proches de *Borrelia* (comme la syphilis qui est aussi un spirochète comme les *Borrelia*)(152,153). En Juin 2018, la HAS a réalisé une synthèse des performances diagnostiques des tests de sérologie.

Pour une borréliose se manifestant par un érythème migrant, la sérologie en deux temps (ELISA plus Western-Blot) n'est positive que dans 30 à 40% des cas en phase aigüe et passe à 60% si le test est réopéré 4 à 6 semaines après les premiers symptômes.
Pour les autres manifestations cliniques (cutanées, neurologiques, articulaires, cardiaques et ophtalmologiques) la sensibilité oscille entre 77 et 97% et la spécificité entre 95 et 97%. Cependant, ces symptômes sont beaucoup plus rares et le diagnostic de cette maladie est souvent tardif(134,154). Ainsi, la faible sensibilité des tests sérologiques en deux temps en phase aigüe rend difficile le bon diagnostic de la borréliose de Lyme, le diagnostic clinique étant peu spécifique. En effet, ces tests se basent sur la recherche d'anticorps anti-*Borrelia* dans le sang, mais ces anticorps sont rarement présents, et les tests ne prennent pas en compte les anticorps dirigés contre toutes les espèces du genre *Borrelia*(155).

Ainsi, de nouveaux tests basés sur l'utilisation des bactériophages ont vu le jour. En effet, l'équipe de recherche du Dr Louis Teulières (sous l'égide de l'association PHELIX France) a travaillé sur un test qui détecte, non pas la bactérie *Borrelia burgdoferi*, mais le phage de cette bactérie. En effet, les bactériophages sont 10 à 100 fois plus présents dans la nature que les bactéries, et leur détection est, par ce fait, beaucoup plus probable que celle des bactéries. Ainsi, si un phage est présent, sa bactérie spécifique l'est aussi, puisque que l'infection de cette dernière par le phage et le seul moyen de multiplication de ce dernier(155).

Ainsi, en 2014, l'association PHELIX France, en partenariat avec l'université de Leicester en Angleterre, a développé un test sensible à 93%, Le PHELIX PHAGE TEST(154). Ce test consiste à rechercher l'ADN des phages par PCR (Polymérase Chain Reaction). Pour se faire, l'équipe de recherche a recensé et caractérisé tous les phages spécifiques de toutes les souches de *Borrelia*. Suite à cela, ils ont identifié une séquence d'acides nucléiques communes à l'ADN de tous ces bactériophages, et mis au point un test PCR(155). Un test PCR détecte directement l'agent infectieux en recherchant son ADN, contrairement aux tests sérologiques qui dépendent de la production d'anticorps(156). Ici, le test PCR est réalisé sur un échantillon de sang du malade, ou sur tout autre liquide biologique. Le test permet ensuite la recherche de la séquence d'ADN commune aux phages de *Borrelia burgdoferi,* et amplifie cette dernière si elle est présente. L'amplification de cette séquence peut alors être détectée et signe la positivité du test. Le PHELIX PHAGE TEST est très spécifique, possède une sensibilité 50% supérieure aux autres tests et différencie les différentes espèces de *Borrelia*(157). A l'avenir, ces tests pourront certainement permettre le diagnostic précoce de la maladie de Lyme, entrainant une prise en charge thérapeutique efficace.

CONCLUSION

Les bactériophages bénéficient d'attributs remarquables, de mieux en mieux connus, qui en font des outils intéressants dans de nombreux secteurs, et tout particulièrement dans le domaine de la santé humaine.

Avec un passé riche en rebondissements, ils sont aujourd'hui de plus en plus présents dans le domaine de la santé avec des applications s'élargissant d'année en année. Ils se positionnent, à mon sens, comme une véritable alternative à l'antibiothérapie en cas de résistances ou d'impasses thérapeutiques. Mais cette application nécessite encore de nombreuses études afin de sécuriser leur utilisation, et une mise à jour réglementaire est nécessaire pour permettre une possible utilisation de la phagothérapie à grande échelle à travers le monde.

De plus, ils permettent la production de médicaments biologiques, dont la place est de plus en plus importante dans l'arsenal thérapeutique et qui sont de plus en plus présents dans les pharmacies d'officine. Il me semble donc essentiel que les pharmaciens soient formés à la dispensation de telles spécialités, et qu'ils comprennent leur mode de fabrication biotechnologique qui en font leurs particularités : prix, nécessité du respect de la chaine du froid, concept de biosimilarité, et existence de potentielles différences entre deux lots d'une même spécialité, du fait de leur production par des êtres vivants. La compréhension de ce qui se passe en amont de la délivrance de ces biomédicaments, devrait, à mon avis, aboutir à l'autorisation du pharmacien d'officine à substituer un biomédicament par son biosimilaire (30% moins cher en moyenne).

Enfin, le rôle des phages en tant que détecteurs de bactéries permet la sécurisation sanitaire de l'alimentation humaine, ainsi que celle des loisirs en eaux de baignade. En diagnostic, ils permettent une recherche plus rapide, moins onéreuse, et plus sensible et spécifique de germes difficilement cultivables. A l'avenir, ils permettront certainement le diagnostic d'autres pathologies.

Nous avons ainsi passé en revue trois des grandes utilisations des phages dans le domaine de la santé. Cependant, leurs applications sont bien plus larges (biologie moléculaire, prophylaxie agroalimentaire, génétique ou encore traitement des tumeurs(23)) et ouvrent un bel avenir pour ces virus.

Bibliographie

1. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. Ann Burns Fire Disasters. 31 mars 2015;28(1):13-20.

2. Dublanchet A. Définition et origine des termes. In: La phagothérapie: des virus pour combattre les infections. [Nouvelle édition augmentée et mise à jour]. Lausanne : Éditions Favre; 2017. p. 14-20.

3. Mc Grath S, Sinderen D van. Bacteriophages and food fermentations. In: Bacteriophage genetics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2007. p. 93-123.

4. Hankin M.E. L'action bactéricide des eaux de la Jumma et du Gange sur le microbe du cholera. Ann L'Institut Pasteur. 1896;

5. Twort FW. An investigation on the nature of the ultra-microscopic viruses. The lancet. 1915;2:1241-3.

6. Publications service. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. Res Microbiol. 1 sept 2007;158(7):553-4.

7. Institut Pasteur. Bactériophages, virus des bactéries - Virus et maladies virales. Disponible sur: https://phototheque.pasteur.fr:443/fr

8. D'Hérelle F. Le bactériophage son rôle dans l'immunité. Monographie de l'institut Pasteur. Paris: Masson; 1921.

9. NICOLLE P. HÉRELLE FÉLIX D' (1873-1949). In Encyclopædia Universalis. Disponible sur: http://www.universalis-edu.com.docelec.u-bordeaux.fr/encyclopedie/felix-d-herelle/

10. D'Hérelle F. Les pérégrinations d'un microbiologiste. (manuscrit non publié). Une édition partielle et sous presse; 1946.

11. Summers WC. Félix Hubert d'Herelle (1873–1949): History of a scientific mind. Bacteriophage. 4 janv 2017];6(4). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5221746/

12. Bordet J. Concerning the theories of the so-called "bacteriophage". British Medical Journal. 1922;296-7.

13. Duckworth DH. « Who discovered bacteriophage? ». Bacteriol Rev. déc 1976;40(4):793-802.

14. Kutter E, Sulakvelidze A. Discovery of bactériophages. In: Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press; 2004. p. 7-16.

15. D'Hérelle F. Le bactériophage et son comportement. Masson et cie Ed. Paris, France. 1926.

16. VIEU J-F. BACTÉRIOPHAGES ou PHAGES. In Encyclopædia Universalis. Disponible sur: http://www.universalis-edu.com.docelec.u-bordeaux.fr/encyclopedie/bacteriophages-phages/

17. Ackermann H-W. Tailed Bacteriophages: The Order Caudovirales. In: Maramorosch K, Murphy FA, Shatkin AJ, éditeurs. Advances in Virus Research. Academic Press; 1998. p. 135-201. Disponible sur: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006535270860785X

18. Ackermann H-W, et al. Bacteriophage taxonomy. Microbiol Aust. 2011;32(2):90-4.

19. Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophage classification. In: Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press; 2004. p. 68-86.

20. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponible sur: https://talk.ictvonline.org/taxonomy/

21. Université de Louvain. UCLOUVAIN FDP Virologie. Initiation à la virologie. Disponible sur: https://www.virologie-uclouvain.be/fr/chapitres/generalites-sur-les-virus/taxonomie

22. Chiura HX, Tagaki J. Phage-Like Particles Production and Gene Transfer by Marine Bacteria. Bull Jpn Soc Microb Ecol. 1994;9(2):75-90.

23. Dublanchet A. Virus et bactériophages. In: La phagothérapie: des virus pour combattre les infections. [Nouvelle édition augmentée et mise à jour]. Lausanne : Éditions Favre; 2017. p. 51-87.

24. Structure bactérienne. Disponible sur: http://www.microbiologie-medicale.fr/microbiologie-generale/structure-bacterienne.html

25. Kutter E, Sulakvelidze A. Basic phage biology. In: Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press; 2004. p. 30-63.

26. Mc Grath S, Sinderen D van. Transfer of DNA from phage to host. In: Bacteriophage genetics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2007. p. 209-28.

27. Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophage in the environement. In: Bacteriophages: Biology and Applications. CRC Press; 2004. p. 61-91.

28. BiOutils. Les bactériophages - BiOutils. Disponible sur: https://www.bioutils.ch/protocoles/20-les-bacteriophages

29. Mc Grath S, Sinderen D van. Bacteriophage-host interaction in lactic acid bacteria. In: Bacteriophage genetics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2007. p. 193-208.

30. Adeline Louvigny. Pour préserver l'efficacité des antibiotiques, l'Europe se tourne vers la phagothérapie. Daily Science. 2015. Disponible sur: http://dailyscience.be/wordpress/2015/11/09/pour-preserver-lefficacite-des-antibiotiques-leurope-se-tourne-vers-la-phagotherapie/

31. Effantin G. Studies by cryo-electron microscopy of viruses structures : phage Gifsy-2 of Salmonella Typhimurium and phage T5 of *Escherichia Coli.* 23 nov 2005;

32. Transduction chez les bactéries. Disponible sur: http://perrin33.com/microbiologie/genetique/transduction_phage_bacterie_generalisee.php

33. Mc Grath S, Sinderen D van. Bactériophages in medicine. In: Bacteriophage genetics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2007. p. 1-41.

34. Dublanchet A. Phagothérapie. In: La phagothérapie: des virus pour combattre les infections. [Nouvelle édition augmentée et mise à jour]. Lausanne : Éditions Favre; 2017. p. 102-68.

35. PHAGOTHÉRAPIE. Encyclopædia Universalis. Disponible sur: http://www.universalis.fr/encyclopedie/phagotherapie/

36. Kuhl S, Mazure H. d'Hérelle. Preparation of Therapeutic Bacteriophages, Appendix 1 from: Le Phénomène de la Guérison dans les maladies infectieuses: Masson et Cie, 1938, Paris—OCLC 5784382. Bacteriophage. 1 mars 2011;1:55-65.

37. Dictionnaire Vidal. 49e éd. Paris : Ed. du Vidal, 1973, p 163 et 164.

38. Mc Grath S, Sinderen D van. The new phage biology: from genomics to applications. In: Bacteriophage genetics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2007. p. 1-41.

39. Gilbert Shama. Prontosil. Nature. Disponible sur: https://www-nature-com.docelec.u-bordeaux.fr/articles/142533a0

40. SULFAMIDES ET SULFONES - Encyclopædia Universalis. Disponible sur: https://www.universalis.fr/encyclopedie/sulfamides-et-sulfones/#i_91795

41. Shama G. La Moisissure et la Bactérie: Deconstructing the fable of the discovery of penicillin by Ernest Duchesne. Endeavour. 1 sept 2016;40(3):188-200.

42. GACHELIN G. FLEMING : DÉCOUVERTE DE LA PÉNICILLINE. In Encyclopædia Universalis. Disponible sur: http://www.universalis-edu.com.docelec.u-bordeaux.fr/encyclopedie/fleming-decouverte-de-la-penicilline/

43. La Poste, France. Disponible sur: https://www.laposte.fr/toutsurletimbre/connaissance-du-timbre/dicotimbre/timbres/la-penicilline-3422

44. ANSM, ANSES, Santé Publique France. Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France: nécessité d'une mobilisation déterminée et durable. 2016 nov.

45. ECDC. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. European Centre for Disease Prevention and Control. 2010. Disponible sur: http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2009

46. ECDC. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017. European Centre for Disease Prevention and Control. 2018. Disponible sur: http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017

47. OMS. L'approche multisectorielle de l'OMS «Un monde, une santé» [Internet]. WHO. Disponible sur: http://www.who.int/features/qa/one-health/fr/

48. Pherecydes Pharma. Les bactériophages pour combattre les infections. Disponible sur: https://fr.pherecydes-pharma.com/

49. Eliava Institute. Disponible sur: http://eliava-institute.org/research/

50. Smith HW, Huggins MB. Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage: its General Superiority over Antibiotics. Microbiology. 1982;128(2):307-18.

51. 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 φMR11. J Infect Dis. 15 févr 2003;187(4):613-24.

52. Barrow P, Lovell M, Berchieri A. Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves. Clin Diagn Lab Immunol. 1 mai 1998;5(3):294-8.

53. Dublanchet A. Antibiothérapie vs phagothérapie. In: La phagothérapie: des virus pour combattre les infections. [Nouvelle édition augmentée et mise à jour]. Lausanne : Éditions Favre; 2017. p. 174-87.

54. Bruttin A, Brüssow H. Human Volunteers Receiving *Escherichia coli* Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. Antimicrob Agents Chemother. 1 juill 2005;49(7):2874-8.

55. Dabrowska K, Switała-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. J Appl Microbiol. 2005;98(1):7-13.

56. Brockstedt DG, Bahjat KS, Giedlin MA, Liu W, Leong M, Luckett W, et al. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity. Nat Med. août 2005;11(8):853-60.

57. Esber HJ, Ganfield D, Rosenkrantz H. Staphage lysate: an immunomodulator of the primary immune response in mice. Immunopharmacology. 1 oct 1985;10(2):77-82.

58. Górski A, Kniotek M, Perkowska-Ptasińska A, Mróz A, Przerwa A, Gorczyca W, et al. Bacteriophages and Transplantation Tolerance. Transplant Proc. 1 janv 2006;38(1):331-3.

59. Weber-Dabrowska B, Zimecki M, Mulczyk M. Effective phage therapy is associated with normalization of cytokine production by blood cell cultures. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2000;48(1):31-7.

60. Przerwa A, Zimecki M, Świtała-Jeleń K, Dąbrowska K, Krawczyk E, Łuczak M, et al. Effects of bacteriophages on free radical production and phagocytic functions. Med Microbiol Immunol (Berl). 1 sept 2006;195(3):143-50.

61. Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. La « synergie phages-antibiotiques » - Un enjeu pour la phagothérapie. médecine/sciences. 1 mai 2008;24(5):449-51.

62. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U. Biofilm Highlights. Berlin, Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg : Imprint: Springer; 2011.

63. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. Microbiology. 1998;144(11):3039-47.

64. Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, Tait K. The interaction of phage and biofilms. FEMS Microbiol Lett. 1 mars 2004;232(1):1-6.

65. Antibiorésistance : la phagothérapie revient doucement en France. Futura. Disponible sur: https://www.futura-sciences.com/sante/actualites/medecine-antibioresistance-phagotherapie-revient-doucement-france-75460/

66. ANSM. Compte rendu de séance: COMITE SCIENTIFIQUE SPECIALISE TEMPORAIRE Phagothérapie – Retour d'expérience et perspectives. 2019 mai.

67. Question n°18415 - Assemblée nationale. Disponible sur: http://questions.assemblee-nationale.fr/q15/15-18415QE.htm

68. Article 83 du règlement (CE) N°726/2004 du Parlement Européen du 31 Mars 2004.

69. Hospices Civils de Lyon. Des virus pour soigner des infections résistantes aux antibiotiques. Disponible sur: https://www.chu-lyon.fr/fr/des-virus-pour-soigner-des-infections-resistantes-aux-antibiotiques

70. Pherecydes pharma. Présentation [Internet]. Disponible sur: https://fr.pherecydes-pharma.com/presentation.html

71. EU Clinical Trials Register. Clinical Trials Register. Disponible sur: https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2014-000714-65/BE

72. Pherecydes Pharma. PhagoBurn, une étude clinique européenne. Disponible sur: https://fr.pherecydes-pharma.com/etude-clinique-phagoburn.html

73. Huang G, Wei Z, Wang D. What do we lean from the "PhagoBurn" project. Burns. 1 févr 2019;45(1):260.

74. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. Lancet Infect Dis. 1 janv 2019;19(1):35-45.

75. M. Dedrick R, Guerrero Bustamante C, A. Garlena R, A. Russell D, Ford K, Harris K, et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. Nat Med. 1 mai 2019;25:730-3.

76. SEA-PHAGES | Home. Disponible sur: https://seaphages.org/

77. Phage Therapy Treats Patient with Drug-Resistant Bacterial Infection. HHMI.org.. Disponible sur: https://www.hhmi.org/news/phage-therapy-treats-patient-with-drug-resistant-bacterial-infection

78. Hille Frank, Charpentier Emmanuelle. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. Philos Trans R Soc B Biol Sci. 5 nov 2016;371(1707):20150496.

79. Tanji Y, Shimada T, Fukudomi H, Miyanaga K, Nakai Y, Unno H. Therapeutic use of phage cocktail for controlling *Escherichia coli* O157:H7 in gastrointestinal tract of mice. J Biosci Bioeng. sept 2005;100(3):280-7.

80. Laanto E, Bamford JKH, Laakso J, Sundberg L-R. Phage-Driven Loss of Virulence in a Fish Pathogenic Bacterium. PLOS ONE. 31 déc 2012;7(12):e53157.

81. Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. Nat Rev Microbiol. févr 2004;2(2):166-73.

82. Balcazar JL. Bacteriophages as Vehicles for Antibiotic Resistance Genes in the Environment. PLOS Pathog. 31 juill 2014;10(7):e1004219.

83. Choc septique. Vulgaris Médical. Disponible sur: https://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/choc-septique

84. Matsuda T, Freeman TA, Hilbert DW, Duff M, Fuortes M, Stapleton PP, et al. Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. Surgery. 1 juin 2005;137(6):639-46.

85. CNCPI. Comment peut-on protéger le vivant ? Disponible sur: https://www.cncpi.fr/ba-ba/FAQ_questions_reponses/Comment_peut-on_proteger_le_vivant/

86. Garnier A. Problématiques juridiques liées à la phagothérapie. 2018. 93 p.

87. ANSM. Décision DG n° 2019-156 du 1er Février 2019 portant sur la création d'un Comité scientifique spécialisé temporaire « Phagothérapie - Retour d'expérience et perspectives » à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. 2019 févr. Report No.: 2019-156.

88. ANSM. Avis aux demandeurs d'Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU). 2014 sept.

89. ANSM. Qu'est ce qu'une autorisation temporaire d'utilisation? Disponible sur: https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Qu-est-ce-qu-une-autorisation-temporaire-d-utilisation/(offset)/0

90. Pherecydes Pharma. PhagoPROD, nouvelle unité de production de bactériophages à Nantes. Disponible sur: https://fr.pherecydes-pharma.com/phagoprod.html

91. VIDAL - Biomédicaments immunomodulateurs (et autres anticorps et protéines de fusion). Disponible sur: https://www.vidal.fr/recommandations/4042/biomedicaments_immunomodulateurs_et_autres_anticorps_et_proteines_de_fusion/prise_en_charge/

92. Minard P. L'évolution dirigée des protéines. médecine/sciences. 1 févr 2019;35(2):169-75.

93. GP Smith. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. 1985. Disponible sur: https://science.sciencemag.org/content/228/4705/1315

94. Souriau C, Hua TD, Lefranc MP, Weill M. Présentation a la surface de phages filamenteux : les multiples applications du phage display. MS Médecine Sci Rev Pap ISSN 0767-0974 1998 Vol 14 N° 3 P300-9 [Internet]. 1998 [cité 11 juill 2019]; Disponible sur: http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/1033

95. Stoessel A. Sélection et ingénierie de fragments d'anticorps pour des applications de thérapie du cancer et de diagnostic.

96. Shim H. Antibody Phage Display. In: Lim TS, éditeur. Recombinant Antibodies for Infectious Diseases. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 21-34. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7_2

97. ANTICORPS. Encyclopædia Universalis. Disponible sur: http://www.universalis.fr/encyclopedie/anticorps-monoclonaux/

98. Emmanuel Jaspard. Immunoglobulines anticorps Immunoglobulins antibodies Relation structure fonction proteine protein structure function relationship Enseignement recherche Biochimie

Universite Angers Emmanuel Jaspard biochimej. Disponible sur: http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/8Immunoglobulines/1Immunoglobulin.htm

99. Maria Mamani Matsuda. Immunité adaptative. 2016; Université de Bordeaux, DFG SP3.

100. Brekke OH, Sandlie I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. Nat Rev Drug Discov. 1 janv 2003;2(1):52-62.

101. Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. Hum Vaccines Immunother. 1 déc 2012;8(12):1817-28.

102. Kolopp-Sarda M-N. Les immunoglobulines et leurs fonctions. 209apr. J.-C. oct; Laboratoire d'Immunologie Centre de Biologie Lyon Sud.

103. Maria Mamani Matsuda. Les anticorps monoclonaux et les récepteurs solubles. 2017; Université de Bordeaux, DFA SP1.

104. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge R. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. mAbs. 1 mai 2010;2(3):256-65.

105. Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty. Biology of the filamnetous bacteriophage. In: Phage Display of peptids and protein: a laboratory Manual. San Diego: Academic Press; 1996. p. 1-20.

106. Rakonjac J, J. Bennett N, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. Filamentous Bacteriophage: Biology, Phage Display and Nanotechnology Applications. Curr Issues Mol Biol. 2011. Disponible sur: http://www.horizonpress.com/cimb/abstracts/v13/51.html

107. Ledsgaard L, Kilstrup M, Karatt-Vellatt A, McCafferty J, Laustsen AH. Basics of Antibody Phage Display Technology. Toxins. 9 juin 2018;10(6). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6024766/

108. Rakonjac J, Feng J, Model P. Filamentous phage are released from the bacterial membrane by a two-step mechanism involving a short C-terminal fragment of pIII11Edited by M. Gottesman. J Mol Biol. 25 juin 1999;289(5):1253-65.

109. Brian K. Kay, Jill Winter, John McCafferty. Vectors for phage display. In: Phage Display of peptids and protein: a laboratory Manual. San Diego: Academic Press; 1996. p. 35-53.

110. Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS. Phage Display. In: Debnath M, Prasad GBKS, Bisen PS, éditeurs. Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities. Dordrecht: Springer Netherlands; 2010. p. 181-92. Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4_12

111. Rami A, Behdani M, Yardehnavi N, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F. An overview on application of phage display technique in immunological studies. Asian Pac J Trop Biomed. 1 juill 2017;7(7):599-602.

112. Code de la santé publique | Legifrance. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=535F9C08962F672F4E3C938E38E312C9.tplgfr28s_2?idSectionTA=LEGISCTA000006171366&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20190911

113. ANSM. Autorisation - Minigraphie. Disponible sur: http://agence-prd.ansm.sante.fr/php/ecodex/extrait.php?specid=64287538

114. VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/

115. Substances Adalimumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/22520/adalimumab.html

116. Substances Certolizumab pégol - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/23236/certolizumab_pegol.html

117. Substances Golimumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/23227/golimumab.html

118. Encyclopédie Larousse en ligne - interleukine. Disponible sur: http://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/interleukine/13936

119. Substances Ustékinumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/23169/ustekinumab.html

120. ANSM. STELARA 45 mg, solution injectable en flacon. Disponible sur: https://ansm.sante.fr/Activites/Recommandations-Temporaires-d-Utilisation-RTU/Liste-des-RTU-arretees/Liste-des-RTU-arretees/STELARA-45-mg-solution-injectable-en-flacon

121. Substances Sécukinumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/24366/secukinumab.html

122. Substances Ixékizumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/24927/ixekizumab.html

123. Substances Mépolizumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/24438/mepolizumab.html

124. Substances Canakinumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/23224/canakinumab.html

125. Substances Tocilizumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/23176/tocilizumab.html

126. Substances Benralizumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/25517/benralizumab.html

127. Substances Ranibizumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/22876/ranibizumab.html

128. Substances Omalizumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/22808/omalizumab.html

129. HAS. COMMISSION DE LA TRANSPARENCE Avis du 4 avril 2018 bélimumab BENLYSTA 200 mg, solution injectable en stylo pré rempli. 2018 avr.

130. Substances Bélimumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/23446/belimumab.html

131. Substances évolocumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/24494/evolocumab.html

132. Substances Alirocumab - VIDAL eVIDAL. Disponible sur: https://evidal.vidal.fr/substance/details/24745/alirocumab.html

133. Bardet C, Buxeraud J, Cook-Moreau J. Délivrance d'un anticorps monoclonal à l'officine. Actual Pharm. 1 nov 2013;52(530):33-4.

134. Schofield DA, Sharp NJ, Westwater C. Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. Bacteriophage. 1 avr 2012;2(2):105-283.

135. Qualité de l'eau potable. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/eaux/eau

136. DGS_Anne.M, DICOM_Jocelyne.M. Le contrôle de la qualité de l'eau du robinet. Ministère des Solidarités et de la Santé. 2020. Disponible sur: https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/eaux/article/le-controle-de-la-qualite-de-l-eau-du-robinet

137. Ministère des Solidarité et de la Santé AR de S. La qualité de l'eau du robinet en France-Synthèse 2018. 2019 nov.

138. Ministère des Solidarité et de la Santé AR de S. La qualité de l'eau de baignade en France-Synthèse 2018. 2019 juin.

139. Medema GJ, van Asperen IA, Havelaar AH. Assessment of the exposure of swimmers to microbiological contaminants in fresh waters. Water Sci Technol. 1 janv 1997;35(11):157-63.

140. Sylvain SKRABER. Intérêt des bactériophages en tant que témoin de contamination fécale et de présence de virus entériques pathogènes dans les eaux de la rivière Moselle. [France]: Université de Nancy; 2003.

141. Grabow WOK, Holtzhausen CS, De Villiers JC, South Africa, Water Research Commission, University of Pretoria, et al. Research on bacteriophages as indicators of water quality, 1 January 1990 to 31 December 1992: final report. 1993.

142. Skraber S, Gassilloud B, Gantzer C. Comparison of Coliforms and Coliphages as Tools for Assessment of Viral Contamination in River Water. Appl Environ Microbiol. 1 juin 2004;70(6):3644-9.

143. GRABOW, W. O. K., NEUBRECH, T. E., HOLTZHAUSEN, C. S., et al. Bacteroides fragilis and *Escherichia coli* bacteriophages: excretion by humans and animals. Water Science and Technology. 1995;vol. 31, no 5-6, p. 223.

144. Vinay M, Franche N, Grégori G, Fantino J-R, Pouillot F, Ansaldi M. Phage-Based Fluorescent Biosensor Prototypes to Specifically Detect Enteric Bacteria Such as *E. coli* and *Salmonella enterica Typhimurium*. 2015;10(7). Disponible sur: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4506075/

145. Phagosensor: Un outil rapide et discriminant de détection de bactéries pathogènes dans les eaux. Archives. Disponible sur: http://archives.cnrs.fr/insb/article/627

146. Cytométrie en flux. Futura. Disponible sur: https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/biologie-cytometrie-flux-15967/

147. Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W, Kłębukowska L. Vidas UP-Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay Based on Recombinant Phage Protein and Fluorescence In Situ Hybridization as Alternative Methods for Detection of *Salmonella enterica* Serovars in Meat. Foodborne Pathog Dis. 27 juin 2014;11.

148. BioMerieux lance une technologie revolutionnaire de detection de Salmonella pour ameliorer la securite alimentaire. bioMérieux Corporate Website. Disponible sur: https://www.biomerieux.com/fr/biomerieux-lance-une-technologie-revolutionnaire-de-detection-de-salmonella-pour-ameliorer-la

149. Zadernowska A, Chajęcka-Wierzchowska W, Kłębukowska L. Vidas UP-Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay Based on Recombinant Phage Protein and Fluorescence In Situ Hybridization as Alternative Methods for Detection of *Salmonella enterica* Serovars in Meat. Foodborne Pathog Dis. 27 juin 2014;11.

150. WHO. Tuberculose. Disponible sur: https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis

151. Revue des Maladies Respiratoires. Disponible sur: https://www.rev-mal-respir.com/revue/RMR/20/6-C2/table-des-matieres/

152. Santé Publique France. Borréliose de lyme. Disponible sur: /maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/borreliose-de-lyme

153. HAS. Borréliose de Lyme et autres maladies vectorielles à tiques. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2857558/fr/borreliose-de-lyme-et-autres-maladies-vectorielles-a-tiques

154. Avancée de la recherche sur les bactériophages : appel urgent du Dr Teulières | Association Lyme Sans Frontières. Disponible sur: https://www.associationlymesansfrontieres.com/avancee-de-la-recherche-sur-les-bacteriophages-appel-urgent-du-dr-teulieres/

155. Lyme : de nouveaux tests fondés sur les bactériophages. Disponible sur: https://www.alternativesante.fr/lyme/lyme-de-nouveaux-tests-fondes-sur-les-bacteriophages

156. Notre Test : le « Phage-Based Test ». Phelix Research & Development. Disponible sur: http://phelix.info/fr/

157. Notre Test : le « Phage-Based Test ». Phelix Research & Development. Disponible sur: http://phelix.info/fr/nos-projets/notre-test-le-phage-based-test/

Serment de Galien

Je jure, en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes Condisciples.

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

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

Titre : Le bactériophage au service de notre santé : Phagothérapie, production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par « Phage display » et utilisation diagnostique en tant que détecteur de bactéries

Résumé : Les bactériophages sont des virus de bactéries présents dans tous les environnements et en grande quantité. Leur diversité est exceptionnelle, tant au niveau de leur morphologie que de leur cycle d'infection. Chaque phage a la particularité primordiale d'être spécifique d'une espèce de bactérie et toutes ces caractéristiques confèrent aux phages de nombreuses applications d'intérêt dans le domaine de la santé. La recrudescence des résistances aux antibiotiques a permis le retour de la phagothérapie, soit « soigner par les phages ». De nombreuses recherches et essais cliniques ont ainsi été réalisés avec succès. Les bactériophages permettent également la production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques pour la prise en charge de nombreuses pathologies grâce à la technique du « Phage display ». Seize de ces anticorps sont disponibles en officine et le pharmacien a donc un rôle important à jouer. Les bactériophages ont aussi un rôle en tant que détecteurs de bactéries. La spécificité phage-bactérie permet la détection d'agents pathogènes pour l'homme dans le domaine de la sécurité sanitaire et de la médecine humaine pour le diagnostic de maladies.

Mots clés : Bactériophages, bactéries, résistance, anticorps monoclonaux, surveillance sanitaire, diagnostic

Title: Bacteriophages at the service of our health: phagotherapy, production of therapeutic monoclonal antibodies by "Phage display" and diagnostic use as a bacteria sensor

Abstract: Bacteriophages are bacteria viruses found in all environments and in large quantities. Their diversity is exceptional, both in terms of morphology or cycle of infection. Each phage has the essential characteristic of being specific to a species of bacteria, and all these characteristics give them many applications of interest in the health field. The resurgence of resistance to antibiotics has enabled the return of phage therapy, which means "treatment by phages". Numerous researches and clinical trials have thus been successfully carried out. Bacteriophages also allow the production of therapeutic monoclonal antibodies for the cure of much pathology thanks to "Phage display". Sixteen of these antibodies are available in pharmacies and the pharmacist therefore has an important role to play. Bacteriophages also have a role as bacteria sensors. The phage-bacteria specificity allows the detection of human pathogens in the field of food and water safety and in medicine for the diagnosis of diseases.

Keywords: Bacteriophage, bacteria, resistance, monoclonal antibodies, health surveillance, diagnostic

Discipline : Sciences pharmaceutiques

UFR des Sciences Pharmaceutiques
Collège Sciences de la santé
146, rue Léo Saignat
33076 Bordeaux Cedex