

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2024-2025

N° 64

THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Hartwig Weilhart

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 26 Septembre 2024

Utilisation et efficacité des bactériophages dans la prise en charge des
infections résistantes aux antibiotiques

JURY

Président : M. le Professeur Denys Brand, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie – TOURS

Membres : Madame le Docteur Adeline Pastuszka, Praticien Hospitalier, CHU de Tours

Madame le Docteur Marie-Anne Cassier, Pharmacienne d'officine,
Gabarret (40310)

Monsieur le Professeur Philippe Lanotte, Professeur des Universités-
Praticien Hospitalier, Faculté de Pharmacie et CHU de Tours

ANNEE : 2024 - 2025

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAUDAU, Mme Claire POUPLARD, Mme Audrey OUDIN, Mme GERMON Stéphanie

ENSEIGNANTS

16 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIOLOGIE
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE
THIBAUT	Gilles	IMMUNOLOGIE

33 MAITRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE & TOXICOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE
DELAYE	Pierre-	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE

DUMAS	Jean-	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE
JUSTE	Matthieu	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-INFECTIEUSE
LAJOIE	Laurie	IMMUNOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
OUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SAHLI	Ramla	PHARMACOGNOSIE
SIEROCKI	Pierre	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUE & ÉPIDÉMIOLOGIE
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 MAST

CAMUS GABRIEL	Mathilde	Filière Officine
---------------	----------	------------------

5 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE
POUPIN	Pierre	SANTÉ PUBLIQUE, BIOSTATISTIQUE & ÉPIDÉMIOLOGIE
VEYRAT DUREBEX	Charlotte	BIOCHIMIE CLINIQUE

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

BOULARD	Pierre	IMMUNOLOGIE
DOUEZ	Emmanuel	PHARMACIE GALENIQUE
TULOUP	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

GERBIER	Soledad	ANGLAIS
---------	---------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

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 Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

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

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 26/09/2024

L'étudiant
Hartwig Weilhart

Le Doyen de la Faculté
Professeur Denys BRAND

Table des matières

Index des abréviations.....	8
Introduction.....	9
I. Avantages et inconvénients des bactériophages.....	11
1. Biologie des phages.....	13
1.1. Caractéristiques morphologiques et diversité.....	13
1.2. Mécanismes infectieux.....	15
2. Les avantages de la phagothérapie.....	17
2.1. Une approche thérapeutique différente.....	17
2.2. Une thérapie ciblée, ubiquitaire et adaptative.....	17
2.3. Une thérapie sûre.....	18
2.4. Une thérapie accessible.....	21
2.5. Une thérapie aux possibilités multiples.....	21
3. Les inconvénients de la phagothérapie.....	22
3.1. Une thérapie restreinte.....	22
3.2. Une thérapie sensible.....	22
3.3. Une thérapie aux répercussions mal connues.....	23
3.4. Le problème des résistances.....	24
3.5. Réactions de l'organisme.....	25
3.6. Problématiques de mise à disposition.....	27
II. Intérêts des bactériophages dans les infections multirésistantes.....	28
1. Emploi des bactériophages comme alternatives aux antibiotiques.....	28
2. Emploi des bactériophages en associations avec les antibiotiques.....	35
1. Théorie et mécanismes : les phages comme adjuvants dans l'antibiothérapie.....	35
2. Théorie et mécanismes : les antibiotiques comme adjuvants dans la phagothérapie.....	46
Conclusion et discussion.....	50
Références bibliographiques.....	51
Engagement de non plagiat	54

Index des figures

Figure 1: Connexions envisagées entre les applications des phages et la recherche. (Viertel, Ritter, et Horz 2014).....	12
Figure 2: Aperçu des principales familles de virus bactériophages (Dublanche et Patey 2011).....	13
Figure 3: Structure du bactériophage T4 (Dufour et Debarbieux 2017).....	14
Figure 4: Cycles infectieux des phages virulents et tempérés (Dufour et Debarbieux 2017).....	15
Figure 5: Effet inhibiteur du phage LM12 sur des cellules planctoniques de <i>S. aureus</i> (a), du phage LM99 sur des cellules planctoniques d' <i>E. faecalis</i> (b) et du phage JB75 sur des cellules planctoniques d' <i>E. coli</i> recueillies au site d'infections associées à des implants orthopédiques (Barros et al. 2019).....	29
Figure 6: Efficacité <i>in vivo</i> de la préparation de bactériophages (souche CHA_P1) déterminée par la survie d'animaux traités par CHA_P1 (Henry, Lavigne, et Debarbieux 2013).....	32
Figure 7: Variation de la CMI de 4 antibiotiques pour 8 souches de <i>P. aeruginosa</i> en fonction de la résistance vis-à-vis d'une souche virale infectant cette bactérie (Chan et al. 2016).....	36
Figure 8: Traitement de biofilms intacts cultivés sur support neutre (Chaudry et al. 2017).....	38
Figure 9: Effet de l'application séquentielle de phages et d'antibiotiques sur une population de <i>P. aeruginosa</i> cultivée sur polystyrène (Chaudry et al. 2017).....	40
Figure 10: Traitement de biofilms de <i>P. aeruginosa</i> cultivés sur des cellules épithéliales (Chaudry et al. 2017).....	42
Figure 11: Synergie bactéricide entre un cocktail de bactériophages et deux antibiotiques (ciprofloxacine et méropénème) administrés à 2,5 fois leur CMI après croissance de colonies de <i>P. aeruginosa</i> sur caillot de fibrine (Oechslin et al. 2017).....	44
Figure 12: Croissance de la population de bactériophages (Φ MFP) après infection avec et sans adjonction de cefotaxime (CTX) (Comeau et al. 2007).....	46
Figure 13: Courbe d'évolution de l'effet bactéricide des phages σ -1 envers la souche ATCC9027 (a), phages envers la souche PA-4U (b) et phages 001A envers la souche PA-M2 (c) (Knezevic et al. 2013).....	47

Index des tableaux

Tableau I: Fréquence des effets indésirables rapportés au cours du traitement par phagothérapie d'une otite chronique (Wright et al. 2009).....	19
Tableau II: Concentration minimale inhibitrice de 3 souches de <i>P. aeruginosa</i> (Knezevic et al. 2013).....	47

Index des abréviations

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

EI : Effets Indésirables

Ig : Immunoglobuline

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

PFU / UFP : Plaque-Forming Unit / Unité formant des plages

PAS : Phage – Antibiotic Symbiosis (Synergie phage – antibiotique)

SARM : *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction

L'antibiorésistance est un phénomène aussi ancien que les anti-bactériens de par l'existence de mécanismes innés tels que des enzymes de dégradation ou une absence de cible cellulaire chez certaines espèces de bactéries.

A ces mécanismes innés s'ajoutent des mécanismes acquis apparus par l'acquisition de plasmides hébergeant des gènes de résistance ainsi qu'une sélection de souches mutantes résistantes, sélections appuyées notamment par l'utilisation à grande échelle d'antibiotiques, notamment en usage préventif dans l'élevage ou en thérapie probabiliste sans vérification préalable d'une étiologie bactérienne.

En 2017, le Center for Disease Control (organisme américain de recherche en santé publique) imputait à l'antibiorésistance quelques 25,000 décès et 2,5 millions de journées d'hospitalisation supplémentaires en Europe (CDC Global Health 2019).

En France, c'est quelques 158 000 cas d'infections à bactéries multirésistantes qui furent rapportés en 2012, avec une estimation de plus de 12 000 décès (Dufour et Debarbieux 2017).

L'Organisation Mondiale de la Santé a récemment inclus la résistance aux agents antimicrobiens dans les dix principaux risques pour la santé à l'échelle mondiale, citant notamment le cas de la tuberculose multirésistante ayant affecté près de 500 000 personnes en 2017 (OMS 2019).

Malgré l'édition de recommandations au niveau national (HAS 2020) et international (« Antibiotic Resistance », OMS 2020) sur le bon usage des antibiotiques, l'emploi d'associations inefficaces voir contre-productives pouvant favoriser l'émergence de bactéries multi-résistantes (Chicoine 1966) et le strict contingentement des antibiotiques ayant le moins de résistances connues à une utilisation en milieu hospitalier et en dernier recours tendent à favoriser un épuisement des alternatives thérapeutiques en la matière, aggravé par un ralentissement de la recherche en la matière du fait d'un faible retour économique et de la diminution des pistes de développement envisageables.

La phagothérapie consiste en l'emploi de virus dits « bactériophages » ayant pour hôte des espèces bactériennes à des fins préventives ou curatives. Ces phages sont généralement sélectionnés pour leur affinité à l'égard des bactéries pathogènes visées.

La phagothérapie n'est pas une thérapie nouvelle : ses fondements remontent à la fin du XIXe siècle avec l'identification de solutions disposant de propriétés bactéricides. Réellement employée dans les années 20-30, elle tombe en désuétude en Europe de l'ouest avec l'avènement des antibiotiques modernes, plus faciles à produire et à employer.

L'usage de la phagothérapie réapparaît dans la seconde moitié du XXe siècle en Europe de l'Est et en Russie du fait de son efficacité et de son accessibilité par rapport aux antibiotiques de synthèse, alors difficiles à obtenir dans les pays du bloc soviétique.

Son emploi dans cette partie du monde s'est maintenu et développé au cours des dernières décennies, notamment en Géorgie où l'institut George Eliva continue activement à enrichir les connaissances et les perspectives d'applications de ces bactériophages, et son recours y est plus fréquent que dans les pays de l'Ouest où elle demeure actuellement extrêmement confidentielle et soumise à des conditions d'utilisation qui relèvent de la recherche clinique, bien qu'un nombre grandissant d'essais soient menés dans le cadre de collaborations internationales (Chanishvili 2012).

En 2016, une conférence portant sur la possibilité de remettre en valeur les bactériophages et leurs différentes applications a identifié parmi les causes du manque d'acceptation de la phagothérapie un manque de recherche et d'essais cliniques fiables sur le sujet ainsi qu'un manque de communication aux professionnels de la santé des informations disponibles et une législation mal adaptée à la nature particulière des produits employés (« Silk Route to the Acceptance and Re-Implementation of Bacteriophage Therapy » 2016).

L'objectif de notre travail est de déterminer la place de la phagothérapie dans la prise en charge des infections à bactéries résistantes aux antibiotiques, quelle soit seule ou associée à des agents antibactériens.

I. Avantages et inconvénients des bactériophages

Observés, identifiés et répertoriés depuis le début du XXe siècle, les bactériophages furent employés pendant des décennies comme alternative aux antibiotiques pour les caractéristiques propres et pour pallier aux déficiences de ces derniers. Leur usage est aujourd'hui de plus en plus répandu dans le domaine de la recherche scientifique, de la médecine mais aussi de l'industrie en raison de leur multiples avantages [Figure 1].

La phagothérapie conventionnelle consiste à l'emploi de phages lytiques isolés d'une source environnementale (par opposition à un souche de phage obtenue par modification génétique ou sélection maîtrisée) à des fins de traitement d'une infection bactérienne en cours.

La modification de phages, comme par exemple par substitution d'un acide aminé dans la structure de la capside, permettrait d'augmenter la capacité de dissémination des virions, bien que certaines modifications s'accompagnent d'une diminution de la virulence des souches concernées. La modification de la cible cellulaire de certains phages leur permettrait d'affecter une plus grandes variétés de souches bactériennes de par la sélection d'une cible bactérienne sous la forme d'un constituant commun à plusieurs souches. Enfin, l'inactivation ou la modification de gène viraux responsables de la lyse de la cellule-hôte permettrait de réduire les effets secondaires indésirables liés au relargage de toxines bactériennes. Les phages ainsi modifiés et devenus non lytiques induirait une apoptose.

La théorie sous-tendant l'emploi de bactériophages comme "désinfectant de surface" résulte de la capacité des phages à augmenter la susceptibilité des bactéries vis-à-vis des agents antibactériens, qu'il s'agisse d'antibiotiques ou d'antiseptiques. Outre une action directe, les phages permettrait de faciliter la prise en charge des infections nosocomiales en milieu hospitalier en diminuant l'importance des populations de bactéries antibiorésistantes. De plus, la capacité de certains phages à désorganiser les biofilms bactériens ou à produire des enzymes affectant la structure de la paroi cellulaire de bactéries Gram+ participerait à cette action préventive.

Certaines souches de phages possèdent des endolysines affectant les peptidoglycanes de la paroi cellulaire des bactéries Gram+. Ces enzymes présentent plusieurs propriétés intéressantes en tant qu'agents thérapeutiques : elles sont hautement spécifiques, à l'image des bactériophages dont elles sont issues, elles peuvent agir sans délai contrairement aux phages qui nécessitent un temps de latence lié aux cycles de répliquations et l'emploi de lysines ayant des cibles différentes aboutit à un effet synergique. De plus, aucune résistance ne semble avoir été découverte et de par leur nature, les enzymes ne présentent pas de risque de transmission accidentelle de matériel génétique entre bactéries. En revanche, la présence chez les bactéries Gram- d'une membrane cellulaire empêchant le contact direct de ces enzymes avec la paroi cellulaire réduit significativement l'utilité de ces produits envers les bactéries Gram-.

L'emploi de phages dépendant des plasmides de conjugaison comme cible cellulaire pour l'infection des bactéries-hôtes permettraient de réduire la fréquence de transfert de plasmides contenant des gènes codant pour des éléments de résistances vis-à-vis des

antibiotiques, soit en exerçant une pression de sélection en faveur des bactéries dépourvues des plasmides en question, soit en perturbant le mécanisme de transfert lui-même en employant des phages dont la cible serait un élément de surface codé par un gène présent dans le plasmide de conjugaison (Ojala, Laitalainen, et Jalasvuori 2013).

L'analyse métagénomique de phages prélevés chez des individus humains sains ou atteints d'infections ont permis de mettre en évidence une importante diversité ainsi que la présence de phages capables d'infecter des souches bactériennes opportunistes présentent naturellement au sein de la flore. Ces phages pourraient jouer un rôle dans la prévention d'infections en régulant la population des-dites bactéries opportunistes. Plusieurs études ont ainsi montré une disparité en terme de prépondérance des phages concernés chez des sujets sains et chez des sujets atteints d'infections.

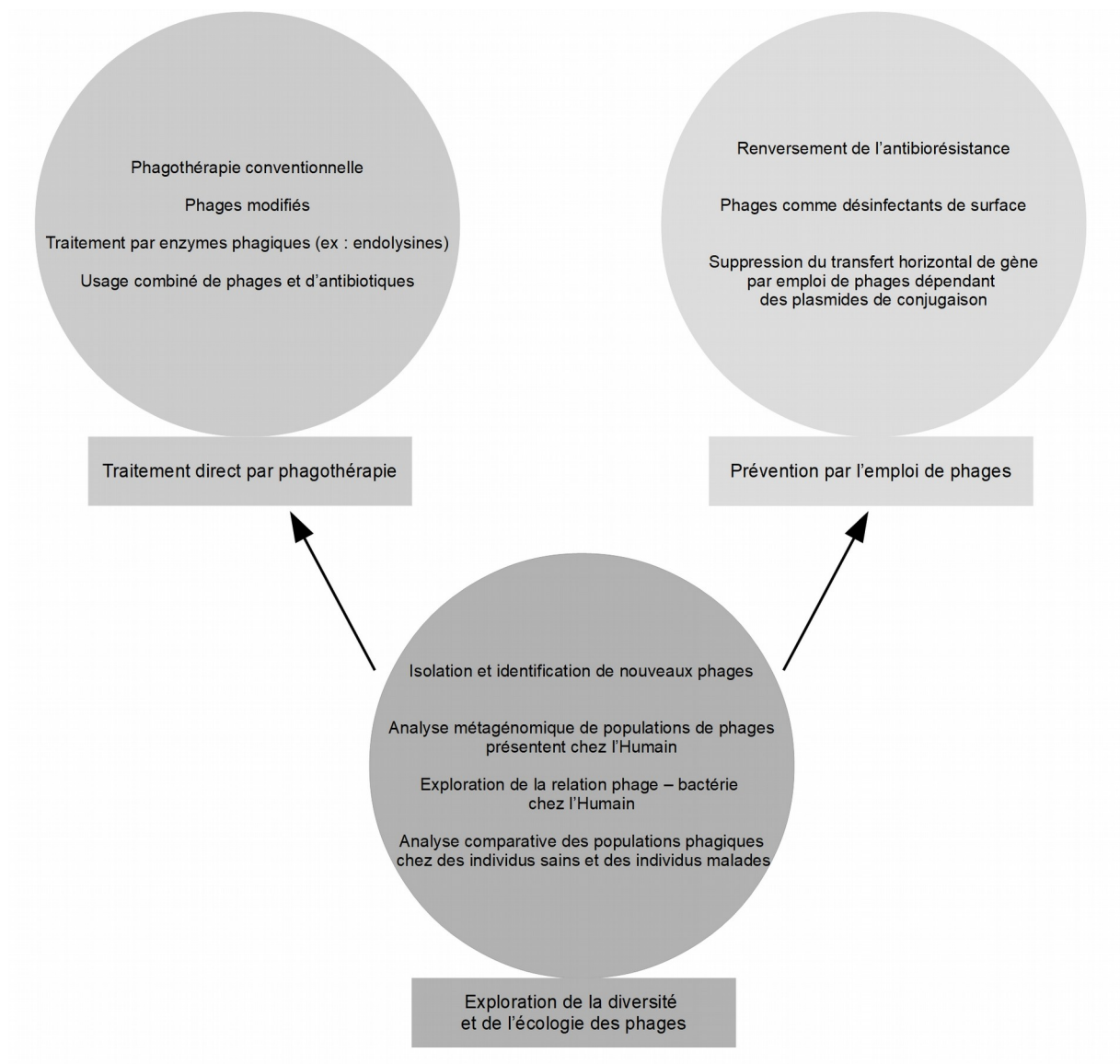


Figure 1: Connexions envisagées entre les applications des phages et la recherche. (Viertel, Ritter, et Horz 2014)

1. Biologie des phages

1.1. Caractéristiques morphologiques et diversité

Les bactériophages (souvent simplement nommés « phages ») sont un ensemble de virus ciblant les bactéries. La diversité de ces dernières est telle que les différentes souches de bactériophages sont bien plus nombreuses que les espèces virales infectant les organismes eucaryotes.

Comme tout virus, les bactériophages sont composés d'une capside renfermant le matériel génétique du virus ainsi que des protéines telles que les intégrases nécessaires à l'inclusion du matériel génétique du virus dans le génome de la cellule-hôte. Cette capside comporte également des éléments de surface permettant la reconnaissance et la fixation voire l'intégration du virion dans la cellule-cible.

Les phages peuvent être répartis en 13 familles en fonction de la nature de leur génome [Figure 2] : ADN ou ARN, simple ou double brin, linéaire ou circulaire, positif ou négatif (pour les virus à ADN simple brin), mais également en fonction de la configuration de leur capside, de la présence ou non d'une enveloppe et/ou de lipides (Dublanche et Patey 2011).

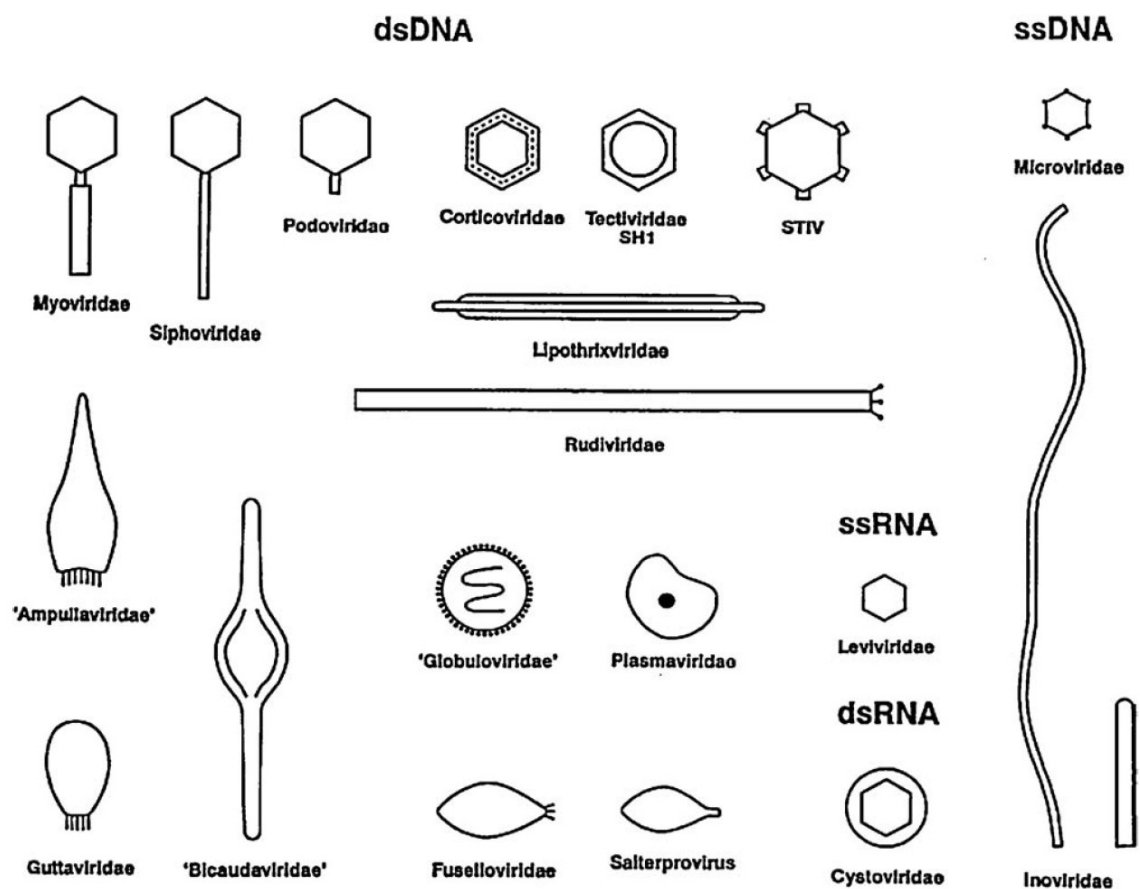


Figure 2: Aperçu des principales familles de virus bactériophages (Dublanche et Patey 2011)

La configuration la plus connue parmi les phages est celle des *Caudoviridae* auxquels appartient le bactériophage T4 infectant la bactérie *Escherichia coli*. Ces virus se composent d'une « tête » formée par la capside contenant le matériel génétique viral, d'une « queue » servant au transfert du matériel génétique viral à la bactérie-hôte après adhésion à celle-ci, de fibres de queue servant à la reconnaissance de la cellule-cible et d'une plaque basale pourvue d'épines servant à fixer la particule virale à la membrane plasmique de la bactérie [Figure 3].

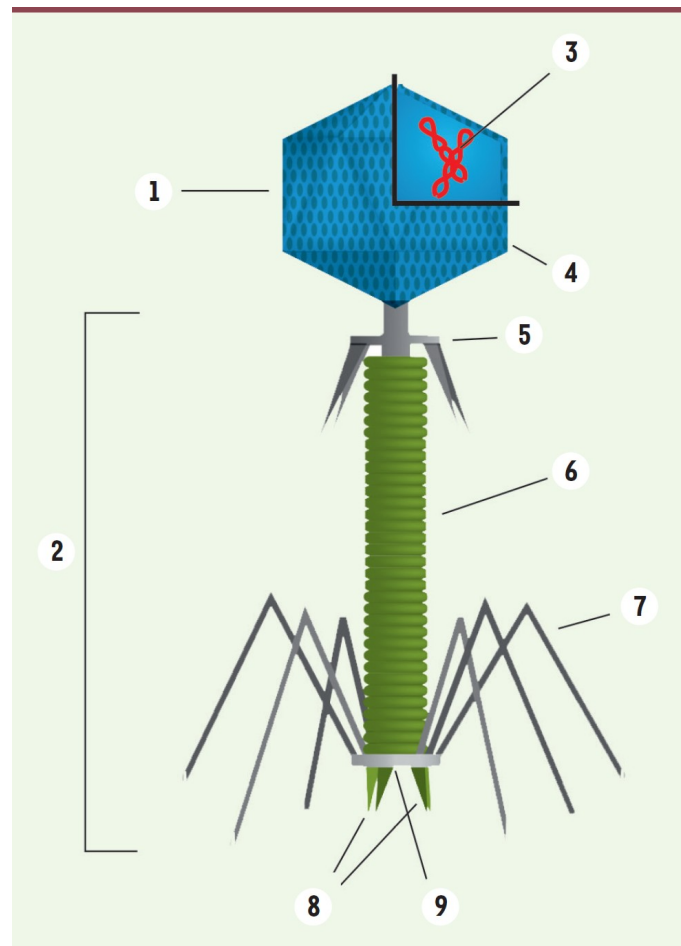


Figure 3: Structure du bactériophage T4. 1 : tête, 2 : queue, 3 : acide nucléique, 4 : capsid, 5 : collier, 6 : gaine, 7 : fibres de queue, 8 : épines, 9 : plaque basale

(Dufour et Debarbieux 2017)

1.2. Mécanismes infectieux

En ce qui concerne le comportement infectieux des bactériophages, deux modalités ont été à ce jour répertoriées : le cycle lytique et le cycle lysogénique [Figure 4].

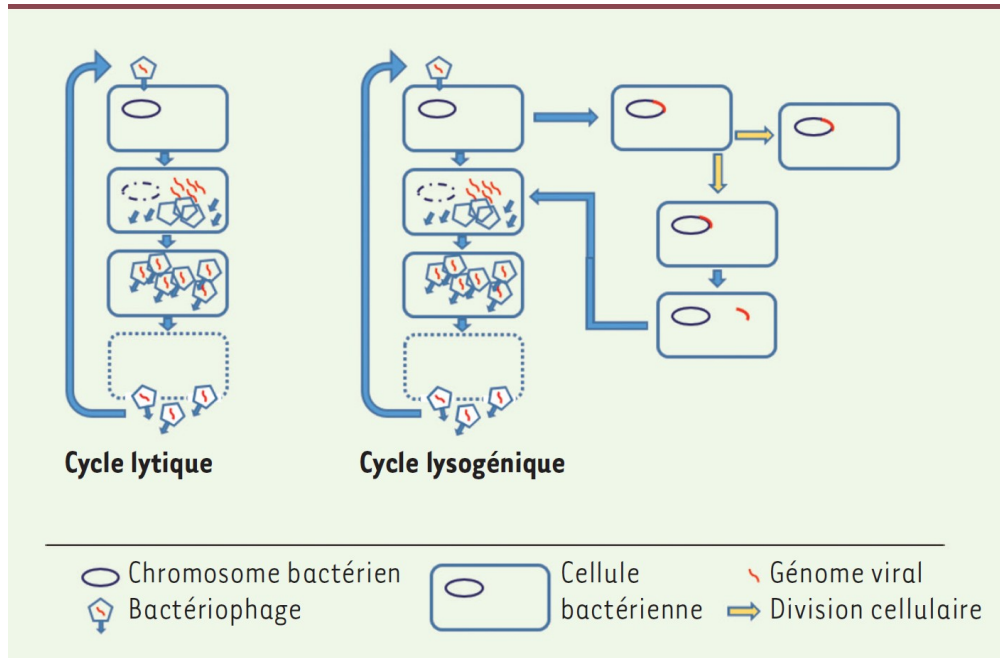


Figure 4: Cycles infectieux des phages virulents et tempérés.
L'injection du génome du phage virulent (partie gauche) signe le point de départ de la subversion de la bactérie par les gènes du phage menant à la production de nouveaux virions qui seront dispersés lors de la lyse de la cellule. L'injection du génome du phage tempéré (partie droite) s'accompagne parfois d'une intégration dans le chromosome conduisant à l'atténuation de l'expression des gènes du phage. Sous l'effet d'un stress, le génome du phage peut reprendre le cours d'une infection lytique (partie gauche et permettre la production de nouveaux virions qui seront dispersés lors de la lyse de la cellule. (Dufour et Debarbieux 2017)

Lors de l'infection, le matériel génétique viral va être injecté dans le cytoplasme bactérien puis soit intégré au chromosome bactérien (après une éventuelle étape de transcription inverse pour les virus à ARN), soit assemblé sous forme de virions, particules virales infectantes.

Le matériel génétique du virus est par la suite répliqué par la bactérie-hôte et de nouvelles capsides sont synthétisées.

Les phages lytiques infectent la cellule-hôte en vue d'une production de virions et cette infection aboutit invariablement à la mort de la cellule-hôte par éclatement permettant la libération des nouvelles particules virales. L'expression des gènes viraux primordiaux et la synthèse protéique initiale se font au détriment de fonctions natives de la cellule-hôte

bactérienne, dont les structures sont alors mises au service de la production des éléments constitutifs des nouveaux virions (Skurnik et Strauch 2006).

La durée moyenne d'un cycle lytique peut varier de 30 minutes à 90 minutes et est dépendante du virus et de la bactérie infectée. Lorsque cette durée est inférieure à la durée du cycle de réplication bactérienne, le virus est capable de réduire activement la population bactérienne (Ravat, Jault, et Gabard 2015).

Les phages tempérés sont capables d'induire la production de virions avec ou sans apoptose *in fine* de la cellule-hôte. Ces phages peuvent également maintenir la production de virions en dormance après intégration de leur génome dans celui de la cellule-hôte, dans le chromosome de cette dernière ou sous forme de plasmide, cette dormance prenant fin après induction de la production de virions par l'action de facteurs environnementaux (par exemple un état de stress pour la cellule-hôte ou une activation des mécanismes de réparation du matériel génétique de celle-ci). L'introduction de matériel génétique de phages tempérés en dormance dans le génome des cellules-hôtes (prenant alors le nom de prophage) peut conférer à celles-ci certaines propriétés, l'un des exemples les plus connus étant la production de toxine par certaines souches de la bactérie *Vibrio cholerae*, facteur de virulence responsable du cholera (Skurnik et Strauch 2006). Le cycle infectieux des phages tempérés est qualifié de lysogénique.

L'infection par des phages filamenteux est quant à elle exclusivement non-lytique. Les phages filamenteux infectent des espèces bactériennes Gram négatif présentant des pili , excroissances cellulaires terminales permettant l'adhésion des cellules bactériennes à des supports ou cellules-hôtes. Ces phages se caractérisent également par la modification de la structure de la bactérie-hôte : l'apparition chez celle-ci d'excroissances de la membrane cytoplasmique permet d'augmenter la surface de libération de nouvelles particules virales mais peut également augmenter le caractère pathogène des cellules-hôtes (Krylov 2014).

2. Les avantages de la phagothérapie

2.1. Une approche thérapeutique différente

La phagothérapie est, par sa nature et ses mécanismes d'action, totalement différente de l'antibiothérapie. Ceci a donc deux conséquences : il n'y a pas d'effet de compétition connu entre phages et antibiotiques et il n'existe pas non plus de résistance croisée entre ces deux éléments.

Une autre caractéristique des bactériophages ayant une utilité dans l'approche thérapeutique est la capacité de réplication des phages : ceux-ci peuvent théoriquement demeurer aussi longtemps qu'il leur sera possible d'infecter de nouvelles bactéries pour perpétuer leur cycle, ce qui signifie qu'une petite dose administrée peut théoriquement suffire à mettre en place et maintenir l'action thérapeutique, qu'il n'est pas nécessaire de procéder à plusieurs administrations pour un même traitement et que le phénomène peut s'auto-entretenir aussi longtemps que nécessaire pour réduire l'infection. Ceci présente des avantages économiques (moindre coût par rapport à un schéma complet d'antibiothérapie injectable) et technique (plus de simplicité à l'administration dans la plupart des cas pour les soignants, plus de confort pour les patients).

2.2. Une thérapie ciblée, ubiquitaire et adaptative

L'une des grandes forces de la phagothérapie réside dans la très grande sélectivité des souches virales : chacune d'elle cible exclusivement une espèce voire une souche particulière de bactérie, bien que certains phages soient capables de cibler un grand nombre de souches (le phage Φ 812 peut infecter plusieurs centaines de souches de *Staphylococcus aureus*) (Pantůček et al. 1998). Ceci permet donc de limiter les répercussions collatérales pour le microbiote et, par conséquent, de limiter les effets secondaires digestifs et les infections opportunistes (notamment fongiques) fréquentes lors de traitement par des antibiotiques à large spectre.

Ciblée, la phagothérapie l'est aussi sur le plan de la localisation dans l'organisme : si les phages sont théoriquement capables, de par leur petite taille, de diffuser dans l'ensemble du corps (certains pouvant même franchir la barrière hémato-encéphalique), la nécessité pour les virus de disposer de cellules-hôtes pour garantir leur survie et leur multiplication engendre une concentration des particules virales au site de l'infection visée, là où demeure l'agent pathogène (Wittebole, De Roock, et Opal 2014).

Une des autres caractéristiques fondamentales des phages est leur co-évolution et leur coexistence avec leurs hôtes bactériens : les phages sont présents là où se trouvent les bactéries ciblées.

Ainsi, il est possible d'isoler des phages à partir d'échantillons de sol ou d'eau prélevés dans la nature ou même dans l'environnement humain, par exemple dans les eaux usées (Krylov 2014).

Par ailleurs, ceci signifie qu'il existe virtuellement une ou plusieurs souches virales pour chaque espèce bactérienne, y compris pour les bactéries résistantes aux antibiotiques.

Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où le développement de nouvelles souches virales ne repose pas sur la base classique du développement pharmacologique actuel consistant à créer une molécule à partir de l'analyse de la cible envisagée mais simplement sur la sélection naturelle d'une souche par exposition d'un échantillon prélevé à une culture de la bactérie ciblée.

L'une des grandes forces des phages par rapport aux antibiotiques est qu'il s'agit d'agents vivants, ainsi les phages subissent la même pression de sélection que leur cellules-hôtes, ce qui leur permet de contourner les problèmes de modification des cibles cellulaires.

Un avantage de plus de la phagothérapie réside dans l'auto-entretien du phénomène : tant que le nombre de cellules-hôtes est suffisant, les virus continuent leur cycle de réplication. L'étude de Wright et al. a ainsi démontrée une augmentation par un facteur 200 de la concentration en bactériophages *in vivo* dans les échantillons récupérés sur les sujets par rapport à la quantité d'agent viral initialement administrée, indiquant la possibilité que la multiplication virale ait pu être encore plus importante.

Enfin, une meilleure connaissance du fonctionnement des phages et de leur propriétés intrinsèques a permis l'introduction de phages génétiquement modifiés capables, par exemple, d'introduire un gène codant pour des protéines affectant négativement la cellule-hôte, comme cela fut le cas avec une souche de phages affectant la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* et ayant subi une mutation génétique introduisant un gène codant pour une enzyme de restriction aboutissant à la destruction du génome bactérien (Skurnik et Strauch 2006).

2.3. Une thérapie sûre

Outre le fait que les phages ciblent exclusivement une espèce voire une souche bactérienne, les bactériophages n'ont pas d'effets connus sur les cellules constitutives de l'organisme, notamment les cellules du système immunitaire. Couplée à l'absence d'impact sur les flores symbiotiques participant à la défense de l'organisme contre les pathogènes extérieurs comme la flore digestive ou la flore génitale, cette caractéristique réduirait fortement le risque de développement d'infections par des pathogènes opportunistes en cours de traitement, effet indésirable fréquemment associé à l'antibiothérapie.

Une étude clinique menée en Grande-Bretagne auprès de patients atteints d'une forme chronique d'otite externe à *Pseudomonas aeruginosa* (Wright et al. 2009) indique ainsi

que seule la moitié des patients traités ont signalé un effet indésirable (EI) au cours du traitement, que les effets indésirables étaient d'importance modérée (essentiellement des céphalées, des troubles digestifs bénins et des otalgies), spontanément résolutifs en cours de traitement (à l'exception de deux d'entre eux) et qu'aucun n'a pu être imputé avec certitude au traitement administré [Tableau I].

Tableau I: Fréquence des effets indésirables rapportés au cours du traitement par phagothérapie d'une otite chronique (Wright et al. 2009)

	Groupe de traitement		
	Phagothérapie	Placebo	Total
Nombre de patients	12	12	24
Nombre de patients ayant rapporté au moins un effet indésirable	6	5	11
Taux de survenue d'effets indésirables par groupe de traitement	50 %	42 %	46 %
Nombre d'effets indésirables rapportés	13	13	26

Une étude menée au Bangladesh a évalué la sécurité de la phagothérapie administrée par voie orale à 15 volontaires sains d'un cocktail de 9 phages recueillis à partir d'échantillons de selles prélevés chez des enfants sains ainsi que de enfants atteints de diarrhées mais également à partir d'échantillons d'eaux usées et d'eaux courantes venant du Bangladesh et de Suisse (Sarker et al. 2012).

Ces 9 souches de phages furent sélectionnées sur la base de leur action sur des sérotypes de la bactérie *E. coli* fréquemment associés à des diarrhées infantiles.

Les 15 volontaires furent répartis en trois groupes recevant, successivement et dans un ordre aléatoire pour chaque groupe, une dose importante de phages (3×10^9 UFP), une dose plus modeste (3×10^7 UFP) et un produit placebo. Ainsi, cette étude de type croisée ne présentait pas de groupe contrôle à proprement parler mais analysait en fait l'impact de l'administration de phages sur l'état de santé de chaque sujet. Les auteurs ont néanmoins reconnu que ce schéma expérimental présentait des risques de déformation des résultats de par la susceptibilité vis-à-vis d'effets à apparition retardée.

L'impact sur l'organisme de l'administration de ce cocktail de phages fut évalué sur la base d'analyses biologiques (analyses hématologiques, analyses de marqueurs biochimiques, suivi de la fonction rénale), d'analyses cliniques et de signalements spontanés par les patients. Par ailleurs, la quantité excrétée de phages dans les selles fut suivie.

Une quantité de phages supérieure à celle administrée n'a été découverte que dans un seul échantillon de selles, la plupart montrant une quantité inférieure à 1 % de la quantité initiale. Ceci a été attribué au milieu stomacal dont le contenu acide dégrade les phages.

Afin d'évaluer l'impact des phages administrés par voie orale sur la flore digestive des individus, une analyse de la diversité génomique fut effectuée par amplification de l'ADN bactérien isolé à partir d'échantillons de selles prélevés avant et après administration des phages aux volontaires. Les résultats obtenus en terme de diversité se révélèrent significativement variables d'un sujet à l'autre. Si des changements furent observés, ceci le furent à la fois au sein du groupe test et du groupe placebo. De plus, les auteurs insistent sur le fait que ces variations ne suivaient aucun modèle reproductible et que, par conséquent, l'administration de phages par voie orale ne pouvait être mise en cause en cas de diminution d'une population d'entérobactéries *in vivo*.

Les auteurs reconnurent que l'évaluation de l'impact *in vivo* de l'administration de phages sur la seule base d'analyse génomique est insuffisante et que les doses administrées au cours de cette étude furent inférieures à celles habituellement employées dans un contexte thérapeutique. En réponse à l'impact du milieu stomacal sur la dégradation des phages, pouvant mener à une augmentation des doses à administrer pour maintenir un effet thérapeutique aggravant notamment les problématiques d'accès à cette thérapie dans certaines régions du monde, fut évoquée une solution consistant en la co-administration de bicarbonate afin de réduire l'acidité gastrique et ainsi assurer une meilleure survie des virus au cours du traitement, avec néanmoins l'inconvénient de la perte de l'effet de cette acidité dans la prévention du développement de certaines infections digestives. Cette solution est déjà appliquée en Russie et en Géorgie.

Une autre étude menée en 2015 s'est intéressée à la sécurité et à l'efficacité de l'administration de préparations phagiques dans le traitement de diarrhées bactériennes aiguës infantiles (Sarker et al. 2016). Cette étude mis en parallèle deux cocktails de phages dirigés contre *E. coli* (Microgen et Nestlé) et un placebo consistant en une solution de réhydratation orale enrichie en zinc.

Après analyses visant à exclure les sujets atteints de diarrhées d'origine virales, de diarrhées avec complications généralisées, de malnutrition sévère, de malformations significatives ou ayant déjà reçu un traitement antibiotique, 120 patients âgés de 6 à 24 mois hospitalisés pour diarrhée bactérienne aiguë furent recrutés puis répartis équitablement entre les trois bras de traitement : placebo, solution de phages Microgen et solution de phages Nestlé.

Chacun des trois groupes présentait des cas d'infection avérée à *E. coli* ainsi que des cas négatifs pour cet agent pathogène. Chaque patient s'est vu administrée une solution de réhydratation orale afin de corriger les pertes liquidiennes

L'objectif primaire de cette étude fut la détermination de la sécurité de l'administration par voie orale de produits phagiques par l'observation de critères cliniques ainsi que le suivi de différentes fonctions biologiques, notamment rénale, hépatique et hématologique. Furent également analysés la quantité de phages et bactéries présents dans les selles.

L'efficacité du traitement par phagothérapie dans la prise en charge de diarrhées aiguës causées par *E. coli* fut calculée sur la base de la fréquence d'émission de selles, sur la quantité de matière fécale excrétée quotidiennement ainsi que sur la nécessité d'administrer une solution de réhydratation orale. Une persistance de la diarrhée, déterminée sur la base d'une émission de selles liquides ou non moulées sur deux périodes consécutives de 6 heures, au-delà d'une période de 5 jours fut considéré comme un échec du traitement étudié et les patients concernés reçurent un traitement standard.

Sur la question de l'efficacité du traitement, les auteurs conclurent que toute différence entre les résultats obtenus pour chaque groupe est non significative, y compris pour les infections à *E. coli* avérées.

Les auteurs insistent sur le fait que l'atteinte de la muqueuse digestive dans un contexte de diarrhée bactérienne pourrait faciliter le passage systémique de toxines relarguée lors de la lyse induite par les phages. Ils indiquent que l'absence d'une telle manifestation au cours de cette étude peut être attribuée à une absence de réplication des phages employés corroborée par l'absence de différence observée du traitement sur la durée et l'importance de la diarrhée.

2.4. Une thérapie accessible

Beaucoup de phages employés dans la recherche, voire même dans le domaine thérapeutique sont isolés à partir d'échantillons d'eau et de terre issus de l'environnement naturel. La possibilité d'obtenir des phages exploitables simplement par extraction, isolement et purification rend cette technique particulièrement intéressante dans les pays où l'accès au soins et à des thérapies de pointe est rendu difficile par le contexte économique et des infrastructures de recherches limitées.

2.5. Une thérapie aux possibilités multiples

Certaines enzymes d'origines virales ont démontré une action non seulement comme agent facilitateur de l'infection virale, par exemple en dégradant les éléments constitutifs de biofilms bactériens rendant ces derniers plus perméables non seulement aux phages mais aussi aux antibiotiques, mais également comme agents bactéricides eux-mêmes, à l'image de la lysine PlyG agissant sur la bactérie *Bacillus anthracis* (Schuch, Nelson, et Fischetti 2002)

Les bactériophages ont déjà fait l'étude de recherches et d'essais en temps que vecteurs vaccinaux (Bao et al. 2019). A cette fin, des bactériophages sont modifiés afin d'intégrer dans leur structure des antigènes de surface correspondant à des éléments distinctifs d'agents pathogènes aussi bien viraux que bactériens mais aussi de porter dans leur génome des gènes spécifiques, devenant ainsi une forme de vaccin hybride. Plus faciles à produire et plus sûrs à employer que les pathogènes concernés eux-mêmes, les phages représentent un intermédiaire intéressant dans le processus de prévention. Des études sont même en cours afin d'employer ces même phages comme base de vaccins dirigés contre certaines formes de cancers par la présentation d'antigènes non présents à la surface de cellules saines.

Plus faciles à manipuler, stocker et pouvant être employés avec un risque moins important que les phages eux-mêmes, ces produits dérivés ont fait l'objet d'essais en temps qu'agents de traitement des surfaces dans le contexte de la lutte contre les infections nosocomiales en milieu hospitalier (García-Cruz et al. 2023).

3. Les inconvénients de la phagothérapie

3.1. Une thérapie restreinte

La très grande sélectivité de chaque phage pour une espèce voire pour une souche bien particulière d'une bactérie est à la fois un avantage et un inconvénient. En effet, contrairement aux antibiotiques à large spectre, une souche de phage définie ne peut être employée pour traiter plusieurs infections à pathogènes différents et ne sont ainsi pas en l'état une solution pour la prise en charge dans une optique probabiliste.

Cette caractéristique a deux conséquences : la nécessité d'une analyse du pathogène a priori et l'élaboration de cocktails de phages.

L'analyse microbiologique avant traitement permet de déterminer le pathogène responsable de l'infection à traiter et donc la variété de phage à employer, l'inconvénient étant que la plupart de ces analyses prennent a minima 24 à 48h, la phagothérapie n'est donc pas adaptée dans ce cas à une utilisation en urgence ou dans le cas de bactéries difficilement observables et/ou cultivables. La seconde conséquence est la difficulté de mise en œuvre pour des structures de soins ne disposant pas des moyens techniques et humains nécessaires à ces analyses (Wittebole, De Roock, et Opal 2014).

Concernant l'élaboration des cocktails, ceux-ci permettent de palier à la très grande sélectivité des phages en associant des phages visant différentes souches d'une même espèce bactérienne voire plusieurs espèces bactériennes responsables du même type d'infection. La difficulté réside ici dans la détermination des souches à inclure dans un même cocktail et la nécessité de modifier régulièrement les mélanges en fonction de l'apparition de nouvelles souches bactériennes, impliquant un suivi épidémiologique important.

3.2. Une thérapie sensible

Les phages, comme la majeure partie des virus, sont très sensibles aux agents chimiques et physiques.

La nécessité de conserver ces produits de façon contrôlée, notamment sur le plan thermique, limite leur possibilité d'emploi « sur le terrain » et nécessite le recours à des professionnels formés pour leur administration. Néanmoins, de récentes évolutions techniques ont permis la production de vecteurs assurant une certaine stabilité pour les préparations phagiques, comme par exemple des hydrogels pouvant garantir une concentration en phages sur 28 jours, ce qui facilite l'accès à ce type de traitement en ambulatoire, notamment dans le traitement de brûlures étendues à haut risque d'infection (Kaur, Gondil, et Chhibber 2019).

Il est nécessaire de s'assurer que la phagothérapie est viable non seulement de par la sensibilité intrinsèque de l'agent bactérien visé mais également de par la capacité des virus à survivre et de fonctionner efficacement *in vivo*. De même qu'avec des agents

chimiques ou physiques classiques, les différents organes d'un individu n'offrent pas la même compatibilité ni la même perméabilité aux agents viraux (Skurnik et Strauch 2006).

Par ailleurs, une autre problématique soulevée par une étude publiée en 2003 est la nécessité de bien comprendre les spécificités des bactériophages en temps qu'agents thérapeutiques en terme de cinétique (Payne et Jansen 2003). En effet, une administration trop précoce pourrait aboutir à une perte d'efficacité du traitement du fait d'une population bactérienne insuffisante et/ou trop éparse pour permettre la mise en place d'une réplication virale efficace. Il se pourrait ainsi que les phages soient éliminés avant d'avoir pu un impact significatif. Néanmoins, cette problématique serait de moins grande importance en usage thérapeutique normal dans la mesure où l'emploi de la phagothérapie surviendrait dans le contexte d'une infection bactérienne déjà symptomatique et assez avancée donc permettant de présumer d'une concentration bactérienne suffisante pour assurer une subsistance des bactériophages.

3.3. Une thérapie aux répercussions mal connues

Si les virus sélectionnés pour être employés en phagothérapie le sont normalement sur la base de leur efficacité sur les souches bactériennes pathogènes mais aussi pour leur innocuité vis-à-vis des espèces composant le microbiote humain, il est nécessaire de garder à l'esprit qu'il s'agit d'éléments assimilés au vivant, capables de muter et d'évoluer. Il n'est donc pas exclu que certaines souches virales puissent subir des modifications après administration les amenant à infecter des souches constitutives parfois symbiotiques du microbiote appartenant à la même espèce que l'agent pathogène visé, l'exemple le plus important étant *E. coli*, espèce très présente au niveau intestinal (surtout chez les populations caucasiennes) mais dont certaines souches sont responsables d'infections potentiellement graves (les souches d'antigène capsulaire K1 d'*E. coli* sont responsables de méningites néonatales).

De plus, malgré des travaux d'étude très avancés en la matière, certains gènes viraux ont encore aujourd'hui une fonction inconnue. L'emploi d'une souche virale ne devrait donc se faire qu'avec l'assurance que son génome ne code pas pour des éléments potentiellement délétères pour la santé des patients.

La dimension relativement imprévisible du devenir des virions après administration explique ainsi la réticence de certains états à encourager voir à autoriser l'emploi de la phagothérapie.

Par contraste, la plupart des antibiotiques sont assez anciens, leur mécanisme d'action, leurs effets indésirables et les précautions d'emploi qui en découlent sont bien connus et longuement étudiés et leur nature strictement chimique exclue toute possibilité d'une modification inenvisagée au sein de l'organisme.

Un autre problème soulevé est le risque d'intégration de gènes bactériens de résistances aux antibiotiques dans le génome viral lors de la réplication du matériel génétique et, par conséquent, le risque de diffusion de ces gènes.

Cette transduction (transfert de matériel génétique d'une cellule à une autre par un intermédiaire phagique) peut avoir lieu selon deux mécanismes différents : la transduction généralisée et la transduction spécialisée (Torres-Barceló 2018b). La transduction généralisée survient lorsqu'une partie du génome bactérien est accidentellement encapsidée en lieu et place du matériel génétique viral, notamment lors de la lyse de la bactérie-hôte. Comme le matériel génétique bactérien est contenu dans une particule virale fonctionnelle, celle-ci peut très bien infecter une nouvelle bactérie et ainsi transférer ce matériel génétique à une nouvelle bactérie-hôte. La transduction spécialisée survient lorsque, au moment de la réplication et de l'excision de l'ADN viral intégré au génome bactérien, une partie de ce dernier est accidentellement emportée et sera par conséquent intégrée au génome d'une nouvelle bactérie-hôte après infection.

Le risque de transfert de gène de résistance aux antibiotiques semble toutefois très faible, notamment du fait que les gènes codants pour des éléments de résistances aux antibiotiques sont rarement situés dans les zones du génome où sont intégrés les gènes viraux. Une estimation fait état d'une fréquence de transduction de 10^{-9} transduction par Unité Formant Colonie (UFC), avec une variabilité de 10^{-1} à 10^{-9} transduction par UFC (Mazaheri Nezhad Fard, Barton, et Heuzenroeder 2011) selon les espèces bactériennes étudiées. Cette estimation a néanmoins été faite sur la base d'observations en milieu contrôlé et la fréquence peut être plus ou moins élevée dans la nature.

Si une solution évidente pour prévenir ce risque pourrait être le recours à un séquençage du génome viral lors de la sélection des souches entrant dans la composition des cocktails thérapeutiques, cette étape pourrait se révéler fastidieuse et coûteuse dans la mesure où plusieurs souches virales sont généralement employées simultanément. De plus, une même infection pouvant être due à plusieurs souches d'une même bactérie, il apparaît difficilement possible de garantir qu'une fois administrés les phages ne pourraient pas devenir le véhicule d'échanges de matériel génétique entre ses différentes souches.

Il est par ailleurs recommandé de faire preuve de la plus grande prudence dans la mesure où, comme pour tout médicament mais plus particulièrement du fait de la nature de l'agent employé, les résultats obtenus en terme d'efficacité, de cinétique mais surtout de sécurité peuvent grandement varier lors d'une utilisation chez l'humain par rapport aux observations découlant d'expériences usant de modèles *in vivo* et animaux (Skurnik et Strauch 2006).

3.4. Le problème des résistances

De même que pour tout traitement visant un agent vivant doté de capacités adaptatives, la phagothérapie peut être concernée par le développement d'une résistance par l'agent visé.

Les bactéries sont ainsi capables d'élaborer des stratégies visant à limiter le risque d'infection par les virus de même qu'elles peuvent élaborer des mécanismes de défense vis-à-vis des agressions chimiques des antibiotiques.

Ces résistances peuvent s'opérer par la modification de leurs récepteurs visés par les virus, le masquage de ces récepteurs par des protéoglycanes voir leur disparition, privant ainsi les virions de toute possibilité de fixation aux cellules-hôtes et prévenant ainsi leur internalisation (Wittebole, De Roock, et Opal 2014).

Un certain nombre d'espèces bactériennes présentant un système CRISPR-cas comme mesure de défense visant à empêcher l'intégration et l'expression de matériel génétique, il a été montré que ce système participe activement à l'acquisition d'une résistance vis-à-vis des virus. Cette résistance est par ailleurs transmissible lors de la réplication cellulaire et pose donc le problème de l'apparition de populations entières de bactéries résistantes aux bactériophages (Barrangou et al. 2007).

Les mécanismes de résistances peuvent aussi concerner des étapes plus en aval dans le cycle infectieux. Les bactéries sont ainsi capable de limiter l'intégration du matériel génétique viral au sein de leur propre génome par des mécanismes de restriction / modification mais aussi inhiber la transcription et la translation du génome viral et bloquer l'assemblage de nouvelles particules virales (Torres-Barceló 2018a).

Comme pour toute résistance bactérienne, la résistance aux phages peut être transmise horizontalement (de bactérie à bactérie par l'intermédiaire d'un plasmide de conjugaison) ou verticalement (d'une bactérie-mère à ses cellules-filles par réplication du génome) surtout, dans le second cas, après infection par un phage non-lytique qui laisse à la bactérie-cible la possibilité de se multiplier et ainsi de propager les facteurs de résistance.

Ces mécanismes peuvent toutefois être contournés de par la nature adaptative des virus, aidée en cela par leur capacité à muter très rapidement.

Certains virus peuvent notamment sécréter une enzyme permettant la lyse des protéoglycanes servant au masquage par les bactéries de leurs récepteurs (Wittebole, De Roock, et Opal 2014).

3.5. Réactions de l'organisme

Comme tout agent « extérieur » et, qui plus est, un agent viral, le phage est susceptible d'être reconnu par le système immunitaire de l'organisme du receveur comme un danger et de déclencher une réponse adaptative.

Ce phénomène peut entraîner une diminution voire une abolition de l'efficacité de la phagothérapie, que ce soit pour un éventuel traitement futur voir pour le traitement en cours.

Il semble néanmoins que l'importance de la réponse immunitaire à l'administration d'une phagothérapie soit liée à la voie retenue. Ainsi, une administration par voie orale semble moins inductrice d'une production d'anticorps qu'une administration locale.

Il est possible que des phages structurellement proches engendrent des réponses immunitaires différentes et des niveaux élevés d'anticorps dirigés contre les

bactériophages ne semblent pas être corrélés à une diminution à court terme de l'efficacité de ces derniers.

Une étude publiée en 2016 a porté sur la réponse immunitaire, notamment la réponse humorale, après administration d'un cocktail de phages dans le cadre du traitement d'infections osseuses et sinusales à *S. aureus* et *S. lugdunensis* résistantes à la méthicilline (Żaczek et al. 2016). 20 patients traités par un cocktail de trois phages dirigés contre *S. aureus* (cocktail MS-1) furent donc sélectionnés. Ces patients avaient pour point commun d'être traités pour une infection à SARM traitée avec le même cocktail, bien que le siège de l'infection et donc la voie d'administration fut différente pour chaque patient. La posologie quotidienne consistait en 2 à 3 administrations journalières de 5 à 10 mL d'une solution de concentration indicative supérieure à 5×10^5 UFP/mL.

La présence ou non dans le sérum des patients d'anticorps dirigés contre les phages employés fut déterminée par une technique d'analyse immuno-enzymatique ELISA à partir d'échantillons de sérum obtenus en amont du traitement puis au cours des visites de suivi. Pour les patients ayant eu plusieurs prélèvements, celui montrant le taux d'anticorps le plus élevé fut retenu pour l'exploitation statistique. L'élément de comparaison retenu fut un groupe de 10 sujets sains naïfs du traitement par MS-1.

En ce qui concerne les immunoglobulines G totales (IgG), les patients présentaient un taux initial plus important que parmi les sujets témoins, ce que les auteurs attribuent à une infection précédente avec possibilité d'exposition préalable à un phage similaire à ceux employés dans cette étude. Les valeurs obtenues en cours de traitement furent très variables d'un patient à l'autre, allant d'une absence de différence significative par rapport au taux initial à une augmentation de facteur 7, avec une médiane correspondant à une augmentation de facteur 3.

Les taux d'IgA mesurés avant traitement furent très bas pour l'ensemble des patients, étant même inférieurs à la limite de détection pour 11 des 20 patients. De même, les sujets témoins ne présentaient pas d'anticorps de ce groupe dirigés contre les souches phagiques concernées. Seuls les prélèvements de 2 des 20 patients révélèrent des quantités élevées d'IgA en cours de traitement.

Concernant les taux relevés d'IgM, les échantillons pré-traitements ont montré des niveaux très faibles d'anticorps à l'exception d'un patient. Les analyses en cours de traitement ont révélé une grande disparité en terme de production d'IgM, avec des taux exceptionnellement élevés pour 2 des patients. Malgré ces différences, la valeur médiane est demeurée assez basse.

Deux des patients traités pour des infections osseuses par administration localisée du cocktail MS-1 ont montré une importante production d'anticorps pour l'ensemble des trois types d'immunoglobulines (IgM, IgG, IgA). Néanmoins, l'analyse des échantillons d'autres patients traités pour des infections similaires et/ou avec la même voie d'administration n'a pas révélé de dynamique concordante. Les auteurs ont conclu à une absence de corrélation entre la voie d'administration retenue et une production significative d'anticorps. Les auteurs indiquent également que les IgG semblent être les principaux responsables de la réponse humorale dirigée contre les bactériophages. Néanmoins, l'ensemble des études menées à ce jour n'a pas permis d'établir de lien de causalité entre la production d'anticorps dirigés contre les bactériophages et la perte d'efficacité thérapeutique, des patients présentant une production importante d'immunoglobulines

ayant montré une réponse favorable au traitement, y compris en cas de thérapie prolongée.

3.6. Problématiques de mise à disposition

Les phages, du fait de leur nature assimilée au vivant, sont des agents beaucoup plus sensibles aux facteurs extérieurs (lumière, température, agents chimiques) que les antibactériens. Il est donc beaucoup plus difficile, voir même impossible, de les employer en dehors de structures capables d'assurer un stockage adéquat.

Par ailleurs, les préparations de phages n'ont pas, jusqu'à maintenant, montré une réelle efficacité qu'après utilisation contrôlée, que ce soit par injection mais aussi par administration locale (exemple du traitement des grands brûlés (Leontyev et al. 2021)), ce qui implique une administration par du personnel qualifié avec un matériel adapté, là où beaucoup d'antibiotiques peuvent être pris par les patients eux-mêmes, souvent par voie orale.

Enfin, cette méthode longtemps délaissée reste insuffisamment promue dans certains pays et, dépourvue de prise en charge financière, inaccessible à un certain nombre de patients. Ceci s'accompagne d'une seconde conséquence : sans utilisation en conditions réelles, il est difficile d'obtenir des données assez fiables et nombreuses pour pouvoir juger du réel impact de cet outil thérapeutique.

Une autre barrière à l'application généralisée de la phagothérapie est le cadre légal d'application. En tant qu'agent thérapeutique destiné à une utilisation chez l'humain, la phagothérapie est strictement encadrée par les autorités responsables du contrôle du développement, de la commercialisation et de l'emploi de tels produits. Ce contrôle est d'autant plus strict sur ce sujet du fait que les préparations de phages, agents biologiques assimilés au vivant, ne peuvent être standardisées dans leur composition de par la grande variabilité des souches virales (Verbeken et al. 2007).

II. Intérêts des bactériophages dans les infections multirésistantes

1. Emploi des bactériophages comme alternatives aux antibiotiques

Récemment, plusieurs équipes de recherches se sont penchées sur la problématique du traitement des infections liées à la pose de prothèses orthopédiques, en particulier en lien avec les bactéries multirésistantes. En effet, la prévalence de ce type d'infection en fait la première cause de ré-opération après la pose d'une prothèse totale. De plus, le taux de rémission sous antibiothérapie est malheureusement assez faible, de l'ordre de 18 % selon certaines études (Fedorov et al. 2023), et la solution de référence reste le changement de prothèse en deux temps. Le changement de prothèse en deux temps consiste dans un premier temps à retirer complètement la prothèse, le ciment fixateur et les tissus environnant lorsqu'ils sont endommagés par l'infection puis à appliquer un séparateur imprégné d'antibiotiques (comme par exemple la daptomycine) en association avec une antibiothérapie par voie orale ou parentérale. La deuxième étape est la remise en place d'une prothèse complète.

Une étude (Barros et al. 2019). a ainsi porté sur 15 souches de bactéries multirésistantes isolés dans un contexte d'infections apparues sur des implants orthopédiques (6 souches de l'espèce *Staphylococcus aureus* dont 4 résistantes à la méthicilline, 7 souches de l'espèce *Enterococcus faecalis* toutes résistantes à la vancomycine et 2 souches de l'espèce *E. coli*). Ces bactéries furent exposées à plusieurs souches de bactériophages sélectionnés pour leur capacité de dissémination importante et pour la faible durée de leur cycle de réplication. Après exposition de ces 3 espèces bactériennes de souches phagiques (LM 12, LM 99 et JB75), ces dernières ont toutes montré une action avec un effet maximal à 2h après application de la solution de bactériophages. Cette diminution de la population bactérienne a atteint plus de 95 % à 24h pour les trois bactéries étudiées [figure 5].

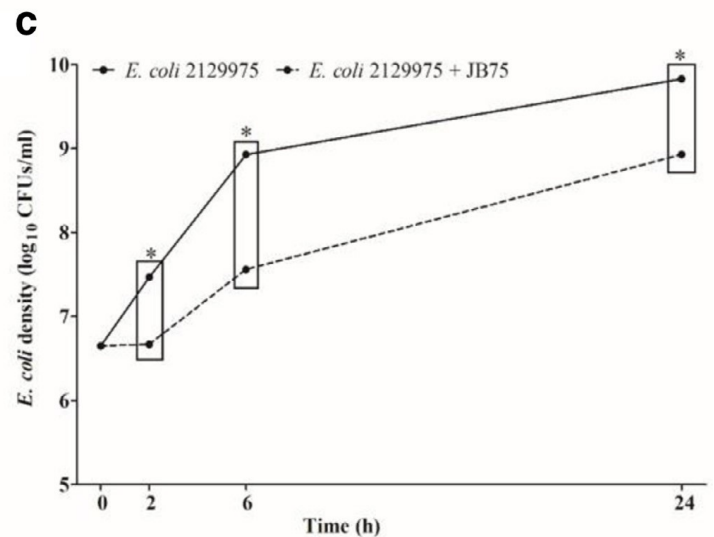
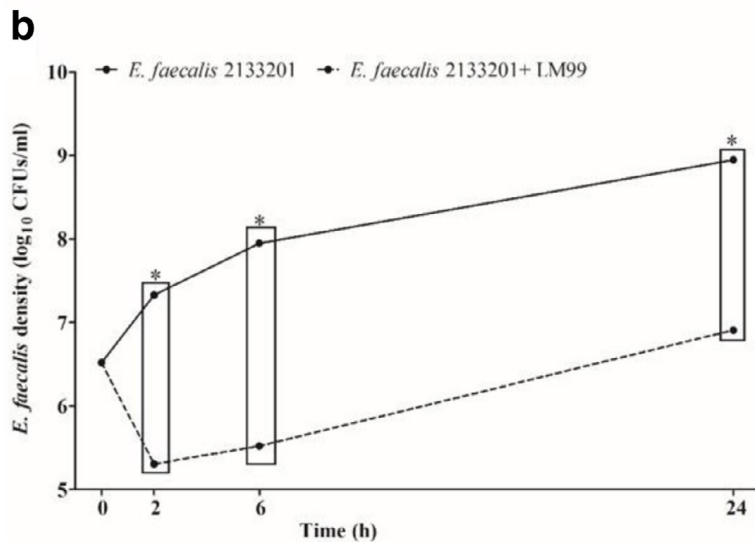
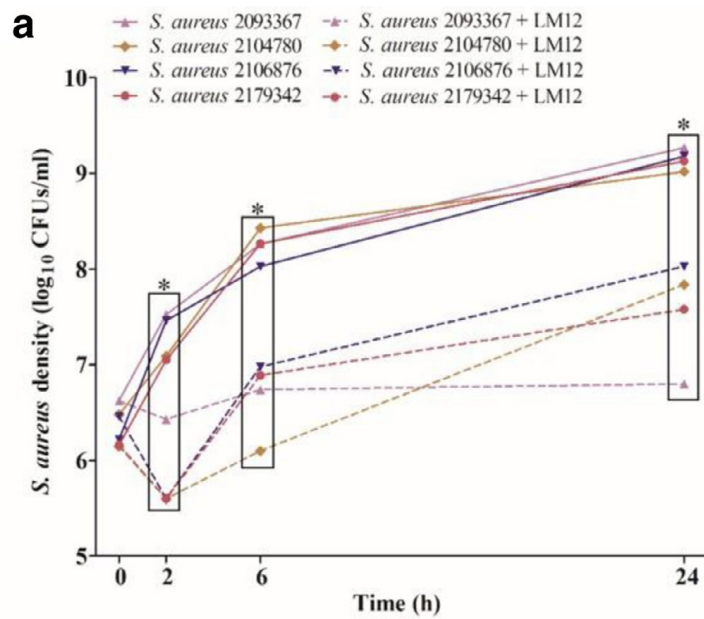


Figure 5: Effet inhibiteur du phage LM12 sur des cellules planctoniques de *S. aureus* (a), du phage LM99 sur des cellules planctoniques d'*E. faecalis* (b) et du phage JB75 sur des cellules planctoniques d'*E. coli* recueillies au site d'infections associées à des implants orthopédiques (Barros et al. 2019)

Dans le même registre, une deuxième étude (Morris et al. 2019) a cherché à déterminer cette fois-ci l'efficacité des bactériophages sur des souches de *S. aureus* issues de prélèvements nasaux effectués chez des patients hospitalisés pour la pose d'une prothèse totale de hanche. Ces souches bactériennes, confirmées par immunochromatographie comme présentant une résistance à la méticilline, furent étudiées à la fois sous forme de colonies planctoniques mais également sous formes de colonies organisées en biofilms fixées sur des surfaces en titane poreux permettant de reproduire une infection de prothèse. Après exposition à 31 préparations de phages ciblant spécifiquement *S. aureus*, les résultats observés furent une sensibilité générale de l'ensemble des souches observées à 17 des 31 préparations de bactériophages ainsi qu'une efficacité manifeste du traitement en terme de réduction de la croissance des colonies bactériennes mais

aussi en terme de potentiel d'éliminations des souches organisées en biofilms sur le support de titane.

Au cours d'un autre essai clinique (Fedorov et al. 2023), un groupe test de patients (effectif final de 22 personnes) s'est vu administré injection localisée un cocktail de phages sélectionnés pour leur affinités pour les staphylocoques en complément d'un traitement par antibiothérapie systémique. Les résultats obtenus furent comparés aux données de patients (effectif final de 22 personnes) ayant précédemment été traités par une association d'une antibiothérapie locale et d'une antibiothérapie systémique en accord avec les recommandations actuellement en vigueur pour ce type d'infection. Les données de suivi post-traitement recueillies ont couvert une période de 12 mois.

Le taux de rechute infectieuse parmi les patients du groupe contrôle fut 8 fois plus élevé que chez les patients du groupe test. D'une façon générale, les marqueurs de l'inflammation ont suivi une cinétique similaire au sein des deux groupes, avec cependant un taux de CRP plus élevé dans le groupe test.

Les auteurs ont fait remarqué que l'un des patients du groupe test a vu le profil bactériologique de son infection évoluer en cours de traitement, avec l'apparition de *Staphylococcus epidermidis* et de *Proteus mirabilis*. L'hypothèse admise dans ce cas est que les espèces bactériennes en question était déjà présente en début de traitement mais « masquées » par la présence beaucoup plus importante de *Staphylococcus aureus* et que l'élimination de ce dernier à donner l'opportunité à d'autres pathogènes de se développer. Cette situation vient renforcer l'idée de l'importance d'une antibiothérapie à spectre large en plus de la phagothérapie, cette dernière étant par nature trop sélective pour éviter l'apparition d'infections opportunistes.

Cette étude a permis de mettre en lumière l'importance à moyen et long terme de la mise en place de stratégies de prévention et de lutte efficaces envers les infections liées à la pose de prothèses orthopédiques totales, ce type d'infection pouvant entraîner la nécessité de réopérer avec un risque de complications et une altération du confort de vie des patients concernés.

Il ressort de ces études que la phagothérapie est une alternative envisageable et intéressante aux antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes s'implantant sur des prothèses orthopédiques, notamment lorsque les bactéries responsables sont résistantes à une ou plusieurs familles d'agents antibactériens. Par ailleurs, les bactériophages présentent deux intérêts supplémentaires dans cette application : contrairement aux virus que sont les phages, les antibiotiques diffusent généralement mal au sein des tissus osseux, ce qui impacte grandement leur action dans le traitement des infections à ce niveau mais présentent également une mauvaise capacité de diffusion dans les biofilms établis.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie connue pour sa virulence, sa capacité à s'organiser en biofilms, sa prévalence sans cesse croissante dans les infections nosocomiales, sa dangerosité pour les patients immunodéprimés, sa présence récurrente chez les patients atteints de mucoviscidose et l'importance des populations résistantes aux antibiotiques associée à la capacité de la bactérie à ralentir son métabolisme afin de limiter d'avantage l'efficacité des agents antibactériens conventionnels.

La souche phagique OKMO1 fut utilisée dans le cadre du traitement d'une infection chronique à *P. aeruginosa* affectant un greffon vasculaire (Chan et al. 2018). Ce type d'infection, d'incidence variable selon l'implantation du greffon, peut avoir des répercussions sévères pour la santé des patients receveurs, répercussions aggravées par le contexte de co-morbidité et les traitements associés à ce type de greffe : la morbi-mortalité est estimée à plus de 20 % en cas d'infection survenant sur le greffon, pouvant atteindre 75 % de mortalité dans le cas d'une infection survenant sur un greffon aortique thoracique et un risque de récurrence de 20 % après remplacement du greffon.

Le patient traité, un homme âgé de 76 ans, avait présenté, suite à une greffe aortique, plusieurs occurrences d'infections à *P. aeruginosa* qui, après plusieurs cycles de traitement par administration intraveineuse de ceftazidime avec un relais par ciprofloxacine par voie orale. Devant la recrudescence des infections et le risque pour l'aorte, la décision fut prise de recourir à une phagothérapie associée à de la ceftazidime afin de pallier à une résistance avérée vis-à-vis du phage OKMO1. Après administration unique de l'association à proximité du site de l'infection, le patient fut renvoyé à domicile avec maintien du traitement par ceftazidime. Suite à l'opération d'une perforation aortique liée à une excroissance osseuse, le traitement antibiotique fut arrêté. Le patient n'a pas connu de réinfection en 18 mois malgré l'absence de couverture préventive.

Dans le même domaine, une étude menée par une équipe de l'institut Pasteur (Henry, Lavigne, et Debarbieux 2013) a cherché à déterminer la possibilité d'une corrélation entre l'efficacité *in vitro* et l'efficacité *in vivo* d'un ensemble de neuf souches de phages collectées en différents points du réseau des eaux usées de Paris et dirigés contre la souche PAK de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, un modèle murin ayant été sélectionné pour reproduire une infection respiratoire. Afin de correspondre à la réalité du traitement d'une infection déjà installée, l'administration du traitement (ou d'un placebo sous la forme de sérum physiologique), fut retardé par rapport à l'exposition à l'agent bactérien. Le traitement par phagothérapie a montré une efficacité certaine, avec un taux de survie à 8 jours significativement accru par rapport au groupe contrôle [figure 6].

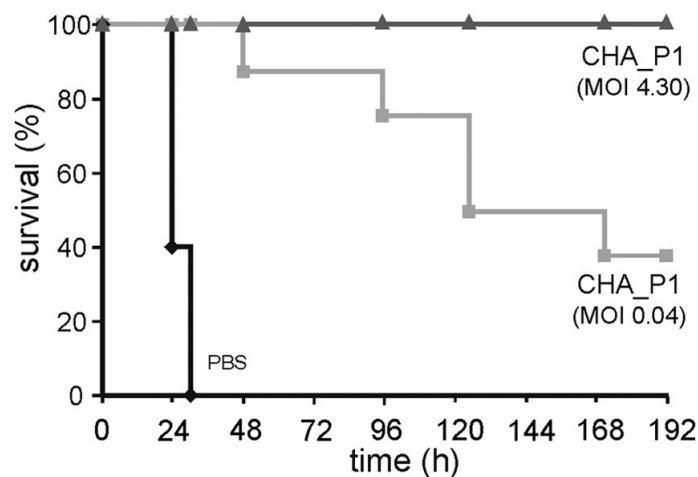


Figure 6: Efficacité in vivo de la préparation de bactériophages (souche CHA_P1) déterminée par la survie d'animaux traités par CHA_P1. Le groupe contrôle a reçu un tampon phosphate salin (PBS) (Henry, Lavigne, et Debarbieux 2013)

Cette expérience a permis non seulement de montrer une corrélation entre l'efficacité *in vivo* et celle observée *in vitro* pour la plupart des cocktails employés, corrélation ouvrant la voie à la possibilité d'une prédiction *in vivo* de la réponse à ce type de traitement dans le cadre d'une utilisation en médecine humaine ou vétérinaire, mais également une influence de la souche bactérienne employée pour la sélection et la réplique des souches de phages recherchées. Ces éléments permettraient d'établir des modèles prédictifs et de développer deux grandes stratégies d'application de la phagothérapie, à savoir d'une part une approche probabiliste faisant usage de cocktails incluant des souches de phages ciblées contre les souches bactériennes les plus répandues dans un type d'infection donnée et, d'autre part, une approche plus adaptative basée sur l'isolation de souche de phages en faisant usage de la bactérie responsable de l'infection traitée (par prélèvement sur le patient concernée) afin de produire le traitement ayant la plus grande efficacité possible.

Ces études servent à mettre en évidence l'efficacité de la phagothérapie même employée seule et ouvrent la voie à des possibilités de mise en place de schémas types et de modèles prédictifs permettant d'augmenter les chances de rétablissement des patients concernés ainsi que de réduire les moyens nécessaires à lutter efficacement contre ces infections et leurs conséquences à court ou long terme.

Staphylococcus aureus est un pathogène bien connu et malheureusement très répandu, fréquemment responsable d'infections nosocomiales. L'émergence et l'augmentation de la prévalence de souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline rend la lutte contre cette bactérie de plus en plus compliquée. A cette fin, la thérapie par bactériophages présente une alternative intéressante.

Une étude (Wills, Kerrigan, et Soothill 2005) s'est ainsi intéressée au potentiel de la phagothérapie comme traitement préventif en administrant à un groupe de 8 lapins une souche de phage infectant *S. aureus* concomitamment à l'application de l'agent pathogène. Comparé au groupe contrôle composé de 8 lapins n'ayant pas reçu de traitement après infection, le nombre de souris du groupe test ayant montré des signes de l'infection fut significativement réduit, avec un seul sujet ayant développé un abcès contre 8 pour le groupe contrôle. Par ailleurs, le nombre d'UFC bactériennes au site d'infection était inférieur dans le groupe test, avec une différence moyenne de facteur 10 par rapport au groupe contrôle. Cette expérience a permis de mettre en lumière le potentiel de la phagothérapie comme agent protecteur et préventif, élément pouvant présenter un intérêt dans la prévention des infections post-opératoires.

Le corpus d'études actuellement disponible s'oriente donc vers une réponse clairement positive concernant l'efficacité de la phagothérapie dans la prise en charge des infections multirésistantes. Néanmoins, il est important de garder à l'esprit que les bactériophages ne sont pas forcément applicable dans toutes les situations et ne sont pas exempts de problèmes d'apparition de résistances de la part des bactéries visées. Une solution idéale viserait donc à associer, comme cela est le cas dans un certain nombre de pathologies, plusieurs agents thérapeutiques afin d'augmenter la probabilité de rémission tout en réduisant les répercussions à long terme.

2. Emploi des bactériophages en associations avec les antibiotiques

Si les bactériophages seuls ont d'ores et déjà démontrés des applications dans le domaine thérapeutique, comme par exemple dans le traitement d'infections chroniques à *Pseudomonas aeruginosa*, un nombre grandissant d'études et d'essais cliniques se sont intéressés à la possibilité de les employer conjointement avec des agents antibiotiques traditionnels afin de potentialiser l'action des deux groupes.

En 1945, le Dr Himmelweit avait déjà publié une étude détaillant les effets d'une association de bactériophages et de pénicilline sur une culture de staphylocoques. Il avait ainsi montré que cette association permettait de réduire de façon significative le délai nécessaire pour éliminer complètement la souche bactérienne sans qu'il ne se produise de phénomène de compétition entre les deux agents antibactériens. Néanmoins, l'auteur a précisé dans la conclusion de cette étude que ce phénomène de complémentarité pouvait être inexistant lorsque d'autres antibiotiques étaient employés, par exemple l'actinomycine. Cette étude montre donc l'importance d'approfondir les connaissances concernant les mécanismes participant à cette synergie ainsi que la nécessité d'évaluer les possibles associations afin d'établir des protocoles thérapeutiques applicables en situations réelles (Himmelweit 1945).

1. Théorie et mécanismes : les phages comme adjuvants dans l'antibiothérapie

Les traitements par antibiotiques se heurtent fréquemment à l'organisation des bactéries en biofilms. Ces biofilms sont des colonies bactériennes intégrés dans une matrice extracellulaire (MEC) imperméabilisante freinant, voir bloquant la diffusion des antibiotiques, y compris dans les premiers stades de développement et d'organisation.

Les phages, en revanche, conservent leur activité en présence biofilms puisque la forte concentration en cellules bactériennes facilite leur multiplication.

De surcroît, les phages peuvent produire des lysozymes mais certains sont capables d'induire la production d'algines par les cellules-hôtes pour un résultat similaire. Rendue plus poreuse, la MEC serait plus facilement pénétrables par les agents antibactériens, permettant une potentialisation de l'action de ceux-ci (Kumaran et al. 2018).

Une modification du génome des souches virales employées dans la phagothérapie permettrait d'accroître leur efficacité en augmentant leur arsenal enzymatique.

Il a été isolé à partir d'échantillons d'eau et de terre prélevé dans la nature des phages utilisant comme récepteurs bactériens certaines pompes d'efflux intervenant dans les mécanismes de résistance aux antibiotiques ou encore des plasmides contenant des gènes de résistance aux antibiotiques (Ojala, Laitalainen, et Jalasvuori 2013).

Les infections à *P. aeruginosa* sont notamment de plus en plus difficiles à traiter de par la faible perméabilité de la membrane plasmique de cette bactérie aux antibiotiques et le développement de mécanismes de résistances affectant plusieurs familles d'antibiotiques, le premier de ces mécanismes étant un ensemble de protéines d'efflux non-spécifiques permettant le relargage des antibiotiques.

Employer des phages ciblant ces facteurs de résistances permettrait d'orienter la pression de sélection en faveur de lignées bactériennes plus sensibles aux antibiotiques. En effet, les phages qui induisent chez les bactéries-cibles une forme de dilemme consistant à choisir entre l'expression de ces éléments de surface les rendant susceptibles à une infection virale et leur masquage, permettant d'éviter l'internalisation des virions mais les empêchant de fait d'éliminer les agents antibactériens par relargage. L'utilisation de phages favorisant ce type de phénomène permettrait donc d'induire une pression qui favorise une sélection de souches bactériennes sensibles à certains antibiotiques actuellement utilisés dans le domaine thérapeutique. Cette méthode permettrait même l'emploi d'agents antibactériens sur des espèces bactériennes ayant une résistance innée vis-à-vis de ces agents.

Afin d'étudier cette possibilité, une autre étude a été menée sur plusieurs souches multirésistantes de *P. aeruginosa* (Chan et al. 2016). Ces souches furent isolées à partir de prélèvement effectués dans la nature (égouts, terre, lacs, rivières, ruisseaux, compost) et enrichis par 2 souches de phages connues pour leur capacité à infecter deux des souches les plus étudiées de *P. aeruginosa*, PA01 et PA14. 4 des souches furent prélevées dans l'environnement (PA14, PAN, 1845, 1607) et 3 souches furent prélevées sur des patients en milieu hospitalier (PAPS, PASK, PADFU). Les isolats bactériens furent analysés afin de déterminer la présence ou non de variants dépourvus des éléments de surface de résistances aux antibiotiques nécessaires à la fixation et à l'infection par les phages.

Les différents essais et isolements ont aboutit à l'identification d'une souche virale capable d'infecter les souches bactériennes obtenues dans la nature mais incapable d'infecter celles dépourvues des pompes d'efflux OprM, éléments de surface bactériens impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Cette souche virale fut nommée OMKO1. La souche OMKO1 fut ensuite utilisée comme référence pour le reste de l'étude.

Les 8 souches bactériennes furent alors séparées chacune en deux groupes en fonction de leur statut de résistance vis-à-vis de du phage OMKO1 puis exposées à 4 antibiotiques (ciprofloxacine, tetracycline, ceftazidime et erythromycine). Les résultats obtenus ont montré une diminution de la CMI variable selon les souches bactériennes et les antibiotiques avec des écarts allant d'une absence de modification à une réduction par un facteur 45, bien que la moyenne se situe d'avantage aux alentours d'un facteur 2-3 [figure 7].

Ces résultats montre un effet significatif de la résistance aux phages sur la sensibilité à la tetracycline et l'erythromycine pour la plupart des souches bactériennes issues de l'environnement tandis que 2 des souches obtenues à partir de prélèvements cliniques ont montré une sensibilité accrue à la ciprofloxacine et à la ceftazidime.

Les auteurs en ont conclu que l'acquisition d'une résistance à l'infection par les phages utilisant des facteurs de résistance aux antibiotiques comme éléments de reconnaissance et de fixation était corrélée avec une sensibilité accrue à ces antibiotiques. L'utilisation de phages ayant pour cible cellulaire des protéines de surface codée par le génome contenu dans les plasmides permet de limiter la diffusion d'éléments de résistance vis-à-vis des antibiotiques et ainsi d'exercer une pression de sélection en faveur de bactéries dépourvues de ces éléments.

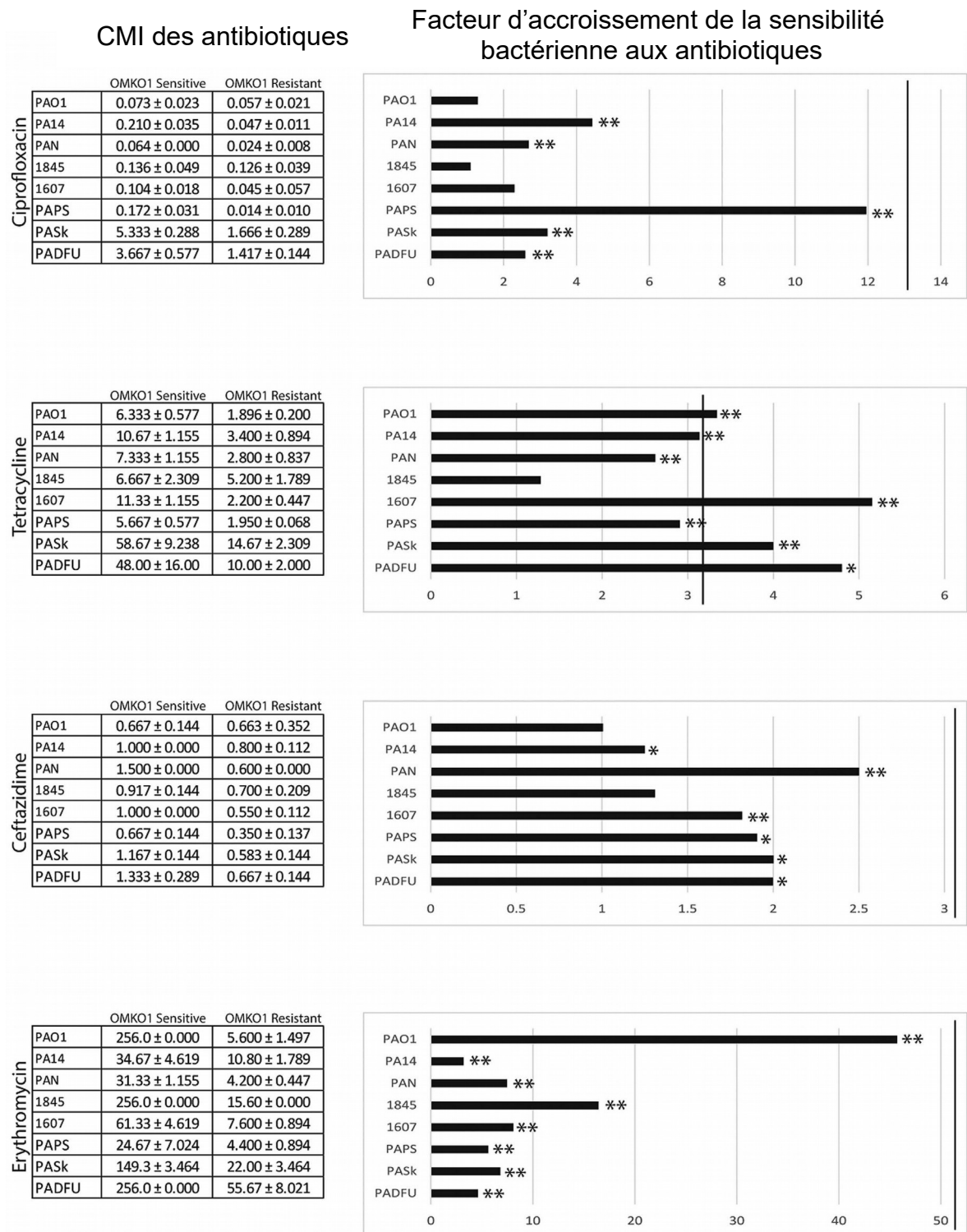


Figure 7: Variation de la CMI de 4 antibiotiques pour 8 souches de *P. aeruginosa* en fonction de la résistance vis-à-vis d'une souche virale infectant cette bactérie (Chan et al. 2016).

Similairement, une étude publiée en 2016 (Chaudhry et al. 2017) s'est intéressée au potentiel de la synergie phages-antibiotiques dans la réduction voire l'élimination de biofilms de *P. aeruginosa*. Les auteurs de cette étude ont établi leur postulat sur l'importance de la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces dans le traitement d'infections causées par cet agent bactérien et responsables de complications potentiellement mortelles chez des patients atteints de mucoviscidose, de brûlures sévères, de déficits immunitaires ainsi que chez les patients diabétiques présentant des ulcérations.

La difficulté de traitement de ce type d'infection est non seulement lié aux multiples résistances innées et acquises de *P. aeruginosa* vis-à-vis d'agents antibiotiques mais également à la capacité de cette bactérie à s'organiser en biofilms limitant son exposition aux produits antibactériens classiques.

Afin d'évaluer l'efficacité de cette synergie, les auteurs ont utilisé une souche bactérienne (PA14) exposée à des concentrations croissantes de ciprofloxacine et de gentamicine afin de sélectionner des mutants résistants à ces deux antibiotiques (PA14Cip-R et PA14Gen-R respectivement). Deux souches phagiques spécifiques de *P. aeruginosa* (NP1 et NP3) furent obtenues à partir d'échantillons obtenus dans une usine de traitement des eaux usées et isolées par exposition à un bouillon de culture contenant la bactérie. Des analyses complémentaires ont montré que certains variants de *P. aeruginosa* étaient résistants à l'une ou l'autre des souches phagiques et que ces dernières présentaient des récepteurs cellulaires différents. 5 antibiotiques fréquemment employés dans le traitement d'infections à *P. aeruginosa* furent utilisés au cours de cette étude : ceftazidime (cephalosporine de 3^e génération), ciprofloxacine (fluoroquinolone), colistine (polymyxine E), gentamicine (aminoside) et tobramycine (aminoside). La CMI de chaque antibiotique vis-à-vis de la souche PA-14 fut établie avant le début de l'expérience.

L'efficacité de l'application des différents traitements sur les biofilms bactériens fut évaluée par analyse de la croissance bactérienne après 48h d'incubation puis de la destruction des cellules bactérienne après 48h de traitement au travers d'un comptage des bactéries fiables.

Les échantillons furent répartis en 4 groupes : traitement simultané par phages et antibiotiques de biofilms cultivés sur un support polystyrène (groupe A) ; traitement séquentiel par phages et antibiotiques de biofilms cultivés sur un support polystyrène (groupe B) ; traitement par phages et antibiotiques de cellules bactériennes planctoniques issues de souches sensibles et résistantes aux antibiotiques cultivées sur un support polystyrène (groupe C) ; traitement simultané par phages et antibiotiques de biofilms cultivés sur des cellules épithéliales nasopharyngées (groupe D).

Une partie des bactéries du groupe A furent exposées aux 2 souches de phages, à la fois isolément et en association. Les autres échantillons furent traités par chacun des 5 antibiotiques à des concentrations équivalentes à 1 fois et 8 fois la CMI, soit seuls, soit en associations avec les deux souches de phages.

L'étude des résultats du groupe A a permis de confirmer l'efficacité accrue de l'action combinée des deux souches phagiques NP1 et NP3 de part leurs récepteurs de fixation différents aboutissant à une action complémentaire.

A l'exception de la colistine, les antibiotiques ont tous montré un effet significatif sur la réduction de la population bactérienne après application à des concentrations de 8 fois la CMI.

Un effet synergique statistiquement significatif fut observé pour deux antibiotiques (ceftazidime et ciprofloxacine) en association avec les phages, y compris avec des concentrations en agent antibactérien équivalentes à la CMI.

Par ailleurs, il est à noter que l'association des phages à la ceftazidime, à la ciprofloxacine (faible concentration uniquement), à la colistine et à la tobramycine (faible concentration uniquement) a abouti à une augmentation par un facteur 10 minimum du titre phagique initial, montrant une influence des agents chimiques sur la production de particules virales.

Dans le cas de la tobramycine, l'association de phages avec une concentration à 8 fois la CMI de l'antibiotique montra un effet amoindri sur la population bactérienne par rapport à cette même association avec une concentration plus faible de l'agent antibactérien. Les auteurs attribuèrent ce résultat soit à une interférence entre l'action de la tobramycine et le mécanisme de réplication, soit à une réduction de la population bactérienne à un niveau limitant cette réplication [Figure 8].

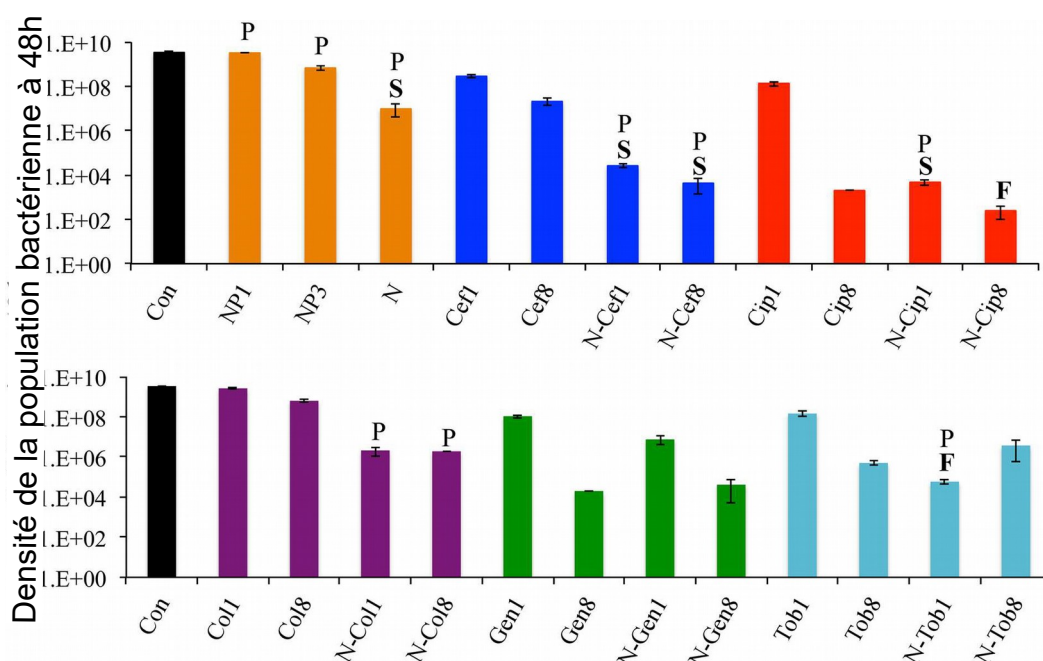


Figure 8: Traitement de biofilms intacts cultivés sur support neutre. Densité de cellules bactériennes viables après 48h de traitement par phages et/ou antibiotiques. Les antibiotiques sont marqués par une abréviation (Cef : Ceftriaxone ; Cip : Ciprofloxacine ; Col : Colistine ; Gen : Gentamicine ; Tob : Tobramycine) suivi d'un indicatif chiffré correspondant à la concentration employée (1 ou 8 fois la CMI pré-établie), « Con » correspondant au bras contrôle. Le suffixe N- indique l'adjonction des deux souches phagiques). La lettre P indique une augmentation par un facteur 10 minimum du titre phagique initial. La lettre S indique un effet synergique statistiquement significatif. La lettre F indique un phénomène de facilitation (effet majoré par rapport à l'emploi d'un traitement seul mais sans démonstration d'une synergie)

(Chaudhry et al. 2017)

Les bactéries du groupe B furent, après 48h d'incubation, exposées aux deux souches de phages puis à chaque antibiotique selon 3 cinétiques différentes : adjonction d'antibiotiques simultanément à l'exposition aux phages, adjonction d'antibiotiques 4h après l'exposition aux phages et adjonction d'antibiotiques 24h après l'exposition aux phages. La densité de cellules bactériennes viables fut par la suite analysée 48h après l'exposition aux phages, ce qui signifie que la durée d'exposition aux antibiotiques n'était pas constante d'un bras à l'autre. Le groupe contrôle employé fut un échantillon bactérien exposé à l'antibiotique seul. En parallèle, un titrage des particules virales fut réalisé. Cette analyse révéla des effets disparate en fonction de l'antibiotique employé. Ainsi, les échantillons traités par ciprofloxacine, gentamicine et tobramycine ont toutes les 3 révélés une réduction significative de la population bactérienne corrélée à une introduction tardive de l'antibiotique après exposition aux phages, allant jusqu'à réduire cette population bactérienne en deçà de la limite de détection en ce qui concerne les échantillons traités par ciprofloxacine et gentamicine. En revanche, l'échantillon traité par la colistine ne montra pas d'effet accru de l'association en fonction du délai d'introduction de cet antibiotique et l'échantillon traité par ceftazidime révéla une réduction de l'efficacité de l'association corrélée à l'introduction tardive de l'agent antibactérien. Le titrage des particules virales montra une augmentation significative corrélée à une introduction tardive de l'antibiotique pour les échantillons traités par ciprofloxacine, gentamicine et tobramycine. Il n'y eu en revanche pas de variations pour les échantillons traités par ceftazidime et colistine. Les auteurs soulignèrent le fait que la limite de détection ne permet pas d'affirmer avec certitude que l'effet observé pour l'échantillon traité par ciprofloxacine soit lié à un phénomène de causalité vis-à-vis de l'application séquentiel des traitements [figure 9].

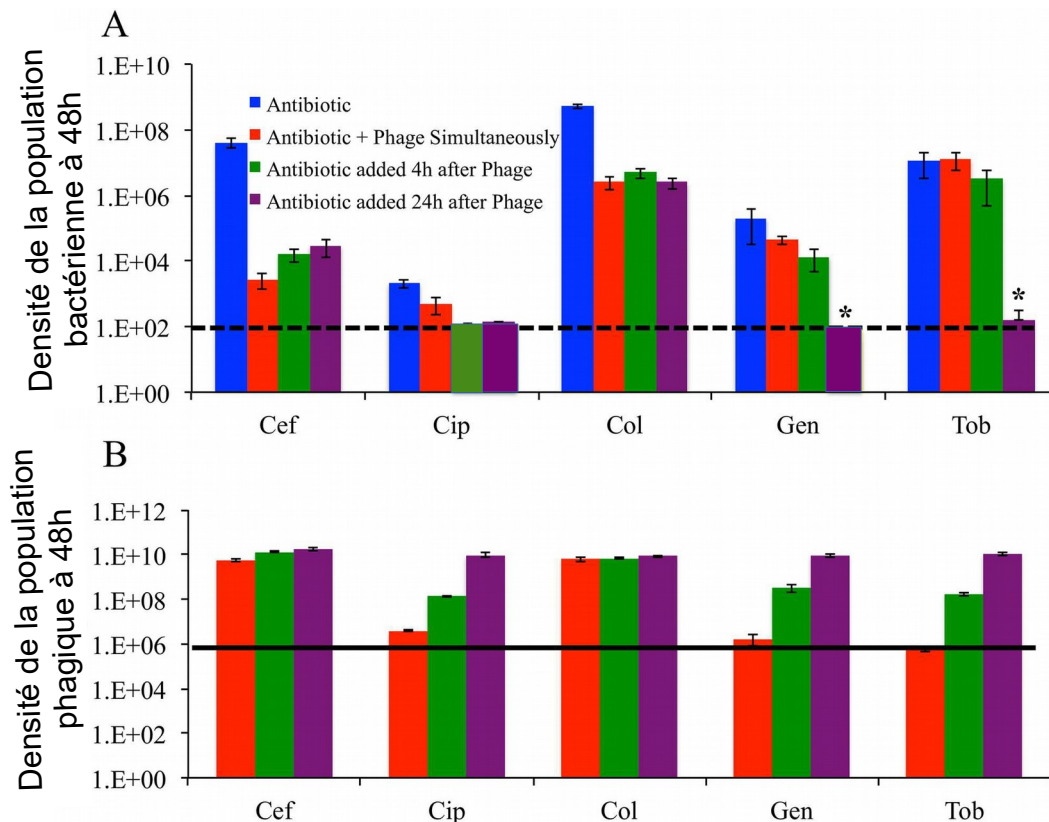


Figure 9: Effet de l'application séquentielle de phages et d'antibiotiques sur une population de *P. aeruginosa* cultivée sur polystyrène

(A) : Densité de cellules viables de *P. aeruginosa* en fin de traitement. La ligne discontinue indique la limite de détection, les barres jaunes indiquant une estimation inférieure à la limite de détection ; (B) : Densité de particules phagiques en fin de traitement. La ligne horizontale indique le titre initial de la solution de phages.

(Cef : Ceftazidime ; Cip : Ciprofloxacine ; Col : Colistine ; Gen : Gentamicine ; Tob : Tobramycine)

* : effet statistiquement significatif de l'introduction de l'antibiotique 24h après exposition aux phages

(Chaudhry et al. 2017)

Le traitement d'un mélange de bactéries sensibles et dans une moindre mesure, de bactéries antibiorésistantes soit par un antibiotique seul, soit par une combinaison de phages et d'antibiotiques permet d'identifier plusieurs points d'intérêt. Ainsi, la présence des bactériophages ne suffit pas à limiter le développement d'une population de bactéries antibiorésistantes. Cependant, le traitement combiné a permis de maintenir la densité en cellules bactériennes à des niveaux comparables à ceux obtenus lors du traitement d'un échantillon de bactéries sensibles par antibiothérapie seule mais il est à noter que le traitement combiné a permis, par l'élimination des bactéries sensibles, le développement des bactéries antibiorésistantes.

Afin d'approcher le plus possible des conditions d'applications réelles de ce type de traitement, le traitement combiné fut appliqué à des biofilms de *P. aeruginosa* présents ou s'étant développés sur des cellules épithéliales humaines issues de prélèvements nasopharyngés et répartis en deux groupes : EXP1, et EXP2. Ces biofilms furent cultivés pendant 8h avant traitement, durée au-delà de laquelle la bactérie induit une destruction des cellules épithéliales, puis traités par antibiotique seul, par phages seuls ou par une combinaison de phages et d'un antibiotique à une concentration équivalente à la CMI. Il ressort de cette expérience que si l'administration des différents antibiotiques et de la solution de phages seuls a démontré un effet sur l'évolution de la densité des cellules bactériennes, cet effet apparut comme majoré par rapport à l'administration de phages seuls lorsque ces derniers furent administrés conjointement avec 4 des 5 antibiotiques testés, l'exception étant la tobramycine pour laquelle l'administration conjointe n'a pas montré d'effet supérieur par rapport à la solution de phages seuls. L'effet le plus significatif fut obtenu par l'association de phages et de ceftazidime. L'administration conjointe d'antibiotiques et de phages n'induisit pas d'altération de la capacité de réplication de ces derniers, y compris pour la gentamycine, contrairement aux résultats obtenus lors du traitement de biofilms cultivés sur polystyrène. Les auteurs supposèrent un effet de facilitateur des cellules épithéliales sur la réplication virale [figure 10].

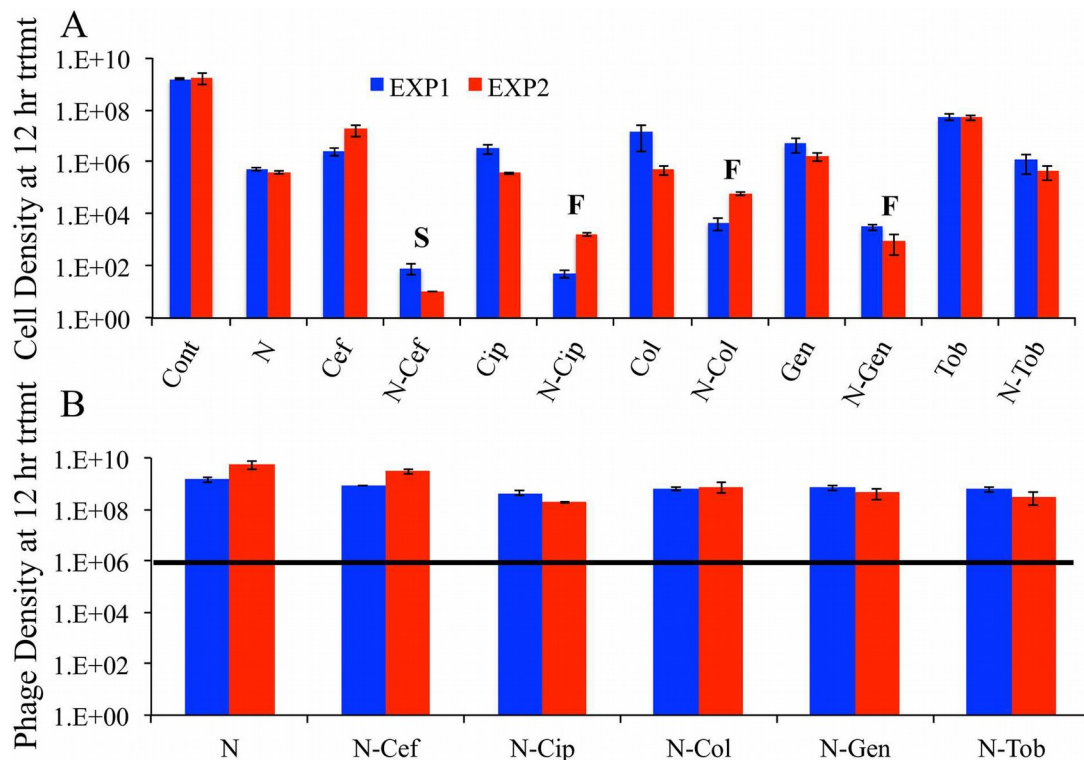


Figure 10: Traitement de biofilms de *P. aeruginosa* cultivés sur des cellules épithéliales

(Cont : Contrôle ; Cef : Ceftazidime ; Cip : Ciprofloxacine ; Col : Colistine ; Gen : Gentamicine ; Tob : Tobramycine)

A : densité en cellules viables de *P. aeruginosa* après 12h de traitement ;
B : densités en particules virales après 12h de traitement (la ligne horizontale indique le niveau de densité dans la solution de phages avant administration)

La lettre S indique un effet synergique statistiquement significatif. La lettre F indique un phénomène de facilitation (effet majoré par rapport à l'emploi d'un traitement seul mais sans démonstration d'une synergie)

(Chaudhry et al. 2017)

Les auteurs de cette étude concluent que l'administration conjointe de phages et d'antibiotiques permet d'engendrer un effet synergique significatif aboutissant à une efficacité accrue dans le contrôle de la population bactérienne par rapport à l'un de ces deux agents antibactériens employé isolément. Ils notèrent par ailleurs que certains antibiotiques maintiennent leur efficacité lorsque associés à des phages, y compris à des doses inférieures à leur CMI. Ils notèrent également que l'efficacité de certains des antibiotiques dans ces associations était accrue si la solution de phages était appliquée avant l'antibiothérapie plutôt que simultanément à cette dernière. Les auteurs précisèrent néanmoins qu'une étude approfondie des mécanismes sous-jacents aux effets observés serait nécessaire afin de comprendre les conditions sous lesquelles ces associations thérapeutiques peuvent se révéler efficaces.

Une autre étude, publiée en 2014 (Coulter et al. 2014), s'est intéressée à la question de l'efficacité de la réduction de populations bactériennes de *E. coli* et *P. aeruginosa* organisées en biofilms par l'emploi combiné de phages (T4 pour *E. coli*, PB-1 pour *P. aeruginosa*) et de tobramycine. Des essais préalables visèrent à évaluer l'efficacité individuelle de ces types de traitement puis des échantillons des deux espèces bactériennes étudiées furent exposées à des doses croissantes d'antibiotiques et de bactériophages administrées concomitamment, doses déterminées au cours des essais préalables comme ayant la capacité de réduire de 90 % la population bactérienne.

L'emploi d'une combinaison de tobramycine et de bactériophages T4 a abouti à une réduction significative de la population bactérienne par rapport à un traitement par tobramycine seule, avec une réduction de 99,99 % des souches résistantes à la tobramycine et de 39 % des cellules d'*E. coli* organisées en biofilm en terme de cellules bactériennes viables.

En revanche, l'emploi d'une association de tobramycine et de phage PB-1 dirigée contre *P. aeruginosa* n'a pas abouti à une diminution de la population bactérienne significativement augmentée par rapport à l'emploi de tobramycine seule. Cette association a pour autant permis de réduire de 60 % le nombre de cellules bactériennes viables résistantes vis-à-vis de l'agent antibiotique et de 99 % le nombre de cellules bactériennes présentant une résistance vis-à-vis du bactériophage. Les auteurs de l'étude ont émis l'hypothèse selon laquelle l'absence d'efficacité accrue de l'association par rapport à l'antibiotique seul pourrait être due au masquage par des composants de la MEC des récepteurs visés par le phage.

Les auteurs insistent également sur le fait que les infections en conditions réelles, contrairement aux essais généralement pratiqués sur des espèces bactériennes individualisées, impliquent plusieurs germes aux caractéristiques différentes, ce qui limite l'efficacité des bactériophages très spécifiques, notamment du point de vue des enzymes déployées pour désorganiser les composants extracellulaires des biofilms.

Par ailleurs, une étude portant sur un cocktail de 12 phages (cocktail PP1131) étudié dans l'essai clinique européen multicentrique Phagoburn s'est intéressée au potentiel synergique de ce produit en association avec la ciprofloxacine et le méropénème dans le traitement d'infections à *P. aeruginosa* (Oechslin et al. 2017). Les souches du cocktail employé ici furent sélectionnées sur la base des souches bactériennes ciblées, permettant de développer un produit possédant une large couverture. Les auteurs ont noté une forte pression de sélection exercée sur les bactéries après exposition *in vitro* aux bactériophages avec une démultiplication des mutants résistants. Néanmoins, ce phénomène ne s'est pas reproduit lors des essais *in vivo*, ce qui, d'après les auteurs, pourrait s'expliquer par une modification de facteurs bactériens de virulence ou une diminution de la capacité de survie concomitante à l'acquisition d'éléments de résistance vis-à-vis des bactériophages, hypothèse vérifiée par l'administration à des sujets murins de deux mutants résistants vis-à-vis de la plupart des 12 souches de bactériophages : des prélèvements biologiques effectués après infections ont révélé un moindre taux de croissance par rapport à une infection par une souche du germe dépourvue de résistance.

L'association du cocktail de bactériophages et de chacun des deux antibiotiques a résulté en un effet bactéricide accru par rapport à l'administration de la phagothérapie ou de l'antibiothérapie seule, avec une réduction de la population bactérienne viable de 4 à 6 log UFC/mL *in vitro* [figure 11].

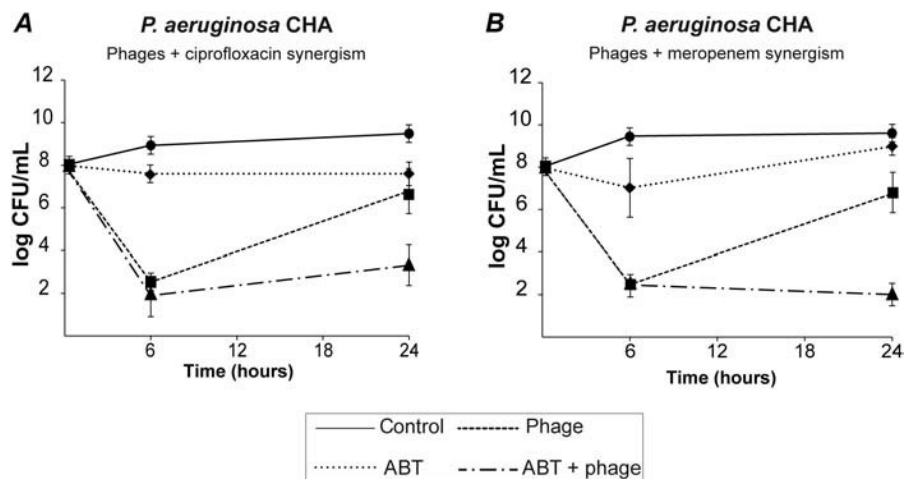


Figure 11: Synergie bactéricide entre un cocktail de bactériophages et deux antibiotiques (ciprofloxacine et méropénème) administrés à 2,5 fois leur CMI après croissance de colonies de *P. aeruginosa* sur caillot de fibrine (Oechslin et al. 2017)

Ces résultats se sont vérifiés après administration à des rats après induction d'une endocardite. Si l'emploi d'une phagothérapie ou d'une antibiothérapie par ciprofloxacine seule a aboutit à une diminution significative de la population bactérienne, de l'ordre de 2 à 3 log UFC/mL, au site de l'infection, sans différence statistique entre les deux types de traitement, l'administration combinée des deux produits a induit une diminution accrue de l'ordre de 4 log UFC/mL par rapport à la monothérapie, avec une absence de détection de la bactérie chez 7 des 11 rats soumis à la bithérapie après 6h de traitement.

Il est également possible d'employer des phages non-lytiques et non-réplicants dans une logique de transfection afin de transférer aux bactéries des gènes de susceptibilité aux antibiotiques ou de limiter voir bloquer l'expression de facteurs de résistances. Cette méthode permettrait de rétablir l'efficacité de certaines molécules touchées par l'apparition de lignées résistantes, voir d'induire une sensibilité chez des bactéries ayant une résistance innée (Viertel, Ritter, et Horz 2014).

Cette méthode présente cependant un inconvénient majeur : elle fonctionne uniquement pour des facteurs pour lesquels le gène ou l'allèle de susceptibilité est dominant. En effet, lorsque ces derniers sont récessifs, leur expression peut être limitée voir rendue impossible par l'expression d'un gène ou d'un allèle dominant codant pour des facteurs de résistance aux antibiotiques.

L'utilisation de phages comme vecteurs pharmacologiques dans l'antibiothérapie pourrait présenter plusieurs avantages.

Premièrement, la capacité des phages à se concentrer au niveau du site de présence de la bactérie-cible permettrait de réduire la diffusion de l'agent antibactérien, donc ses effets indésirables pour l'organisme.

Deuxièmement, en délivrant l'agent bactérien directement dans les bactéries, les phages permettrait de contourner le problème des résistances par modification des récepteurs de surfaces et éléments d'intégration cellulaire.

Ces deux premiers aspects participent à un troisième : la réduction des doses administrées. En effet, une concentration de l'agent antibactérien avec une réduction des phénomènes de diffusion dans l'organisme et une action plus efficace du fait de la délivrance en intracellulaire permettrait théoriquement de conserver une même efficacité des agents antibactériens tout en réduisant les quantités employées de façon significative.

2. Théorie et mécanismes : les antibiotiques comme adjuvants dans la phagothérapie

Si les bactériophages peuvent favoriser la diffusion dans les biofilms bactériens des antibiotiques et permettre de faire réémerger une sensibilité à ces agents antibactériens, une autre piste actuellement envisagée est la possibilité d'employer des doses sub-thérapeutiques d'antibiotiques en vue de favoriser l'action des virus au sein d'une population bactérienne.

Une étude, menée *in vitro* sur une souche de la bactérie *E. coli* responsable d'infections urinaires, s'est intéressée à l'influence de l'administration d'antibiotiques sur la croissance d'une population de phages infectant cette bactérie (Comeau et al. 2007). Au cours de cette étude, une souche de *E. coli* obtenu à partir d'un échantillon d'urine d'un patient présentant une infection urinaire causée par ce germe, échantillon contenant également des phages infectant cette bactérie, a été exposé à plusieurs antibiotiques.

L'emploi de dose subinhibitrices d'antibiotiques inhibant la division cellulaire comme les β -lactamines ou bloquant les mécanismes de synthèse de l'ADN comme les quinolones favorise l'infection de bactérie par les phages de par l'induction d'un mécanisme d'élongation de la cellule bactérienne par développement de filaments.

Cette élongation possède deux avantages pour les bactériophages : elle augmente la surface de contact (donc d'entrée) mais également la production de nouveaux virions. Cette accroissement de la production de phages est retrouvée dans des populations de bactéries ayant filamenté par défaut du mécanisme de division cellulaire. Si cet effet est retrouvé dans plusieurs espèces bactériennes, il peut varier en importance d'une bactérie à l'autre, en fonction des spécificités morphologiques et fonctionnelles de celles-ci. Il a notamment été démontré que deux phages de familles différentes infectant deux souches différentes de la bactérie *E. coli* aboutissaient à deux résultats différents en terme de modifications de la production de phage : le premier cas de figure voyait une augmentation de la production de nouvelles particules virales tandis que pour le second virus, la production de particules virales n'était pas augmentée mais la durée du cycle lytique était significativement réduite, aboutissant à une accélération de la dissémination des particules virales [Figure 12].

Ce phénomène d'accroissement de la production de phages par des bactéries en situation de stress cellulaire a été observé à la fois avec des phages tempérés et des phages lytiques et peut atteindre des amplitudes de facteur 7 à 11.

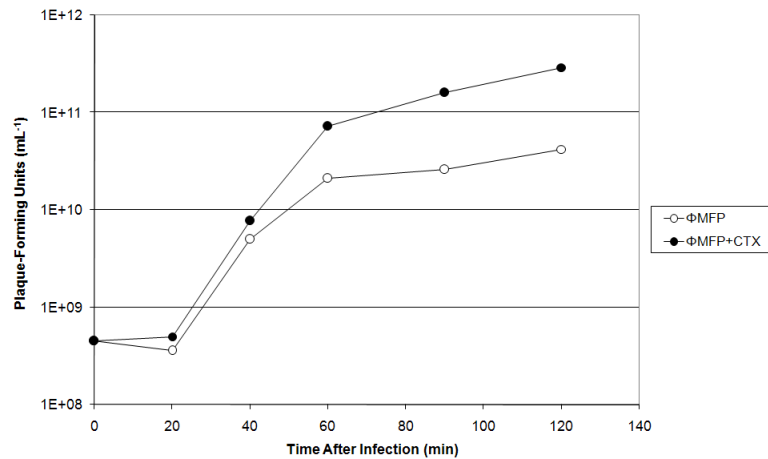


Figure 12: Croissance de la population de bactériophages (Φ MFP) après infection avec et sans adjonction de cefotaxime (CTX) (Comeau et al. 2007)

Néanmoins, il a été noté que le choix de l'antibiotique est déterminant dans le fonctionnement de la synergie phage-antibiotique : les meilleurs résultats furent obtenus avec des antibiotiques bloquant la division cellulaire tandis que les antibiotiques bloquant les ADN gyrases et les ribosomes impactaient également la production de virions de par la dépendance de celle-ci vis-à-vis de ces éléments cellulaires, limitant par conséquent l'utilité de cette association. Ainsi, une étude (Knezevic et al. 2013) menée *in vitro* sur 3 souches de *P. aeruginosa* a étudié l'efficacité comparée de plusieurs associations de 3 souches de phages infectant cette bactérie et de différents antibiotiques (gentamicine, ciprofloxacine, gentamicine et polymyxine B). Les souches de phages retenus étaient différentes les unes des autres, deux d'entre elles appartenant à la famille des *Podoviridae* et la troisième appartenant à la famille des *Siphoviridae*, les deux familles faisant partie de l'ordre des *Caudovirales*. L'effet des différentes associations d'antibiotiques et de phages fut mesuré par leur effet sur la population bactérienne (exprimée en log UFC/mL) dans le temps en comparaison de l'effet des antibiotiques et des phages employés seuls et en utilisant des préparations de bactéries non traitées comme témoins [figure 13]. Les auteurs ont choisi de considérer comme significative toute diminution supérieure à 2 log UFC/mL de la population bactérienne par l'association phage-antibiotique par rapport au niveau de population bactérienne le plus bas obtenu par emploi d'un agent antibactérien seul (phage ou antibiotique).

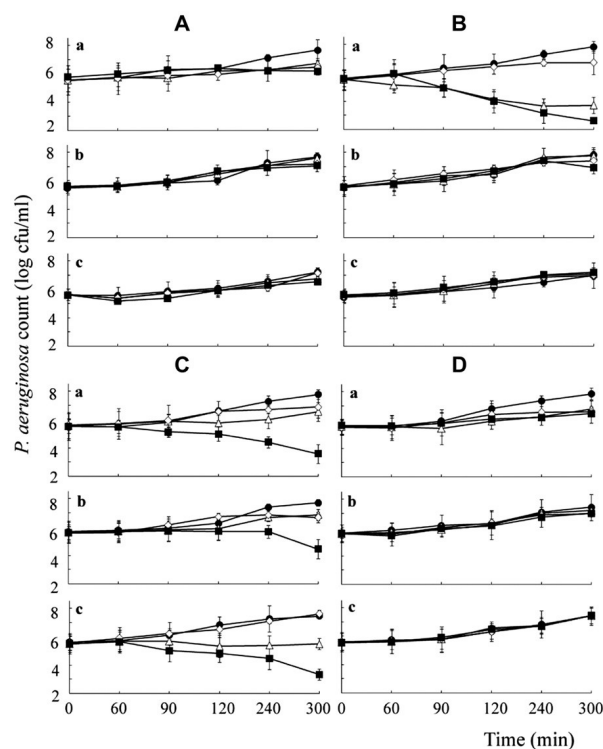


Figure 13: Courbe d'évolution de l'effet bactéricide des phages σ -1 envers la souche ATCC9027 (a), phages envers la souche PA-4U (b) et phages 001A envers la souche PA-M2 (c), en présence de quantité subinhibitrices de gentamicine (A), ciprofloxacine (B), ceftriaxone (C) et polymyxin B (D) ; (●) bactérie sans traitement ; (Δ) antibiotique ; (◇) phage et (■) phage et antibiotique (Knezevic et al. 2013)

Il a été noté à l'issue de cette étude qu'un réel effet synergique n'apparaissait qu'en présence de ceftriaxone et ce pour l'ensemble des phages, les autres antibiotiques testés n'ayant pas montré d'effet significatif en association avec des phages par rapport à un usage d'antibiotique seul [Figure 10]. Les auteurs soulignent par ailleurs le fait que *P. aeruginosa* manifeste une résistance naturelle systématique vis-à-vis de la ceftriaxone [Tableau II], ce qui contribue à l'idée d'une Synergie Phage – Antibiotique (PAS) permettant de potentialiser l'action des agents antibactériens.

Tableau II: Concentration minimale inhibitrice de 3 souches de *P. aeruginosa* (Knezevic et al. 2013)

Souches de <i>P. aeruginosa</i>	CMI (μg/mL)			
	Gentamicine	Ciprofloxacine	Ceftriaxone	Polymyxin B
ATCC 9027	2	1	8	4
PA-M2	2	1	64	4
PA-4U	1	0,06	16	2

Les auteurs précisent également que l'aspect pharmacodynamique des différents antibiotiques est un facteur essentiel dans l'apparition ou non d'un effet synergique lors de l'association avec des phages, notamment pour les antibiotiques agissant par inhibition des mécanismes de synthèse de l'ADN comme les fluoroquinolones ou de la synthèse protéiques comme les aminosides.

Employer conjointement des phages et des antibiotiques pourrait également, par une réduction plus rapide et plus efficace de la population bactérienne pathogène *in vivo*, aider le système immunitaire des patients à contenir l'infection à moindre effort, ce qui aboutirait à une diminution du risque d'infection opportuniste. L'emploi de quantités réduites d'antibiotiques pour un effet comparable voir supérieur permettrait également de limiter l'apparition d'effets indésirables liés à leur utilisation, comme par exemple la toxicité rénale des aminosides.

Conclusion et discussion

Au travers de l'étude de la littérature actuellement disponible, il est possible d'affirmer que la phagothérapie est une forme de traitement des infections bactériennes ayant démontré une efficacité et une sécurité certaine dans bon nombre de cas. Qu'elle soit administrée de façon systémique ou localisée, pour des infections aiguës ou chroniques, pour l'élimination de germes sensibles ou résistants aux antibiotiques classiques, cette thérapie est amenée à voir son utilisation renforcée de par son potentiel et ses multiples avantages. Par ailleurs, les phages sont déjà employés dans le domaine de l'agronomie et de la production alimentaire de par leur capacité à contrôler les populations bactériennes tout en présentant un impact modéré pour l'environnement et la sécurité sanitaires. Des études sont également en cours pour évaluer la possibilité des les appliquer dans un contexte médical comme agents de réduction du risque septique notamment dans les zones stériles, par exemple les blocs opératoires, mais également afin de déterminer la possibilité de synthétiser des produits dérivés comme par exemple des enzymes capables de désorganiser des biofilms bactériens ou de les employer comme agents vaccinaux.

Plus qu'une alternative, la phagothérapie est un complément de l'antibiothérapie : leur capacité de fonctionnement synergique et la possibilité d'une utilisation conjointe permettant de réduire le risque d'émergence de souches bactériennes multirésistantes de même que les doses à administrer et par conséquent de réduire les répercussions de chacun de ces agents pour la santé de patients ainsi que les économies générées en terme de moyens humains et matériels en font indéniablement des outils prometteurs dans un contexte d'apparitions de plus en plus fréquentes d'infections réfractaires aux thérapies usuelles. De plus, les antibiotiques restent des agents thérapeutiques de premier ordre de par la possibilité de les employer comme traitements probabilistes à large spectre dans des conditions difficiles, par exemple dans les régions dépourvues d'infrastructures hospitalières suffisantes, dans un contexte ambulatoire ou en situation d'urgence.

Dans un contexte où l'utilisation des médicaments antibiotiques les plus répandus et efficaces est régulièrement confrontée à l'émergence de souches bactériennes de plus en plus résistantes, les pénuries fréquentes et les options de développement de nouvelles molécules de moins en moins nombreuses, la possibilité de ré-introduire des éléments de susceptibilité au sein des populations de bactéries pathogènes offrirait d'avantage de choix dans les protocoles thérapeutiques et permettrait d'utiliser de nouveau des médicaments devenus inefficaces à grande échelle.

Au-delà de la problématique présentement étudiée, la possibilité d'introduire des gènes de susceptibilité par l'usage d'un vecteur auto-répliquant pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques, de même que la programmation de virus en vue de cibler des profils cellulaires spécifiques afin de limiter le développement de pathologies prolifératives, comme par exemple certaines formes de cancer caractérisées des marqueurs cellulaires spécifiques.

Références bibliographiques

- « Antibiotic Resistance ». s. d. Consulté le 12 janvier 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- Bao, Qing, Xiang Li, Gaorong Han, Ye Zhu, Chuanbin Mao, et Mingying Yang. 2019. « Phage-Based Vaccines ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 145 (mai):40-56. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.013>.
- Barrangou, Rodolphe, Christophe Fremaux, Hélène Deveau, Melissa Richards, Patrick Boyaval, Sylvain Moineau, Dennis A. Romero, et Philippe Horvath. 2007. « CRISPR Provides Acquired Resistance against Viruses in Prokaryotes ». *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819): 1709-12. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- Barros, Joana, Luís D. R. Melo, Patrícia Poeta, Gilberto Igrejas, Maria P. Ferraz, Joana Azeredo, et Fernando J. Monteiro. 2019. « Lytic Bacteriophages against Multidrug-Resistant *Staphylococcus Aureus*, *Enterococcus Faecalis* and *Escherichia Coli* Isolates from Orthopaedic Implant-Associated Infections ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 54 (3): 329-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.06.007>.
- « CDC Global Health - Infographics - Antibiotic Resistance The Global Threat ». s. d. Consulté le 25 août 2019. https://www.cdc.gov/globalhealth/infographics/antibiotic-resistance/antibiotic_resistance_global_threat.htm.
- Chan, Benjamin K., Mark Sïstrom, John E. Wertz, Kaitlyn E. Kortright, Deepak Narayan, et Paul E. Turner. 2016. « Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa* ». *Scientific Reports* 6 (mai). <https://doi.org/10.1038/srep26717>.
- Chan, Benjamin K, Paul E Turner, Samuel Kim, Hamid R Mojibian, John A Eleftheriades, et Deepak Narayan. 2018. « Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa* ». *Evolution, Medicine, and Public Health* 2018 (1): 60-66. <https://doi.org/10.1093/emph/eoy005>.
- Chanishvili, Nina. 2012. « Phage Therapy--History from Twort and d'Herelle through Soviet Experience to Current Approaches ». *Advances in Virus Research* 83:3-40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3>.
- Chaudhry, Waqas Nasir, Jeniffer Concepción-Acevedo, Taehyun Park, Saadia Andleeb, James J. Bull, et Bruce R. Levin. 2017. « Synergy and Order Effects of Antibiotics and Phages in Killing *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms ». *PloS One* 12 (1): e0168615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168615>.
- Chicoine, L. 1966. « [Combinations of antibiotics] ». *L'union Médicale Du Canada* 95 (8): 981-82.
- Comeau, André M., Françoise Tétart, Sabrina N. Trojet, Marie-Françoise Prère, et H.M. Krisch. 2007. « Phage-Antibiotic Synergy (PAS): β -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth ». *PLoS ONE* 2 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>.
- Coulter, Lindsey B., Robert J. C. McLean, Rodney E. Rohde, et Gary M. Aron. 2014. « Effect of Bacteriophage Infection in Combination with Tobramycin on the Emergence of Resistance in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms ». *Viruses* 6 (10): 3778-86. <https://doi.org/10.3390/v6103778>.
- Dublanche, A., et O. Patey. 2011. « La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation) ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 26 (4): 165-75. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2011.06.001>.

- Dufour, Nicolas, et Laurent Debarbieux. 2017. « La phagothérapie - Une arme crédible face à l'antibiorésistance ». *médecine/sciences* 33 (4): 410-16. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173304011>.
- Fedorov, Eugeny, Alexander Samokhin, Yulia Kozlova, Svetlana Kretien, Taalai Sheraliev, Vera Morozova, Nina Tikunova, Alexey Kiselev, et Vitaliy Pavlov. 2023. « Short-Term Outcomes of Phage-Antibiotic Combination Treatment in Adult Patients with Periprosthetic Hip Joint Infection ». *Viruses* 15 (2): 499. <https://doi.org/10.3390/v15020499>.
- García-Cruz, Juan Carlos, Daniel Huelgas-Méndez, Jorge Santiago Jiménez-Zúñiga, Xareni Rebollar-Juárez, Mariel Hernández-Garnica, Ana María Fernández-Presas, Fohad Mabood Husain, et al. 2023. « Myriad Applications of Bacteriophages beyond Phage Therapy ». *PeerJ* 11:e15272. <https://doi.org/10.7717/peerj.15272>.
- Henry, Marine, Rob Lavigne, et Laurent Debarbieux. 2013. « Predicting *in vivo* Efficacy of Therapeutic Bacteriophages Used To Treat Pulmonary Infections ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (12): 5961-68. <https://doi.org/10.1128/AAC.01596-13>.
- Himmelweit, F. 1945. « Combined action of penicillin and bacteriophage on staphylococci ». *The Lancet*, Originally published as Volume 2, Issue 6361, 246 (6361): 104-5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(45\)91422-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(45)91422-X).
- Kaur, Prabhjot, Vijay Singh Gondil, et Sanjay Chhibber. 2019. « A Novel Wound Dressing Consisting of PVA-SA Hybrid Hydrogel Membrane for Topical Delivery of Bacteriophages and Antibiotics ». *International Journal of Pharmaceutics* 572 (décembre):118779. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118779>.
- Knezevic, Petar, Sanja Curcin, Verica Aleksic, Milivoje Petrusic, et Ljiljana Vlaski. 2013. « Phage-Antibiotic Synergism: A Possible Approach to Combatting *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Research in Microbiology* 164 (1): 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.08.008>.
- Krylov, Victor N. 2014. « Chapter Five - Bacteriophages of *Pseudomonas Aeruginosa*: Long-Term Prospects for Use in Phage Therapy ». In *Advances in Virus Research*, édité par Karl Maramorosch et Frederick A. Murphy, 88:227-78. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800098-4.00005-2>.
- Kumaran, Dilini, Mariam Taha, QiLong Yi, Sandra Ramirez-Arcos, Jean-Simon Diallo, Alberto Carli, et Hesham Abdelbary. 2018. « Does Treatment Order Matter? Investigating the Ability of Bacteriophage to Augment Antibiotic Activity against *Staphylococcus Aureus* Biofilms ». *Frontiers in Microbiology* 9:127. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00127>.
- Leontyev, A. E., I. V. Pavlenko, O. V. Kovalishena, N. V. Saperkin, A. A. Tulupov, et V. V. Beschastnov. 2021. « Application of Phagothrapy in the Treatment of Burn Patients (Review) ». *Sovremennye Tekhnologii V Meditsine* 12 (3): 95-103. <https://doi.org/10.17691/stm2020.12.3.12>.
- Mazaheri Nezhad Fard, R., M. D. Barton, et M. W. Heuzenroeder. 2011. « Bacteriophage-Mediated Transduction of Antibiotic Resistance in Enterococci ». *Letters in Applied Microbiology* 52 (6): 559-64. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03043.x>.
- Morris, Jodie, Natasha Kelly, Lisa Elliott, Andrea Grant, Matthew Wilkinson, Kaushik Hazratwala, et Peter McEwen. 2019. « Evaluation of Bacteriophage Anti-Biofilm Activity for Potential Control of Orthopedic Implant-Related Infections Caused by *Staphylococcus Aureus* ». *Surgical Infections* 20 (1): 16-24. <https://doi.org/10.1089/sur.2018.135>.
- Oechslin, Frank, Philippe Piccardi, Stefano Mancini, Jérôme Gabard, Philippe Moreillon, José M. Entenza, Gregory Resch, et Yok-Ai Que. 2017. « Synergistic Interaction Between Phage Therapy and Antibiotics Clears *Pseudomonas Aeruginosa* Infection

- in Endocarditis and Reduces Virulence ». *The Journal of Infectious Diseases* 215 (5): 703-12. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw632>.
- Ojala, Ville, Jarkko Laitalainen, et Matti Jalasvuori. 2013. « Fight evolution with evolution: plasmid-dependent phages with a wide host range prevent the spread of antibiotic resistance ». *Evolutionary Applications* 6 (6): 925-32. <https://doi.org/10.1111/eva.12076>.
- Pantůček, Roman, Alena Rosypalová, Jiří Doškař, Jana Kailerová, Vladislava Růžicková, Pavla Borecká, Šárka Snopková, Radek Horváth, Friedrich Götz, et Stanislav Rosypal. 1998. « The Polyvalent Staphylococcal Phage Φ812: Its Host-Range Mutants and Related Phages ». *Virology* 246 (2): 241-52. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9203>.
- Payne, Robert J. H., et Vincent A. A. Jansen. 2003. « Pharmacokinetic Principles of Bacteriophage Therapy ». *Clinical Pharmacokinetics* 42 (4): 315-25. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342040-00002>.
- Ravat, F., P. Jault, et J. Gabard. 2015. « Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes ». *Annals of Burns and Fire Disasters* 28 (1): 13-20.
- Sarker, Shafiqul Alam, Shawna McCallin, Caroline Barretto, Bernard Berger, Anne-Cécile Pittet, Shamima Sultana, Lutz Krause, et al. 2012. « Oral T4-like Phage Cocktail Application to Healthy Adult Volunteers from Bangladesh ». *Virology*, Special issue: viruses of microbes, 434 (2): 222-32. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.002>.
- Sarker, Shafiqul Alam, Shamima Sultana, Gloria Reuteler, Deborah Moine, Patrick Descombes, Florence Charton, Gilles Bourdin, et al. 2016. « Oral Phage Therapy of Acute Bacterial Diarrhea With Two Coliphage Preparations: A Randomized Trial in Children From Bangladesh ». *EBioMedicine* 4 (février): 124-37. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.023>.
- Schuch, Raymond, Daniel Nelson, et Vincent A. Fischetti. 2002. « A Bacteriolytic Agent That Detects and Kills *Bacillus Anthracis*. » *Nature* 418 (6900): 884-89. <https://doi.org/10.1038/nature01026>.
- « Silk Route to the Acceptance and Re-Implementation of Bacteriophage Therapy ». 2016. *Biotechnology Journal* 11 (5): 595-600. <https://doi.org/10.1002/biot.201600023>.
- Skurnik, Mikael, et Eckhard Strauch. 2006. « Phage Therapy: Facts and Fiction ». *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* 296 (1): 5-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.09.002>.
- « Stratégie d'antibiothérapie et prévention des résistances bactériennes en établissement de santé ». s. d. Haute Autorité de Santé. Consulté le 12 janvier 2020. https://www.has-sante.fr/jcms/c_665169/fr/strategie-d-antibiotherapie-et-prevention-des-resistances-bacteriennes-en-etablissement-de-sante.
- « Ten threats to global health in 2019 ». s. d. Consulté le 25 août 2019. <https://www.who.int/emergencies/ten-threats-to-global-health-in-2019>.
- Torres-Barceló, Clara. 2018a. « Phage Therapy Faces Evolutionary Challenges ». *Viruses* 10 (6). <https://doi.org/10.3390/v10060323>.
- Torres-Barceló, Clara. 2018b. « The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria ». *Emerging Microbes & Infections* 7 (octobre). <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0169-z>.
- Verbeken, Gilbert, Daniel De Vos, Mario Vaneechoutte, Maya Merabishvili, Martin Zizi, et Jean-Paul Pirnay. 2007. « European Regulatory Conundrum of Phage Therapy ». *Future Microbiology* 2 (5): 485-91. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.5.485>.
- Viertel, Tania Mareike, Klaus Ritter, et Hans-Peter Horz. 2014. « Viruses versus Bacteria- Novel Approaches to Phage Therapy as a Tool against Multidrug-Resistant

- Pathogens ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (9): 2326-36. <https://doi.org/10.1093/jac/dku173>.
- Wills, Quintin F., Claire Kerrigan, et James S. Soothill. 2005. « Experimental Bacteriophage Protection against *Staphylococcus aureus* Abscesses in a Rabbit Model ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (3): 1220-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.3.1220-1221.2005>.
- Wittebole, Xavier, Sophie De Roock, et Steven M Opal. 2014. « A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens ». *Virulence* 5 (1): 226-35. <https://doi.org/10.4161/viru.25991>.
- Wright, A., C. H. Hawkins, E. E. Anggård, et D. R. Harper. 2009. « A Controlled Clinical Trial of a Therapeutic Bacteriophage Preparation in Chronic Otitis Due to Antibiotic-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*; a Preliminary Report of Efficacy ». *Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK ; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery* 34 (4): 349-57. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>.
- Żaczek, Maciej, Marzanna Łusiak-Szelachowska, Ewa Jończyk-Matysiak, Beata Weber-Dąbrowska, Ryszard Międzybrodzki, Barbara Owczarek, Agnieszka Kopciuch, Wojciech Fortuna, Paweł Rogóż, et Andrzej Górski. 2016. « Antibody Production in Response to Staphylococcal MS-1 Phage Cocktail in Patients Undergoing Phage Therapy ». *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01681>.

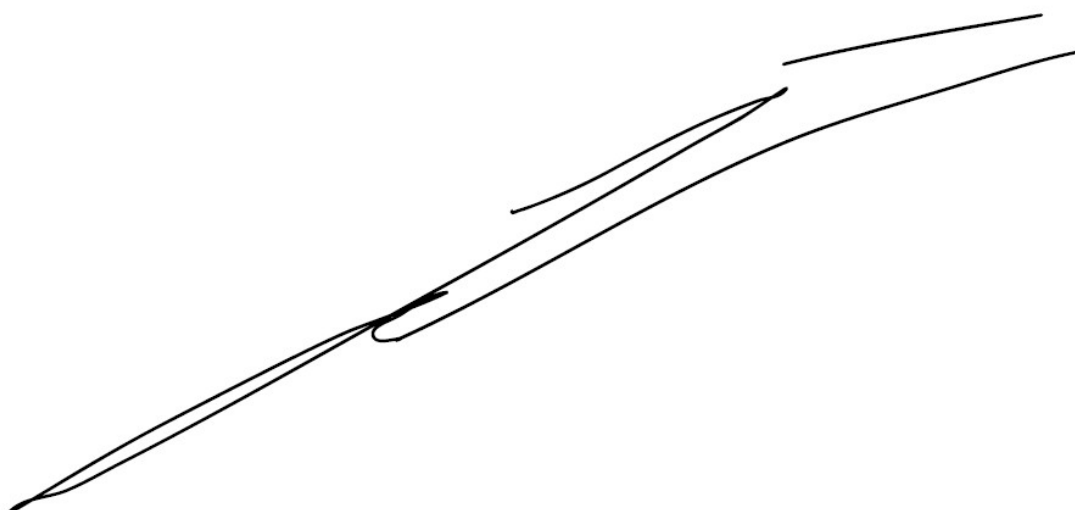
ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Hartwig Weilhart

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21100297t

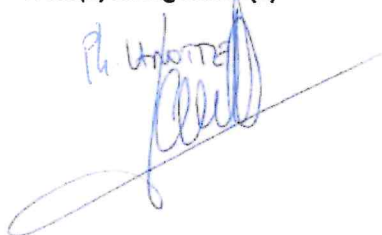
N° Thèse : 64

Nom et Prénom : WEILHART Hartwig

Sujet : Utilisation et efficacité des bactériophages dans la prise en charge des infections
résistantes aux antibiotiques

Tours, le : 27/09/2024

Le(s) Directeur(s) de Thèse :
Nom(s) et signature(s)



**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



TITRE DE LA THÈSE

Utilisation et efficacité des bactériophages dans la prise en charge des infections résistantes aux antibiotiques

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Dans un contexte actuel d'augmentation de l'incidence d'infections à bactéries multirésistantes et d'épuisement progressif des stratégies thérapeutiques malgré la mise en place de plans d'action en terme de prévention et d'usage raisonné des dites stratégies, de nouvelles approches doivent être envisagées.

Connus et étudiés depuis plus d'un siècle, les bactériophages, virus infectant les bactéries, sont d'ors et déjà utilisés pour le traitement d'infections sévères comme des infections consécutives à la pose de prothèses orthopédiques, les infections chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose ou encore les infections affectant les grands brûlés. À cette fin, ils présentent plusieurs caractéristiques intéressantes en terme de disponibilité, de sécurité, d'adaptabilité ainsi qu'un potentiel de développement d'outils dérivés ayant des propriétés aussi bien préventives que curatives.

Au delà de la question de leur utilité, celle de leur place dans les stratégies de lutte contre les bactéries multirésistantes et les infections dont elles sont responsables est aujourd'hui importante. L'emploi des bactériophages ne faisant pas exemption aux problématiques régulièrement rencontrées dans le développement de nouvelles approches médicales, telles que l'apparition de résistances, un manque de recul sur les conséquences à court et/ou long terme sur la santé des individus traités ou encore la difficulté d'une application pratique à grande échelle, il semble nécessaire d'étudier ce type de thérapie à la fois comme remplaçant potentiel des agents antibiotiques actuels mais aussi comme élément complémentaire à ces derniers, non seulement dans le cadre d'un usage individuel et immédiat mais aussi dans un contexte plus large et à plus long terme d'action de santé publique.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Bactériophages, antibiorésistance, infections bactériennes

JURY

PRÉSIDENT : Monsieur le Professeur Denys Brand, Professeur des Universités, Faculté de Pharmacie, Tours
MEMBRES :

Madame le Docteur Adeline Pastuszka, Praticien Hospitalier, CHU de Tours

Madame le Docteur Marie-Anne Cassier, Pharmacienne d'Officine, Gabarret

Monsieur le Professeur Philippe Lanotte, Professeur des Université – Praticien Hospitalier, Faculté de Pharmacie et CHU de Tours

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE

Le 26 Septembre 2024

Salle des Actes de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Tours