

Année 2014

**LA PHAGOTHÉRAPIE : HISTORIQUE ET  
POTENTIELLE UTILISATION CONTRE LES  
INFECTIONS À BACTÉRIES  
MULTIRÉSISTANTES**

THÈSE

Pour le

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

Présentée et soutenue publiquement devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE CRÉTEIL

Le 30 janvier 2014

par

**Magali, Christiane, Elisabeth BERGER SAVIN**

Née le 30 octobre 1987 à Marseille 6<sup>ème</sup> (Bouches-du-Rhône)

JURY

**Président : Pr.**

**Professeur à la Faculté de Médecine de CRÉTEIL**

**Membres**

**Directeur : M. Marc ELOIT**

**Professeur à l'ENVA**

**Assesseur : M. Pascal ARNÉ**

**Maître de conférences à l'ENVA**



**LISTE DES MEMBRES DU CORPS ENSEIGNANT**

Directeur : M. le Professeur GOGNY Marc

Directeurs honoraires : MM. les Professeurs : COTARD Jean-Pierre, MORAILLON Robert, PARODI André-Laurent, PILET Charles, TOMA Bernard  
Professeurs honoraires : Mme et MM. : BENET Jean-Jacques, BRUGERE Henri, BRUGERE-PICOUX Jeanne, BUSSIERAS Jean, CERF Olivier, CLERC Bernard, CRESPEAU François, DEPUTTE Bertrand, MOUTHON Gilbert, MILHAUD Guy, POUCHELON Jean-Louis, ROZIER Jacques**DEPARTEMENT D'ELEVAGE ET DE PATHOLOGIE DES EQUIDES ET DES CARNIVORES (DEPEC)****Chef du département : M. POLACK Bruno, Maître de conférences - Adjoint : M. BLOT Stéphane, Professeur****UNITE DE CARDIOLOGIE**

- Mme CHETBOUL Valérie, Professeur \*
- Mme Gkouni Vassiliki, Praticien hospitalier

**UNITE DE CLINIQUE EQUINE**

- M. AUDIGIE Fabrice, Professeur
- M. DENOIX Jean-Marie, Professeur
- Mme DUMAS Isabelle, Maître de conférences contractuel
- Mme GIRAUDET Aude, Praticien hospitalier \*
- M. LECHARTIER Antoine, Maître de conférences contractuel
- Mme MESPOULHES-RIVIERE Céline, Praticien hospitalier
- Mme TRACHSEL Dagmar, Maître de conférences contractuel

**UNITE D'IMAGERIE MEDICALE**

- Mme BEDU-LEPERLIER Anne-Sophie, Maître de conférences contractuel
- Mme STAMBOULI Fouzia, Praticien hospitalier

**UNITE DE MEDECINE**

- Mme BENCHEKROUN Ghita, Maître de conférences contractuel
- M. BLOT Stéphane, Professeur\*
- Mme MAUREY-GUENEC Christelle, Maître de conférences

**UNITE DE MEDECINE DE L'ELEVAGE ET DU SPORT**

- Mme CLERO Delphine, Maître de conférences contractuel
- M. GRANDJEAN Dominique, Professeur \*
- Mme YAGUIYAN-COLLIARD Laurence, Maître de conférences contractuel

**DISCIPLINE : NUTRITION-ALIMENTATION**

- M. PARAGON Bernard, Professeur

**DISCIPLINE : OPHTALMOLOGIE**

- Mme CHAHORY Sabine, Maître de conférences

**UNITE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES**

- M. BENSIGNOR Emmanuel, Professeur contractuel
- M. BLAGA Radu Gheorghe, Maître de conférences (rattaché au DPASP)
- M. CHERMETTE René, Professeur \*
- M. GUILLOT Jacques, Professeur
- Mme MARIIGNAC Geneviève, Maître de conférences
- M. POLACK Bruno, Maître de conférences

**UNITE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE**

- M. FAYOLLE Pascal, Professeur
- M. MAILHAC Jean-Marie, Maître de conférences
- M. MOISSONNIER Pierre, Professeur\*
- M. NIEBAUER Gert, Professeur contractuel
- Mme RAVARY-PLUMIOEN Bérangère, Maître de conférences (rattachée au DPASP)
- Mme VIATEAU-DUVAL Véronique, Professeur
- M. ZILBERSTEIN Luca, Maître de conférences

**DISCIPLINE : URGENCE SOINS INTENSIFS**

- Vacant

**DEPARTEMENT DES PRODUCTIONS ANIMALES ET DE LA SANTE PUBLIQUE (DPASP)****Chef du département : M. MILLEMANN Yves, Professeur - Adjoint : Mme DUFOUR Barbara, Professeur****UNITE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE**

- M. AUGUSTIN Jean-Christophe, Maître de conférences
- M. BOLNOT François, Maître de conférences \*
- M. CARLIER Vincent, Professeur
- Mme COLMIN Catherine, Maître de conférences

**UNITE DES MALADIES CONTAGIEUSES**

- Mme DUFOUR Barbara, Professeur\*
- Mme HADDAD/HOANG-XUAN Nadia, Professeur
- Mme PRAUD Anne, Maître de conférences
- Mme RIVIERE Julie, Maître de conférences contractuel

**UNITE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR**

- M. ADJOU Karim, Maître de conférences \*
- M. BELBIS Guillaume, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel
- M. HESKIA Bernard, Professeur contractuel
- M. MILLEMANN Yves, Professeur

**UNITE DE REPRODUCTION ANIMALE**

- Mme CONSTANT Fabienne, Maître de conférences
- M. DESBOIS Christophe, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)
- M. FONTBONNE Alain, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)
- Mme MASSE-MOREL Gaëlle, Maître de conférences contractuel
- M. MAUFFRE Vincent, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel
- M. NUDELMANN Nicolas, Maître de conférences (rattaché au DEPEC)
- M. REMY Dominique, Maître de conférences\*

**UNITE DE ZOOTECHNIE, ECONOMIE RURALE**

- M. ARNE Pascal, Maître de conférences\*
- M. BOSSE Philippe, Professeur
- M. COURREAU Jean-François, Professeur
- Mme GRIMARD-BALLIF Bénédicte, Professeur
- Mme LEROY-BARASSIN Isabelle, Maître de conférences
- M. PONTER Andrew, Professeur

**DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET PHARMACEUTIQUES (DSBP)****Chef du département : Mme COMBRISSON Hélène, Professeur - Adjoint : Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences****UNITE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES**

- M. CHATEAU Henry, Maître de conférences\*
- Mme CREVIER-DENOIX Nathalie, Professeur
- M. DEGUEURCE Christophe, Professeur
- Mme ROBERT Céline, Maître de conférences

**DISCIPLINE : ANGLAIS**

- Mme CONAN Muriel, Professeur certifié

**UNITE DE BIOCHIMIE**

- M. BELLIER Sylvain, Maître de conférences\*
- M. MICHAUX Jean-Michel, Maître de conférences

**DISCIPLINE : BIOSTATISTIQUES**

- M. DESQUILBET Loïc, Maître de conférences

**DISCIPLINE : EDUCATION PHYSIQUE ET SPORTIVE**

- M. PHILIPS Pascal, Professeur certifié

**DISCIPLINE : ETHOLOGIE**

- Mme GILBERT Caroline, Maître de conférences

**UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET MOLECULAIRE**

- Mme ABITBOL Marie, Maître de conférences
- M. PANTHIER Jean-Jacques, Professeur\*

**UNITE D'HISTOLOGIE, ANATOMIE PATHOLOGIQUE**

- Mme CORDONNIER-LEFORT Nathalie, Maître de conférences\*
- M. FONTAINE Jean-Jacques, Professeur
- Mme LALOY Eve, Maître de conférences contractuel
- M. REYES GOMEZ Edouard, Assistant d'enseignement et de recherche contractuel

**UNITE DE PATHOLOGIE GENERALE MICROBIOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

- M. BOULOUIS Henri-Jean, Professeur
- Mme LE ROUX Delphine, Maître de conférences
- Mme QUINTIN-COLONNA Françoise, Professeur\*

**UNITE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE**

- Mme ENRIQUEZ Brigitte, Professeur
- M. PERROT Sébastien, Maître de conférences
- M. TISSIER Renaud, Maître de conférences\*

**UNITE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE**

- Mme COMBRISSON Hélène, Professeur
- Mme PILOT-STORCK Fanny, Maître de conférences
- M. TIRET Laurent, Maître de conférences\*

**UNITE DE VIROLOGIE**

- M. ELOIT Marc, Professeur
- Mme LE PODER Sophie, Maître de conférences \*

\* responsable d'unité



# REMERCIEMENTS

---

**Au Professeur de la Faculté de Médecine de Créteil,**

Pour l'honneur que vous m'avez fait d'accepter la présidence de mon jury de thèse.  
Hommage respectueux.

**A Monsieur Marc Eloit**

**Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,**

Pour l'honneur que vous m'avez fait de diriger cette thèse, pour votre grande disponibilité, vos conseils avisés et vos corrections pertinentes dans cette tâche. Vous avez su m'orienter et m'avez permis d'améliorer ce travail avec intérêt, et ce malgré un timing serré.

Sincères remerciements.

**A Monsieur Pascal Arné**

**Maître de conférences à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort,**

Pour l'honneur que vous m'avez fait d'accepter de participer à mon jury de thèse, pour votre relecture vraiment très minutieuse et rapide, et pour les trois années passées à travailler avec vous au CEDAF.

Sincères remerciements.

**A Monsieur Laurent Debarbieux**

**Chercheur à l'Institut Pasteur travaillant sur la phagothérapie,**

Pour votre disponibilité, pour vos réponses à mes questions et pour toutes les informations que vous m'avez transmises. Votre aide a été précieuse.

Sincères remerciements.

**A ma famille, Berger et Savin,**

En particulier à ma mère, mon père et ma sœur, qui m'ont toujours soutenue quoi que je décide, qui n'ont jamais douté de moi, qui m'ont supportée pendant toute l'écriture de cette thèse et sans qui ces longues études qui s'achèvent aujourd'hui n'auraient pu aboutir.

Chaleureuse tendresse.

### **A Raphaël,**

L'homme de ma vie. Mon mari qui m'a supportée tout le temps de l'écriture de cette thèse. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien et pour tout l'amour que tu m'apportes chaque jour. Tu as su te montrer attentif et affectueux en toutes circonstances, malgré mes heures passées sur l'ordinateur.

Sincère amour.

### **A mon groupe de clinique**

Sans le Groupe 7, la vie à l'ENVA aurait été beaucoup moins heureuse. J'ai passé cinq années merveilleuses grâce à vous, et vous me manquez beaucoup maintenant que nous ne nous voyons plus chaque jour.

Chaleureux remerciements.

### **A mes amis de toujours,**

Qu'ils soient des amis d'enfance, des amis d'études, des amis de GN, des amis par valeur ajoutée, des amis d'Alfort ou des amis du Couloir du 6 ...j'ai eu le bonheur de vous revoir presque tous entre deux paragraphes de thèse, à l'occasion de mon mariage. Rien n'a changé et c'est ce qui est merveilleux.

Chaleureux remerciements.

### **A ma famille alforienne**

A ma famille ascendante, celle qui m'a accueillie alors que je n'étais qu'une toute petite poulotte qui venait d'éclorre et qui m'a appris tout ce qu'il fallait savoir sur l'ENVA, et à ma famille descendante, celle que j'ai construite avec mon poulot et dont je ne pouvais pas rêver mieux tant il me ressemble...

Chaleureux remerciements.

### **Aux dames de la scolarité**

Qui font un travail remarquable et qui sont toujours à notre écoute.

Sincères remerciements.

### **A Monsieur Félix d'Hérelle,**

Sans qui cette thèse n'aurait peut-être jamais existé.

Merci.

# TABLE DES MATIÈRES

---

TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	- 7 -
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	- 8 -
INTRODUCTION.....	- 11 -
PREMIÈRE PARTIE : HISTOIRE DE LA DÉCOUVERTE ET DE L'ÉTUDE DE LA PHAGOTHÉRAPIE.....	- 13 -
1 La découverte des bactériophages.....	- 15 -
1.1 Les prémices .....	- 15 -
1.2 Les travaux de Félix d'Hérelle .....	- 17 -
2 L'âge d'or de la phagothérapie .....	- 21 -
2.1 Conflits initiaux sur la nature des phages.....	- 21 -
2.2 Premières utilisations thérapeutiques .....	- 21 -
2.2.1 Initiation de la phagothérapie sur des animaux .....	- 21 -
2.2.2 Premières applications à la médecine humaine .....	- 22 -
2.3 Caractérisation des bactériophages.....	- 23 -
2.4 Production de suspensions phagiques.....	- 23 -
3 Le déclin.....	- 27 -
3.1 Révision complète de la phagothérapie .....	- 27 -
3.2 Développement des antibiotiques .....	- 29 -
3.3 Seconde Guerre Mondiale .....	- 30 -
3.4 L'après-guerre .....	- 32 -
3.4.1 À l'Est.....	- 32 -
3.4.2 À l'Ouest.....	- 33 -
4 La redécouverte.....	- 35 -
4.1 L'antibiothérapie, grandeur et décadence.....	- 35 -
4.1.1 L'apogée des antibiotiques .....	- 35 -

4.1.2	Découverte et prise de conscience des antibiorésistances .....	- 35 -
4.2	Renaissance de la phagothérapie en Occident .....	- 38 -
<b>DEUXIÈME PARTIE : DESCRIPTION DES BACTÉRIOPHAGES ET DE LA</b>		
<b>PHAGOTHÉRAPIE.....</b>		<b>- 43 -</b>
1	Qu'est-ce qu'un bactériophage .....	- 45 -
1.1	Présentation .....	- 45 -
1.2	Structure et classification.....	- 45 -
1.2.1	Différentes familles.....	- 45 -
1.2.2	Description générale .....	- 47 -
1.3	Habitat .....	- 48 -
1.4	Résistance dans l'environnement .....	- 49 -
2	Plusieurs types d'invasion de la cellule bactérienne.....	- 51 -
2.1	Principe du cycle chronique (phages filamenteux).....	- 52 -
2.2	Principe du cycle lysogénique (phages tempérés) .....	- 52 -
2.3	Principe et étapes du cycle lytique (phages virulents).....	- 53 -
2.3.1	Arrimage .....	- 55 -
2.3.2	Entrée du génome viral et réplication .....	- 56 -
2.3.3	Libération des nouveaux phages.....	- 56 -
3	La phagothérapie.....	- 57 -
3.1	Principe.....	- 57 -
3.2	Pharmacologie .....	- 58 -
3.2.1	Pharmacocinétique.....	- 58 -
3.2.2	Pharmacodynamique.....	- 61 -
3.3	Préparation des phages pour une utilisation thérapeutique .....	- 70 -
3.3.1	Obtention de suspensions contenant des phages.....	- 70 -
3.3.2	Propagation des phages.....	- 70 -
3.3.3	Purification des phages .....	- 71 -
3.3.4	Numération des clones.....	- 72 -

3.3.5	Contrôle .....	- 72 -
3.4	Phagogramme .....	- 72 -
3.5	Phagothèque.....	- 73 -
3.6	Cocktails .....	- 73 -
TROISIÈME PARTIE : LA PHAGOTHÉRAPIE AUJOURD’HUI.....		- 77 -
1	Méthode d’analyse employée .....	- 79 -
2	Forces.....	- 80 -
2.1	Avantage sur les antibiotiques .....	- 80 -
2.1.1	Un pouvoir bactéricide même sur les bactéries antibiorésistantes .....	- 80 -
2.1.2	Une croissance rapide et exponentielle des phages .....	- 81 -
2.1.3	Destruction des biofilms bactériens .....	- 81 -
2.2	Peu d’effets secondaires .....	- 84 -
2.2.1	Effets secondaires rares et de faible intensité .....	- 84 -
2.2.2	Explication de la faiblesse et de la rareté des effets secondaires.....	- 84 -
2.3	Autres bénéfiques thérapeutiques .....	- 87 -
2.3.1	Pas de multiplication phagique en l’absence de bactéries cibles.....	- 87 -
2.3.2	Pas de sélection de résistances.....	- 88 -
2.3.3	Possible transfert de phages entre patients .....	- 89 -
2.4	Accessibilité.....	- 89 -
3	Faiblesses .....	- 90 -
3.1	Tous les phages ne sont pas aptes à être utilisés en phagothérapie .....	- 90 -
3.2	Phago-résistances.....	- 91 -
3.2.1	Mécanismes .....	- 91 -
3.2.2	Des conséquences cependant limitées .....	- 95 -
3.3	Handicap pharmacologique .....	- 99 -
3.3.1	Nécessité de cibler le traitement .....	- 99 -
3.3.2	Problème d’inactivation par le système immunitaire .....	- 100 -

3.3.3	Un seuil bactérien nécessaire à atteindre .....	- 101 -
3.3.4	Problème de translocation.....	- 102 -
3.3.5	Inefficacité face aux bactéries intracellulaires .....	- 102 -
4	Indications.....	- 104 -
4.1	Passé, présent et avenir.....	- 104 -
4.1.1	Un recul historique important.....	- 104 -
4.1.2	Une actualité riche .....	- 105 -
4.1.3	Une recherche en marche.....	- 112 -
4.2	Traitement anti-infectieux .....	- 119 -
4.2.1	Traitement des infections antibiorésistantes .....	- 119 -
4.2.2	Traitement des infections à biofilm .....	- 121 -
4.2.3	Multiplicités des voies d'administration et des formes galéniques ...	- 122 -
4.3	Autres utilisations potentielles.....	- 123 -
4.3.1	Utilisation en prophylaxie.....	- 123 -
4.3.2	Utilisation en agro-alimentaire .....	- 123 -
4.3.3	Utilisation comme probiotiques.....	- 126 -
4.3.4	Désinfection des surfaces inertes.....	- 128 -
4.4	Rentabilité.....	- 128 -
5	Limites .....	- 130 -
5.1	Une redécouverte compliquée .....	- 130 -
5.1.1	Mauvaise image du passé .....	- 130 -
5.1.2	Victime des confrontations idéologiques du passé.....	- 132 -
5.1.3	Peu d'informations dans l'enseignement médical .....	- 133 -
5.2	Absence de réglementation adaptée .....	- 133 -
5.2.1	Des particules non considérées par le règlement pharmaceutique ....	- 133 -
5.2.2	Un accès difficile aux soins .....	- 137 -
5.2.3	Règlementation en agro-alimentaire.....	- 137 -

5.3 Désintéret des laboratoires et des gouvernements politiques .....	- 139 -
5.3.1 Absence actuelle d'un modèle économique viable.....	- 139 -
5.3.2 Peu de démarches gouvernementales appuyant la recherche .....	- 140 -
CONCLUSION .....	- 143 -
BIBLIOGRAPHIE .....	- 145 -
ANNEXES .....	- 157 -



# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1 : Portrait de Frederick Twort .....	- 16 -
Figure 2 : Portrait de Felix d'Hérelle .....	- 17 -
Figure 3 : D'Hérelle entouré de son assistante et de Georgiy Eliava .....	- 24 -
Figure 4 : Cocktail "Bacté-intesti-phage" .....	- 25 -
Figure 5 : Ancienne publicité pour la préparation Enterofagos .....	- 26 -
Figure 6 : Première visualisation de phages par Edmund Ruska .....	- 29 -
Figure 7 : En 1929, Sir Alexander Flemming découvre la pénicilline.....	- 30 -
Figure 8 : Extrait d'un livre pharmaceutique de référence allemand.....	- 31 -
Figure 9 : Médecin administrant de la pénicilline à un soldat .....	- 32 -
Figure 10 : Ancienne publicité pour la pénicilline .....	- 32 -
Figure 11 : Incidence de trois infections antibiorésistantes .....	- 37 -
Figure 12 : Publicité "Les antibiotiques, c'est pas automatique" .....	- 38 -
Figure 13 : Pourcentage de publications contenant le terme "phage therapy" .....	- 41 -
Figure 14 : Les principales familles de bactériophages .....	- 46 -
Figure 15 : Structure des principales familles de phages .....	- 48 -
Figure 16 : Schéma d'un cycle lysogénique .....	- 53 -
Figure 17 : Schéma d'un phage T4 .....	- 54 -
Figure 18 : Schéma du cycle lytique .....	- 55 -
Figure 19 : Exemple de cocktails de phages .....	- 75 -
Figure 20 : Principe illustré de l'analyse SWOT .....	- 79 -
Figure 21 : Schéma du modèle de formation d'un biofilm.....	- 82 -
Figure 22 : Schéma représentant la traversée d'un biofilm par un bactériophage.....	- 83 -
Figure 23 : Mécanisme d'extension de la population bactérienne antibiorésistante .....	- 88 -
Figure 24 : Schéma représentant le système CRISPR/Cas .....	- 95 -
Figure 25 : Les différentes étapes des essais cliniques .....	- 109 -
Figure 26 : Carte mondiale des études cliniques de phagothérapie .....	- 111 -
Figure 27 : Évolution des publications sur Pubmed.....	- 112 -
Figure 28 : Résultats des antibiogrammes observés par l'équipe de Comeau.....	- 117 -
Figure 29 : Nouveaux antibiotiques approuvés aux États-Unis d'Amérique entre 1980 et 2012 .....	- 120 -

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

- ACdeBMR : Alliance contre le développement des bactéries
- AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ADVIN : Association des Victimes d'Infections Nosocomiales
- AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
- ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé
- ARN : Acide ribonucléique
- ARNm : ARN messenger
- CAS : Centre d'Analyse Stratégique
- CDC : Centers for Disease Control and Prevention (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies)
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- CHUPS : Centre Hospitalier Universitaire Pitié-Salpêtrière
- CHPM : Committee for Medicinal Products for Human Use (Comité des médicaments à usage humain)
- CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (groupe de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées)
- DG Sanco : Direction Générale de la Santé et des Consommateurs
- DGA : Direction Générale de l'Armement
- DTRA : Defense Threat Reduction Agency (Agence de la défense pour la réduction des menaces)
- ECDC : European Center for Disease Prevention and Control (Centre européen de prévention et de contrôle des maladies)
- EFSA : European Food Safety Authority (Autorités européennes de sécurité des aliments)
- EMA : European Medicines Agency (Agence européenne des médicaments)
- FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)
- FDA : Food and Drug Administration (Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux)
- FQRP : *Pseudomonas aeruginosa* résistante aux fluoroquinolones
- GRAS : Generally recognized as safe (généralement reconnu comme étant sans danger)

ICTV : International Committee on Taxonomy of Virus (Comité international de taxonomie des virus)

IDSA : Infectious Diseases Society of America (Société américaine des maladies infectieuses)

IL : Interleukine

LAL : Lysat d'Amœbocyte de Limule

LPS : Lipopolysaccharide

LTF : Long tail fibers (Fibres longues de la queue)

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

NCBI : National Center for Biotechnology Information (Centre national américain d'information en biotechnologie)

NK : Natural killers (tueurs naturels)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P.H.A.G.E. : Phages for Human Application Group Europe (Groupe européen d'application de phages en médecine humaine)

PAS : Phage-Antibiotic Synergy (synergie phage-antibiotique)

PDG : Président directeur général

PFU : Plages Formant Unité

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

SDF : Side tail fibers (crochets de la queue)

SWOT : Strengths – Weaknesses – Opportunities – Threats (Forces – Faiblesses – Opportunités – Menaces)

TA : Toxine-antitoxine

TNF : Tumor necrosis factor (facteur de nécrose tumorale)

VRE : *Enterococci* résistants à la vancomycine

WHO : World Health Organization (Organisation Mondiale de la Santé)

YOPI : Young – Old – Pregnant – Immunodepressed (Jeunes – Personnes Agées – Femmes enceintes – Personnes immunodéprimées)



# INTRODUCTION

---

Face à l'augmentation des infections impliquant des bactéries multirésistantes, le besoin de nouveaux traitements antibactériens efficaces est de plus en plus impérieux. Parmi les différents traitements envisagés pour éviter la menace d'une « ère post-antibiotiques », la phagothérapie apparaît comme un candidat particulièrement intéressant.

Thérapie découverte au début du XX<sup>ème</sup> siècle puis oubliée, en Occident, cette méthode met en pratique l'administration de virus nommés « bactériophages ». Également appelés plus simplement phages, ces virus sont les prédateurs naturels des bactéries, et co-évoluent avec ces dernières. En présence d'une colonie bactérienne, ils vont pouvoir pénétrer au sein des bactéries, y fabriquer de nouveaux virions à leur image, puis faire éclater cette bactérie pour libérer leur descendance.

Le principal objectif de cette étude est de découvrir cette phagothérapie et de comprendre sa place dans l'enjeu actuel de lutte contre les infections multi-résistantes aux traitements antibactériens.

Cette thèse s'organise en trois parties. Dans un premier temps, j'explorerai l'histoire riche en rebondissements de la phagothérapie, de sa découverte au début des années 1900 à sa disparition dans les pays occidentaux, puis à sa redécouverte dans les années 1980. Je traverserai ses périodes d'essor tout comme ses périodes de déclin, à travers les multiples espoirs, les différentes controverses et les réussites ou échecs thérapeutiques qu'elle a pu connaître.

Je présenterai et développerai ensuite les bactériophages, ces « virus mangeurs de bactéries » qui permettent de mettre en pratique cette thérapie particulière. Nous discernons les différents phages existants de manière à étudier par la suite uniquement ceux utiles à la phagothérapie, développerons leur mode de vie et d'action ainsi que la façon de les préparer et de les mettre en pratique dans le domaine de la médecine.

Enfin, j'analyserai la place de la phagothérapie face à l'actualité des infections à germes multirésistants. Pour ce faire, j'évaluerai les différents avantages et inconvénients de

cette thérapie en discernant les considérations propres aux bactériophages de celles leur étant extérieures. J'examinerai ainsi la potentialité de la réhabilitation de cette approche en milieu médical à la lumière de cette analyse et déterminerai les écueils à éviter et les points encore obscurs à explorer.

---

PREMIÈRE PARTIE : HISTOIRE DE LA  
DÉCOUVERTE ET DE L'ÉTUDE DE LA  
PHAGOTHÉRAPIE

---



# 1 La découverte des bactériophages

## 1.1 Les prémices

Le moment précis de la découverte même des bactériophages a souvent été sujet à débats et à controverses. Il est globalement admis que la première mise en évidence de l'existence des bactériophages daterait de 1896 : nous la devons aux travaux d'Ernest Hanbury Hankin sur le choléra en Inde. Le bactériologiste anglais indiqua dans son ouvrage « L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du choléra », qu'il existait au sein des eaux du Gange et de la Jumna, rivières de l'Inde, un élément inconnu capable d'activité bactéricide contre *Vibrio cholerae* (Hankin, 1896). Cette substance apparut comme labile à la chaleur et capable de passer à travers un filtre de porcelaine fine de Chamberland, lequel retient les bactéries mais est perméable aux virus et aux toxines (Chamberland, 1884). Deux ans après cette découverte, ce fut au tour du bactériologiste russe Gamaleya de remarquer ce phénomène lors de ses recherches sur *Bacillus subtilis* (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

En 1915, Frederick Twort (figure 1), chercheur bactériologiste anglais, rapporta lui aussi le même phénomène. Il émit de nombreuses hypothèses sur la nature de la substance antibactérienne impliquée et proposa entre autres qu'il pourrait s'agir d'un virus (Twort, 1936). Cependant, pour des raisons principalement financières, Twort ne put approfondir ses recherches sur le sujet (Abedon *et al.*, 2011 ; Bernhardt *et al.*, 2002 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Figure 1 : Portrait de Frederick Twort



D'après (Chanishvili, 2011). Dès 1915, Twort relata l'observation d'un phénomène de lyse au milieu de colonies de microcoques provoqué par un agent bactériolytique invisible.

Il fallut attendre les travaux de Félix d'Hérelle, chercheur franco-canadien travaillant à l'Institut Pasteur pour commencer à comprendre la nature et l'importance de cette substance inconnue, nommée alors par certains « phénomène de Twort-d'Hérelle ».

## 1.2 Les travaux de Félix d'Hérelle

Il semblerait que Félix d'Hérelle (figure 2) ait tout d'abord observé le phénomène de bactériophagie dans les années 1909-1910, alors qu'il étudiait une épizootie chez des sauterelles (*Schistocerca pallens*) au Mexique (d' Hérelle, 1926, 1912, 1911).

Figure 2 : Portrait de Felix d'Hérelle



D'après (Häusler, 2006). Félix d'Hérelle, chercheur franco-canadien, fut le premier chercheur à approfondir le phénomène de lyse bactérienne par le bactériophage.

Il remarqua que ces insectes mouraient de septicémie s'accompagnant de symptômes intestinaux. A partir des liquides diarrhéiques des insectes malades, il isola la bactérie *Coccobacillus acridiorum* et considéra à juste titre qu'il s'agissait de l'élément pathogène. Dans le but de limiter les invasions de sauterelles et d'éviter leurs nuisances envers les cultures des régions tropicales et subtropicales, d'Hérelle ensemença de grandes quantités de bouillon de culture avec cette bactérie, de manière à répandre ensuite les bactéries incubées sur les insectes encore à l'état larvaire et ainsi les éliminer par maladie. Cependant, il remarqua que dans plusieurs tubes d'isolement ou de repiquage apparaissaient des colonies échancrées ou des taches vierges. Ces zones suspectes, qu'il nomma « taches claires », mesuraient deux à trois mm de diamètre. Après récupération de la surface des taches claires

sur la gélose et observation au microscope, il s'avéra qu'aucun élément n'était visible (d' Héréelle, 1918).

D'Héréelle émit l'hypothèse qu'un élément minuscule avait produit ces taches claires au sein des cultures, et qu'il ne s'agissait pas d'une autre bactérie car cet élément avait la capacité de traverser le filtre de Chamberland (Chamberland, 1884 ; d' Héréelle, 1918).

En 1915, la Tunisie subit une importante invasion de sauterelles qui menaça de ravager les ressources agricoles du pays. D'Héréelle fut chargé de détruire les sauterelles en créant une épidémie mortelle dans les essaims. D'après ce qu'en décrit d'Héréelle, le résultat fut sans équivoque. Lorsqu'une invasion de sauterelles vint à sévir l'année suivante en Afrique du Nord, la Tunisie ne fut même pas touchée. À cette occasion, d'Héréelle observa de nouveau les « taches claires » dans ses cultures de bactéries et décida d'approfondir ses investigations (d' Héréelle, 1915). Pour expliquer sa découverte, il émit tout d'abord l'hypothèse que le coccobacille n'était qu'un microbe de sortie (agent accessoire isolé au détour d'une maladie infectieuse d'une autre origine) et que le véritable agent pathogène était un microbe invisible qui, de plus, empêchait parfois la culture des coccobacilles. Mais après avoir tenté d'induire la maladie chez des sauterelles en utilisant uniquement le filtrat, il remarqua que, sauf exception, les orthoptères ne tombaient pas malades. La présence simultanée des deux microbes devait donc, selon lui, être nécessaire pour engendrer la maladie. Il présenta le phénomène à Charles Nicolle, directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, institut où d'Héréelle travaillait alors, qui déclara qu'il s'agissait peut-être d'un virus filtrable porté par les coccobacilles et que ce virus constituerait l'agent pathogène tandis que les coccobacilles seraient juste le contaminant, la maladie nécessitant alors les deux entités pour agir. D'Héréelle partit donc initialement sur cette hypothèse (d' Héréelle, 1926).

À la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, la notion de virus était assez vague. On qualifiait un élément ainsi lorsqu'il s'agissait d'un agent infectieux invisible au microscope optique, capable de traverser un filtre de Chamberland, dont le pouvoir infectieux n'était pas diminué par dilution (éliminant donc l'hypothèse d'une toxine) et qui ne s'apparentait ni à une bactérie, ni à un champignon, ni à un parasite. Les premiers virus découverts, nommés alors « virus filtrables », « virus ultrafiltrant » ou encore « infrabactérie », furent le virus de la mosaïque du tabac en 1892, le virus de la fièvre aphteuse chez les animaux en 1898 et le virus de la fièvre jaune chez l'homme en 1902 (Berche, 2007).

De retour à Paris en août 1915, d'Hérelle eu pour mission d'étudier une épidémie de dysenterie chez un escadron de cavalerie à Maisons-Laffitte. Basé sur son hypothèse que le microbe invisible et la bactérie devaient être liés pour produire les maladies, d'Hérelle voulut savoir si elle s'appliquait aussi aux maladies humaines, en particulier sur la dysenterie bacillaire et sur la fièvre typhoïde. Il filtra donc une émulsion de déjections de patients dont la maladie était en pleine évolution, laissa agir le filtrat sur des émulsions de la bactérie incriminée dans la maladie et inocula le mélange à des animaux de laboratoires, de manière à voir s'il arrivait à reproduire les symptômes. De plus, il étala aussi son mélange sur gélose pour tenter de recréer les « taches claires ». Cependant, l'inconstance des résultats de ses expériences ne lui permit pas d'en tirer des conclusions (d' Hérelle, 1916). Puis, en relisant ses cahiers d'expériences, d'Hérelle se rendit compte que les taches claires n'apparaissaient que lorsque les fèces filtrées provenaient de patients dont la maladie était à un stade très avancé (d' Hérelle, 1917).

Il décida donc de suivre le cas de patients, de leur admission à leur convalescence, de manière à déterminer à quel moment l'élément créant les « taches claires » entrait en jeu (d' Hérelle, 1917).

Il suivit ainsi, en août 1916, le cas d'un patient souffrant de dysenterie à bacille Shiga traité à l'hôpital Pasteur. Chaque jour, d'Hérelle prélevait un peu de fèces du patient, puis, après une nuit à l'étuve, les filtrait, ajoutait le filtrat à un bouillon de cultureensemencé auparavant de bacilles dysentériques et plaçait le tout à l'étuve à 37 °C. Les premiers jours de cette expérience, il n'obtint à chaque fois qu'une simple culture de bacilles Shiga, mais un jour, le tube préparé la veille se révéla exempt de bactéries. D'Hérelle se renseigna alors sur l'état du patient, et on lui indiqua qu'il présentait une nette amélioration, suivie plus tard d'une totale guérison. D'Hérelle ajouta alors une nouvelle émulsion de bacilles Shiga au bouillon de culture apparu comme exempt de bactéries jusqu'à obtenir un mélange trouble, et le plaça à l'étuve. Une dizaine d'heures après, le bouillon redevint limpide et exempt de bactéries. C'est alors que le chercheur comprit que son hypothèse initiale (le fait que le microbe invisible et la bactérie étaient tous les deux nécessaires pour engendrer la maladie) était fausse, et que ce microbe invisible engendrait la destruction des bactéries et permettait la guérison. Il ne s'agissait donc pas d'un microbe pathogène pour l'homme mais pour la bactérie.

Après cette conclusion, D'Hérelle ajouta une goutte de la solution devenue limpide à une culture en bouillon de bacilles Shiga. Une quinzaine d'heures plus tard ce bouillon se révéla lui aussi limpide. Il réitéra l'expérience plusieurs fois en ajoutant à chaque fois une goutte du dernier bouillon rendu limpide, et se rendit compte qu'au fil de l'expérience, la lyse des bactéries était de plus en plus rapide. D'Hérelle conclut de cela que « le principe existant dans les déjections se reproduisait aux dépens des bacilles Shiga ; il se comportait comme un microbe filtrant, parasite des bactéries » (d' Hérelle, 1926).

D'Hérelle tenta alors une nouvelle expérience : il ajouta à un bouillon de bacilles Shiga une goutte d'un des bouillons lysés de l'expérience précédente. Il étala un peu de ce mélange sur des géloses, la première immédiatement après l'ajout de la goutte, la deuxième une heure après passage du mélange à l'étuve, la troisième deux heures après étuve et la quatrième trois heures après étuve. Après incubation il observa sur la première gélose deux plages circulaires bien nettes et exemptes de bactéries. La deuxième gélose présentait six plages de ce genre, la troisième en présentait une centaine et il n'y avait sur la quatrième aucune trace de culture bactérienne. D'Hérelle déduisit de cette expérience que le principe lytique présent dans les déjections « se reproduisait réellement en cours d'action, et de plus que ce principe était condensé sous forme de particules actives » (d' Hérelle, 1926) car « ces points ne peuvent représenter que des colonies du microbe antagoniste : une substance chimique ne pourrait se concentrer sur des points définis » (d' Hérelle, 1917).

Le 15 septembre 1917, le Dr Émile Roux exposa à l'Académie des Sciences une note dans laquelle d'Hérelle présentait, pour la première fois, à la communauté médicale, le microbe invisible qui avait agi en tant qu'antagoniste du bacille dysentérique. À partir des mots grecs « baktéria » (« bâton », référence à la forme des premières bactéries observées) et « phagein » (« manger » au sens strictement étymologique, ici pris sous son sens « se développer aux dépens de »), il lui avait donné le nom de « bactériophage » (d' Hérelle, 1917).

## 2 L'âge d'or de la phagothérapie

### 2.1 Conflits initiaux sur la nature des phages

Pendant les vingt années qui suivirent, la phagothérapie vécut une très forte expansion à travers le monde. À cette époque, aucun traitement contre les infections bactériennes n'était vraiment efficace. Pourtant, la crédibilité de d'Hérelle fut dès le départ mise en doute, à commencer par ses affirmations sur la nature du principe lytique qu'il avait mis en évidence. Jules Bordet, à l'époque directeur de l'Institut Pasteur de Bruxelles et lauréat du prix Nobel de physiologie ou médecine pour ses découvertes sur l'immunité, soutenait que la substance responsable de la bactériolyse était soit une diastase, terme qui désigne anciennement une enzyme (Bordet, 1931), soit un principe inerte porté par l'hérédité bactérienne et capable de provoquer l'autolyse des bactéries sensibles (Bordet et Ciuca, 1921).

D'autres scientifiques attribuaient eux aussi cette lyse bactérienne à une substance inerte. Kabeshima considérait, par exemple, ce phénomène comme étant une cascade de réactions aboutissant à la libération d'un ferment par les cellules infectées, ferment entraînant la production d'une enzyme endobactérienne lysant ensuite la bactérie (Kabeshima, 1920).

### 2.2 Premières utilisations thérapeutiques

#### 2.2.1 Initiation de la phagothérapie sur des animaux

Malgré ces critiques, d'Hérelle maintint ses positions et poursuivit ses recherches sur le sujet. Il se tourna très rapidement vers l'utilisation des phages dans les soins thérapeutiques. Ainsi, en 1919, il employa pour la première fois *in vivo* le fruit de sa découverte contre une épidémie de typhose aviaire (*Salmonella enterica* serovar Gallinarum) en Europe. Il se rendit dans vingt-cinq élevages de volailles contaminés situés dans différents départements éloignés les uns des autres et élaborait une suspension de bactériophages à partir de fèces de volailles malades. Il administra cette suspension oralement à des animaux sains, et par injection à des

animaux malades. Alors que cette infection était normalement mortelle pour 95 à 100 % des volailles contaminées et non traitées, le traitement de d'Hérelle permit à 95 % des poules de survivre. Le biologiste en conclut que sa suspension avait été efficace tant sur le plan thérapeutique que prophylactique. Il venait d'inventer la phagothérapie (Grossi, 2006).

Fort de ce succès thérapeutique, d'Hérelle partit quelques mois plus tard à Saigon (ancien nom de Hô-Chi-Minh-Ville, située en Cochinchine, province historique au sud de l'actuel ViêtNam) soigner, avec succès, des buffles (*Babulus bubalis*) atteints de barbone (septicémie hémorragique bovine mortelle due à *Pasteurella multocida*). Ses travaux sur la barbone, relus à la lumière des connaissances d'aujourd'hui, laissent cependant penser que ce n'est pas la phagothérapie qui a permis la guérison des bovins, mais qu'il s'agirait plutôt d'une immunisation involontaire créée par l'administration de débris bactériens souillant les suspensions (d' Hérelle, 1921a).

### 2.2.2 Premières applications à la médecine humaine

Ces réussites thérapeutiques sur les animaux confortèrent d'Hérelle sur l'intérêt des bactériophages et le poussèrent à promouvoir la phagothérapie et à l'appliquer chez l'homme. L'absence de traitements anti-infectieux efficaces et la fréquence importantes des épidémies lui permirent d'obtenir facilement le feu vert des médecins. Il se mit à traiter de nombreux malades et obtint, selon ces critères, de bons résultats, par exemple lors d'injection intra-ganglionnaires de phages sur des patients atteints de peste bubonique en quarantaine sur une île au large du canal de Suez (d' Hérelle, 1921a), ou lors d'épidémie de choléra aux Indes en 1927. Pour ce dernier exemple, d'Hérelle prit soin de traiter les habitants malades du village et de ne pas le faire pour un village voisin également atteint de manière à avoir un groupe témoin. Seuls 8 % de décès s'ensuivirent pour le village traité, tandis que le non traité perdit 62 % de ses malades (d' Hérelle, 1928).

De nombreux médecins et chercheurs suivirent l'exemple de d'Hérelle et, de 1920 à 1930, le nombre de publications sur le sujet passa de 20 à 60 par an, preuve de l'engouement pour cette nouvelle thérapie (Häusler, 2006). Les phages furent utilisés dans le traitement de maladies telles que les infections aiguës ou chroniques à staphylocoque, les infections urinaires, digestives (dysenterie, cholera, fièvre typhoïde, colibacillose, ...) ou même la peste.

Ils furent également employés en prophylaxie contre le choléra ou en chirurgie lors d'infections du site opératoire ou de chirurgies septiques (Beckerich et Hauduroy, 1922a ; Bruynoghe et Maisin, 1921).

Les résultats étaient cependant très variables, allant de la guérison totale à l'absence complète de signes de rémission voire au décès. En cause de ces résultats variables, une mauvaise connaissance et mise en pratique de la phagothérapie : les protocoles de soins (posologie, fréquences et mode d'administration) et le contrôle des suspensions (efficacité et innocuité) n'étaient pas standardisés et réalisés correctement.

## 2.3 Caractérisation des bactériophages

De nombreux chercheurs tentèrent de percer les secrets de la nature et du mécanisme d'action des phages en parallèle de leur utilisation thérapeutique. Les laboratoires déterminèrent ainsi leur taille, leur capacité de résistance au milieu extérieur (pH, chaleur, agent chimiques, ...), l'existence de plusieurs types de bactériophages différents, et de nombreux aspects de leurs propriétés pharmacologiques (Grossi, 2006). La nature des phages, elle, demeurait encore un mystère. Grâce à des comparaisons entre cet agent lytique et les rares virus déjà étudiés à l'époque, tels que celui de la mosaïque du tabac, André Gratia fit une démonstration très pertinente de la nature virale des bactériophages. Néanmoins, ses contemporains restèrent sceptiques (Gratia et Fredericz, 1937).

À côté de ces avancées sur la biologie des phages, d'Hérelle persistait à dire qu'il n'existait qu'un seul phage, capable de s'adapter à différentes espèces bactériennes, et critiquait ouvertement ses contemporains qui le contredisaient.

## 2.4 Production de suspensions phagiques

En 1928, d'Hérelle fut nommé professeur à l'Université de Yale, où une chaire de « protobiologie » fut créée spécialement pour lui. Pourtant cinq ans après il démissionna et partit en Géorgie, dans l'Union des Républiques Socialistes Soviétiques (URSS) rejoindre l'un de ses élèves, Georgyi Eliava (figure 3). Ils fondèrent dans la capitale, Tbilissi, un institut

travaillant exclusivement sur les bactériophages et produisant des suspensions thérapeutiques (Grossi, 2006).

Cet institut, renommé Institut Eliava vers la fin des années quatre-vingt en hommage à ce dernier, mort en 1937, produit toujours activement des suspensions de phage.

Figure 3 : D'Hérelle entouré de son assistante et de Georgiy Eliava



D'après (Häusler, 2006). Georgiy Eliava, l'un des plus fervents élèves de d'Hérelle, travailla avec ce dernier en Géorgie. L'Institut Eliava de Tbilissi fut nommé ainsi en l'honneur de ce scientifique.

Plusieurs laboratoires s'étaient lancés dans la confection et la fabrication de suspensions phagiques. En France, d'Hérelle, de retour à Paris après son séjour en Géorgie, céda l'exploitation de ses recherches au laboratoire « Robert et Carrière » (laboratoire qui devint plus tard « Synthélabo », aujourd'hui une filiale de Sanofi-Aventis). Le « Laboratoire du Bactériophage » fut alors fondé. Il commercialisa des suspensions buvables de phages en cocktails, mélange de plusieurs phages (que d'Hérelle considérait comme différentes adaptations de cibles à partir d'un bactériophage fondamental) pour étendre le spectre d'action, spécifiques à un appareil de l'organisme. On peut citer par exemple les suspensions « Bacté-pyélo-phage » pour lutter contre les pyélonéphrites et les cystites ou les suspensions « Bacté-intesti-phage » contre les entérites coliques et les diarrhées infantiles (figure 4).

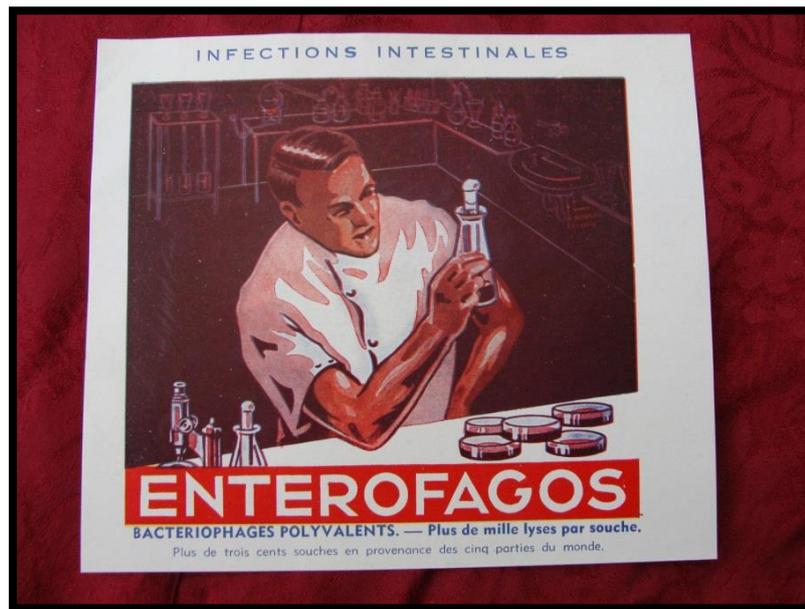
Figure 4 : Cocktail "Bacté-intesti-phage"



D'après (Chanishvili, 2011). La préparation « Bacté-intesti-phage » était une des suspensions préparées par le Laboratoire du Bactériophage dans un but thérapeutique. Elle était indiquée pour les infections bactériennes intestinales.

En Allemagne, la « Société Allemande du Bactériophage » vendait des comprimés contre les furonculoses et contre les infections stomacales à *Escherichia coli*, tandis qu'Antipiol délivrait le produit Enterofagos destiné aux infections intestinales (figure 5). En Angleterre, la compagnie londonienne Medico-Biological Laboratories distribuait un produit similaire à Enterofagos. La notoriété des phages avait traversé l'Atlantique et, au début des années 30, aux Etats-Unis d'Amérique, les laboratoires Eli Lilly Compagny, E.R.Squibb and Sons (appartenant maintenant à Bristol Myers Squibb), Abbott Laboratory et Parke, Davis and Company (appartenant aujourd'hui à Pfizer) se mirent également à commercialiser des suspensions thérapeutiques (Häusler, 2006).

Figure 5 : Ancienne publicité pour la préparation Enterofagos



D'après (Arts Décoratifs, 2013). La suspension « Enterofagos » était commercialisée à destination des infections intestinales par le laboratoire allemand Antipiol.

Malheureusement, les phages connurent une mauvaise publicité à cause de préparations de mauvaise qualité. Les contrôles étant incomplets, voire inexistantes, et certains vendeurs leur prêtant des propriétés qu'ils n'avaient pas, la réputation en patie grandement. Des impuretés bactériennes souillaient les préparations et certaines suspensions du commerce étaient même involontairement exemptes de phages actifs car les stabilisants utilisés par les fabricants avaient détruit les phages et aucun contrôle n'avait été mené ensuite (Straub et Applebaum, 1933).

## 3 Le déclin

### 3.1 Révision complète de la phagothérapie

Malgré les recherches de l'époque, plusieurs points intriguaient toujours les scientifiques :

- la nature des phages toujours inconnue ;
- la variabilité des résultats thérapeutiques ;
- la découverte par certaines études pharmacologiques de la neutralisation des phages par certains liquides biologiques ;
- le développement anarchique du marché des suspensions phagiques.

Ces points inquiétaient beaucoup les autorités sanitaires et, en 1934, le « Council on Pharmacy and Chemistry », institution créée en 1905 et ancêtre de la Food and Drug Administration (FDA, service du gouvernement américain responsable de la pharmacovigilance et de la sécurité sanitaire des aliments) exigea une révision complète de l'ensemble des publications de l'époque, pour juger de la qualité, de l'efficacité et de l'innocuité de ces agents non-inscrits dans la pharmacopée américaine et au commerce pourtant florissant. C'est ainsi que le microbiologiste, Monroe Eaton et l'infectiologue, Stanhope Bayne-Jones se mirent à décortiquer plus d'une centaine de publications sur le sujet de la phagothérapie. Ils soumièrent à l'examen du conseil leurs conclusions qui n'étaient nettement pas en faveur des bactériophages. En effet, les auteurs indiquaient qu'il n'y avait pas de preuves que la substance proposée par d'Hérelle soit une substance vivante, encore moins un virus, et eux songeaient plus à une enzyme ; ils affirmaient qu'en l'absence de certitude concernant la nature vivante de cette substance, il était impossible de savoir si les résultats obtenus sur les cultures bactériennes ou en application thérapeutique étaient réellement dus à cette substance.

Les deux scientifiques confirmèrent cependant que le caractère bactéricide des suspensions de phages avait été démontrée dans les infections urinaires basses à *Escherichia coli* et à *Staphylococcus aureus* et dans les infections localisées à staphylocoque. Ils

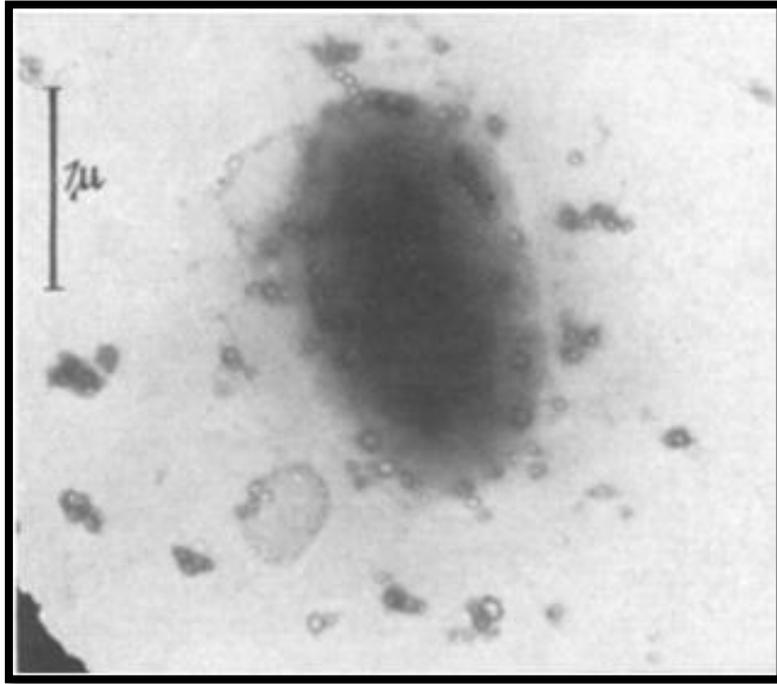
affirmèrent cependant que ces capacités lytiques étaient inhibées *in vivo* par de nombreux fluides corporels dont le sérum humain (Eaton et Bayne-Jones, 1934).

Malgré cette publication négative et en l'absence d'antibactériens alternatifs, les travaux se poursuivirent jusqu'à ce qu'en 1941, une nouvelle révision, là encore demandée par le « Council on Pharmacy and Chemistry » livre une fois de plus des conclusions très sévères (Krueger et Scribner, 1941). Les scientifiques Albert Krueger et Jane Scribner indiquèrent dans ce document que la substance nommée bactériophage était apparemment une protéine de haut poids moléculaire synthétisée par des bactéries sous forme de précurseur inactif et activée ensuite par d'autres phages matures. Les autres conclusions allèrent dans le même sens que celles faites par Eaton et Bayne-Jones. Le point qui accabla la phagothérapie fut l'affirmation par les auteurs de son caractère potentiellement dangereux, pouvant déclencher des réactions anaphylactiques.

Face à cette dernière conclusion, le « Council on Pharmacy and Chemistry » trancha en refusant définitivement d'officialiser la phagothérapie et en interdisant son accès au marché pharmaceutique américain.

La question de la nature des phages fut pourtant éclaircie par Helmut Ruska à la lumière de la microscopie électronique développée quelques années auparavant (figure 6). Le scientifique confirma l'hypothèse principale de d'Hérelle : un bactériophage était bien un virus (Ruska, 1943, 1940).

Figure 6 : Première visualisation de phages par Edmund Ruska



D'après (Ruska, 1940). Il s'agit de la première visualisation de bactériophages grâce au microscope électronique nouvellement mis au point. Au centre de la photographie se trouve une bactérie *Escherichia coli*. Elle est entourée de plusieurs bactériophages, reconnaissable à leur tête dont le contour apparaît rond et opaque et le contenu translucide.

En dépit de la confirmation de la nature virale du bactériophage, les affirmations publiées dans les travaux de synthèse précédemment évoqués ne furent pas remises en question. La phagothérapie débuta alors une lente agonie que les événements majeurs de l'époque, à savoir l'avènement des antibiotiques et la Seconde Guerre Mondiale, ne firent qu'aggraver.

### 3.2 Développement des antibiotiques

Après la découverte de la pénicilline par Sir Alexander Fleming en 1929 (figure 7), quelques antibiotiques comme la streptomycine ou le chloramphénicol avaient vu le jour et suscitaient de nouveaux espoirs dans la lutte contre les maladies infectieuses. Leur développement sonna le début du déclin de la phagothérapie. Jugée moins pratique (fabrication, conditionnement et utilisation) et moins efficace, elle fut petit à petit délaissée par les pays occidentaux au profit de ces nouvelles molécules.

Figure 7 : En 1929, Sir Alexander Flemming découvre la pénicilline



D'après (Fenster, 2013). Sir Alexander Flemming avait préparé des cultures bactériennes, cependant une de ces cultures s'est retrouvée contaminée par un champignon, *Penicillium notatum*, qui avait détruit les bactéries à son contact. Ce champignon produisait de la pénicilline.

### 3.3 Seconde Guerre Mondiale

Le premier conflit mondial avait parfaitement montré l'importance des pertes dues à l'absence de soins antibactériens efficaces pour traiter les blessures et suite aux chirurgies de guerre. Les belligérants en étaient bien conscients ; chaque armée choisit une stratégie différente et les champs de batailles devinrent des champs d'investigation pharmaceutique à grande échelle.

Au sein de l'Union soviétique et des forces de l'Axe, les bactériophages ne furent pas mis tout de suite de côté, l'antibiothérapie n'étant au début de la seconde guerre mondiale que balbutiante. Allemands, Japonais et Soviétiques continuèrent de soigner les infections avec des phages. Le paquetage militaire distribué aux soldats de la Wehrmacht contenait même des flacons de suspensions de phages à appliquer sur les blessures de guerre. Les médecins allemands utilisèrent en particulier un traitement contre la dysenterie, nommé « Typhus-Paratyphus B-Polyfagin » (figure 8). Lorsqu'une partie de la France fut occupée, les troupes d'occupation réquisitionnèrent le « Laboratoire du Bactériophage » pour produire des préparations phagiques (ils n'exploitèrent cependant que les installations, et non pas les produits phagiques déjà créés par le laboratoire) pour ravitailler leurs troupes. D'Hérelle dut

alors suspendre les travaux qu'il avait en cours là-bas et s'exila hors de Paris. Vers la fin de la guerre, jugeant leur efficacité insuffisante, les Allemands arrêtaient petit à petit leur production (Häusler, 2006).

Figure 8 : Extrait d'un livre pharmaceutique de référence allemand

	Schachtel mit 3 Amp. zu 1 ccm . . . . .	1,40
	Flasche zu 10 cm . . . . .	—,70
<b>B 17</b>	<b>Typhus-Paratyphus B-Polyfagin (Bakteriophagen Behringwerke)</b>	
	Zus. Polyvalente Vaccine mit 500 Mill. Typhus- u. je 250 Mill. Paratyphus A- u. B-Bazillen pro ccm, 0,5% Phenol.	
	Ind. Prophylaxe des Typhus und Paratyphus.	
	Dos. 2—3 × 0,5 bzw. 1 ccm subkutan in Abständen von 7—8 Tagen.	
	Packung A (orale Anwendung):	
	Schachtel mit 6 Amp. zu 10 ccm . . . . .	4,65

D'après (Fachgruppe Pharmazeutische Erzeugnisse der Wirtschaftsgruppe Chemische Industrie, 1940). La suspension « Typhus-Paratyphus B-Polyfagin » était utilisée par les médecins allemands pour lutter contre la dysenterie pendant la seconde guerre mondiale

De nouvelles fabriques de suspensions thérapeutiques furent construites en Union soviétique, à l'image de l'Institut Eliava. La production de suspensions de phages augmenta de 300 % entre 1940 et 1942. Le but était de soutenir l'effort de guerre en soins antibactériens. Les médecins de l'Armée rouge utilisèrent et développèrent ainsi la phagothérapie, par exemple contre la gangrène ou l'ostéomyélite (Chanishvili *et al.*, 2001 ; Häusler, 2006 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001).

Dans les armées américaines et anglaises, au contraire, les recherches pharmaceutiques militaires s'orientèrent vers le développement et la production d'antibiotiques, nouvelle arme antibactérienne « miracle ». La première forme chimiquement stable de pénicilline apparut en 1939. La production à but militaire de sulfamide et de pénicilline, seuls antibiotiques testés au début du conflit, devint massive et leur efficacité clinique contribua en partie à la victoire alliée (figures 9 et 10).

Figure 9 : Ancienne publicité pour la pénicilline

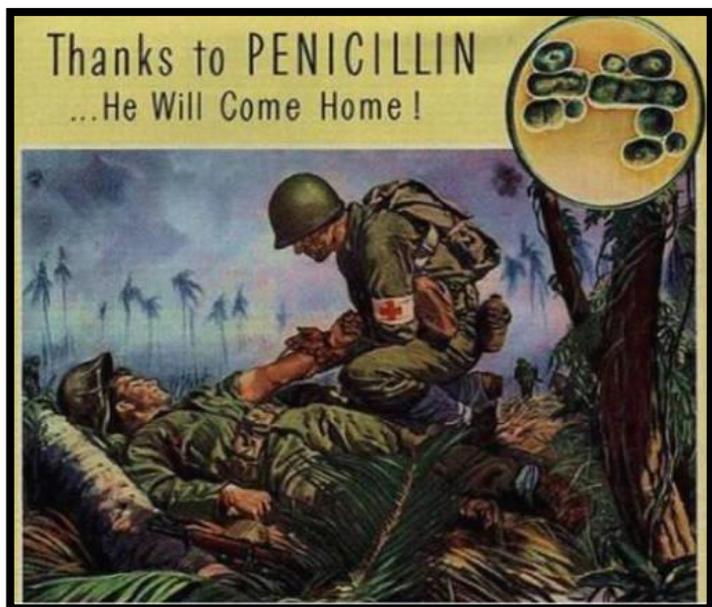
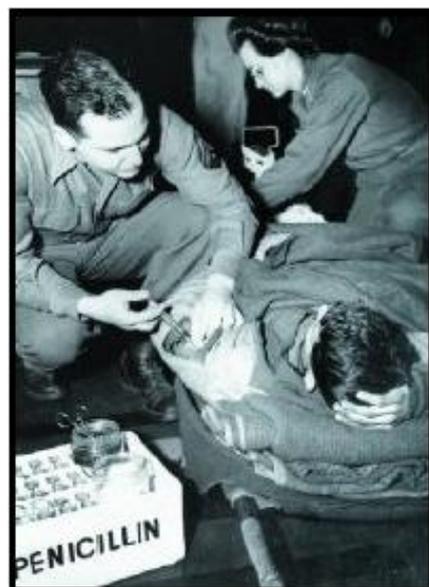


Figure 10 : Médecin administrant de la pénicilline à un soldat



D'après (The National WWII Museum, 2013). Pendant la seconde guerre mondiale, les Américains ont développé la connaissance et la mise en pratique des antibiotiques, médicaments antibactériens nouvellement découverts, et en particulier la pénicilline.

## 3.4 L'après-guerre

### 3.4.1 À l'Est

L'URSS poursuit ses avancées sur la phagothérapie et fit profiter de son savoir et de sa production l'ensemble du Bloc communiste et des Républiques « sœurs ». Dès 1940, les plans quinquennaux, mis en place par Staline, donnèrent une place importante à la phagothérapie, promouvant de nouvelles formes galéniques et évaluant leur efficacité. Ainsi, les chercheurs soviétiques développèrent pendant dix ans ces nouvelles formes (comprimés gastro-résistants pour les atteintes intestinales, poudres et compresses imprégnées de phages pour les plaies humides, ...). Puis entre 1950 et 1960, toujours dans le cadre de ces plans quinquennaux, les scientifiques étudièrent l'utilisation potentielle de l'association entre phages et antibiotiques (Chanishvili *et al.*, 2001).

Les recherches sur les phages continuèrent à fleurir à l'Est ; on peut par exemple citer l'étude colossale menée en 1961 sur plus de trente mille sujets pour évaluer le rôle prophylactique des bactériophages, et dont les conclusions mirent en valeur les bénéfices de la phagothérapie (Alisky *et al.*, 1998 ; Chanishvili *et al.*, 2001 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001).

A partir de cette époque, médecins et chercheurs de l'URSS effectuèrent un vaste travail sur la phagothérapie (voir annexe 1). Le « Rideau de Fer » n'en laissa passer aucune publication.

## 3.4.2 À l'Ouest

### 3.4.2.1 Déclin de la production phagique

Une fois la paix retrouvée, d'Hérelle revint à Paris, mais fut très affecté par la quasi disparition de la phagothérapie. Il fit sa dernière apparition en 1947, à l'occasion d'une conférence organisée par les chercheurs de l'Institut Pasteur, en l'honneur du 30<sup>ème</sup> anniversaire de sa publication de 1917. Ironie du destin, Twort, l'autre découvreur des bactériophages, et d'Hérelle s'éteignirent la même année, en 1949, dans un quasi anonymat (Grossi, 2006 ; Häusler, 2006).

Les laboratoires occidentaux se focalisèrent sur l'antibiothérapie tandis que quelques laboratoires indépendants et bientôt marginaux continuaient à produire des préparations phagiques. Cette production se prolongea jusque dans les années soixante-dix. En France, des préparations de bactériophages demeurèrent inscrites au VIDAL également jusqu'en 1974, puis en furent effacées, malgré les protestations de quelques rares scientifiques comme André Raga-Clémenceau, chirurgien et directeur de clinique à la Salpêtrière à Paris qui tenta en vain des pétitions de soutien à la phagothérapie. Les publications sur le sujet se clairsemèrent et ne permirent pas de retrouver l'engouement d'antan (Shera, 1970).

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), après une réévaluation de l'efficacité des bactériophages dans la lutte contre le choléra, en comparaison avec celle des antibiotiques, porta le coup de grâce aux bactériophages (Pollitzer, 1959 ; Sayamov, 1963).

### 3.4.2.2 Développement de la biologie moléculaire

En Occident, les bactériophages délaissés par les médecins, connurent une seconde carrière grâce à un groupement créé aux États-Unis d'Amérique en 1941 par Max Delbrück et Salvador Luria, nommé le « Cold Spring Harbor Laboratory Phage Group » qui regroupa plusieurs scientifiques. Les réunions de ce groupe avaient pour but de comprendre le mécanisme d'action des phages vis-à-vis des bactéries. Ces études mirent en lumière le fonctionnement des phages, mais également la mécanique des infections virales. Mieux, ils offrirent aux phages une seconde chance de briller en science en les utilisant en génétique et en biologie moléculaire. Leur nouvelle attribution permit, entre autres, de confirmer que l'ADN était bien le support de l'information génétique (Hershey et Chase, 1952), de découvrir les enzymes de restriction (Arber, 1966) ou de mettre au point la technique de séquençage de l'ADN (Sanger *et al.*, 1977).

## 4 La redécouverte

### 4.1 L'antibiothérapie, grandeur et décadence

#### 4.1.1 L'apogée des antibiotiques

Traitement à l'efficacité redoutable, l'antibiothérapie montra très rapidement un essor considérable et devint le traitement antibactérien de référence. Elle fut mise en pratique en médecine humaine et vétérinaire, mais également en agriculture et en agroalimentaire.

Les laboratoires, poussés par la rentabilité du traitement, développèrent ces molécules et enrichirent rapidement le pool d'antibiotiques sur le marché.

#### 4.1.2 Découverte et prise de conscience des antibiorésistances

Suite à de mauvaises habitudes de prescriptions médicales, tant en médecine humaine que vétérinaire, les antibiotiques furent employés à mauvais escient, notamment contre des infections virales pour lesquels ils étaient inefficaces. Leur large utilisation en prophylaxie dans les élevages industriels contre les épidémies, comme probiotiques ou comme facteurs de croissance ne fut pas non plus sans conséquences.

Peu de temps après avoir découvert la pénicilline, Sir Fleming lui-même avait mis en évidence l'existence de souches de staphylocoques résistants, et avait tenté d'en alerter les autorités sanitaires, en vain.

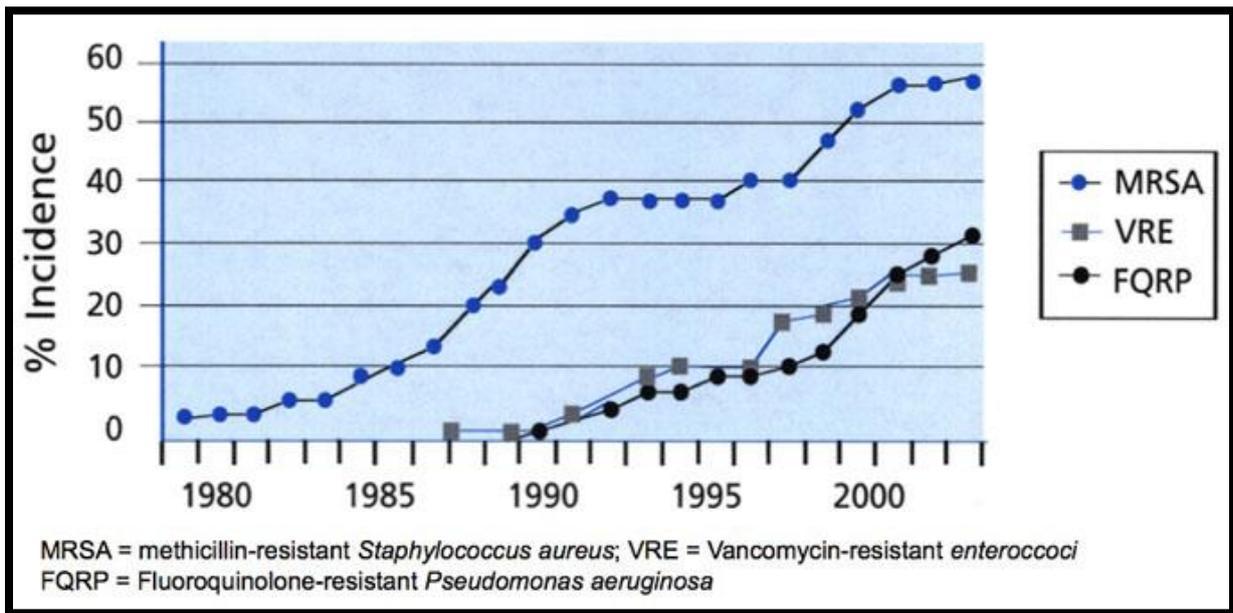
L'utilisation inconsidérée et quasi systématique des antibiotiques engendra des conséquences graves. En détruisant les bactéries les plus sensibles et en laissant vivre et se multiplier les plus résistantes, cette mauvaise gestion avait créé une forte pression de sélection de souches résistantes.

Ces résistances n'effrayèrent pas tout de suite les médecins, puisque la quantité d'antibiotiques existants était telle qu'on pouvait passer outre ces résistances en utilisant un autre antibiotique appartenant à la même famille ou non. L'investissement en temps et en argent dans la découverte de nouveaux antibiotiques étant trop important, les laboratoires, qui jugeaient l'arsenal thérapeutique à disposition plutôt suffisant, cessèrent de financer les projets de recherche de nouvelles familles d'antibiotiques pour ne se consacrer qu'à l'amélioration de ceux déjà existants (Häusler, 2006).

Les résistances devinrent de plus en plus difficiles à contourner, et les premières infections puissamment résistantes aux antibiotiques germèrent vers la fin des années soixante-dix. Ce type de bactéries infectait principalement les personnes extrêmement fragilisées (personnes âgées, nourrissons, patients greffés ou en réanimation, ...) et surtout en milieu hospitalier. Cette constatation eut cependant peu d'échos et ne modifia pas l'utilisation des antibiotiques.

Petit à petit, de plus en plus de résistances hors du commun émergèrent, rendant les traitements de plus en plus aléatoires (figure 11). Cette augmentation exponentielle d'infections multirésistantes fit enfin prendre conscience aux autorités sanitaires de l'intensité du problème. Connaissant les temps rudes qu'avait autrefois traversés le monde sans traitements anti-infectieux efficaces, la potentialité d'une « ère post-antibiotiques » faisait naître les plus grandes craintes en Occident.

Figure 11 : Incidence de trois infections antibiorésistantes



D'après (IDSA, 2004). L'incidence des infections due à des bactéries antibiorésistantes augmente d'années en années, comme présenté ici pour trois bactéries causant des infections résistantes majeures de santé publique entre 1980 et 2003 aux Etats-Unis d'Amérique.

Comprenant l'ampleur du problème, le monde médical décida de réagir. Une importante remise en question au sujet des pratiques de l'antibiothérapie vit le jour et aboutit à la conclusion qu'une utilisation plus raisonnée de la part de tous, et qu'une meilleure hygiène, notamment hospitalière, pourrait ralentir l'émergence de ce problème majeur de santé publique internationale. Il était également impératif de trouver de nouvelles armes antibactériennes. Cette réflexion a donné lieu à une forte politique de prévention et à des campagnes de publicités visant une prise de conscience collective de la part des patients et des médecins. Le slogan « Les antibiotiques, c'est pas automatique », bien ancré dans la mémoire de tous les Français, trouve là son origine (figure 12).

Figure 12 : Publicité "Les antibiotiques, c'est pas automatique"



D'après (Stratégies, 2013). Face à la montée des résistances bactériennes, l'Assurance Maladie française lance en 2002 une vaste campagne publicitaire destinée à communiquer le bon usage de ce médicament et ainsi lutter contre la surconsommation. Cette campagne aura permis, en un an, de réduire de 10 % les prescriptions d'antibiotiques.

## 4.2 Renaissance de la phagothérapie en Occident

Dans ce contexte tendu, découvrir de nouvelles thérapies antibactériennes efficaces s'avérait urgent. La phagothérapie, qui n'était plus qu'un souvenir quasi effacé, resurgit alors en Occident dans les publications scientifiques et dans la mémoire de certains. En effet, durant toutes ces dernières années, et malgré l'avènement des antibiotiques, les scientifiques de l'Europe de Est avaient continué à utiliser et développer la phagothérapie, mais leurs travaux, qui étaient écrits dans leur langue natale dans des revues nationales, n'étaient jamais parvenus jusqu'aux yeux et aux oreilles des occidentaux (Häusler, 2006).

La décision de publier dans une revue internationale fut prise pour la première fois depuis près de cinquante ans par une équipe de l'Institut d'Immunologie et de Thérapies

Expérimentales de Wrocław (Académie des Sciences Polonaise), menée par Stefan Ślopek, qui publia ses travaux sur la phagothérapie chez l'homme. Les résultats présentés furent obtenus entre 1985 et 1987, dans dix départements hospitaliers différents répartis dans 3 villes de Pologne, sur 550 patients atteints d'infections multirésistantes et en situation d'impasse thérapeutique. Parmi ces patients, 518 suivaient une antibiothérapie (de nature non précisée) qui s'avérait inefficace pour cause de résistances bactériennes. Pour 398 d'entre eux, l'antibiothérapie fut arrêtée au profit de la phagothérapie. Tous les patients inclus dans la cohorte souffraient d'infections spontanée ou post-opératoire, dues à *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus* et *Streptococcus*. Parmi eux, 372 sujets étaient atteints d'une infection mono-microbienne, dont 73 % du genre *Staphylococcus*. Les phages, sélectionnés pour leur efficacité *in vitro* parmi les 250 espèces conservés à l'Institut, étaient ensuite administrés, soit par voie orale en trois prises quotidiennes (après neutralisation de l'acidité gastrique par une solution de bicarbonate de soude ou d'eau gazeuse), soit par voie topique pour les atteintes cutanéomuqueuses (compresses imbibées, collyres, gouttes auriculaires ou nasales), soit par injections lors de collections fermées (intrapéritonéales, intrapleurales ou intra-articulaires). Les médecins traitaient les patients pendant une à seize semaines et vérifiaient l'absence d'apparition de résistances bactériennes vis-à-vis des phages au moyen de prélèvements bactériologiques systématiques. Cependant, ces contrôles bactériologiques n'étaient pas les critères sur lesquels se sont basés les scientifiques pour évaluer la réussite de leurs protocoles ; ils se sont appuyés dans leurs conclusions sur la disparition des symptômes.

Dans ces conditions, le taux de réussite fut compris entre 75,9 et 100 % selon la bactérie incriminée et le type d'infection, avec des résultats thérapeutiques positifs chez 508 des 550 patients traités, soit 92,4 % des patients (Slopek *et al.*, 1987).

Malgré l'envergure impressionnante de ce travail, tant par la quantité de cas suivis que par le taux de réussite, le manque notoire de rigueur scientifique, notamment l'absence de groupes contrôles, ne permit que de remettre en lumière l'existence de la phagothérapie et de son potentiel thérapeutique, sans pour autant le convaincre les scientifiques occidentaux.

De leur côté, deux vétérinaires britanniques, Smith et Huggins, se penchèrent sur la question. Ils reprirent en 1982 les expériences que Dubos avait arrêtées en 1943, au sujet du traitement par les phages de septicémie-encéphalite à *Escherichia coli* K1 sur des modèles murins (cette bactérie est également responsable de méningites et de septicémies chez

l'homme). Pour leur étude, ils n'utilisèrent que des phages ayant pour cible l'antigène capsulaire K1, facteur de virulence de la bactérie, et sélectionnèrent les phages les plus actifs *in vitro*. Les différents protocoles qu'ils mirent en place réduisirent très significativement la mortalité des animaux, allant même jusqu'à 100 % de réduction. Ils montrèrent également qu'une seule injection intramusculaire de phage avait de meilleurs résultats que l'antibiothérapie intraveineuse préconisée comme traitement à cette époque. Ils observèrent que les prélèvements bactériens d'un des cas contenaient des souches résistantes aux bactériophages, mais, la résistance provenant de l'absence de l'antigène K1, la virulence de ces bactéries en était grandement atténuée. La conclusion de ces travaux était que, dans ce modèle, les bactériophages étaient plus efficaces que les antibiotiques et que l'apparition de résistances envers les phages se produisait aux dépens de la virulence bactérienne (Smith et Huggins, 1982). Cette publication fut étudiée par une équipe de biostatisticiens qui en confirma la bonne reproductibilité ainsi que la validité statistique (Bull *et al.*, 2002).

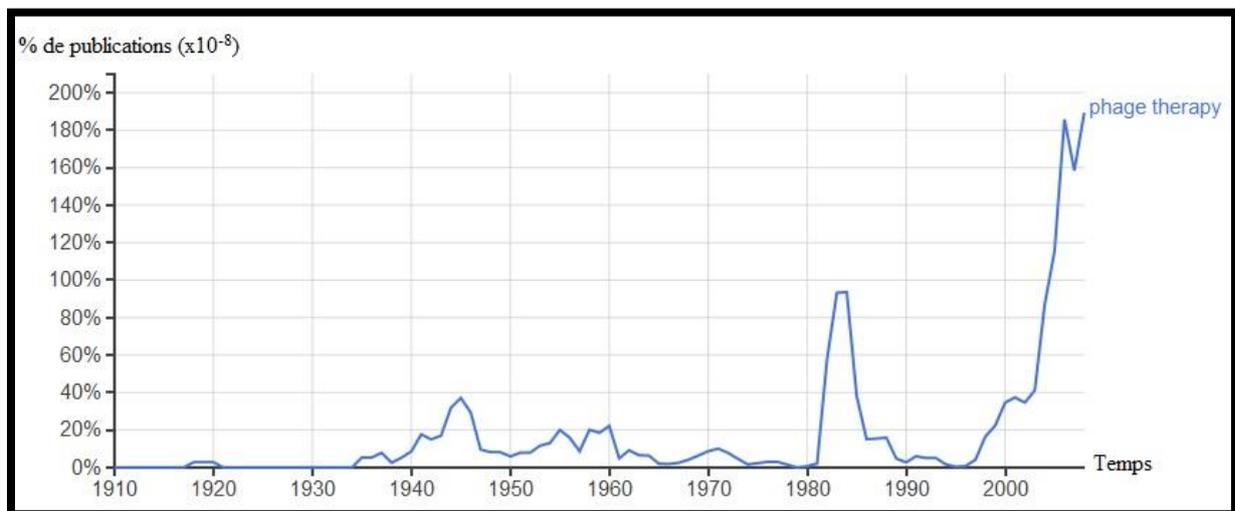
Ils étudièrent de nouveau, en 1983, les résultats d'une phagothérapie appliquée à des diarrhées à *Escherichia coli* entéro-pathogène chez des veaux, des porcelets et des agneaux nouveau-nés. Cette maladie est constamment létale en l'absence de traitements. Ils obtinrent là encore des résultats prometteurs, allant, selon les protocoles employés, d'une légère diminution à une réduction de 100 % de la morbidité et de la mortalité. Ils montrèrent de plus que l'utilisation de plusieurs types de phages ciblant cette bactérie limitait l'apparition de résistances aux phages. Enfin, ils remarquèrent que l'administration prophylactique de phages permettait de diminuer la densité de bactéries pathogènes présentes dans le tube digestif sous un seuil critique, et que les phages persistaient jusqu'à éradication totale des bactéries, démontrant que l'utilisation prophylactique de la phagothérapie protégeait efficacement de la maladie (Smith et Huggins, 1983).

Les publications de ces deux vétérinaires, rigoureuses et de qualité (procédures bien encadrées et contrôlées, groupes témoins inclus dans les études), furent fondamentales dans le regain d'intérêt qui s'ensuivit pour la phagothérapie car elles montrèrent que la phagothérapie avait été considérée comme inefficace et obsolète à tort (Alisky *et al.*, 1998 ; Barrow et Soothill, 1997 ; Carlton, 1999 ; Dixon, 2004 ; Grossi, 2006 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001). De nombreux scientifiques prirent le relais et enrichirent le panel d'expériences prouvant l'efficacité des phages. On peut par exemple citer les travaux de Soothill, qui expérimenta cette thérapie sur des modèles murins de sepsis-péritonite à *Acinetobacter baumannii*,

*Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* multirésistants. Il mit en évidence que l'administration intra-péritonéale d'une faible concentration de phages permettait de traiter les infections, hormis celles dues à *Staphylococcus aureus*, pour lesquelles même une dose importante fut sans effets (Soothill, 1992).

Depuis cette redécouverte, la phagothérapie suscite chaque jour de plus en plus d'intérêt (figure 13). Dans la situation actuelle où se trouvent les médecines humaines et vétérinaires modernes, victimes d'elles-mêmes, le traitement par phagothérapie s'apparente pour de nombreux scientifiques à un nouvel espoir pour traiter les infections multirésistantes et endiguer leur propagation.

Figure 13 : Pourcentage de publications contenant le terme "phage therapy"



D'après (Google Ngram Viewer, 2013). L'outil Ngram Viewer est une application créée par le moteur de recherche internet Google. Cet outil recense les publications comportant un terme recherché parmi l'ensemble des publications de l'application Google Books. Il permet ainsi d'observer l'évolution de la fréquence d'un mot à travers le temps. Le graphique présenté ici est le résultat obtenu pour le terme « phage therapy » dans le corpus anglophone entre 1910 et 2008. On observe bien les différentes phases d'intérêt qu'ont traversés les phages : la découverte de 1917 à 1921, l'âge d'or de 1935 à 1945, le déclin de 1945 à 1980, la redécouverte de 1980 à 1995 et enfin le renouveau à partir des années 1995.



---

## DEUXIÈME PARTIE : DESCRIPTION DES BACTÉRIOPHAGES ET DE LA PHAGOTHÉRAPIE

---



# 1 Qu'est-ce qu'un bactériophage

## 1.1 Présentation

Les bactériophages sont des virus spécifiques des cellules procaryotes que sont les bactéries. Ils sont généralement très spécifiques d'une espèce de bactérie, voire de seulement quelques individus au sein de cette espèce. Par contre, plusieurs bactériophages différents peuvent être spécifiques d'une même bactérie.

La quantité de bactéries sur Terre est estimée au total à environ  $5 \times 10^{30}$  cellules bactériennes (Dublanche et Patey, 2011). Étant donné que toutes les bactéries connues peuvent être infectées par plus d'une espèce de virus, les phages représenteraient l'entité biologique la plus abondante et la plus variée sur Terre. L'estimation actuelle de la quantité de bactériophages existants est comprise entre  $10^{30}$  et  $10^{32}$ . On identifie à l'heure actuelle plus de 5 500 phages différents (entre 5000 et 6000, ce qui représenterait apparemment 10 % seulement des phages existants (Biofutur et GEEPhage, 2013), classés à partir de leur morphologie, de leur composition et de leur spécificité d'hôte bactérien (Dublanche, 2009).

## 1.2 Structure et classification

### 1.2.1 Différentes familles

D'après (Dublanche, 2009).

La structure sur laquelle est basée la classification des bactériophages est extrêmement variée. Les critères de classification sont :

- la nature de l'acide nucléique : généralement ADN double brin, parfois ARN simple brin (Inal, 2003) ;
- la forme de la capsid (icosaédrique ou tubulaire) ;
- la présence ou non d'une enveloppe (nommée péplos).

La classification de l'ensemble des virus (phages ou non) est gérée par un comité appelé « International Committee on Taxonomy of Virus », ou ICTV. C'est à lui que revient l'établissement de la nomenclature et de la taxonomie des virus (ICTV, 2012). D'après la banque de données de l'ICTV, 95 % des bactériophages appartiennent à l'ordre des *Caudovirales*. Les virus de l'ordre des *Caudovirales* présentent une structure dite « à symétrie binaire » ou « caudée », c'est-à-dire se composant d'une tête et d'une queue identifiables, et sont partagés en trois familles : les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae*. Les 5 % des phages n'appartenant pas à l'ordre des *Caudovirales* présentent une structure à symétrie non binaire qui peut être soit cubique, soit hélicoïdale, soit complexe (figure 14).

Figure 14 : Les principales familles de bactériophages

Symétrie	Ac. Nucléique	Famille	Genre	Exemple	Espèce	Particularités
Binaire ou caudé	ADN, db, L	<i>Myoviridae</i>	6	T4	1243	Queue contractile
	ADN, db, L	<i>Siphoviridae</i>	6	$\lambda$	3011	Queue longue et non contractile
	ADN, db, L	<i>Podoviridae</i>	3	T7	696	Queue courte
Cubique ou polyédrale	ADN, sb, C	<i>Microviridae</i>	4	$\phi$ X174	40	
	ADN, db, C, E	<i>Corticoviridae</i>	1	PM2	3?	Capside complexe, lipidique
	ADN, db, L	<i>Tectiviridae</i>	1	PRD1	18	Vésicule interne (lipoprotéine)
	ARN, sb, L	<i>Leviviridae</i>	2	MS2	39	
	ARN, db, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	$\phi$ 6	1	Enveloppe lipidique
Hélicoïdal ou filamenteux	ADN, sb, C	<i>Inoviridae</i>	2	fd	57	Filamenteux ou allongés
	ADN, db, L	<i>Lipothrixviridae</i>	1	TTV1	6?	Enveloppe lipidique
	ADN, db, L	<i>Rudoviridae</i>	1	SIRV1	2	Ressemble au TMV
Complexe ou pléiomorphe	ADN, db, C, E	<i>Plasmaviridae</i>	1	L2	6	Enveloppe lipidique, pas de capsid
	ADN, db, C, E	<i>Fuselloviridae</i>	1	SSV1	8?	Fusiforme, pas de capsid
TOTAL					5130	

D'après (Ackermann, 2003). Les bactériophages appartiennent principalement à l'ordre des *Caudovirales*, qui se compose des phages dit « à symétrie binaire », également appelés « phages caudés ». Les autres familles sont minoritaires quantitativement. L'acide nucléique des phages présente des structures variées : ARN ou ADN, et Sb : simple brin, db : double brin, C : circulaire, L : linéaire, E : super-enroulé, S : segmenté.

## 1.2.2 Description générale

D'après (Dublanche, 2009).

La description morphologique suivante se base sur celle du phage T4 (structure comprenant une tête et une queue), un des phages les plus étudiés en laboratoire, appartenant à la famille *Myoviridae* et permet de présenter la structure à symétrie binaire correspondant aux *Caudovirales* ordre comprenant l'écrasante la majorité des phages connus à ce jour.

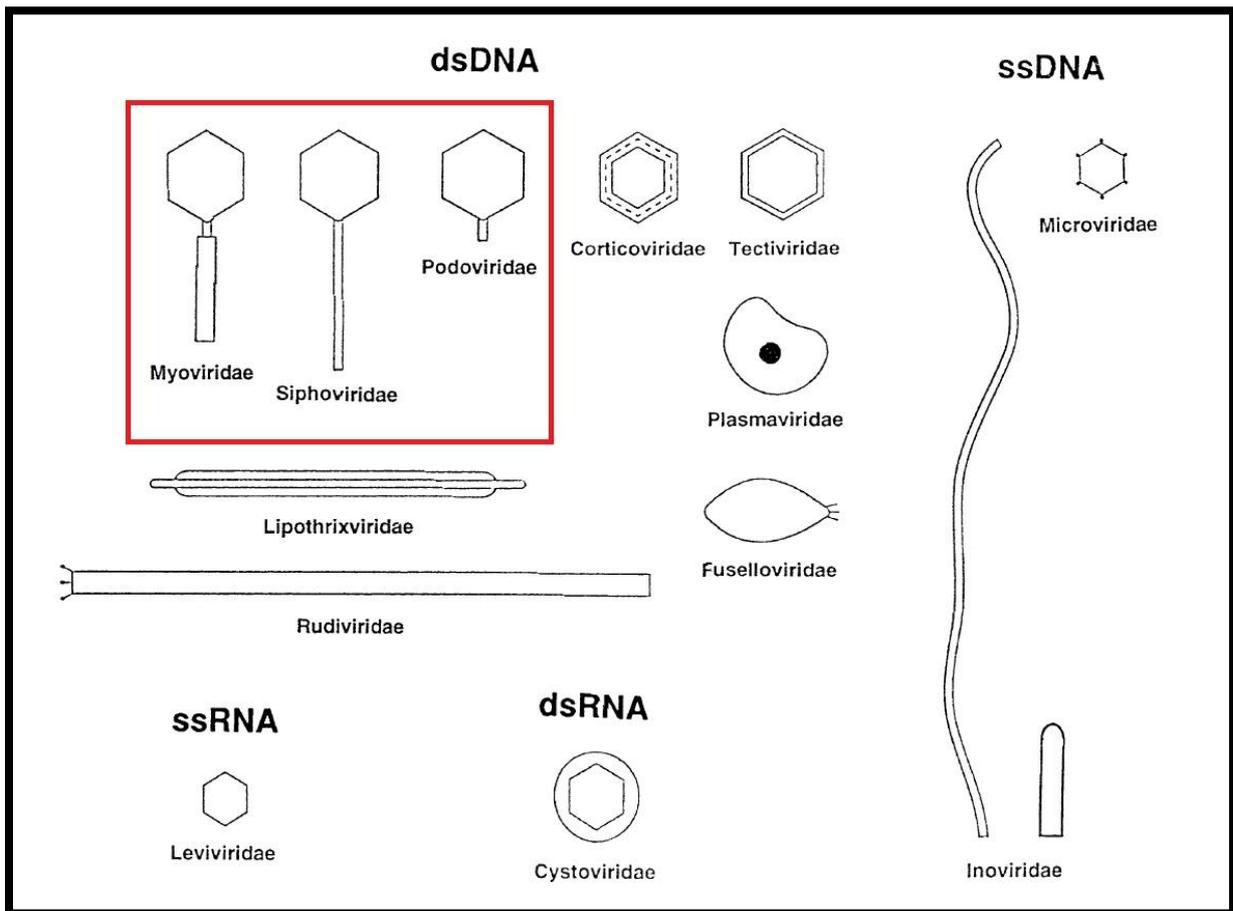
Les bactériophages présentent une taille comprise entre 60 et 300 nanomètres (le phage T4 mesure environ 200 nanomètres), soit environ un centième de la taille moyenne d'une bactérie.

La tête d'un bactériophage se compose d'une capsidie protéique et du génome viral (formé chez le phage T4 d'un ADN double brin). La capsidie de la plupart des phages est sous forme d'un polyèdre (Dublanche, 2009 ; Gilmore, 2012).

La queue du phage, de nature protéique, est nécessaire à l'absorption du virion dans la cellule hôte (Inal, 2003). Elle se présente comme un tube central creux comportant une gaine contractile, 6 fibres caudales et une plaque terminale (Dublanche, 2009).

Cette description vaut pour l'ordre des *Caudovirales*, où sont inclus la majorité des phages, cependant, les familles de phages n'appartenant pas à cet ordre présentent une morphologie plus variée, qui peut être plus ou moins proche de cette description (figure 15). Par exemple, les phages filamenteux, que nous évoquerons rapidement, n'appartiennent pas à l'ordre des *Caudovirales* et leur structure n'est donc pas à symétrie binaire, mais à symétrie hélicoïdale. Ils présentent généralement un ADN simple brin de 6,4 kilobases et mesurent 6,5 nm sur 900 nm. Parmi ces phages on peut citer les phages M13, fd ou f1 (famille des *Inoviridae*) dirigés contre *Escherichia coli* (Ackermann, 2003 ; Calendar et Abedon, 2006).

Figure 15 : Structure des principales familles de phages



D'après (Ackermann, 2003). Cette illustration présente les principales familles de bactériophages selon la nature de leur génome (ssDNA : ADN simple brin, dsDNA : ADN double brin, ssRNA : ARN simple brin, dsRNA : ARN double brin), leur capside et leur enveloppe. Les trois principales familles (encadrées en rouge) sont les *Myoviridae*, les *Podoviridae* et les *Siphoviridae*.

### 1.3 Habitat

Dans la nature, les bactériophages sont extrêmement nombreux. Dans un milieu donné, leur nombre est en général dix, voire cent fois plus élevé que la quantité de bactéries présentes (Dublanche et Patey, 2011). Des bactériophages dirigés contre les archaebactéries ont également été identifiés (Skurnik et Strauch, 2006).

On peut rencontrer des phages dans différents environnements naturels : sur le sol, dans les eaux salées ou douces, sur les surfaces cutanées et muqueuses des êtres vivants (et entre autres dans l'appareil digestif), ...ou plus généralement dans tous les environnements

comportant des bactéries. Ces virus particuliers participent activement à l'évolution des écosystèmes, en détruisant une partie des bactéries, engendrant ainsi un renouvellement de la biomasse bactérienne, ou en interagissant avec les bactéries de telle sorte que des échanges de gènes entre bactéries aient lieu. On estime qu'en règle générale, les bactériophages réduisent la population bactérienne globale de près de moitié toutes les 48 heures (Dublanche, 2009 ; Gilmore, 2012).

Les études datant d'une trentaine d'années parlent d'une population de bactériophages de l'ordre de  $10^7$  par millilitre dans les milieux marins (le milieu aquatique contenant la plus grande quantité de phages étant les eaux usées). On peut trouver en particulier une grande quantité de phages dans les sédiments marins, que l'on estime actuellement à  $10^9$  phages par gramme de sédiment (Dublanche, 2009). Cependant, les études des quinze dernières années ont montré que leur population dans les eaux douces et dans les habitats marins était bien plus importante qu'elle n'avait été imaginée auparavant (Personnic *et al.*, 2006). Dans ces milieux, les bactériophages œuvrent à la dynamique du renouvellement biochimique, en éliminant une partie du bactério-plancton. En effet, la lyse de ce dernier permet de rendre le carbone organique biodisponible, en le faisant passer de l'état particulaire, sous forme de cellules bactériennes, à l'état dissous exploitable, sous forme de produits de lyse (Dublanche, 2009).

## 1.4 Résistance dans l'environnement

Dans les premières recherches de d'Hérelle (d' Hérelle, 1921b), le bactériophage qu'il étudiait pouvait survivre à une température dépassant 65 °C, température létale pour la majorité des bactéries non sporulées, et ce bactériophage était assez difficilement détruits par des agents physiques (chaleur ou rayons ultra-violet par exemple) et chimique (antiseptiques par exemple). Depuis, la recherche a fait des progrès, et a permis de comprendre qu'il n'existait pas un unique bactériophage mais des milliers de type et que chaque bactériophage possédait des caractéristiques différentes. Cependant, certaines caractéristiques sont communes à tous les bactériophages, notamment leur résistance aux milieux extrêmes, généralement meilleure que celle des bactéries (Dublanche, 2009). D'après certains auteurs (Dublanche et Patey, 2011) et (Dublanche, 2009), nombre de ces virus peuvent survivre des semaines à des années dans différents milieux (aqueux ou non) et ainsi demeurer dans les

milieux les plus arides tels que les déserts chauds ou froids, à l'instar des phages observés dans le désert du Chihuahua au Mexique (Souza *et al.*, 2006), les sources chaudes ou les fosses marines où la pression est énorme. De nombreux phages demeurent virulents malgré une exposition à une température supérieure à 60 °C, à des rayons ultra-violet, à de multiples antiseptiques ou à des milieux alcalins ou acides (Dublanche, 2009).

D'après Stephan Jacquet, chercheur à l'Institut Pasteur, il existerait des variations saisonnières de la quantité de bactériophages dans un milieu donné, en fonction de la température extérieure, de l'intense du rayonnement ultra-violet, etc. Ainsi, la population de phages serait 100 fois plus importante en été qu'en hiver. L'étude des populations bactériennes hôtes correspondantes dans un milieu donné montre quant à elle qu'une diminution de population bactérienne existe également, en parallèle de celle des bactériophages, mais qu'elle serait d'un facteur bien inférieur. La corrélation entre les variations des deux populations est cependant délicate à interpréter (Jacquet, 2007).

## 2 Plusieurs types d'invasion de la cellule bactérienne

D'après (Dublanche, 2009).

On discerne trois types de bactériophages : les phages dits « virulents » ou « lytiques », représentant près de 90 % des bactériophages, ceux dits « tempérés » ou « endogènes » représentant environ 10 % et ceux dits « filamenteux », bien plus minoritaires (moins d'1 %). Parmi tous les bactériophages existants, les plus étudiés sont le phage T4, appartenant aux phages virulents, et le phage  $\lambda$ , appartenant aux phages tempérés. Le type de cycle qui nous intéresse pour les traitements thérapeutiques correspond au cycle des phages virulents, appelé « cycle lytique » ; nous utiliserons donc le phage T4 comme modèle dans notre étude.

Le cycle dit « lysogène » ou « lysogénique », correspondant à celui des phages tempérés, ne sera évoqué que brièvement car il n'est pas exploitable pour la phagothérapie.

La différence principale entre les deux principaux types de phages (virulents et tempérés) réside dans leur comportement vis-à-vis de la bactérie après intrusion : un phage lytique va directement détruire la bactérie, tandis qu'un phage tempéré va intégrer son génome à celui du chromosome bactérien, rester « silencieux » un temps et se multiplier avec lui (Inal, 2003).

Le troisième type de phages existant, appelé phage filamenteux ne sera que très peu abordé car ses représentants sont rares et son cycle, nommé cycle chronique, non exploitable pour la phagothérapie (comme le cycle lysogène). Après pénétration dans la bactérie hôte, ce phage ne va pas la lyser mais va produire en continu de nombreux phages par bourgeonnement de la membrane bactérienne (Ackermann, 2003).

Il existe un quatrième type de cycle de reproduction, nommé pseudo-lysogénie. Il s'agit d'un intermédiaire entre les cycles lytiques et lysogéniques, au cours duquel le génome viral ne s'intègre pas au génome de la cellule hôte, et demeure latent dans le cytoplasme. Ce cycle reste encore mal compris (Grossi, 2006).

## 2.1 Principe du cycle chronique (phages filamenteux)

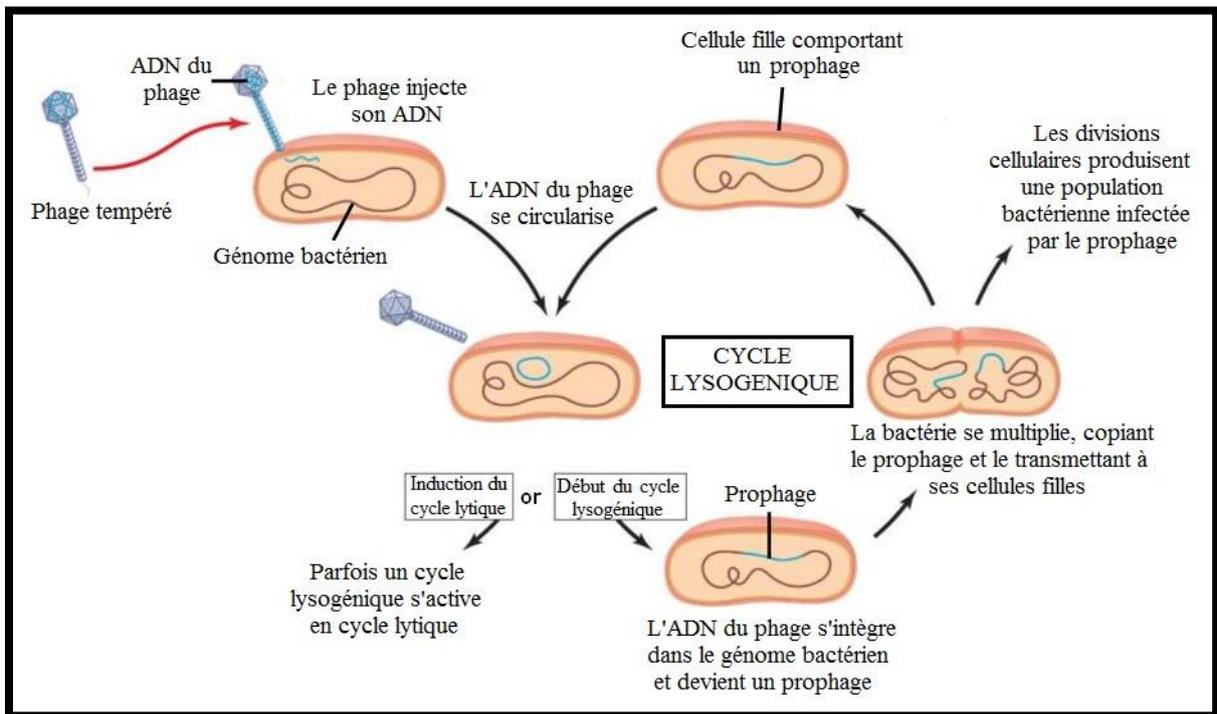
La durée d'un cycle de réplication typique chez les phages filamenteux varie entre 10 et 15 minutes. Lors de ce cycle, le phage se fixe sur la membrane de la bactérie à partir du pili sexuel bactérien et injecte son ADN dans la bactérie. L'ADN viral introduit dans la cellule bactérienne est converti de simple brin à double brin puis répliqué et transcrit en ARNm ; les ribosomes bactériens traduisent ensuite les ARNm en protéines de la capsid virale, qui s'insèrent ensuite dans la membrane bactérienne, et s'assemblent entre elles en entourant un nouveau brin d'ADN viral, tout en traversant la membrane bactérienne jusqu'à être totalement excrétées sous forme de nouveaux virions. Cette invasion ne détruit généralement pas les bactéries et n'est donc pas intéressante en ce qui concerne la phagothérapie (Ackermann, 2003).

## 2.2 Principe du cycle lysogénique (phages tempérés)

Le cycle lysogénique, aussi nommé « lysogénisation » (Dublanche et Patey, 2011), a lieu lorsqu'un phage tempéré pénètre dans une cellule bactérienne (figure 16). Le génome du phage s'insère dans celui de la bactérie et devient dès lors partie intégrante de celle-ci (on appelle le génome viral intégré « prophage »). La réplication de ce matériel génétique a ainsi lieu en même temps que celui de la bactérie. Celle-ci, dont le chromosome bactérien a été envahi, transmet ensuite lors de sa division ce nouveau patrimoine génétique à sa descendance (Dublanche, 2009).

Cet état « silencieux » demeure jusqu'à ce qu'à un moment donné, le cycle lysogénique s'active en cycle lytique et que le génome du phage s'excise du chromosome bactérien. Ce changement d'état est relativement rare : un cas pour 100 000 phages tempérés environ (Dublanche, 2009), mais sa fréquence est augmentée lors d'un stress, induit par exemple par des rayons ultra-violets, des rayons X ou des substances chimiques comme des oxydants.

Figure 16 : Schéma d'un cycle lysogénique



D'après (Chen, 2008). Lors du cycle d'un phage tempéré, le génome phagique va s'intégrer au génome bactérien et prendre le nom de « prophage ». Ce prophage peut être transmis par transfert bactérien vertical (cellule mère à cellule fille) ou horizontal (entre deux bactéries sans lien de parenté). Parfois le cycle lysogénique s'active en cycle lytique notamment à l'occasion d'un stress.

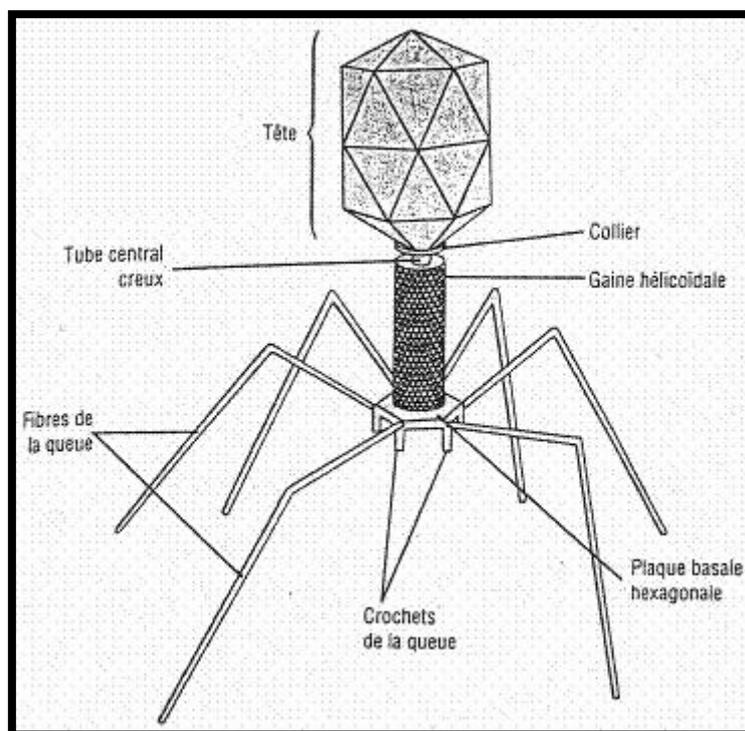
### 2.3 Principe et étapes du cycle lytique (phages virulents)

Contrairement aux phages tempérés, les bactériophages virulents possèdent la capacité de se multiplier selon leur propre rythme, et non pas au gré des divisions bactériennes. La reproduction d'un tel phage permet d'engendrer simultanément plusieurs dizaines de virus tous identiques. Pour décrire ce cycle, le microbiologiste Mark Müller a déclaré « Les bactéries ne meurent pas, elles explosent en multiples phages. »

Un cycle lytique complet prend quelques minutes à maximum une heure pour se réaliser. À côté de cela, la réplication bactérienne ne permet, dans les conditions optimales, de générer que deux bactéries filles toutes les demi-heures chez les espèces bactériennes à développement rapide. Cette réplication dichotomique bactérienne n'est pas en mesure de résister à une lyse par les dizaines, et même les centaines de bactériophages produits lors de leur réplication. Une colonie bactérienne entière même abondante est ainsi rapidement détruite par le nombre de bactériophages à croissance exponentielle (Dublanche, 2009).

Pour étudier le cycle lytique, comme indiqué précédemment, Je vais me baser sur le phage T4 (figure 17). Ce phage, dirigé contre la bactérie *Escherichia coli*, a fait l'objet de multiples études pendant de très nombreuses années (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Sa séquence nucléotidique, complètement décryptée dans les années 1990 (Miller *et al.*, 2003) est accessible *via* le site internet du Centre National pour l'Information Biotechnologique (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) sous les dénominations AF158101 (au sein de la base de données GenBank) et NC\_000866 (au sein de la base de données NCBI) (NCBI, 2005).

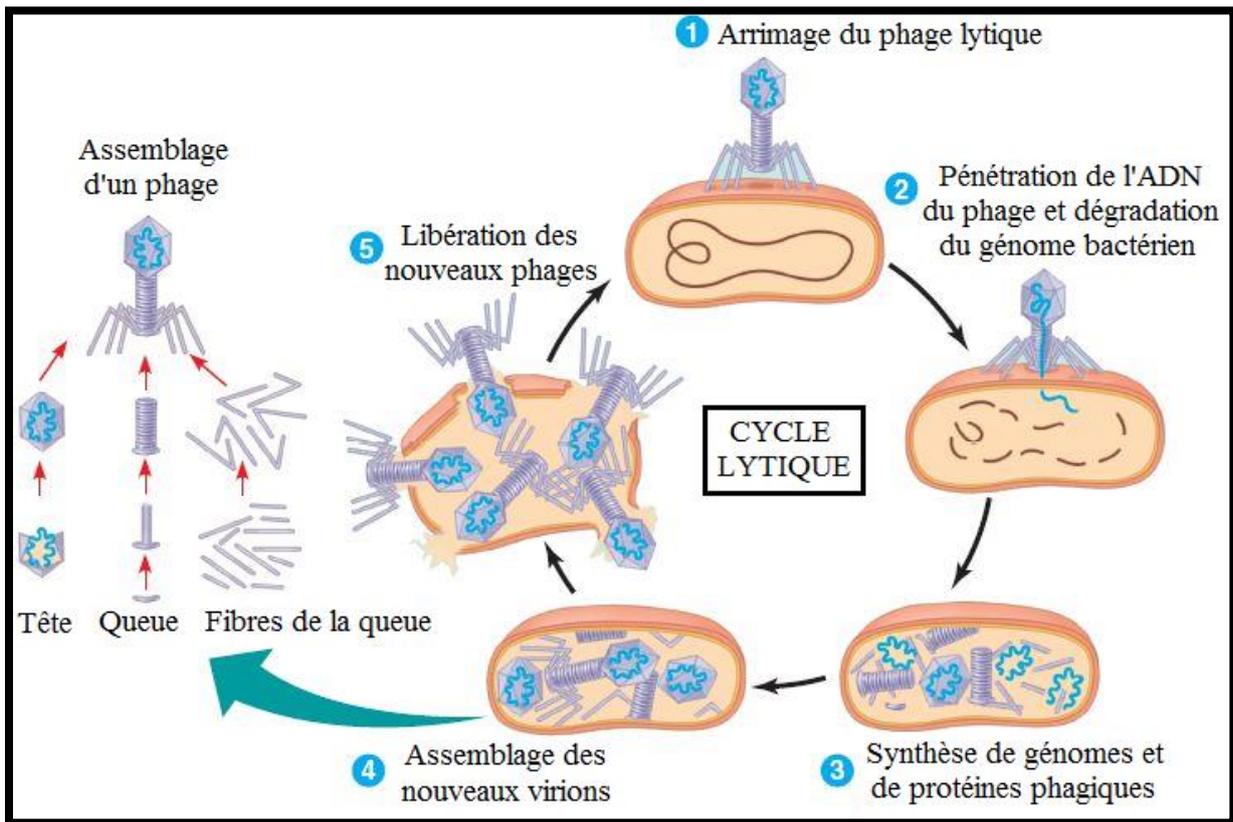
Figure 17 : Schéma d'un phage T4



D'après (Biologie marine, 2006). Le bactériophage T4, phage virulent appartenant à la famille des *Myoviridae*, se compose d'une tête comportant une capsidie polyédrique et un ADN double brin, et d'une queue sur laquelle se situent entre autres des éléments essentiels à l'arrimage du phage sur une bactérie : des fibres (LTF, *long tail fibers*), des crochets (STF, *side tail fibers*) et une plaque basale.

Son cycle lytique est aujourd'hui bien décrit et semble être représentatif de la plupart des cycles lytiques que suivent les autres types de phages virulents (figure 18). L'étude de ce cycle a révélé la complexité de son mécanisme consistant en une cascade événementielle impliquant de nombreux gènes régulateurs et structuraux.

Figure 18 : Schéma du cycle lytique



D'après (Chen, 2008). Lors d'un cycle lytique, un phage virulent va pénétrer au sein de la cellule bactérienne, détruire le génome bactérien, en détourner la machinerie pour produire des éléments constitutifs de nouveaux phages et enfin lyser la bactérie pour libérer ces nouveaux virions.

### 2.3.1 Arrimage

La fixation d'un bactériophage sur la membrane plasmique d'une bactérie fait intervenir deux types de structures : une ou plusieurs fibres caudales du bactériophage, et des molécules particulières situées à la surface de la membrane externe de la bactérie hôte qui vont jouer le rôle de « récepteurs » pour le virus. Dans le cas du phage T4, par exemple, plusieurs fibres caudales, dont les six fibres caudales longues (LTF, *long tail fibers*), vont venir se fixer aux lipopolysaccharides (LPS) et aux protéines membranaires C (OmpC). Cette fixation, souvent réversible, permet un rapprochement du virus et de la bactérie. S'en suit un changement de conformation des fibres qui signale au plateau situé à la base de la queue du phage que l'attachement est correctement en place. Ce plateau va alors lui aussi se placer sur la membrane bactérienne sur le site adéquat pour injecter le génome viral. De nouvelles fibres vont s'accrocher à des molécules de surface bactériennes pour stabiliser l'attache : pour le

phage T4, il s'agit de 6 fibres caudales courtes (STF, *side tail fibers*) dont l'attache est irréversible. Ces nouvelles fixations vont entraîner un changement de conformation du plateau (pour le phage T4, passage d'une conformation hexagonale à une conformation en étoile) et vont être à l'origine d'une contraction de la gaine contractile de la queue. Toutes ces étapes de fixation durent environ dix secondes et l'ensemble s'appelle l'arrimage (Dublanche, 2009).

### 2.3.2 Entrée du génome viral et réplication

Une enzyme du phage perce la paroi cellulaire de la bactérie, ce qui permet à l'axe central rigide de la queue de traverser cette paroi. L'extrémité de cet axe entre en contact avec la membrane plasmique de la bactérie et interagit avec des molécules membranaires : pour le phage T4, il s'agit de lipides particuliers comme des phosphatidylglycérols ou des cardiolipides. Cette interaction entraîne la perforation de la membrane bactérienne.

Le génome du phage se retrouve éjecté de la capsid virale vers le cytoplasme bactérien, tandis que la capsid reste à l'extérieur. Ce génome exogène détourne alors le métabolisme de la cellule hôte à son profit : une endonucléase découpe l'ADN bactérien en de nombreux fragments inactifs, puis le génome viral puise dans les réserves d'énergie de la bactérie et se sert des ribosomes hôtes pour se reproduire et pour synthétiser différentes protéines nécessaires à la formation de nouvelles particules virales. Tous ces nouveaux éléments viraux sont ensuite assemblés pour composer les nouveaux virus, tous similaires au phage infectant initial. (Dublanche, 2009).

### 2.3.3 Libération des nouveaux phages

En plus des protéines utilisées dans l'assemblage des nouvelles unités virales, le phage force la synthèse d'enzymes lysozymiales destinées à détruire la membrane bactérienne après la constitution d'une quantité importante de nouveaux virions. L'éclatement de la bactérie hôte permet alors la libération de dizaines de nouveaux virus qui, à leur tour, attaquent les bactéries voisines (Dublanche, 2009).

## 3 La phagothérapie

### 3.1 Principe

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

En pratique, il existe deux protocoles de phagothérapie : soit on administre un cocktail de bactériophages, soit un phagogramme est pratiqué (à l'image des antibiogrammes pour les antibiotiques) pour cibler la bactérie incriminée et choisir le phage lui correspondant, les bactériophages étant très spécifiques d'une espèce de bactérie, voire de seulement quelques souches dans cette espèce. Utiliser un bactériophage qui ne correspondrait pas la bactérie ciblée serait inefficace.

L'avantage du cocktail de phages réside dans le large spectre couvert par son utilisation et par le risque moindre de se confronter à des résistances (cf. partie III). Ce type d'application est compatible avec une utilisation en urgence.

La méthode plus ciblée nécessite l'isolement de la bactérie, ce qui prend plus de temps et peut s'avérer plus compliqué. Une fois isolée, la bactérie est testée *in vitro* grâce aux nombreux phages disponibles dans une collection de bactériophages étudiés auparavant et nommée phagothèque. D'après Stephen T. Abedon, une étude russe aurait montré que la phagothérapie serait généralement plus efficace si elle était pratiquée de façon ciblée, et cette technique serait de ce fait devenue la technique généralement utilisée pour traiter les infections en Pologne (Abedon *et al.*, 2011).

## 3.2 Pharmacologie

À l'orée de la découverte du pouvoir thérapeutique des bactériophages, avant même de bien connaître la nature exacte de ces virus, quelques études se sont penchées sur leur pharmacologie. Les nombreuses lacunes scientifiques de l'époque ont quelque peu faussé certaines interprétations de ces travaux, mais les résultats demeurent pour le moins intéressants.

### 3.2.1 Pharmacocinétique

La pharmacocinétique traite du devenir d'une substance au sein d'un organisme. Elle se divise en quatre phases (CHUPS, 2006) :

- l'absorption : la substance passe du milieu extérieur vers la circulation sanguine ;
- la diffusion : la substance, passée dans la circulation systémique, va migrer dans les différents organes, en se liant ou non à des protéines plasmatiques ;
- la métabolisation : la substance est transformée par les organes du corps ;
- l'élimination : la substance, inchangée ou transformée lors de la métabolisation, est éliminée de l'organisme.

D'après Sulakvelidze et ses collaborateurs, peu d'études explorent la pharmacocinétique des préparations thérapeutiques de phages (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

#### 3.2.1.1 Absorption

Lors de la phase d'absorption, la molécule doit être capable de traverser les membranes biologiques pour atteindre la circulation systémique. Il peut s'agir des parois stomacale ou intestinale, de la peau, de muqueuse diverses, ...

Au début des études pharmacologiques, quelques travaux ont mis en évidence la présence de phages dans la circulation sanguine des animaux et des humains, qu'ils soient malades ou sains. Les scientifiques se sont alors interrogés sur l'origine de cette « phagémie »

et ont étudié la possibilité d'un passage de la barrière gastro-intestinale par les phages, qu'ils ont nommé « translocation phagique ». La durée déterminée pour ce passage varie d'une étude à l'autre. Keller et Engley ont par exemple montré, en 1958, que des phages, introduits dans le tube digestif de souris, étaient retrouvés cinq minutes après dans le sang. Une autre étude, citée par l'équipe de Górski et réalisée par Reynaud en 1992 chez le lapin parle d'un délai de quatre jours pour cette absorption (Górski *et al.*, 2006b).

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

Concernant l'être humain, très peu de documents traitent de l'absorption des bactériophages. L'équipe de Górski relate une étude réalisée par Weber-Dabrowska en 1987 dans laquelle le scientifique atteste de la présence de bactériophages dans le flux sanguin de patients au bout de dix jours de traitements oraux par phagothérapie contre diverses infections (Górski *et al.*, 2006b).

### 3.2.1.2 Diffusion

Il a tout d'abord été mis en évidence, par les travaux d'Appelmans en 1921, que des phages injectés par voie intraveineuse disparaissaient de la circulation sanguine en deux heures (Appelmans, 1921). Cela signifiait qu'il y avait potentiellement une migration des particules virales du sang vers un autre compartiment. La question était à présent de savoir où ces particules diffusaient.

Des études russes réalisées par Bogovazova en 1991 et 1992 et relatées par l'équipe de Sulakvelidze indiquent qu'après administration orale de phages à des animaux de laboratoire, on les retrouve deux à quatre heures après dans la circulation sanguine, puis dix heures après dans divers organes comme le foie, les reins ou la rate (Sulakvelidze *et al.*, 2001).

D'après l'équipe de Górski, certains auteurs décrivent une possible liaison entre des bactériophages et des érythrocytes. C'est le cas de Bystricky en 1964 ainsi que celui de Reynaud en 1992 à propos de coliphages CF 0103. D'autres affirment n'avoir pas trouvé de liaisons, comme Keller et Engley en 1958 à propos de coliphages T1 (Górski *et al.*, 2006b).

D'autre part, il a été également montré, grâce aux travaux minutieux de l'équipe de Dubos, que des phages injectés par voie intrapéritonéale à des souris, saines ou présentant une encéphalite causée par *Shigella dysenteriae*, étaient décelés au sein de leur encéphale, dans une très forte proportion lorsqu'ils s'agissaient des souris infectés, témoignant d'une dissémination vers le cerveau et, lors d'infection, de la multiplication des phages sur le lieu d'infection (Dubos *et al.*, 1943).

Il y a donc une dissémination des bactériophages dans différents organes de l'organisme, et notamment dans les organes où se situe l'infection bactérienne ciblée. Cependant, Skurnik et Strauch affirment, sans les citer, que certaines parties de l'organisme ne permettraient pas une bonne diffusion des bactériophages jusqu'à la zone d'infection (Skurnik et Strauch, 2006).

### 3.2.1.3 Métabolisation

Sur ce point, les travaux d'Evans ont montré, en 1933, l'inhibition *in vitro* de la capacité de phagocytose des phages lors de mise en contact avec du sang, du pus, de la bile ou de la salive (Evans, 1933). Bien plus tard, Smith et Huggins ont observé une inactivation des phages par l'acidité de l'estomac, par des anticorps dirigés contre ces phages ou par une température non optimale (Smith *et al.*, 1987).

La mise en évidence par Evans de l'inactivation des phages par certains fluides corporelle plongea, à cette époque, les scientifiques dans le doute concernant l'efficacité de la phagothérapie. Ces observations *in vitro* ne concordaient pas avec la réussite des traitements généralement observée *in vivo*. Les scientifiques avaient remarqué une activité immunogène lors d'administration de suspensions de phages. Certains ont alors supposé que les réussites thérapeutiques observées n'étaient pas dues au pouvoir bactéricide des bactériophages, mais aux débris bactériens présents au sein des suspensions (les suspensions n'étant effectivement

pas toujours correctement purifiées) susceptibles de stimuler le système immunitaire adaptatif ou à l'introduction de protéines (la capsid des phages étant elle-même de nature protéique) à même d'induire une réponse immunitaire innée (Krueger et Scribner, 1941). Cependant, il n'existait à cette époque pas vraiment d'alternative au traitement des infections bactériennes et les médecins continuèrent donc de prescrire des suspensions de bactériophages. Les mécanismes mis en jeu restèrent obscurs jusqu'à la véritable compréhension de la nature et du fonctionnement des bactériophages.

#### 3.2.1.4 Élimination

De nombreux travaux témoignent de l'élimination des bactériophages dans l'urine ou dans les fèces. La présence de phages dans les fèces est par exemple démontrée par les expériences de Smith et Huggins portant sur plusieurs phages administrés oralement à des veaux (Smith *et al.*, 1987), ou plus tard lors de celles de Bruttin et Brüssow portant sur des phages T4 administrés oralement à des humains cette fois-ci (Bruttin et Brüssow, 2005).

Cette élimination s'effectue après une période plus ou moins longue (jusqu'à plusieurs jours) de persistance des phages au sein de l'organisme (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Lors de ses travaux, l'équipe de Merrill a réussi à sélectionner *in vivo* des bactériophages mutants dont la persistance dans le corps était accrue grâce à un mécanisme d'échappement par rapport au système immunitaire, et qui présentaient en plus une meilleure efficacité thérapeutique (Merril *et al.*, 1996).

### 3.2.2 Pharmacodynamique

#### 3.2.2.1 Effets anti-infectieux

Pendant longtemps, peu d'études véritablement ciblées sur la pharmacodynamique ont été publiées. De nombreux travaux expérimentaux dont le but était plutôt d'étudier les résultats de la thérapie ont livré quelques informations sur ce domaine mais les informations devraient être considérées avec précaution du fait du manque de méthodologie scientifique

pour certaines publications. Des travaux plus récents et plus fiables ont vu le jour à la suite de la redécouverte des bactériophages par les pays occidentaux.

Plusieurs scientifiques se sont intéressés à la dynamique de population des bactériophages au sein de l'organisme et ont élaboré des modèles mathématiques théoriques pour la décrire (Bull *et al.*, 2002 ; Levin et Bull, 2004 ; Payne et Jansen, 2001, 2000) ou se sont basés sur des études plus expérimentales (Kasman *et al.*, 2002 ; Weld *et al.*, 2004).

Par exemple, dans leur étude sur ce point, Kasman et ses collaborateurs ont confirmé les informations déjà présentées auparavant par Wiggins et Alexander. Tout d'abord, ils ont indiqué que l'interaction entre phage et bactérie était, comme pour tous les virus, due à une collision aléatoire entre les deux éléments. Ensuite, ils ont observé qu'une trop faible population bactérienne ne permettait pas un bon développement de la population des bactériophages, et ont donc conclu à l'existence d'un seuil de densité bactérienne nécessaire à atteindre pour la bonne prolifération des phages. Dans le cas d'une faible concentration bactérienne initiale, la population bactérienne met du temps à atteindre la densité nécessaire à une augmentation de la concentration en bactériophages. Il apparaît de plus qu'une faible probabilité de rencontre entre phages et bactéries, selon le site d'infection, le nombre de phage administrés, etc., augmenterait la valeur de ce seuil, et vice versa (Kasman *et al.*, 2002 ; Skurnik et Strauch, 2006 ; Wiggins et Alexander, 1985).

Ainsi, débiter une phagothérapie au plus tôt est primordial pour la guérison, mais la débiter trop tôt, c'est-à-dire alors qu'il n'y a encore qu'une faible population bactérienne au niveau du site d'infection, ne permettrait pas aux phages de se propager et ceux-ci seraient éliminés de l'organisme avant même d'avoir initié un début de thérapie.

### 3.2.2.2 Interaction avec le système immunitaire

Il est reconnu que les protéines, surtout sous forme d'assemblage particulière, sont très souvent fortement immunogènes lorsqu'elles sont introduites dans un organisme. De plus, normalement, le système immunitaire de tout être vivant réagit à l'intrusion d'un agent infectieux (virus, bactérie ou parasite). La capsid des bactériophages étant de nature

protéique et le phage lui-même étant un virus, il est donc légitime de s'intéresser aux effets immunologiques que peut induire l'introduction de bactériophages dans un organisme.

La recherche a établi que les phages diffusant dans un organisme étaient reconnus comme des intrus par le système immunitaire de cet organisme (Dublanche et Patey, 2011). Diverses expériences ont été menées sur de nombreuses espèces de phages en ciblant différents facteurs tels que le mode d'administration, et ont permis d'observer que, selon les cas, il existait une immunostimulation, une immunosuppression ou encore une immunotolérance (Beckerich et Hauduroy, 1922b).

#### 3.2.2.2.1 Réponse immunitaire innée

##### 3.2.2.2.1.1 *Macrophages*

Dans les premières études pharmacologiques sur la clairance des bactériophages, ceux-ci apparaissaient principalement éliminés par le système réticulo-endothélial (notamment par les macrophages, et en particulier ceux du foie nommés cellules de Küpffer). Ce phénomène a été expliqué par Nungester et Watrous dans leur travaux démontrant l'accumulation de phages dans le foie et la rate avant élimination (Nungester et Watrous, 1934), puis a été confirmé par Inchley dans son étude concernant l'action des cellules de Küpffer, étude dans laquelle il indiquait que l'accumulation de phages actifs la plus importante se situait dans le foie (Inchley, 1969). *A contrario*, l'équipe de Geier a, de son côté, observé une accumulation plus importante de phages actifs dans la rate que dans le foie, et ce indépendamment de la voie d'administration (Geier *et al.*, 1973). Les publications d'Inchley et de l'équipe de Geier s'accordaient cependant sur la moindre vitesse d'inactivation des phages dans la rate par rapport à celle survenant dans les autres organes et en particulier dans le foie, traduite par la persistance d'une concentration significative de phages dans la rate plusieurs jours après l'inoculation de ces phages. D'après Kaur, cette faible inactivation décrite à propos des macrophages de la rate pourrait avoir pour conséquence une mise en mémoire plus efficace des lymphocytes B vis-à-vis des phages qui permettrait à terme réponse immunitaire adaptative plus efficace contre ces phages (Kaur *et al.*, 2012).

Néanmoins, les travaux plus récents menés par l'équipe de Srivastava suggèrent que les macrophages ne joueraient pas un rôle si important dans l'inactivation des phages (Srivastava *et al.*, 2004).

#### 3.2.2.1.2 Polynucléaires

Les bactériophages sont incapables d'activer les polynucléaires. Toutefois, ceux-ci, une fois activés, seraient capables d'inactiver les bactériophages. Cette inactivation est supposée être causée par l'acide hypochloreux libéré par les polynucléaires activés (Górski *et al.*, 2012 ; Kurzepa *et al.*, 2009).

Cependant, certaines expériences laissent entendre que l'inactivation des bactériophages pourrait ne pas être due à l'activité des macrophages (Srivastava *et al.*, 2004) ou à celle des polynucléaires (Uchiyama *et al.*, 2009)

#### 3.2.2.1.3 Lymphocytes NK

D'après Srivastava et ses collaborateurs, les lymphocytes NK (*natural killers*) n'auraient pas de rôle dans l'inactivation des phages, puisque, dans leur expérience, des sujets dépourvus de lymphocytes NK présentent une inactivation des phages similaires à ceux présentant ces lymphocytes NK (Srivastava *et al.*, 2004).

#### 3.2.2.1.4 Cellules dendritiques

L'équipe de Barfoot a démontré, à grand renfort de clichés de microscopie électronique, que les cellules dendritiques phagocytèrent les bactériophages relativement rapidement (Barfoot *et al.*, 1989).

### 3.2.2.2.2 Réponse immunitaire adaptative

#### 3.2.2.2.2.1 Réponse immunitaire à médiation humorale

D'après Jerne, la majorité des anticorps observés lors d'administration de bactériophages sont des anticorps neutralisants. Ces anticorps, s'ils se lient aux protéines nécessaires au bon fonctionnement du cycle phagique, vont bloquer la pénétration des phages dans les bactéries. En revanche, si la liaison concerne d'autres protéines, on n'observe pas de modifications (Jerne, 1956).

Lorsqu'il s'agit d'une exposition primaire à un phage, l'hôte, dit « naïf » ou « non immun », ne présenterait qu'une faible concentration d'anticorps anti-phages (Jerne, 1956). La présence d'anticorps anti-phage avant même l'administration de phages s'expliquerait par l'omniprésence des phages dans la nature donnant lieu à une exposition de l'être humain dès la naissance et le développement de ces anticorps suite à cette exposition, une sorte de constante immunisation naturelle (Abedon *et al.*, 2011 ; Górski et Weber-Dabrowska, 2005).

Après administration intraveineuse de bactériophages, on observe une importante concentration d'anticorps anti-phage, témoignant d'une augmentation de leur production (Jerne, 1956). Clark et son équipe ont montré qu'administrer ainsi des phages  $\phi$ X174 engendrait la production d'anticorps, et ce même chez des patients immunodéprimés (Clark *et al.*, 2006). Autre point, Srivastava et ses collaborateurs ont remarqué que la clearance des phages T7 dans le sang de souris était plus lente lorsque ces animaux étaient déficients en lymphocytes B (Srivastava *et al.*, 2004).

Tout porte à croire que les anticorps neutralisants dirigés contre les phages pourraient diminuer l'efficacité de leur pouvoir bactéricide et ainsi affecter le rendement de la phagothérapie. Cependant, il a été démontré que cette réponse immunitaire était variable d'un phage à l'autre, et que certains phages étaient par ailleurs très peu immunogène (pour obtenir une concentration détectable d'anticorps, plusieurs injections complémentées d'adjuvants étaient nécessaires). On rapporte également qu'après administration à des patients de traitements phagiques par voie orale, aucune augmentation du titre d'anticorps n'a été observée, contrairement aux traitements par voie intraveineuse (Górski *et al.*, 2012)

Cependant, d'autres substances telles que des fragments de bactéries ou des toxines dues aux suspensions utilisées ou à la lyse bactérienne par bactériophagie, comme du LPS par exemple, pourraient également interagir avec le système immunitaire et biaiser les résultats.

#### *3.2.2.2.2 Réponse immunitaire à médiation cellulaire*

Lors de la pénétration d'un virus dans l'organisme, une réponse immunitaire à médiation cellulaire (reposant sur les lymphocytes T) se met en place. Dans le cas des phages, les publications traitant de ces lymphocytes sont extrêmement rares (Górski *et al.*, 2012).

L'équipe de Srivastava rapportent néanmoins que, lors d'administration de phages à des sujets immunocompétents et à d'autres déficients en lymphocytes T, il en résulte une cinétique des phages similaire. Ces résultats penchent donc pour l'absence de rôle significatif des lymphocytes T dans le cadre d'une phagothérapie, et ce malgré la phagocytose des phages par les cellules dendritiques impliquées dans l'activation des lymphocytes T (Srivastava *et al.*, 2004).

#### *3.2.2.2.3 Action immunomodulatrice*

##### *3.2.2.2.3.1 Effets sur les cellules de l'immunité innée*

###### *3.2.2.2.3.1.1 Modulation de la phagocytose*

Plusieurs auteurs rapportent que certains phages diminueraient le pouvoir de phagocytose des monocytes vis-à-vis des bactéries. La phagocytose des bactéries par les granulocytes (aussi appelé polynucléaires) se montre, elle, soit inchangée, soit augmentée, soit diminuée, en fonction des phages, des bactéries et des doses employées (Górski *et al.*, 2012).

L'équipe de Weber-Dabrowska a également remarqué que l'utilisation de phages accélérerait le renouvellement des polynucléaires neutrophiles se traduisant par une augmentation de formes immatures et en parallèle une diminution des formes matures (Weber-Dabrowska *et al.*, 2002).

#### 3.2.2.2.3.1.2 Réduction des dérivés réactifs de l'oxygène

Lors d'infection bactérienne, les polynucléaires libèrent des dérivés réactifs de l'oxygène comme des radicaux libres ou des peroxydes. Ces dérivés réactifs de l'oxygène sont utiles dans l'élimination des bactéries, mais leur présence en excès peut induire un stress oxydatif néfaste pour l'organisme, d'où l'importance d'évaluer ce paramètre pour déterminer l'innocuité ou non des phages. Les travaux de Miedzybrodzki et son équipe ont montré qu'en présence de bactériophages, cette libération était atténuée et n'engendrait donc pas de risque de stress oxydatif pour l'organisme (Kaur *et al.*, 2012 ; Miedzybrodzki *et al.*, 2008).

#### 3.2.2.2.3.1.3 Effets sur les lymphocytes NK

Peu d'études s'intéressent aux lymphocytes NK. Pourtant, l'équipe de Górski indique que ce type cellulaire subirait potentiellement une modulation par la phagothérapie. Leur étude a révélé que leur nombre serait diminué lors d'administration intrarectale de bactériophages après 49 à 84 jours de traitement (selon les sujets). En revanche, aucune modulation n'a été observée après application topique ou administration orale (Górski *et al.*, 2012).

#### 3.2.2.2.3.1.4 Diminution de l'activité des cellules dendritiques

Les publications de l'équipe de Górski attestent d'une diminution de l'activité phagocytaire des cellules dendritiques lors d'une administration orale, laquelle aurait pour conséquences d'empêcher leur activité pro-inflammatoire (Górski *et al.*, 2006b).

#### 3.2.2.2.3.2 Effets sur les lymphocytes B et T

Là encore, les observations expérimentales sont contradictoires. Lors de leurs expériences, l'équipe de Gorski a remarqué qu'une préparation purifiée de phage T4 inhibait l'activation et la prolifération des lymphocytes T chez l'homme (Górski *et al.*, 2006a). D'un autre côté, les études menées par Zimecki et ses collaborateurs ont démontré l'existence d'une

stimulation des splénocytes par des phages dirigés contre *Staphylococcus aureus* (Zimecki *et al.*, 2003).

#### 3.2.2.2.3.3 Effets sur la production de cytokines

La modulation affectant la production de cytokines varie également en fonction des phages testés et des infections étudiées (Górski *et al.*, 2012).

Les scientifiques ont observé l'augmentation de certaines cytokines après inoculation de préparation phagiques. Par exemple, selon Zimecki, l'administration d'une préparation purifiée de phages contre *Staphylococcus aureus* aurait pour conséquence d'activer la production d'IL-6 dans les splénocytes cultivés *in vitro* (Zimecki *et al.*, 2003).

D'autres travaux démontrent une diminution de la concentration de certaines cytokines dans l'organisme. Les travaux de Kumari et son équipe montrent par exemple une diminution des IL-1b, des TNF- $\alpha$  et des IL-10 dans le sérum et dans les poumons de souris traitées par des phages contre une infection à *Klebsiella pneumoniae* (Kumari *et al.*, 2010). Cette diminution des cytokines IL-6 et TNF- $\alpha$  induites par l'administration de suspensions de bactériophages a également été observée par l'équipe de Debarbieux lors de travaux sur des infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* (Debarbieux *et al.*, 2010).

Enfin, l'équipe de Weber-Dabrowska a montré que chez l'homme, lors de phagothérapie, la production de cytokines était effectivement modulée et que, par ailleurs, cette modulation se réalisait en fonction du niveau de TNF- $\alpha$  des patients préalablement au traitement. Ceux dont le niveau était faible ou moyen voyaient leur taux de TNF- $\alpha$  augmenter avec le traitement, tandis que l'inverse se produisait chez les patients présentant un taux initialement élevé. Les auteurs rapportent le même type de résultat lors d'études *in vitro* sur des cellules de patients atteints de mononucléose, où du LPS est capable d'induire la production de cytokines (Weber-Dabrowska *et al.*, 2000)

#### 3.2.2.2.4 Mais peu de conséquences apparentes

La plupart des observations décrites sur les interactions avec le système immunitaire résultent d'études *in vitro*. Ces interactions varient selon de nombreux paramètres tels que la méthode d'administration des phages, le type et la localisation de l'infection, la dose et la nature des phages utilisés. De plus, il ne faut pas oublier que, malgré une purification, une suspension de phages contient toujours une très faible quantité de débris bactériens qui peuvent également interagir avec le système immunitaire. De la même manière, les fragments de lyse bactérienne qui suit la phagothérapie peuvent également interagir avec le système immunitaire. L'importance des phénomènes pharmacologiques liés à la phagothérapie au sein de l'organisme n'est pas encore clairement définie et de plus amples études sont donc nécessaires pour approfondir la pharmacologie des bactériophages

De toutes ces informations, il ressort que les éléments de l'organisme les plus à même d'inactiver les bactériophages seraient les anticorps dirigés contre ces virus. La répercussion sur la phagothérapie de cette synthèse d'anticorps demeure peu claire. Les inconvénients qui en résultent semblent de peu d'importance, en particulier lors de la phase initiale du traitement d'infections aiguës puisque les phages agissent plus vite que la cinétique de production d'anticorps, vu qu'une à deux semaines doit s'écouler avant que cette production d'anticorps soit effective (Dublanche, 2009).

De par la faible quantité de molécules réactives sécrétées et de par leur impact sur les phages, ces inconvénients apparaissent plus théoriques que réels. Cela pourrait s'expliquer en partie par la forte fréquence des contacts avec des phages très tôt après la naissance, notamment par voie digestive, qui induirait un certain degré de tolérance immunitaire, et expliquerait la faible réponse des lymphocytes B et l'absence de réponse effective des lymphocytes T, contrairement à une réponse immunitaire classique face à un virus, et en dépit de la phagocytose des phages par les cellules dendritiques (Górski *et al.*, 2012 ; Kelsall et Leon, 2005). Par contre il serait intéressant de connaître la durée pendant laquelle les anticorps sécrétés demeurent présents car si, lors d'un traitement, il est nécessaire de réaliser une nouvelle administration de phages, par exemple lors d'une récurrence d'infection, il ne faudrait pas que les phages nouvellement administrés soient neutralisés par les anticorps. En effet, dans le cas où cela se produirait, il serait alors nécessaire soit d'augmenter les doses de phage à administrer (de manière à ce qu'il reste suffisamment de phages actifs pour le traitement), soit d'administrer un autre phage actif contre la bactérie causale mais avec un profil antigénique différent du phage précédemment administré, pour qu'il ne soit pas

neutralisé par les anticorps circulants. Des recherches ciblées sur le sujet sont encore nécessaires (Alisky *et al.*, 1998 ; Dublanquet et Patey, 2011 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001).

### 3.2.2.3 Action anti-inflammatoire

Il existerait une action anti-inflammatoire par les phages commensaux de la muqueuse du tube digestif ainsi qu'une prolifération phagique lors d'inflammation gastro-intestinale. Cette action anti-inflammatoire pourrait en partie découler de l'action immunomodulatrice précédemment exposée, notamment de l'inhibition de l'activité pro-inflammatoire des cellules dendritiques (Abedon *et al.*, 2011 ; Górski *et al.*, 2006b). La diminution des dérivés réactifs de l'oxygène ou de certaines cytokines pourraient également diminuer l'inflammation consécutive à une infection (Debarbieux *et al.*, 2010).

## 3.3 Préparation des phages pour une utilisation thérapeutique

D'après (Dublanquet, 2009).

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

### 3.3.1 Obtention de suspensions contenant des phages

De par leur omniprésence dans la nature, il est facile de trouver des phages dans l'environnement. Un moyen simple est par exemple de récupérer un échantillon d'eaux usées, riches en phages de toutes espèces et de le traiter pour n'en récupérer que les bactériophages, ces eaux usées étant fortement chargées en bien d'autres microorganismes.

### 3.3.2 Propagation des phages

Cet échantillon d'eaux résiduelles doit ensuite être centrifugé et décanté, de manière à éliminer les grosses particules, puis le surnageant de la décantation doit être filtré (filtre de 0,2 micromètres) pour éliminer les bactéries. On obtient ainsi une préparation contenant une grande quantité de phages.

Il faut ensuite déterminer si le ou les bactériophages recherchés, c'est-à-dire celui ou ceux dirigés contre une bactérie donnée, sont présents dans la préparation obtenue. Pour cela on ajoute une suspension contenant la bactérie ciblée à la préparation et on incube le mélange pendant quelques heures à 35°C et sous agitation douce (pour la plupart des phages recherchés). À l'issue de cette incubation, si un ou plusieurs phages se sont propagés au détriment des bactéries, il s'agit alors des virus recherchés. En effet, chaque phage dirigé contre la bactérie aura réalisé plusieurs cycles de propagation, augmentant fortement le nombre de particules virales. Il faut enfin centrifuger de nouveau et filtrer pour éliminer les débris bactériens.

Ces tests peuvent aussi être réalisés en plaçant une goutte de la préparation dans une boîte de Petri avec une gélose contenant la bactérie étudiée. Si l'on observe un trou dans le film bactérien après incubation, la préparation contenait bien le ou les bactériophages correspondants à la bactérie étudiée.

### 3.3.3 Purification des phages

De manière à isoler les bactériophages d'intérêt, il faut tout d'abord diluer sériellement la préparation précédemment réalisée, puis étaler les différentes préparations diluées en boîte de Petri sur des géloses comportant les bactéries étudiées réparties de manière homogène en surface. Après incubation, de multiples plages de lyse vont se former sur la gélose. À chaque plage de lyse correspond un clone de bactériophage et l'aspect des plages diffère selon le bactériophage impliqué dans le processus de lyse. On prélève alors une ou plusieurs plages que l'on propage dans un bouillon bactérien (comme réalisé à l'étape précédente de propagation) de sorte d'obtenir une quantité suffisante de clones et de bien les adapter à la bactérie étudiée ; cette étape peut être réalisée plusieurs fois (généralement 2 à 3 fois).

Il est ensuite nécessaire d'éliminer les bactéries restantes ainsi que les débris de lyse bactérienne. Plusieurs méthodes existent pour cela : centrifugation et filtration, précipitation des phages à l'aide de polyéthylène glycol ou chromatographie d'affinité (Abedon *et al.*, 2011).

### 3.3.4 Numération des clones

Cette étape permet de connaître la quantité de bactériophages obtenus et ainsi être certain que cette quantité sera suffisante d'un point de vue thérapeutique. On mesure le titre de phages (le nombre de phages lytiques par unité de volume) en nombre d'Unité Formant Plages (UFP) par millilitre.

### 3.3.5 Contrôle

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

## 3.4 Phagogramme

À la manière des antibiogrammes réalisés pour sélectionner les antibiotiques les plus adéquats au traitement d'une infection bactérienne, il est possible de réaliser ce qu'Alain Dublanche nomme « phagogramme » ou « bactériophagogramme ». Sa réalisation est assez similaire à celle d'un antibiogramme : on prépare tout d'abord plusieurs suspensions contenant chacune une certaine concentration d'un phage isolé à tester. La bactérie d'intérêt est cultivée sur gélose en boîte de Petri et une goutte de chaque suspension est déposée sur la gélose. L'ensemble est ensuite incubé 18 à 24 heures. Après incubation on observe les plages de lyse obtenues sur la gélose et on détermine ainsi les phages vis-à-vis desquels la bactérie s'avère sensible (Dublanche, 2009).

### 3.5 Phagothèque

D'après (Dublanche, 2009).

De manière à optimiser les soins par phagothérapie, des collections de bactériophages ont été créées dès l'époque de Félix d'Hérelle. Les phages stockés sont des virus purifiés (c'est-à-dire isolés et débarrassés de potentielles impuretés) et dont les propriétés physico-chimiques et les capacités thérapeutiques sont connues. Ces phagothèques permettent de s'affranchir de toutes les étapes de récupération, préparation et contrôle des phages, ce qui constitue un gain de temps et d'argent non négligeable. Elles sont utilisées dans l'établissement d'un phagogramme à partir d'un prélèvement bactérien au site d'infection, puis dans le traitement. Avant l'étape du traitement, il est cependant nécessaire d'adapter le phage à la bactérie (c'est-à-dire le rendre le plus efficace possible contre cette bactérie), de produire artisanalement une quantité de phages suffisante, de créer à partir d'eux les suspensions (en ampoule de 5 ou 10 mL) et de les tester pour s'assurer de leur innocuité et de leur pureté (aucune bactérie résiduelle) *via* des tests bactériologiques et des inoculations à des animaux. Toutes ces étapes ne sont pas compatibles avec le traitement d'une infection aiguë, on ne peut se permettre de prendre le temps de préparer ce genre de traitement que pour les infections chroniques. Pour prendre en charge les infections d'urgence, il est préconisé d'employer des cocktails thérapeutiques préparés en tenant compte des atteintes les plus fréquentes.

En France, les collections initiées par d'Hérelle et autrefois perpétuées par le professeur Vieu à l'Institut Pasteur de Paris et par le professeur Guillermet à celui de Lyon sont, à présent, détruites. D'autres instituts étrangers ont, eux, maintenu et amélioré leur phagothèque, notamment à l'Institut Eliava de Tbilissi en Géorgie et à Wroclaw en Pologne.

### 3.6 Cocktails

Les cocktails sont des mélanges bien établis et caractérisés de plusieurs bactériophages destinés à combattre les infections bactériennes les plus courantes. On distingue les cocktails selon les atteintes et les appareils pour lesquels ils sont préconisés (appareil digestif, ...). Ces

préparations thérapeutiques ont été commercialisées à large échelle en France jusque dans les années 70 et étaient décrites dans le dictionnaire des médicaments Vidal (Dublanche, 2009). Cinq cocktails différents étaient ainsi librement commercialisés par la firme « Le Laboratoire du Bactériophage » et distribués par le Laboratoire Robert et Carrière. Puis, subissant la diminution de l'utilisation des bactériophages au profit des antibiotiques, la firme finit par cesser sa production en 1978, malgré les protestations de quelques scientifiques et quelques pétitions militant pour le retour à la bactériophagie thérapeutique (Biofutur et GEEPhage, 2013). Les Instituts Pasteur de Paris et de Lyon continuèrent à fournir des cocktails préparés sur mesure jusqu'au début des années 90, puis la production finit par s'éteindre (Dublanche, 2009).

Les préparations provenant de Tbilissi sont nombreuses et variées (figure 19). On peut notamment citer le cocktail « Pyophage » présentant apparemment une excellente activité entre autres contre *Staphylococcus aureus* et contre *Pseudomonas aeruginosa* (aussi nommé bacille pyocyanique), et la préparation nommée « PhagoBioDerm » associant des phages et un support autorésorbable et qui semble donner de bons résultats (Dublanche, 2009).

Figure 19 : Exemple de cocktails de phages



D'après (Chanishvili, 2011). Contrairement à l'Occident, les pays de l'ex-Union soviétique n'ont jamais cessé la commercialisation de cocktails thérapeutiques de phages à destination humaine.

Cependant ces cocktails sont des préparations « standards » et ne sont pas forcément les plus appropriés lors d'infections graves. Dans ces derniers cas, il vaut mieux privilégier une méthode plus ciblée et où les phages auront suffisamment été adaptés et seront donc plus virulents (Dublanche, 2009).



---

## TROISIÈME PARTIE : LA PHAGOTHÉRAPIE AUJOURD'HUI

---

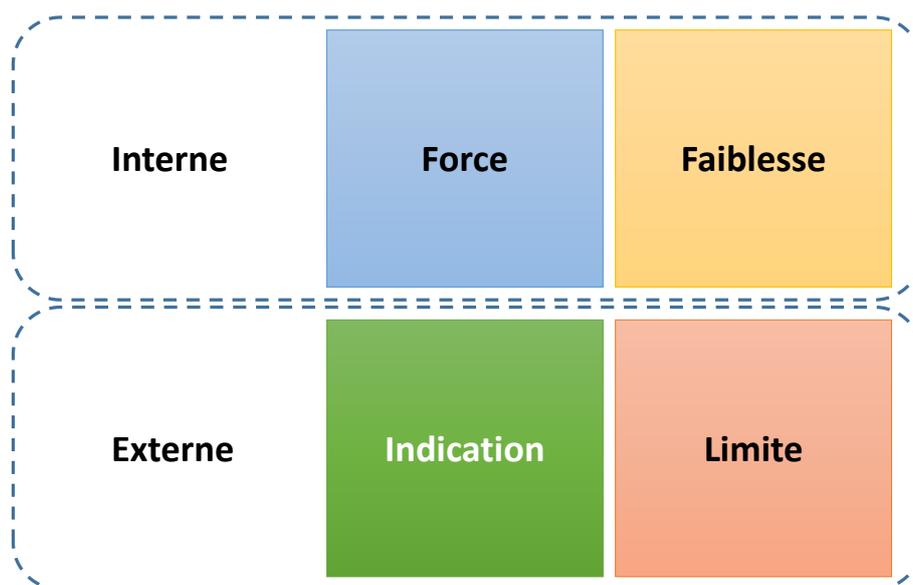


# 1 Méthode d'analyse employée

L'analyse SWOT (Strengths–Weaknesses–Opportunities–Threats), en français AFOM (Atouts–Faiblesses–Opportunités–Menaces) est un outil d'analyse (figure 20) qui combine l'étude des forces et des faiblesses d'une organisation ou d'un produit avec celle des opportunités et des menaces liées à son environnement. Je l'applique ici au traitement qu'est la phagothérapie, afin d'avoir une analyse globale des avantages et des inconvénients de la thérapie.

Dans le cadre de l'étude des bactériophages, les termes « Indication » et « Limite » ont été substitués à « Opportunités » et « Menaces », plus appropriés à l'univers médical.

Figure 20 : Principe illustré de l'analyse SWOT



## 2 Forces

### 2.1 Avantage sur les antibiotiques

#### 2.1.1 Un pouvoir bactéricide même sur les bactéries antibiorésistantes

Comme nous l'avons vu précédemment, peu de temps après l'avènement des antibiotiques, des résistances bactériennes envers différents antibactériens ont été mises en évidence. La découverte active et régulière de nouveaux antibiotiques a longtemps permis de contourner ces résistances. Cette course contre la montre a progressivement été gagnée par les bactéries, de plus en plus résistantes.

Pour cette raison, de nombreuses recherches sont actuellement menées afin de trouver des alternatives aux antibiotiques (Chopra *et al.*, 1996 ; Plouffe *et al.*, 1996).

Les bactériophages sont des prédateurs naturels des bactéries. Ils exercent sur elle un pouvoir bactéricide et c'est précisément ce pouvoir qui est recherché comme alternative aux antibiotiques. Une fois qu'une bactérie est infectée par un phage lytique, elle est complètement détruite.

De plus, l'existence de résistances des bactéries face aux antibiotiques ne restreint en rien l'aptitude des phages à détruire ces bactéries, et c'est bien là l'intérêt principal de la phagothérapie visé actuellement. En effet, d'après Richard Carlton, président de Exponential Biotherapies à Port Washington, les mutations offrant aux bactéries la capacité de résister aux antibiotiques ne leur permettent pas de résister aux phages, car elles mettent en jeu des mécanismes distincts (Carlton, 1999).

### 2.1.2 Une croissance rapide et exponentielle des phages

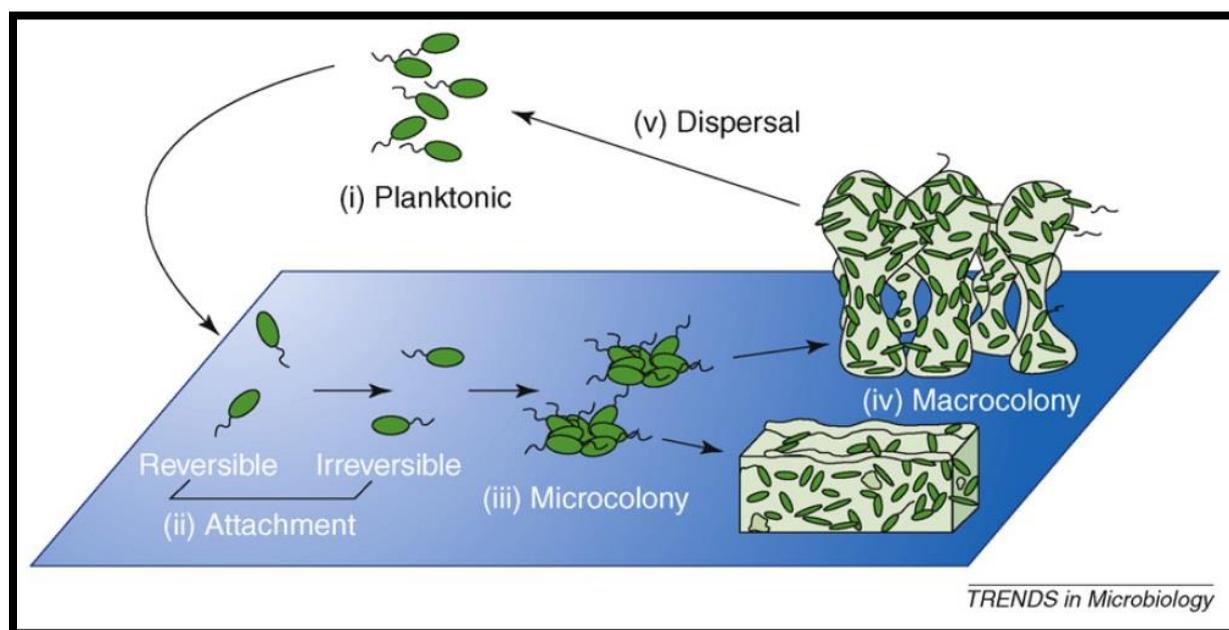
Lorsque le génome d'un bactériophage entre dans une cellule bactérienne, il se reproduit et la lyse de la bactérie qui s'ensuit libère des dizaines de nouveaux virions. Cette multiplication virale ne prend qu'un laps de temps très court. Plusieurs bactéries sont lysées en même temps par des phages différents, la quantité de virions libérés simultanément en est donc d'autant plus importante. Cette propagation virale est bien plus productive que la multiplication bactérienne la plus intense et la colonie bactérienne est rapidement dépassée et ravagée par ces attaques (Pirisi, 2000).

Ce mécanisme, créant en quelque sorte un « effet de masse », n'existe pas du tout en antibiothérapie. Le succès des traitements antibiotiques implique la répétition des administrations, et ce souvent avec de fortes doses, de manière à maintenir une concentration en principe active suffisante pour pallier leur élimination par l'organisme par destruction ou par excrétion (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Pour la phagothérapie, une seule administration suffit généralement à endiguer rapidement l'infection (Pirisi, 2000), et il n'est pas nécessaire que cette dose soit élevée (Gilmore, 2012). En effet, les bactériophages, en se multipliant au niveau de la zone d'infection aux dépens des bactéries infectantes, verront leur élimination largement compensée par cette multiplication (Sulakvelidze *et al.*, 2001). On peut donc presque parler de « médicament intelligent » qui, grâce à sa forte spécificité d'hôte bactérien, ne cible que l'infection pathologique diagnostiquée et qui continue à se perpétuer seul dans l'organisme jusqu'à ce que cette infection ait été complètement contrôlée (Dublanche et Patey, 2011).

### 2.1.3 Destruction des biofilms bactériens

Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries, champignons, ...) généralement symbiotiques, ou d'une seule espèce d'un micro-organisme, adhérant à une paroi et protégée du milieu extérieur par la sécrétion d'une matrice polymère (figure 21).

Figure 21 : Schéma du modèle de formation d'un biofilm



D'après (Monds et O'Toole, 2009). Ce schéma représente le modèle globalement admis de la formation d'un biofilm bactérien dans le temps. Initialement à l'état libre planctonique (i), les bactéries vont venir s'accrocher à une surface inerte ou biologique (ii), s'y multiplier pour former une micro-colonie (iii), puis une macro-colonie, et constituer une matrice principalement polysaccharide autour d'elles, formant alors la capsule du biofilm (iv).

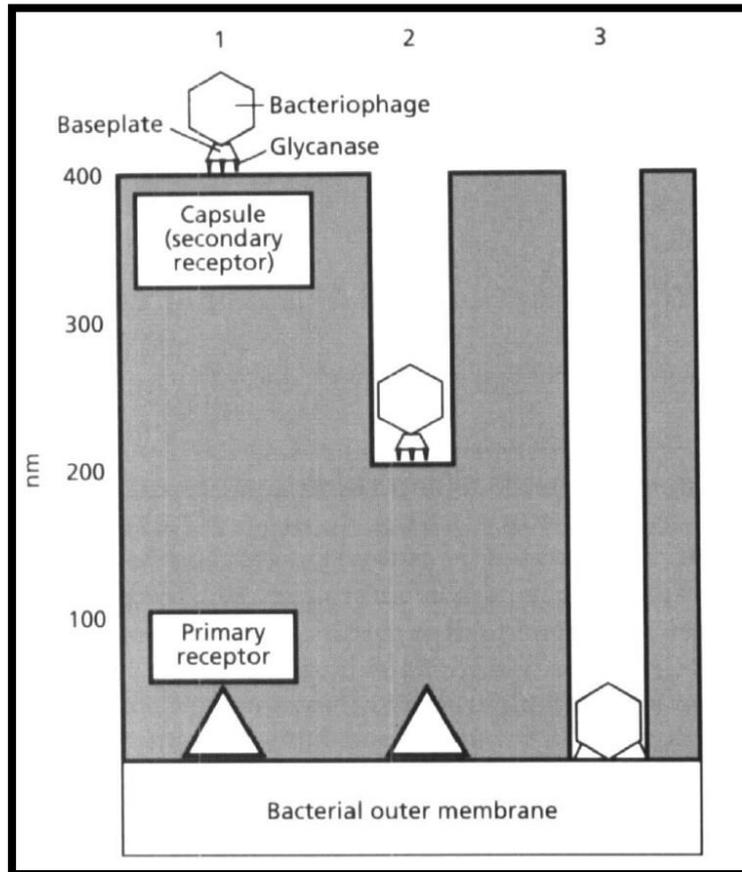
Dans certains cas, la macrocolonie peut se disperser (v), laissant les bactéries sortir du biofilm et redevenir planctoniques et infectantes.

Lors des premières études menées sur l'élimination des bactéries par les antibiotiques, les expériences étaient réalisées *in vitro* sur des bactéries à l'état planctonique, c'est-à-dire juste placées dans une solution ou une boîte de Petri. Dans ces conditions, les bactéries n'avaient ni le temps, ni la capacité de former des biofilms et étaient donc totalement accessibles aux antibiotiques. Cependant, dans l'organisme, au cours d'une infection bactérienne chronique, les bactéries ont la possibilité de créer un biofilm, lequel les isole de l'attaque des antibiotiques, leur permettant de perdurer ainsi dans l'organisme en formant des micro-colonies demeurant à l'état quiescent (Dublanche et Patey, 2011).

Depuis la première observation de destruction d'un biofilm par un phage, en 1956 par Adam et Park, quelques études se sont penchées sur le sujet et ont mis en lumière l'existence de mécanismes enzymatiques provenant des phages et entrant en jeu dans cette élimination (Dublanche et Patey, 2011). Lors d'une étude sur l'activité des phages contre *Escherichia coli*, l'équipe de Stirm a par exemple découvert en 1971 qu'une enzyme de phage, une glycanase, avait la capacité de lyser la capsule mucoïde des biofilms (Stirm *et al.*, 1971). De

même, en 1998, l'équipe de Hugues a remarqué l'existence d'un mécanisme d'accrochage du phage à une molécule située à la surface de la capsule polysaccharidique, dite «récepteur secondaire», permettant la sécrétion d'une dépolymérase et par la suite l'arrimage du phage à une molécule dite «récepteur primaire» à la surface de la paroi bactérienne (figure 22) (Hughes *et al.*, 1998).

Figure 22 : Schéma représentant la traversée d'un biofilm par un bactériophage



D'après (Hughes *et al.*, 1998). Ce schéma présente les trois étapes de pénétration d'un bactériophage au sein d'un biofilm. La première étape correspond à l'arrimage du phage au niveau d'une molécule de surface servant de « récepteur secondaire » (secondary receptor) et permettant au phage d'amorcer sa traversée de la capsule mucoïde du biofilm par dégradation de cette capsule grâce à une glycanase, comme exposé en étape 2. Cette traversée s'achève avec la fixation du phage à une molécule à la surface de la bactérie et servant de « récepteur primaire » (primary receptor).

## 2.2 Peu d'effets secondaires

Dans le cadre d'une antibiothérapie, les patients risquent de nombreux effets secondaires bien connus : atteinte des fonctions rénales ou de l'audition (pour les aminosides), allergie aux bêtalactamines, diarrhées ou mycoses secondaires (pour les antibiotiques à large spectre), ... La phagothérapie a pour avantage, elle, de ne présenter que peu d'effets secondaires (Dublanche, 2009).

### 2.2.1 Effets secondaires rares et de faible intensité

Quasiment toutes les études réalisées sur les bactériophages rapportent l'absence d'effets secondaires (Letkiewicz *et al.*, 2010). Des essais cliniques rigoureux menés récemment chez l'homme selon les critères réglementaires actuellement en vigueur, montrent l'absence d'effets secondaires (Wright *et al.*, 2009).

Les quelques effets secondaires rapportés dans la bibliographie apparaissent bénins, rares et transitoires, sinon facilement réversibles. Il s'agit principalement d'atteintes gastro-intestinales, de douleurs hépatiques, de fièvre ou de maux de tête, et l'intensité en est relativement légère (Alisky *et al.*, 1998 ; Dublanche, 2009). Des symptômes gastro-intestinaux ou allergiques seraient rapportés chez moins de 0,5 % des patients traités (Alisky *et al.*, 1998). Ces désagréments pourraient être engendrés soit par la suspension de phage en elle-même, soit par la réaction associée à son emploi, c'est-à-dire la lyse bactérienne, soit tout simplement par la maladie elle-même.

### 2.2.2 Explication de la faiblesse et de la rareté des effets secondaires

#### 2.2.2.1 Pas d'impact sur la flore commensale

Parmi les effets secondaires observés lors d'antibiothérapie, en particulier à large spectre, les plus fréquents sont les troubles digestifs (surtout des diarrhées) et les infections opportunistes secondaires (notamment des mycoses). En effet, ces antibiotiques détruisent les

bactéries pathogènes, mais aussi celles de la flore commensale non pathogène, dont par exemple les flores intestinale ou génitale. Cela déstabilise l'équilibre de la flore bactérienne naturelle présent sur ces muqueuses et les autres microorganismes pathogènes peuvent alors prendre le dessus, situation donnant lieu à ces effets indésirables. Ce déséquilibre est appelé « dysbiose », les infections secondaires en résultant sont nommées « super-infections » (Abedon *et al.*, 2011 ; Dublanquet et Patey, 2011 ; Dublanquet, 2009 ; Pirisi, 2000).

Comme nous l'avons vu précédemment, les bactériophages sont très spécifiques de leur bactérie hôte. Grâce à l'étroitesse de leur spectre d'action, même leur utilisation en cocktail ne présente pas un aussi large spectre que celui des antibiotiques (Abedon *et al.*, 2011). En ciblant une bactérie pathogène précise, l'utilisation thérapeutique des bactériophages préserve donc la flore bénéfique à l'organisme au lieu de la détruire comme le font les antibactériens notamment à large spectre. Leur usage épargne donc en règle générale aux patients les effets secondaires des traitements à base d'antibiotiques cités précédemment (Dublanquet, 2009).

#### 2.2.2.2 Autres éléments

D'après (Dublanquet, 2009).

La cause des désagréments rencontrés parfois n'étant pas liés à une dysbiose, les autres causes potentielles d'effets secondaires peuvent donc être :

- le phage en lui-même et notamment sa capside de nature protéique ;
- les débris provenant des bouillons de cultures utilisés dans la préparation des phages thérapeutiques ;
- les débris de lyse bactérienne lors de propagation des phages dans les préparations thérapeutiques ou lors de phagothérapie ;
- la maladie en elle-même.

Ces causes potentielles d'effets secondaires sont donc réduites quantitativement, et elles apparaissent contrôlables ou contournables sinon de faible impact.

#### 2.2.2.2.1 Le phage en lui-même

Les phages sont des virus ubiquitaires, c'est-à-dire qu'ils sont naturellement présents partout dans notre environnement en quantité importante : par exemple, les eaux non polluées comporteraient environ  $2 \times 10^8$  bactériophages par mL (Bergh *et al.*, 1989). Sans en avoir conscience, nous vivons donc constamment à leur contact et les ingérons avec les aliments que nous mangeons et dans notre eau de boisson (Dublanche, 2009 ; Inal, 2003). On en trouve également sur notre peau et dans notre corps (notamment dans notre tube digestif). Il a même été découvert des sérums et des vaccins commercialisés contaminés de façon involontaire par des phages, sans pour autant que cela porte préjudice aux bénéficiaires de ces injections (Geier *et al.*, 1975 ; Merrill *et al.*, 1972). Il semble que cette proximité soit bien tolérée et ne pose pas de problèmes de santé.

Une étude menée par le Centre de Recherche de Nestlé a voulu évaluer l'innocuité de l'administration de phages chez l'homme. Les scientifiques ont administré oralement, à quinze volontaires sains, des suspensions de phages dont la pureté avait été auparavant vérifiée et qui s'avéraient donc exemptes de débris bactériens ou de protéines. Les résultats obtenus furent une bonne tolérance de l'administration ; les seuls désagréments rapportés étaient des maux d'estomacs, des nausées, une augmentation du péristaltisme et, pour un seul des volontaires, un mal de gorge, mais ces atteintes étaient légères et n'ont pas nécessité de prise en charge particulière. Ces atteintes n'étaient pas augmentées ni quantitativement, ni qualitativement avec des doses plus élevées de phages et étaient pareillement rapportées pour les personnes recevant un *placebo*. Ces désagréments ont été jugés comme sans rapport avec l'administration de phages, et cette administration a donc été considérée comme n'engendrant pas d'effets secondaires (Bruttin et Brüssow, 2005).

#### 2.2.2.2.2 Les impuretés de la suspension phagique

Les impuretés et notamment les endotoxines présentes dans la préparation de phages thérapeutiques sont, grâce aux technologies actuelles, éliminables en quasi-totalité des préparations lors de la phase de purification. Les préparations actuelles ont ainsi le mérite de ne comporter qu'une très infime quantité de débris contrairement à celles d'autrefois.

### 2.2.2.2.3 Les débris de lyse bactérienne par phagothérapie

Les seules particules de nature protéique qui restent à prendre en compte sont donc les débris et toxines issus de la lyse bactérienne lors de phagothérapie.

Lors de la lyse bactérienne provoquée par des bactériophages, on peut s'attendre à ce qu'il y ait une modification de la concentration en toxines bactériennes présentes dans l'organisme puisque la destruction de la bactérie va entraîner, un relargage des toxines (endotoxines et exotoxines) présentes dans la cellule. Une expérience basée sur l'injection de lysat de bactéries Gram + a généré des effets secondaires d'intensités faible à sévère pouvant expliquer les rares effets secondaires observés lors de phagothérapie (Abedon *et al.*, 2011).

Ce relargage, a également lieu lorsqu'on utilise des antibiotiques bactériolytiques.

Certains auteurs soutiennent que ce relargage constituerait théoriquement un risque d'effets secondaire sévères (Dixon, 2004) d'autres contestent ces affirmations (Letkiewicz *et al.*, 2010).

Quoi qu'il en soit, la bactérie étant détruite, il n'y a alors plus de production de ces toxines et donc arrêt par la suite de l'intoxication de l'organisme (Abedon *et al.*, 2011).

## 2.3 Autres bénéfiques thérapeutiques

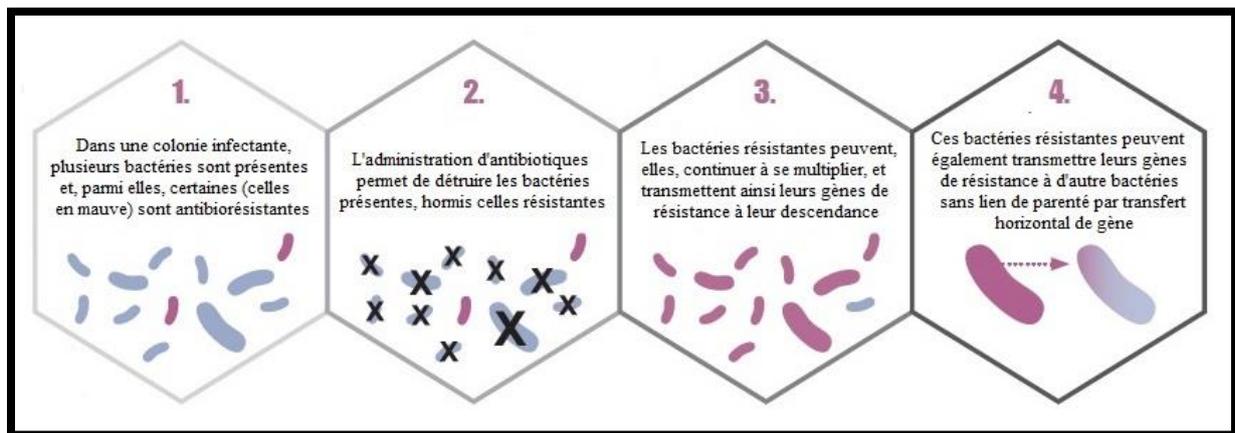
### 2.3.1 Pas de multiplication phagique en l'absence de bactéries cibles

Pour se multiplier, les bactériophages ont besoin d'une cellule bactérienne et sont incapables d'utiliser une cellule eucaryote à cette fin. Sans leur bactérie hôte, les phages n'entrent pas en activité et sont éliminés. Mettre en place une phagothérapie sur une erreur de diagnostic (pas d'infection bactérienne ou infection bactérienne due à une autre bactérie pathogène que la bactérie ciblée par cette phagothérapie) n'aura donc aucune conséquence sur l'innocuité, si ce n'est son inefficacité (Dublanche et Patey, 2011 ; Loc-Carrillo et Abedon, 2011).

### 2.3.2 Pas de sélection de résistances

Lorsqu'une infection est combattue par antibiothérapie, celle-ci exerce une pression de sélection élevée, c'est-à-dire que les bactéries présentant une mutation leur permettant d'y survivre ne vont pas être affectées par ces antibiotiques, se reproduire et transmettre les gènes de résistance à leur descendance (transfert vertical) ou à d'autres bactéries sans lien de parenté (transfert horizontal), constituant une nouvelle population majoritairement résistante à cette antibiothérapie. Il s'agit tout simplement d'une inflexion involontaire et accélérée de l'évolution par sélection des individus résistants. Plus les antibiotiques sont employés, plus le nombre de bactéries résistantes à leurs effets s'accroît (figure 23).

Figure 23 : Mécanisme d'extension de la population bactérienne antibiorésistante



D'après (CDC, 2013). L'administration d'antibiotiques exerce une pression de sélection sur les populations bactériennes visées, permettant aux bactéries résistantes et toujours présentes après antibiothérapie de former une population bactérienne résistante.

De plus, les hôpitaux rencontrent actuellement d'importants soucis dus à certaines bactéries commensales qui, lors d'antibiothérapie se développent et exercent un pouvoir pathogène opportuniste. En effet, les antibiotiques ayant détruit une partie de la flore commensale, l'équilibre entre les populations de microorganismes disparaît et certaines bactéries commensales plus résistantes aux antibiotiques se développent au détriment des autres. En détruisant une partie de cette flore naturelle, les antibiotiques sélectionnent celles qui sont les plus résistantes à leurs attaques, et il s'avère que certaines de ces bactéries sélectionnées développent alors une pathogénicité. C'est le cas de *Clostridium difficile*, première cause de diarrhées infectieuses nosocomiales chez les patients suivant une antibiothérapie, dont la sévérité et la mortalité s'accroissent d'année en année (INVS, 2012).

Nous avons vu précédemment que les bactériophages employés en phagothérapie ne provoquaient pas de dysbiose. En outre, ces phages ne sélectionnent pas de résistances aux antibiotiques ; il n'y a donc pas d'augmentation de l'antibiorésistance ni parmi les bactéries pathogènes ciblées, ni au sein des flores naturelles, ni dans celles de l'environnement. Cette thérapeutique permet donc d'éviter que des bactéries non commensales pathogènes ne deviennent encore plus résistantes et également d'éviter que des bactéries commensales de l'organisme et résistantes aux antibiotiques ne se développent de façon anormale et ne deviennent alors pathogènes (Dublanche, 2009).

### 2.3.3 Possible transfert de phages entre patients

Un tel transfert a lieu lors de contamination croisée de sujets non traités par des bactériophages à partir de sujets traités (ou même à partir de l'environnement où se trouvent ces sujets non traités). Ce transfert pourrait présenter un intérêt dans le domaine de la prophylaxie ou lors de traitement d'infections sur un large nombre de cas, comme par exemple dans des cheptels (Barrow et Soothill, 1997 ; Loc-Carrillo et Abedon, 2011).

## 2.4 Accessibilité

Présents partout dans l'environnement, et relativement faciles à isoler, les bactériophages apparaissent comme faciles d'accès. On peut aisément en trouver dans les eaux usées ou dans les autres zones contenant des déchets et riches en bactéries.

Il suffit de peu d'infrastructures pour réaliser des préparations thérapeutiques à base de phages. De plus, la composition des préparations s'avère relativement maniable, permettant d'incorporer différentes espèces de phages sans répercussion sur leurs capacités thérapeutiques, de manière à élargir leur champ d'action. Il est même possible d'y ajouter d'autres substances, telles que des antibiotiques (Loc-Carrillo et Abedon, 2011)

## 3 Faiblesses

### 3.1 Tous les phages ne sont pas aptes à être utilisés en phagothérapie

De manière à correctement réaliser une phagothérapie, il est nécessaire de n'utiliser que les phages efficaces et sans conséquences délétères. Les phages exécutant un cycle autre que le cycle lytique (c'est-à-dire les phages tempérés) doivent de ce fait être évités car, d'une part, ces derniers ne détruisent pas les bactéries, et d'autre part, ils peuvent modifier le génome de ces bactéries. Cette modification est consécutive à l'intégration du génome d'un phage non lytique. Elle peut engendrer une résistance de la bactérie vis-à-vis des autres phages de génome identique ou proche, et également lui conférer de nouvelles propriétés. Ce phénomène médié par le phage est appelée soit « transduction », lorsque le phage n'est qu'un véhicule de gènes bactériens, soit « conversion lysogénique » lorsque la présence du génome du phage dans celui de la bactérie (c'est-à-dire l'existence d'un prophage) est nécessaire pour que ces nouveaux caractères s'expriment. Les gènes ainsi nouvellement obtenus peuvent être des gènes de virulence ou de résistance et peuvent alors augmenter la pathogénicité de la bactérie (Abedon et LeJeune, 2005 ; Abedon *et al.*, 2011 ; Meyer *et al.*, 2004 ; Waldor et Mekalanos, 1996).

Le mécanisme de cette conversion lysogénique provient de la capacité d'un phage tempéré à emporter une partie des gènes de la bactérie dans laquelle il a été inclus, puis à infecter une nouvelle bactérie et à lui transmettre ces gènes nouvellement acquis, et ainsi de suite (Abedon *et al.*, 2011 ; Dublanquet, 2009).

Dernièrement des scientifiques ont montré que lors d'une infection bactérienne traitée par antibiothérapie, le stress physiologique portant sur les bactéries entraînerait une activation des prophages portés par certaines d'entre elles et accentuerait ainsi la transmission de gènes porteurs de facteurs de pathogénicité, notamment des gènes de résistance contre des antibiotiques (Dublanquet et Patey, 2011). En effet des études sur *Staphylococcus aureus* et sur *Pseudomonas* mis en présence de différents antibiotiques (acide fusidique, érythromycine, tobramycine, rifampicine, ciprofloxacine et imipénème) ont montré une activation de

prophages contenus dans ces bactéries. Au vu de ces résultats, on peut considérer l'hypothèse que l'utilisation d'antibiotiques de façon déraisonnée induirait elle-même la transmission des antibiorésistantes entre les bactéries (Rolain *et al.*, 2009).

Seuls les phages lytiques sont donc aptes à réaliser une phagothérapie efficace et sans conséquences néfastes. L'idéal est d'employer des phages (Dublanche et Patey, 2011 ; Loc-Carrillo et Abedon, 2011) :

- strictement lytiques (caractéristique confirmée par un séquençage complet du matériel génétique du phage) et, au mieux, exempt de gènes de toxines ;
- capables d'accéder facilement au lieu d'infection, donc de montrer une bonne aptitude à diffuser dans l'organisme ;
- exprimant une forte virulence vis-à-vis des bactéries cibles ;
- capables d'éviter l'inhibition par le système immunitaire ;
- stables dans les conditions et les températures de stockage.

## 3.2 Phago-résistances

L'équipe de Fischer a étudié en 2004 la coexistence entre un phage et sa bactérie hôte. Ils ont montré qu'au sein d'une population bactérienne il était possible d'identifier des bactéries résistantes au bactériophage (Fischer *et al.*, 2004). Örmälä et Jalasvuori indiquent que les phago-résistances apparaîtraient relativement rapidement *in vitro* (Örmälä et Jalasvuori, 2013), confirmant les travaux de Lenski, et démontrant par ailleurs qu'elles peuvent même apparaître dans des populations bactériennes de petite taille, c'est-à-dire de l'ordre de  $10^7$  bactéries (Lenski, 1984).

### 3.2.1 Mécanismes

Il existe plusieurs mécanismes différents permettant à certaines bactéries de faire fi de l'attaque des phages. Ces mécanismes sont distincts de ceux mis en œuvre par les bactéries lors d'antibiorésistance (Örmälä et Jalasvuori, 2013)

### 3.2.1.1 Inhibition des actions phagiques

Dans ce cas de figure, l'inhibition va porter soit sur la phase de pénétration du phage, soit sur sa reproduction, soit sur l'éclatement de la bactérie.

Les bactériophages s'attachent aux structures externes de la bactérie. Selon les phages, cela peut être la capsule bactérienne, différentes parties des lipopolysaccharides bactériens (LPS), un flagelle, une *fimbria* ou bien d'autres particules de surface constituant autant de récepteurs putatifs (Skurnik et Strauch, 2006).

Lorsqu'une bactérie perd le récepteur utilisé par le phage ou est mutée sur ce récepteur, elle devient résistante au phage en question puisqu'il ne peut alors plus pénétrer la cellule bactérienne (Skurnik et Strauch, 2006).

Une modification (mutation ou acquisition horizontale de gènes de résistance phagique) peut également toucher un gène bactérien nécessaire à la reproduction des phages (réplication, assemblage ou libération). Une fois la bactérie contaminée, le phage ne peut plus synthétiser de nouveaux virions. Là encore on considère la bactérie comme résistante aux bactériophages (Dublanche, 2009).

### 3.2.1.2 Autodestruction bactérienne

Les bactéries sont capables d'échapper à une invasion de bactériophages par un autre mécanisme nommé « système d'avortement de l'infection » (ou *Abi*, *abortiv infection system*). Lors de ce mécanisme, une bactérie infectée s'autodétruit avant que le phage infectant n'ait pu synthétiser de nouveaux virions, une sorte de « suicide altruiste ». Dans le cas d'*Erwenia caotovora* (sous-espèce *atroseptica*), ce système fonctionne grâce à un élément composé d'une toxine protéique et d'un brin d'ARN antitoxine spécifique. Cet élément est nommé ToxIN et correspond à un système toxine-antitoxine (TA) (Fineran *et al.*, 2009). De très nombreux homologues de ce système TA sont présents au sein de différentes bactéries entériques. Lors d'infection d'une bactérie par un phage, la composante antitoxine est dégradée et la composante toxine entre alors en action, détruisant la membrane bactérienne (Blower *et al.*, 2011). On ne possède à l'heure actuelle que peu d'informations sur les

systèmes TA et sur leurs rôles biologiques, mais en ce qui concerne la phagothérapie, leur existence est un point fondamental à prendre en considération (Gilmore, 2012).

### 3.2.1.3 Déstabilisation du génome phagique

Après avoir été infectée par un phage, la bactérie peut possiblement dégrader les brins d'ADN de phage néoformés de telle sorte qu'ils ne puissent pas engendrer de nouveaux virions. Ce phénomène a par exemple lieu chez *Vibrio cholerae* avec le phage  $\Phi$ 149, où une protéine de la membrane interne de la bactérie déstabilise ces brins d'ADN (Biswas *et al.*, 1992).

Il existe un autre mécanisme de résistance agissant sur le génome des phages, nommé CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*). Cet acronyme désigne une série de courtes séquences génétiques répétées, régulièrement entrecoupées sur le génome des bactéries par d'autres séquences variables nommées « *spacers* ». Les *loci* des CRISPR sont habituellement situés à proximité de gènes *Cas* (*CRISPR-associated*).

Des CRISPR ont été observés chez près de 40 % des eubactéries séquencées et sur près de 90 % des archaebactéries séquencées à ce jour (Horvath et Barrangou, 2010 ; Hyman et Abedon, 2010). Découvert en 1987 mais véritablement étudié à partir de 2005, le système CRISPR/*Cas* possède un mécanisme toujours mal compris à l'heure actuelle, et supposé fonctionner ainsi (Garneau, 2009) :

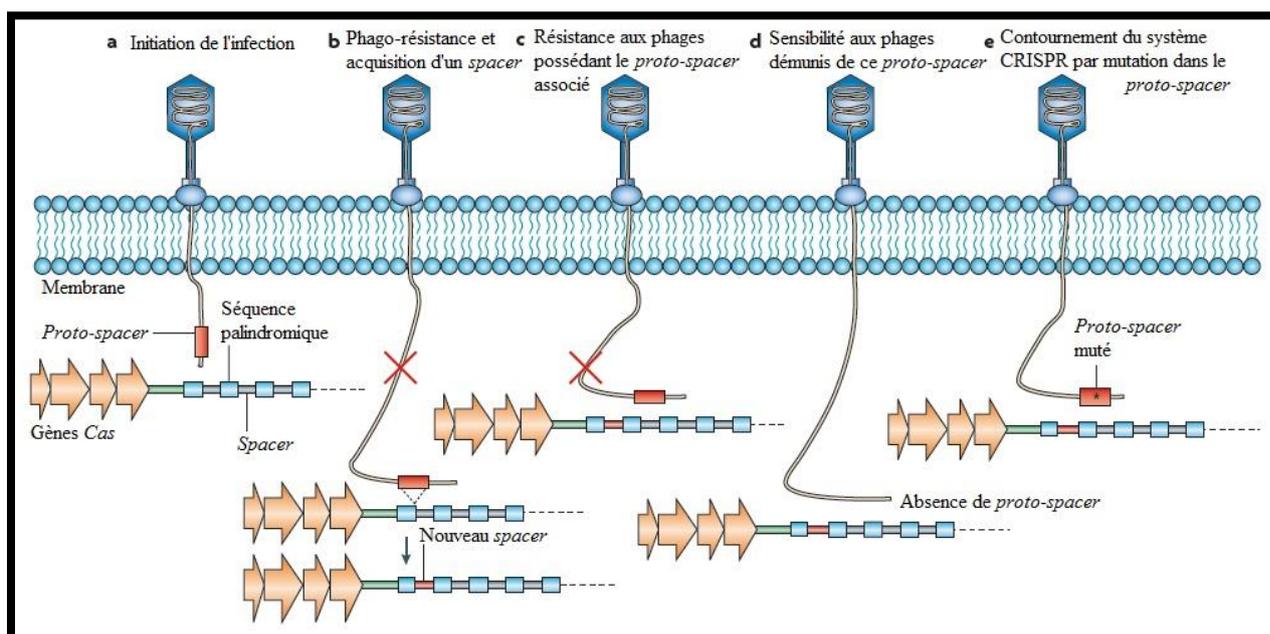
- les gènes *Cas* codent des protéines *Cas* ;
- les CRISPR sont transcrits en ARN ;
- ces ARN sont découpés par certaines protéines *Cas* au niveau des séquences palindromiques en ARN de plus petites tailles, chaque ARN comportant alors un *spacer* ;
- lorsqu'un phage infecte la bactérie et que son génome porte une séquence identique à 100 % à un *spacer* (séquence que l'on nomme *proto-spacer*), alors le petit ARN portant ce *spacer* s'hybride avec le génome phagique infectant ou aux brins néoformés au niveau de ce *proto-spacer*, à l'instar d'un ARN interférent ;
- suite à cette hybridation, le petit ARN déclenche la dégradation ou l'arrêt de la traduction des ARNm viraux. L'infection par le phage est alors bloquée.

Il a été démontré que la mise en contact de bactéries portant des CRISPR avec des bactériophages entraînerait l'apparition de nouveaux *spacers* dans les *loci* des CRISPR des bactéries non éliminées par les phages et donc une acquisition de résistances vis-à-vis des phages portant des *proto-spacer* correspondant à ces nouveaux *loci* (figure 24). De plus les *spacers* correspondraient à la base à un ADN extrachromosomique et dériveraient du génome des phages rencontrés précédemment par la bactérie. L'apparition de ces *spacers* est perçue comme un mécanisme adaptatif d'immunisation des bactéries vis-à-vis des infections de phages. Le mécanisme d'acquisition de ces nouveaux *spacers* demeure lui aussi mal compris. Les scientifiques supposent le déroulement suivant (Labrie *et al.*, 2010) :

- lors d'une attaque des bactéries par les phages, les bactéries phago-résistantes (par un autre mécanisme que celui des CRISPR) ne sont pas éliminées (il resterait environ  $10^{-6}$  bactéries) ;
- parmi ces dernières irréductibles, celles comportant des CRISPR et infectées par un phage portant un *proto-spacer* vont acquérir à partir du génome de leur dernier bioagresseur un nouveau spacer correspondant au *proto-spacer* phagique et espacé par une nouvelle séquence palindromique ;
- par ce nouvel ajout, les bactéries deviennent alors insensibles aux phages possédant ce *proto-spacer*.

Les scientifiques considèrent ainsi les CRISPR comme une sorte d'historique des infections phagiques rencontrées par la bactérie (Barrangou *et al.*, 2007).

Figure 24 : Schéma représentant le système CRISPR/Cas



D'après (Labrie *et al.*, 2010). Ce schéma présente le mode d'action proposé du système CRISPR/Cas. Lors d'une infection de bactéries par des bactériophages (a), les phages vont éliminer une grande partie des cellules bactériennes. Certaines bactéries vont survivre à cette attaque et vont ajouter un nouveau *spacer* à leur génome, correspondant au *proto-spacer* des phages rencontrés lors de cette dernière infection (b). Les bactéries possédant ce nouveau *spacer* vont alors devenir résistantes aux phages portant le *proto-spacer* correspondant (c), mais demeurent sensibles aux phages exempts de ce *proto-spacer* (d). La co-évolution phage-bactérie va permettre le contournement de cette résistance par mutation du *proto-spacer* correspondant (e).

### 3.2.1.4 Intégration d'un phage tempéré

Une bactérie attaquée par un phage tempéré acquiert le génome viral. Au lieu de la détruire, le génome du phage devient un composant à part entière de la cellule bactérienne. L'infection n'est pas combattue puisque les bactéries ne sont pas détruites. Pire, les bactéries infectées deviennent résistantes à ce phage intégré ainsi qu'aux phages proches génétiquement (Abedon *et al.*, 2011 ; Dublanquet, 2009).

### 3.2.2 Des conséquences cependant limitées

Au vu de l'existence de ces phago-résistances, de leur évolution continue et de l'étroitesse du spectre d'action des phages, il est probable qu'arrive le moment où, comme

pour les antibiotiques, il soit de plus en plus difficile de trouver un phage capable d'infecter une future bactérie multirésistante aux phages. Pourtant les risques d'une telle situation semblent faibles (Örmälä et Jalasvuori, 2013).

#### 3.2.2.1 Des phago-résistances limitées par le spectre d'action des phages

Tout d'abord, le spectre d'action d'un phage étant relativement étroit, seules les bactéries cibles sont susceptibles devenir résistantes à ce phage. Cela limite la quantité de bactéries pouvant potentiellement évoluer dans ce sens, en comparaison du nombre de bactéries exposées au risque de devenir antibiorésistantes lors d'administration d'un antibiotique (Loc-Carrillo et Abedon, 2011).

#### 3.2.2.2 Une thérapeutique adaptable selon les résistances

Si un traitement se heurte à une phago-résistance, il est possible de contourner le problème. Comme indiqué précédemment, une bactérie peut être la cible de plusieurs phages différents. Il est donc dans ce cas intéressant d'employer des phages différents ciblant cette même bactérie (utilisation en cocktail), de manière à ce que plusieurs récepteurs bactériens différents soient visés et non pas un seul, car chaque type de bactériophage se fixe sur un récepteur distinct. Les chances de réussites de la phagothérapie sont alors relativement augmentées car la probabilité d'avoir des mutations sur l'ensemble des structures de la surface des bactéries est inversement proportionnelle au nombre de structures (Sulakvelidze *et al.*, 2001) et (Dublanche, 2009).

Il s'agit là du même procédé employé en antibiothérapie lorsque des antibiotiques ayant des mécanismes d'action différents sont combinés en même temps (Dublanche, 2009).

En revanche, comme le soulignent Örmälä et Jalasvuori, cette technique n'est qu'un contournement du problème, et ne fait donc que retarder la confrontation avec ces phago-résistances. De plus, si des cocktails contenant des phages initialement prédéfinis sont utilisés continuellement à la manière des antibiotiques, cette pratique risque d'engendrer des résistances bactériennes : il est donc légitime de se demander si l'évolution des bactéries ne risque pas de devancer celle des phages utilisés dans ces cocktails (Örmälä et Jalasvuori, 2013). Pour pallier ce risque, comme l'affirment Kutateladze et Adamia, il serait nécessaire

de continuellement mettre à jour la composition des cocktails thérapeutiques plutôt que de rester sur une préparation figée, de manière à suivre l'évolution des bactéries cibles (Kutateladze et Adamia, 2010).

### 3.2.2.3 Les phages peuvent eux aussi muter

Les phages et les bactéries sont dans un équilibre permanent, où l'évolution permet à chaque entité de s'adapter en sélectionnant des individus aux mutations *ad hoc* et donc de perdurer dans le temps. Le bactériophage étant une entité pouvant s'adapter aux situations, lorsqu'une bactérie évolue en acquérant des résistances, le phage correspondant est tout aussi susceptible de présenter des mutations lui permettant de passer outre les résistances de la bactérie. Cette co-évolution permet de relativiser le risque de sélection de souches bactériennes résistantes aux phages (Dublanche et Patey, 2011 ; Pirisi, 2000).

Concernant le système CRISPR/Cas, l'action semble tout d'abord être limitée aux phages que la bactérie a déjà rencontrés auparavant, c'est-à-dire au cours d'une infection pour laquelle elle s'était déjà révélée résistante. Cela limite relativement la probabilité de survenue de ce mécanisme (Hyman et Abedon, 2010).

Ensuite, les bactériophages peuvent éviter d'être confrontés à une phago-résistance bactérienne due à la présence de *spacers* correspondant aux *proto-spacers* du phage, *via* un réarrangement dans ce *proto-spacer* (Labrie *et al.*, 2010). Ce mécanisme peut consister en une recombinaison homologue, une mutation ponctuelle ou une courte délétion (Andersson et Banfield, 2008 ; Garneau, 2009).

### 3.2.2.4 La résistance bactérienne a un prix

Pour connaître le coût qu'engendre une phago-résistance, on étudie le « fitness » d'une population bactérienne qui correspond au taux de croissance du mutant résistant comparé à celui du type parental sauvage sensible.

Lors de leurs travaux, Gomez et Buckling ont mis en présence des phages et leur bactéries hôtes dans un milieu pauvre et non pas sur des milieux nutritifs habituels, de manière à se rapprocher plus de la réalité que rencontrent les phages et les bactéries au

quotidien. Ils ont ensuite isolé les bactéries et les phages à différents moments de la mise en présence, de manière à obtenir des bactéries et des phages à différents stades d'évolution.

Habituellement, sur les milieux nutritifs traditionnels, riches en éléments nécessaires à la croissance des bactéries, utilisés *in vitro* en laboratoire, la co-évolution ayant lieu entre les bactéries et les phages résulte en une « course aux armements » où la résistance et la virulence respective de chacun des protagonistes augmentent avec le temps. Ainsi, les bactéries s'avèrent plus résistantes aux phages appartenant aux niveaux d'évolution antérieurs (phages passés) qu'à ceux contemporains, et les phages sont plus virulents envers les bactéries passées qu'avec les contemporaines.

Au contraire, sur le milieu pauvre qu'ils ont utilisé, ils ont remarqué que les bactéries étudiées étaient plus sensibles à des phages passés ou futurs qu'aux phages contemporains à la bactérie. La résistance des bactéries se limitait donc aux phages contemporains et n'augmentait pas avec le temps. La situation inverse (phage moins efficace sur sa bactérie hôte contemporaine que sur une version ancienne ou nouvelle de cette bactérie) était également observable. Ils ont de plus observé que le fitness d'un génotype donné pour les bactéries et pour les virus changeait avec le temps, signe de dynamiques de sélections fluctuantes.

De manière à approfondir la compréhension de leurs observations, ils ont mis en culture des bactéries résistantes ou sensibles aux phages sur des milieux riches ou pauvres. Cette expérience a montré que, pour les bactéries résistantes ou non sur milieu riche et pour les bactéries sensibles sur milieu pauvre, le fitness était inchangé, tandis que les bactéries résistantes sur milieu pauvre perdaient 36 % de fitness. La résistance aux phages était donc coûteuse aux dépens de la multiplication bactérienne, et cette dépense s'avérait désavantageuse, surtout pour une résistance contre des phages n'étant plus présents dans l'environnement en contact avec la bactérie (Gómez et Buckling, 2011 ; Sanchez, 2011).

Ce prix peut en particulier se présenter sous la forme d'une restriction des capacités de la bactérie phago-résistante. Pour s'arrimer à une bactérie, le bactériophage se sert d'une structure située à la surface de la bactérie. Comme indiqué précédemment, cette structure bactérienne peut être modifiée ou perdue, notamment par mutation génétique, et la bactérie devient alors résistante au phage. Cependant, s'il s'agit d'un facteur de virulence ou d'une structure essentielle à la survie de la bactérie (comme cela semble être souvent le cas), la perte ou la modification de cette structure s'avère généralement néfaste à la bactérie et diminue son pouvoir pathogène (Filippov *et al.*, 2011 ; Levin et Bull, 2004). La bactérie étant devenue

avirulente, elle est en règle générale rapidement éliminée par le système immunitaire de l'organisme (Capparelli *et al.*, 2010).

Il a toutefois été observé l'existence de bactéries dont l'acquisition d'une résistance aux phages, sous certaines conditions environnementales, n'entraînait aucun coût. De plus amples recherches sont donc encore nécessaires sur ce point (Meyer *et al.*, 2010) et (Örmälä et Jalasvuori, 2013)

### 3.2.2.5 Un développement lent des phago-résistances

D'après Carlton, les phago-résistances se mettraient en place relativement lentement, environ dix fois plus lentement que celles mises en place contre les antibiotiques : toutes les  $10^6$  divisions bactériennes pour les antibiotiques, contre  $10^7$  pour les bactériophages (Carlton, 1999). Or, les phages ont une croissance exponentielle, permettant à leur population de surpasser rapidement celle des bactéries, et ils mutent eux aussi et au même rythme que leurs cellules hôtes. Le différentiel temporel entre le développement des phago-résistances bactériennes, les adaptations des phages à ces résistances et la croissance entre les populations de phage et de bactérie pencherait donc plutôt en faveur des phages et permettrait à la bactériophagie de ne pas être complètement dépassée par ces phago-résistances (Inal, 2003).

## 3.3 Handicap pharmacologique

### 3.3.1 Nécessité de cibler le traitement

Les bactériophages ont la propriété d'être spécifiques d'une espèce de bactérie, et parfois de seulement quelques représentants de cette espèce (Dublanche, 2009). Le niveau de spécificité varie d'une espèce de phage à l'autre. Cependant il existe souvent plusieurs phages spécifiques de la même bactérie, au minimum une dizaine de bactériophages spécifiques d'une bactérie donnée (Skurnik et Strauch, 2006). Cette spécificité provient de la reconnaissance par les phages de récepteurs particuliers localisés à la surface des bactéries.

Une phagothérapie correcte nécessite de connaître la bactérie à combattre, et cela peut être contraignant pour l'utilisation en routine (Smith *et al.*, 1987). Il y a plusieurs obstacles à cela (Dublanche, 2009) :

- il est nécessaire d'isoler et d'étudier la bactérie responsable de la maladie, ce qui implique de réaliser un prélèvement correct et d'avoir un laboratoire performant. Cela demande de la maîtrise, du temps et des frais ;
- la zone d'infection est parfois difficile à atteindre, ce qui complique encore la manœuvre de prélèvement (et de traitement qui s'en-suit) ;
- certaines infections sont à germes multiples ;
- enfin, il est important d'isoler et de bien déterminer l'agent pathogène effectif et non pas un contaminant (contamination extérieure ou flore commensale), sous peine d'échec thérapeutique.

Cependant, les antibiotiques à spectre étroit connaissent le même problème, dans une moindre mesure. Cela explique le succès des antibiotiques à large spectre en première intention, et par conséquent l'augmentation actuelle des résistances aux antibiotiques. Lors d'antibiothérapie il arrive souvent qu'un antibiotique à large spectre soit mis en place, le temps d'identifier la bactérie et l'antibiotique le plus adapté contre elles, pour ensuite, si nécessaire, réadapter le traitement avec ce dernier (Dublanche, 2009).

De la même manière, il est possible d'employer un cocktail, permettant ainsi d'élargir le spectre d'action du traitement, et s'assurer par exemple que tous les germes incriminables soient bien éliminés.

L'isolement de la bactérie pathogène d'une maladie est important à réaliser, cependant, lors d'infection grave à évolution rapide, l'emploi d'un cocktail est fortement recommandé, pour le traitement d'attaque le temps de trouver le bactériophage spécifiquement dirigé contre cette bactérie.

### 3.3.2 Problème d'inactivation par le système immunitaire

Il existe un risque d'inhibition des bactériophages par le système immunitaire au sein de l'organisme. En effet, les phages peuvent interagir avec différentes cellules de l'immunité

(voir chapitre « Interaction avec le système immunitaire » dans la partie II). Les anticorps anti-phage semblent les plus à même de réaliser cette inhibition.

Cependant, cette interaction ne semble pas avoir un grand impact sur le traitement par phagothérapie (Loc-Carrillo et Abedon, 2011). Tout d'abord, plusieurs expérimentations de phagothérapie n'ont pas conduit à la production d'anticorps anti-phage, en particulier lors d'administration orale. De plus, avec ou sans anticorps il semble que l'interaction avec le système immunitaire n'influence que très peu l'issue du traitement (Bruttin et Brüssow, 2005 ; Capparelli *et al.*, 2010, 2007 ; Górski *et al.*, 2012). La question de l'interaction au long terme, par exemple lors de traitement d'une récurrence, demeure cependant encore difficile à élucider et nécessite plus de recherche.

Néanmoins, il est possible de limiter ces problèmes d'inactivation en employant une méthode de sélection décrite par l'équipe de Merrill et nommée « passage en série ». En effet, par cette méthode développée plus loin, il est possible de sélectionner des phages capables d'éviter d'être piégés par les cellules immunitaires (Merrill *et al.*, 1996).

### 3.3.3 Un seuil bactérien nécessaire à atteindre

Lorsqu'une infection bactérienne n'en est encore qu'aux tous premiers stades, la population bactérienne est relativement faible, les chances de rencontres aléatoires entre les bactéries et les bactériophages sont donc faibles et le seuil de densité bactérienne nécessaire à la reproduction phagique n'est pas atteint. Les bactériophages ne sont alors pas efficaces contre cette infection car ils sont éliminés avant d'avoir atteint leurs cibles.

De même, si l'infection à traiter est due à des bactéries à multiplication lente, le seuil de population bactérienne nécessaire à atteindre est obtenu plus tardivement que sur une infection provoquée par des bactéries se multipliant rapidement. Il est alors possible de se retrouver dans une situation où les phages ne sont pas efficaces.

Ce point est donc à prendre en compte lors de mise en place d'une phagothérapie, pour ne pas se retrouver face à un échec thérapeutique. Pour éviter cet échec, il vaut mieux ne pas commencer une phagothérapie dès le tout début d'une infection, et privilégier des administrations multiples lors d'infection à croissance lente, contrairement aux infections à

croissance rapide où un faible nombre d'administrations, voire une unique administration, suffit (Capparelli *et al.*, 2010, 2007 ; Wiggins et Alexander, 1985).

### 3.3.4 Problème de translocation

L'infection d'une bactérie par un phage se réalise à la faveur d'une collision aléatoire entre les deux éléments, et non pas à la suite d'une recherche active de la bactérie par le phage. Pour combattre une infection bactérienne, il est donc nécessaire de favoriser cette collision. Or, lors d'administration systémique de bactériophages, ceux-ci vont circuler dans l'organisme de manière aléatoire, il y a donc de fortes chances qu'une partie seulement des phages atteigne le lieu d'infection. Cela engendrerait donc une perte quantitative de phages efficaces. En outre, si ces phages arrivaient au lieu d'infection en sous-nombre par rapport au seuil de phages nécessaires à une bonne reproduction virale, le traitement ne sera pas efficace (Debarbieux, communication personnelle).

Les infections affectant les organes internes semblent ainsi théoriquement plus difficiles à combattre que celles locales (plaie cutanée, atteinte du tractus digestif, etc.). Pour obtenir une bonne efficacité de la phagothérapie, il vaut donc mieux privilégier les traitements locaux.

### 3.3.5 Inefficacité face aux bactéries intracellulaires

La caractéristique même des bactéries intracellulaires est de se développer au sein d'une cellule de l'organisme et donc de ne pas être accessible de l'extérieur. Le bactériophage ne pénétrant pas les cellules autres que les bactéries, il semble que la phagothérapie pour ces bactéries intracellulaires soit inappropriée au premier abord.

Quelques études ont tenté de traiter des infections à germes intracellulaires. Une étude a rapporté l'efficacité de phages dans la lutte contre une salmonellose chez des enfants néanmoins le mécanisme d'action ayant opéré n'a pas été correctement élucidé. De même, des expériences menées en 1940 sur la fièvre typhoïde due à *Salmonella typhi* (bacille d'Eberth), ont donné de plutôt bons résultats thérapeutiques (Dublanchet, 2009). Il faut néanmoins

garder en mémoire que les salmonelles ne sont que des bactéries intracellulaire facultatives, l'interprétation des résultats de ces travaux reste donc difficile.

Après avoir découvert dans le génome de *Legionella pneumophila*, germe intracellulaire strict, la présence de séquences comportant de fortes analogies avec des phages, preuve indirecte de l'existence de bactériophages dirigés contre cette bactérie, le Centre National de Référence des légionnelles (Institut de Veille Sanitaire), en collaboration avec une équipe belge menée par le Dr. Lammertyn, a cherché des preuves directes de cette existence. Ils ont effectivement abouti à la conclusion qu'il devait exister des bactériophages dirigés contre ces germes intracellulaires stricts (Lammertyn *et al.*, 2008).

Pour l'instant, la question de l'efficacité potentielle de la phagothérapie sur des bactéries intracellulaires demeure non élucidée.

## 4 Indications

### 4.1 Passé, présent et avenir

#### 4.1.1 Un recul historique important

La phagothérapie n'est pas nouvelle. Découverte et pratiquée avant l'antibiothérapie, elle bénéficie d'une histoire riche en recherche et en expérimentation. Une très large bibliographie rapporte par le passé des réussites dans les guérisons de diverses maladies par la phagothérapie. Sa pratique n'ayant jamais cessé dans les pays de l'Europe de l'Est, ses quatre-vingt-dix ans d'utilisation ont permis l'acquisition d'une importante expérience empirique sur l'efficacité et la sûreté des traitements.

La phagothérapie est depuis longtemps largement reconnue comme étant une méthode à succès dans les pays d'Europe de l'Est, en particulier en Géorgie où la capitale Tbilissi abrite l'Institut Eliava du Bactériophage. Cet institut est le lieu d'importantes recherches en microbiologie et en virologie, et les scientifiques y étudient les bactériophages depuis 1934. Ces scientifiques rapportent par ailleurs un taux de réussite de 80 % dans le traitement phagique des infections à *Enterococcus*. Comme en Géorgie, la Russie et la Pologne travaillent depuis très longtemps sur ce sujet. Les chercheurs polonais rapportent 90 % de succès dans le traitement d'infections diverses dues à *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* (Pirisi, 2000).

En France, dans les années 80, les guérisons par phagothérapie ont aussi largement été rapportées dans le domaine des infections locales en échec thérapeutique (otites externes, cicatrices, ...) et en particulier pour des cas d'infections ostéo-articulaires pour lesquelles soit le seul traitement proposé était l'amputation, soit aucun traitement n'était envisageable (cas d'infection des os du bassin, cas de personnes âgées atteintes d'infection sur prothèse ostéo-articulaire de la hanche et du genou). Ces traitements proposés notamment par les équipes

médicales menées par Alain Dublanchet, s'ancraient dans une tradition de traitement par les bactériophages et aucune publication n'en a été réalisé (Dublanchet et Patey, 2011).

## 4.1.2 Une actualité riche

### 4.1.2.1 Une communauté active

La promotion de l'emploi des phages par ses utilisateurs est restée pendant longtemps inexistante. La place réservée aux phages dans la thérapie a marginalisé pendant près de 60 ans ses partisans. Aujourd'hui une communauté soudée et active essaie de valoriser et de faire connaître auprès d'un large public le potentiel et les possibilités offerts par la phagothérapie.

#### 4.1.2.1.1 Des communautés de scientifiques actives

Grace à internet et au relais des nouveaux média de communication, une communauté de scientifiques et de chercheurs actifs a pu se mettre en place. Au-delà de la diffusion des recherches sur les phages *via* les réseaux scientifiques, une véritable « chaîne » de promotion et d'exploration des phages existe au travers du monde.

On peut citer comme principal exemple le « Bacteriophage Ecology Group » (<http://www.phage.org>) qui ne compte pas moins de 186 membres provenant de 37 pays et représentant 134 institutions scientifiques différentes. Ce groupe actif partage recherches, listes de publications et descriptions des phages. Il diffuse à ses membres des newsletters, une liste de colloques et des discussions sur les phages et la phagothérapie.

L'association GEEPhage (<http://www.geephage.org/joomla/>) est également une communauté scientifique. Sous-groupe du GEEP, association de médecins, biologistes et chercheurs spécialisés dans l'infectiologie, elle rassemble des spécialistes de la phagothérapie qui tentent de faire connaître et comprendre la phagothérapie.

#### 4.1.2.1.2 Des associations partout dans le monde

Chez les particuliers, la mobilisation est également très forte. Pour eux, la phagothérapie est synonyme d'espoir, et l'ouverture à cette « vieille thérapie » n'avance que trop lentement. Des associations ont vu le jour pour promouvoir sa réévaluation par les gouvernements et par les laboratoires :

- PhagEspoir (<http://phagespoirs.unblog.fr>) ;
- Phages for Human Application Group Europe (P.H.A.G.E.) (<http://www.p-h-a-g-e.org/>).

Les associations de lutte contre les infections multirésistantes et contre les maladies nosocomiales en ont également fait leur cheval de bataille :

- Alliance contre le développement des bactéries multirésistantes (ACdeBMR) (<http://www.waaar.org/>);
- Association des Victimes d'Infections Nosocomiales (ADVIN) (<http://www.advin.org/>);
- Le Lien (<http://lelien-association.fr/site/tiki-index.php>).

De plus en plus, ces associations prennent part aux débats et essayent de réhabiliter les phages .On compte pour l'année 2013 plus d'une dizaine d'événements en France pour informer les particuliers de l'alternative que pourraient représenter les phages pour combattre certaines bactéries aujourd'hui antibiorésistantes.

#### 4.1.2.1.3 Des témoignages de patients

Comme on l'observe dans de nombreux articles de presse (Maruchitch et Savolainen, 2012 ; Zarzavatdjan, 2013), le témoignage de patients traités par phagothérapie est un vecteur fort de médiatisation et de mobilisation. Des témoignages comme celui de Serge Fortuna (<http://www.les-phages.com/>) portent un éclairage sur la façon dont est vécue la phagothérapie par les patients atteints de maladies nosocomiales résistantes à l'antibiothérapie.

On peut trouver ainsi plus d'une trentaine de témoignages dans au moins cinq langues différentes racontant les « horreurs » des traitements classiques aux bactéries multirésistantes. Leurs conclusions, toutes en faveur des bactériophages, interpellent par la ferveur et la confiance de ceux qui les rédigent.

#### 4.1.2.2 Une meilleure médiatisation

##### 4.1.2.2.1 Congrès

Le terme « phagothérapie » se fait de plus en plus entendre lors des congrès ou des séminaires présentant les problèmes actuels d'antibiorésistances et débattant des solutions à appliquer ou décrivant les nouvelles avancées biotechnologiques. On note également un nombre croissant de rendez-vous consacrés spécifiquement aux bactériophages et à la phagothérapie. Le magazine scientifique « Landes Bioscience » ne recense pas moins de 26 rendez-vous à travers le monde (principalement aux États-Unis d'Amérique), uniquement sur l'année 2013 (Landes Bioscience, 2013), et sa liste n'est pas exhaustive (voir annexe 2).

J'ai ainsi assisté au forum « Renouveau de la phagothérapie : Pourquoi ? Comment ? » (non cité par Landes Bioscience) qui s'est tenu à l'auditorium de l'Institut Montsouris (Paris) en janvier 2013 (organisé par l'école de biotechnologie Sup'biotech).

Certains de ces rendez-vous sont organisés par des associations de patients et de médecins, comme le forum « Infection à Microbes coriaces : Tous concernés » (Narbonne, janvier 2012) organisé par les associations Phag Espoir et Le Lien. D'autres sont organisés par des Instituts de recherche comme le séminaire « La phagothérapie : Enjeux et Défis » (Paris, mars 2011) présenté par l'Institut de Génétique et de Microbiologie de l'Université Paris XI, ou comme le Colloque international transdisciplinaire « Virus de microbes » (Paris, juin 2010) organisé par l'Institut Pasteur. On trouve même des ateliers pratiques d'utilisation des bactériophages à des fins thérapeutiques, par exemple le Workshop organisé par le GEEPhage en mars 2011 à l'École de Formation du Service de Santé des Armées du Val de Grâce à Paris (FC2M, 2011).

##### 4.1.2.2.2 Information internet, audio et télévisuelle

De plus en plus d'informations sur la phagothérapie circulent désormais sur les supports audio et télévisuels. Plusieurs reportages traitent du sujet à la télévision, par exemple le documentaire « La guerre des phages », le reportage « Virus contre bactérie » rediffusé par la chaîne française Arte le 26 janvier 2012 (Khenkine, 2009), ou le documentaire traitant du projet Phagoburn sur la chaîne suisse RTS le 11 septembre 2013 (RTS, 2013).

Des émissions radio ont également vu le jour. On peut citer les interviews données par Laurent Debarbieux, chercheur à l'Institut Pasteur sur Aligre FM (radio locale parisienne) et sur la Radio Suisse Romande (Institut Pasteur, 2012).

Et que dire de la masse d'articles internet, si ce n'est remarquer sa colossale expansion. Les termes « phage therapy » et « phagothérapie » offrent respectivement 1 870 000 et 287 000 résultats lors d'une recherche sur le moteur de recherche internet Google (obtention de ces résultats le 27/11/2013).

#### 4.1.2.2.3 Presse écrite

La documentation concernant cette thérapie ne se limite plus au cercle quelque peu austère des publications purement scientifiques. La vulgarisation concernant les phages gagne du terrain, passant de revues scientifiques ou médicales grand public comme « Science et vie junior », « Que choisir santé » ou « Viva », à des journaux plus généralistes tels que Paris Match (Zaravatdjian, 2013), le Monde (Maruchitch et Savolainen, 2012) ou l'Indépendant (L'Indépendant, 2013a, 2013b).

#### 4.1.2.3 Utilisation médicale actuelle

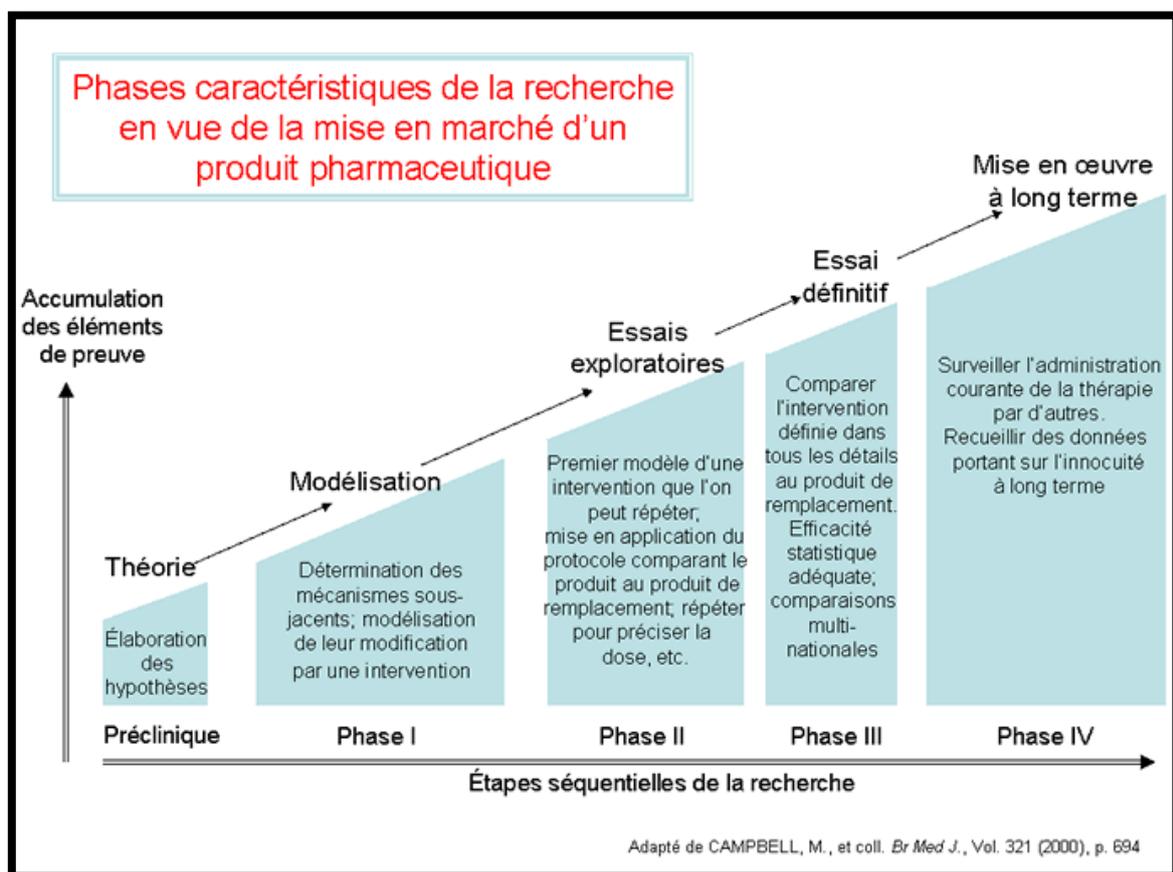
##### 4.1.2.3.1 En médecine humaine

La phagothérapie n'est actuellement officiellement autorisée en médecine humaine que dans certains pays tels que la Pologne, la Géorgie et la Russie. Dans les autres pays (France, Allemagne, Belgique, États-Unis d'Amérique, Canada ou Australie), elle n'est utilisée que ponctuellement dans des cas d'impasses thérapeutiques et dans le cadre d'un usage compassionnel, usage particulier reposant sur la Déclaration d'Helsinki, sous la seule

responsabilité du médecin en accord avec son patient. Le panel d'infections traitées par phagothérapie, autorisée ou tolérée ponctuellement, est relativement large.

Des essais cliniques ont été menés dans le but d'obtenir une future Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). Trois de ces essais cliniques ont correctement suivi les procédures sanitaires actuelles particulièrement rigoureuses (figure 25) et se sont montrés particulièrement convaincant pour ce qui concerne l'efficacité et la non dangerosité des traitements : il s'agit d'essais réalisés en Angleterre, aux États-Unis d'Amérique et en Belgique (Kutter *et al.*, 2010).

Figure 25 : Les différentes étapes des essais cliniques



D'après (Université Ottawa, 2013). Les essais cliniques comportent différentes étapes à franchir avant de permettre à un médicament d'accéder à une AMM. A chaque étape correspond une démarche différente. Avant ces essais cliniques se déroulent des études précliniques réalisées *in vitro* et *in vivo* sur des modèles animaux. Les phases suivantes des essais sont mises en places chez l'homme : les essais de phase I et II (séparés en IIa et IIb) chez des volontaires sains et ceux de phase III chez des patients. La phase IV correspond à la pharmacovigilance du médicament après commercialisation.

Les premiers essais concernent des otites chroniques à *Pseudomonas aeruginosa*. Des études de phase I et de phase IIa ont été réalisées sur ces infections en 2007 à l'Hôpital Royal National d'Otorhinolaryngologie de Londres (Wright *et al.*, 2009)

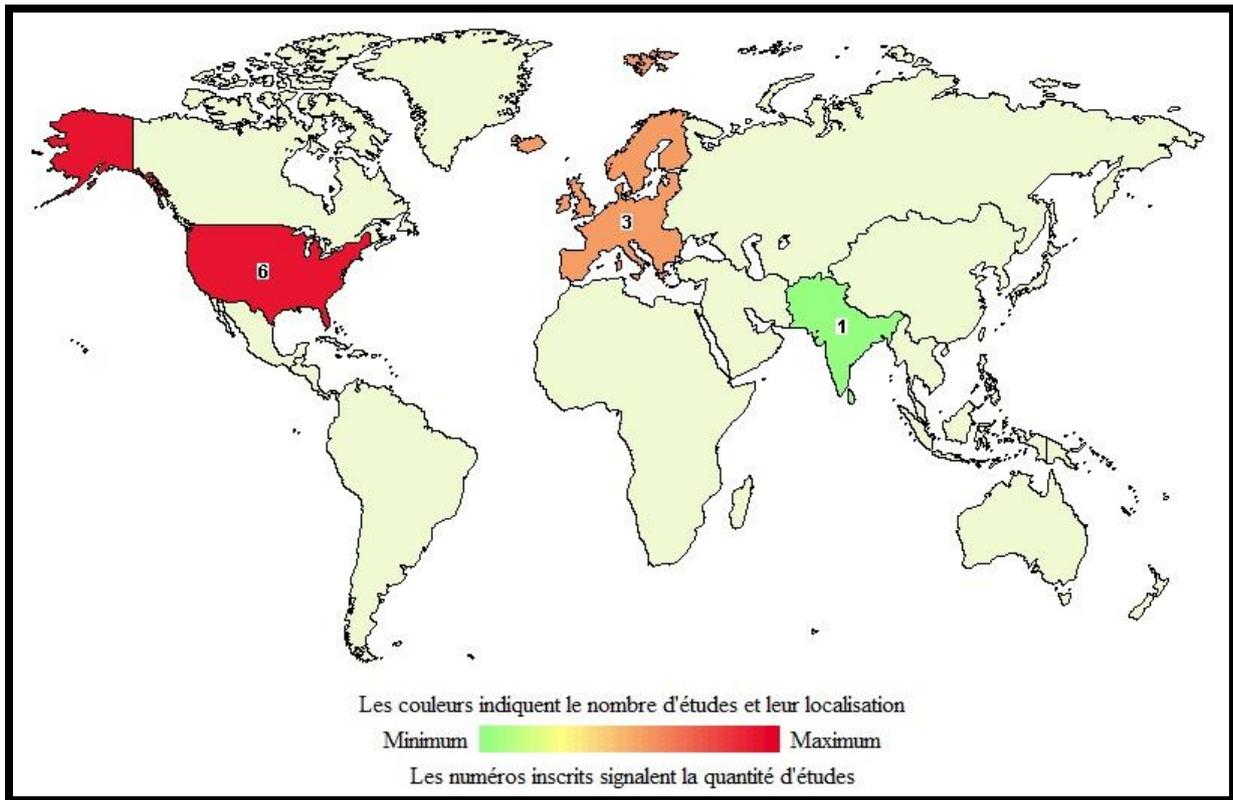
Les essais réalisés en Belgique se sont portés sur l'étude de traitement par des phages de surinfections bactériennes de brûlures (Merabishvili *et al.*, 2009).

Enfin, les essais américains sont en cours au Centre Régional de Traitement des Blessures à Lubbock (Texas). Il s'agit d'essais de phase I à propos d'un cocktail homologué de bactériophages contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. (Clinical Trials, 2011 ; Rhoads *et al.*, 2009).

D'autres essais (figure 26) sont en cours en Inde, au Canada, en Europe, etc. Pour exemple, on peut citer les programmes de recherches de l'Institut Pasteur (en collaboration avec l'association Phag Espoir), le premier nommé « MucoPhage » concernant les infections à *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes chez les personnes atteintes de mucoviscidose et le deuxième, RéapyoPhage, ciblant les bactéries mais dans les services de réanimation (Institut Pasteur, 2012).

On peut également parler du projet de recherche nommé Phagoburn ([www.phagoburn.eu](http://www.phagoburn.eu)), projet collaboratif européen dans le cadre du septième Programme Cadre de Recherche et Développement (Programme Santé). Ce projet, lancé le 1<sup>er</sup> juin 2013 pour une durée de 27 mois, tend à évaluer la phagothérapie appliquée à des infections cutanées par *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients brûlés. Elle est conduite dans les services des grands brûlés de l'Hôpital Militaire Percy (France), l'Hôpital Reine Astrid (Belgique) et le CHU Vaudois (Suisse). Le projet est coordonné par le Service de santé des Armées (Ministère français de la Défense) en collaboration entre autres avec Pherecydes Pharma (<http://www.pherecydes-pharma.com/>), société française spécialisée en bio-nano-technologies utilisant des phages (CORDIS, 2013).

Figure 26 : Carte mondiale des études cliniques de phagothérapie



D'après (Clinical Trials, 2013). La base de données des Instituts Nationaux de Santé Américain (*U.S. National Institutes of Health*) recense les études cliniques importantes dans le monde, terminées ou en cours. Cette carte représente le résultat obtenu pour le terme de recherche « phage therapy ».

#### 4.1.2.3.2 En médecine vétérinaire

De nombreuses études précliniques ou à usage spécifiquement vétérinaire ont été réalisées ces 30 dernières années sur des animaux de laboratoires, surtout des souris (Biswas *et al.*, 2002 ; Smith et Huggins, 1982 ; Soothill, 1992 ; Uchiyama *et al.*, 2009), mais aussi sur des animaux d'élevage comme des volailles, des agneaux, des porcelets et des veaux (CAS, 2012 ; Fiorentin *et al.*, 2005 ; Goodridge et Bisha, 2011 ; Smith et Huggins, 1983 ; Wall *et al.*, 2010).

À l'heure actuelle, certains traitements vétérinaires sont commercialisés dans le monde. Aux États-Unis d'Amérique a été fabriqué et commercialisé un médicament à usage vétérinaire contre les dermatites du chien, à base de lysat de phages dirigés contre *Staphylococcus intermedius* (Staphage Lysate (SPL)® des laboratoires Demont). D'autres produits sont prioritairement destinés aux animaux d'élevage, tels que PLSV-1™ (contre les

salmonelles) ou INT-401™ (contre *Clostridium perfringens*) du laboratoire Intralytix utilisés chez les volailles.

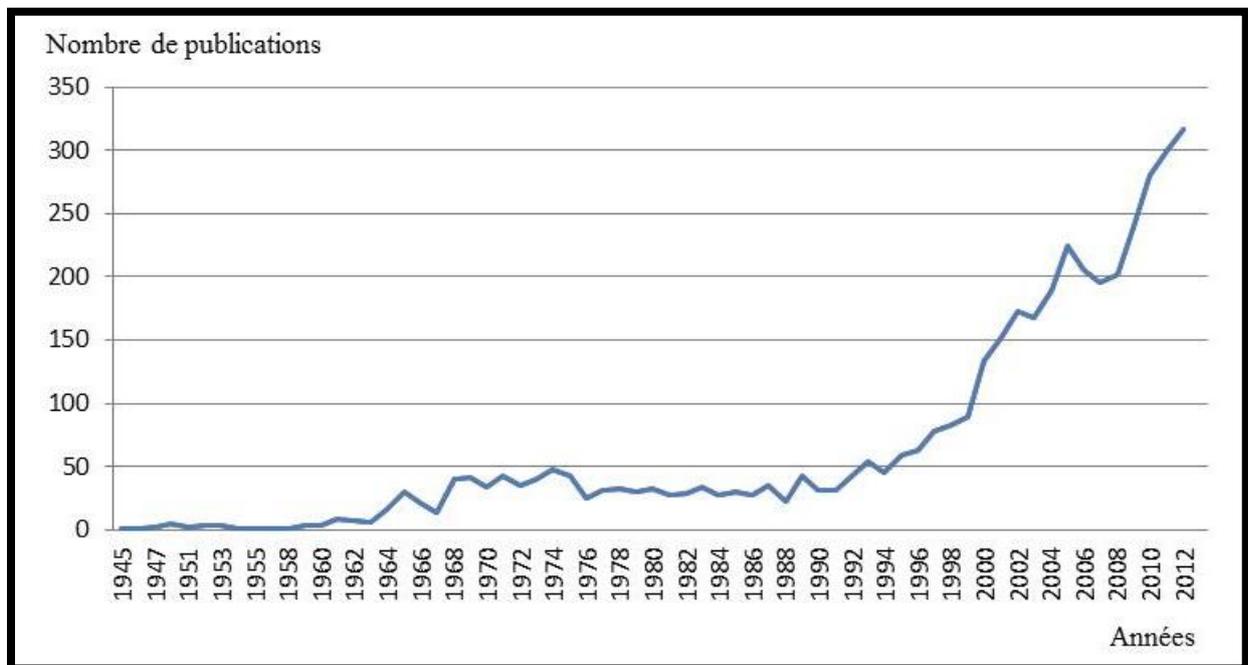
Leur utilisation n'est cependant pas autorisée en Europe.

### 4.1.3 Une recherche en marche

#### 4.1.3.1 Augmentation du nombre de publications

De nombreuses publications voient le jour (figure 27). Google scholar recense 124 000 résultats pour la recherche du terme « *Phage therapy* », et 4456 pour Pubmed (obtention de ces résultats le 27/11/2013). Cette recherche florissante n'a de cesse de démontrer les exploits thérapeutiques des phages (Debarbieux *et al.*, 2010 ; Morello *et al.*, 2011 ; Nale *et al.*, 2012 ; Rhoads *et al.*, 2009 ; Wright *et al.*, 2009).

Figure 27 : Évolution des publications sur Pubmed



D'après (NCBI, 2013). Ce graphique représente le nombre de publications par an sur Pubmed contenant le terme « *phage therapy* », entre 1945 et 2012. On peut y observer une nette augmentation du nombre de publications, en particulier à partir de la fin du XX<sup>ème</sup> siècle.

#### 4.1.3.2 Amélioration de la phagothérapie

##### 4.1.3.2.1 Meilleure purification des suspensions de phages

Les soupçons rencontrés autrefois à l'égard de la pureté des suspensions contenant les phages ne sont plus d'actualité. Il est désormais aisé de purifier les préparations des toxines et autres débris bactériens. L'ancienne technique de purification, décrite par l'équipe de Merrill, consistait en une purification par centrifugation sur coussin (gradient discontinu) de chlorure de césium, ce qui diminuait de plus de 100 fois le niveau de contamination (Merrill *et al.*, 1996). Aujourd'hui, les suspensions peuvent être débarrassées de leurs endotoxines grâce à une technique par chromatographie d'affinité consistant à passer les suspensions sur des colonnes qui retiennent les endotoxines, comme par exemple les colonnes commercialisées sous le nom Endotrap®, dont le ligand est par ailleurs une protéine dérivée des bactériophages et très spécifique des LPS (Dublanche, 2009). Des techniques de purification par chromatographie d'affinité avec un ligand des phages ont également été décrites, permettant d'éliminer les toxines, mais également, dans le même temps, les phages non désirés, en particulier les phages tempérés (Ceglarek *et al.*, 2013).

De plus, il est possible de tester la présence d'endotoxines dans les suspensions après purification par des tests simples *in vitro*, comme le test LAL (Lysat d'Amœbocyte de Limule). En présence d'endotoxines, les amœbocytes, cellules contenues dans l'hémolymphe de limule (*Limulus polyphemus*), sécrètent une protéine transformant cette hémolymphe en gel. Lors d'incorporation d'hémolymphe de limule dans une suspension de phages, ce changement d'état de l'hémolymphe permet donc de caractériser la présence d'endotoxines (Dublanche, 2009).

##### 4.1.3.2.2 Adaptation par passage en série

Parmi les hypothèses ayant autrefois nourri la controverse sur l'efficacité de la phagothérapie, on trouve l'élimination dite rapide des bactériophages de l'organisme. Elle repose sur plusieurs constats d'expériences durant lesquelles les phages étaient, après administration, rapidement retrouvés dans l'urine et les fèces (Merrill *et al.*, 1996 ; Pallares *et*

*al.*, 1995). Les scientifiques considéraient que, pour cette raison, les phages n'avaient pas le temps suffisant pour gagner le foyer d'infection et le maîtriser.

Très tôt après la découverte des bactériophages, D'Hérelle avait déjà observé que plusieurs mises en contact successives *in vitro* entre des phages et leurs bactéries cibles permettaient d'augmenter la virulence des phages (d' Hérelle, 1917).

Lors de leurs expériences en 1996, Merrill et son équipe ont proposé une technique de sélection de phages thérapeutiques plus poussée, pour éviter leur élimination par le système réticulo-endothélial. Il a nommé cette technique « passage en série ». Pour ce faire, ils ont enchaîné les 4 manipulations suivantes en reprenant à chaque étape les phages de l'étape précédente :

- étape 1 : injecter les phages par voie intra-péritonéale à des souris ;
- étape 2 : récupérer les phages par prise de sang 7 h après l'injection ;
- étape 3 : mettre en contact *in vitro* ces phages avec leur bactérie hôte ;
- étape 4 : récupérer ces phages après mise en contact.

Après récupération de ces derniers phages, les auteurs ont à nouveau procédé à l'intégralité de l'opération en reprenant à l'étape 1 et ceci à plusieurs reprises. Ils ont spécifié qu'à chaque enchaînement, les phages devenaient plus persistants dans l'organisme et plus virulents, jusqu'à atteindre un seuil au bout de neuf enchaînements. L'amélioration de ces phages se basait sur une stratégie de sélection naturelle, par laquelle on ne récupérait que les phages les plus efficaces, lesquels présentaient une mutation d'une des protéines de la capsid, leur conférant ce phénotype de virulence accrue (Górski *et al.*, 2012 ; Merrill *et al.*, 1996).

Cette technique de « passage en série » permet donc d'améliorer l'activité antibactérienne et la persistance des phages une fois présents dans l'organisme. Néanmoins, bien que l'élimination des phages par le système réticulo-endothélial puisse être évitée en utilisant ces phages sélectionnés, il semble que cette méthode soit peu pratique et qu'il soit plus simple de réitérer si nécessaire des administrations de bactériophages perdurant moins longtemps (Barrow et Soothill, 1997 ; Inal, 2003).

#### 4.1.3.2.3 Associations phages/antibiotiques

Quelques travaux s'intéressent à l'administration combinée de phages et d'antibiotiques.

##### 4.1.3.2.3.1 Historique et actualité

Lorsque les antibiotiques ont envahi le monde pharmaceutique, ils ont fait naître de grands espoirs dans de nombreux domaines, celui bien sûr des infections bactériennes, mais aussi dans le domaine des infections virales. On ne connaissait pas encore suffisamment les micro-organismes pour savoir que les antibiotiques n'avaient aucune action sur les infections virales. Des expériences pour mettre en place cette toute nouvelle thérapie contre les virus ont été exécutées. Ces expériences n'ont pas été très concluantes, pourtant, quelques scientifiques ont remarqué des synergies entre les antibiotiques et les bactériophages sur les bactéries. Cependant, ces observations n'ont à l'époque pas intéressé le monde scientifique (Dublanche et Patey, 2011).

Les années suivantes, lorsque qu'un nouvel antibiotique était découvert, quelques scientifiques étudiaient son interaction en association avec des phages *in vitro* (Krueger *et al.*, 1948) et (Rountree, 1947). Les scientifiques Faguet et Edlinger se sont tout particulièrement consacrés à cette tâche, étudiant ainsi divers antibiotiques comme la streptomycine (Edlinger et Faguet, 1950 ; Faguet et Edlinger, 1949), l'auréomycine (Faguet et Edlinger, 1951), la terramycine (Edlinger et Faguet, 1951), ou la chloromycétine. Cependant, l'espoir porté par les antibiotiques seuls était tel que, dans les pays occidentaux, ces études n'eurent que peu d'impact.

Avec le retour à la une des bactériophages, l'utilisation combinée des phages et des antibiotiques est actuellement repensée. De nouvelles recherches se penchent sur la question, et plusieurs scientifiques sont d'avis qu'il s'agit d'une approche d'avenir, notamment le Dr. Alain Dublanche (Dublanche, 2009).

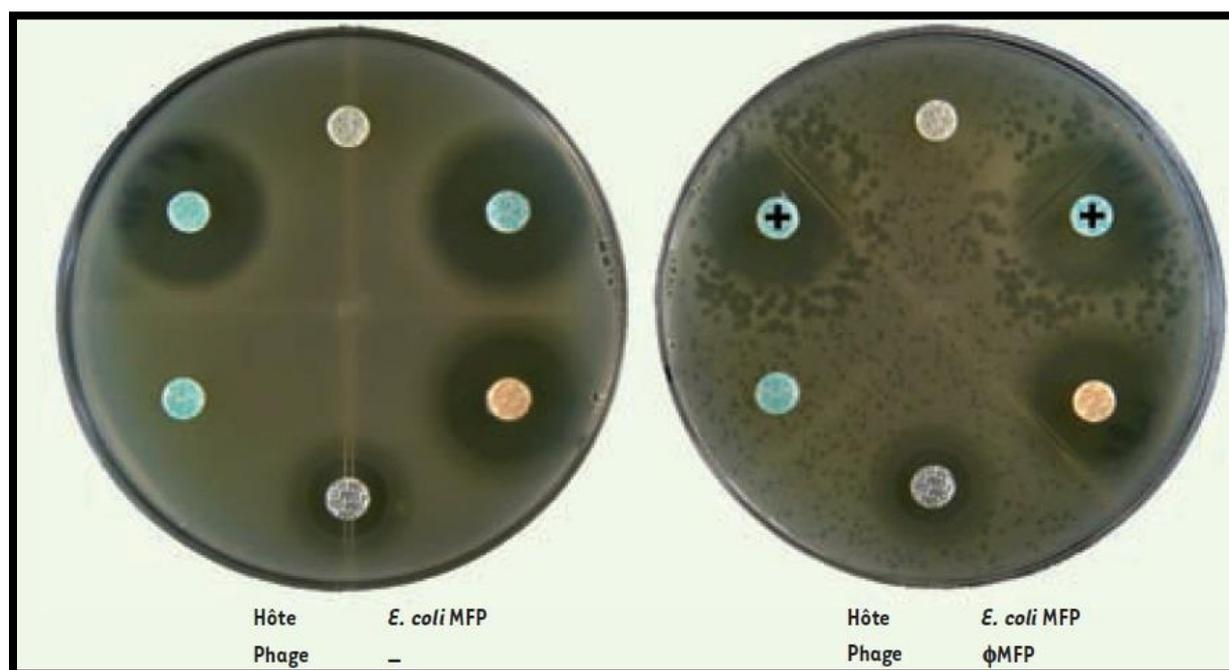
#### 4.1.3.2.3.2 Mécanismes et intérêts

L'intérêt d'une utilisation en duo des antibiotiques et des bactériophages réside dans plusieurs points. Tout d'abord, utiliser des bactériophages réduirait la biomasse bactérienne présente au lieu d'infection, permettant ainsi aux antibiotiques d'agir avec un moindre risque de création d'antibiorésistances. En effet, si la population bactérienne est trop importante lors d'antibiothérapie, il y a un phénomène de pression de sélection, c'est-à-dire qu'il y a un risque accru que des bactéries aient muté spontanément leur conférant une résistance à l'antibiotique, lequel sélectionnera une population de bactéries résistantes. C'est en partie pour cette raison qu'en médecine, lorsque cela est possible, on nettoie le foyer bactérien (par exemple lorsqu'on incise un abcès). L'association de plusieurs agents antibiotiques, de plusieurs phages ou des deux thérapies permettrait donc de diminuer cette pression de sélection (Dublanche, 2009).

En outre, il est nécessaire pour que les bactériophages puissent être correctement actifs qu'un minimum de bactéries soit présent pour permettre aux bactériophages de se multiplier suffisamment. Les phages ne semblent, de plus, pas très efficaces sur les bactéries quiescentes. La stratégie consistant à associer les deux thérapies permettrait de pallier ces difficultés par l'élimination *via* les antibiotiques de la petite portion de bactéries rélictuelles et éventuellement quiescentes (Dublanche, 2009).

De plus, une équipe de chercheurs français a découvert, lors d'une banale analyse d'antibiogramme pour une infection urinaire par *Escherichia coli* qui s'est révélée contaminée par des phages (figure 28), que la physiologie des bactéries était altérée sous l'effet du stress consécutif à l'application des antibiotiques, et, que le blocage de la division cellulaire bactérienne par les antibactériens permettait d'obtenir des bactéries plus grosses. Il en résultait une amplification du nombre virions produits lors du cycle de réplication des phages et donc une lyse bactérienne plus efficace. Ce phénomène a été appelé « Synergie phages-antibiotiques » (PAS, *Phage-Antibiotic Synergy*) (Comeau *et al.*, 2008, 2007). Cet effet a également été observé en traitement expérimental chez des poulets (Huff *et al.*, 2004). Ce phénomène, s'il est vérifié *in vivo*, s'avèrera être un nouvel argument en faveur de l'utilisation combinée de l'antibiothérapie et de la phagothérapie.

Figure 28 : Résultats des antibiogrammes observés par l'équipe de Comeau



D'après (Comeau *et al.*, 2007). Sur ces deux antibiogrammes pour une infection urinaire à *Escherichia coli*, la boîte de Petri de droite a en plus été contaminée par des phages, contrairement à celle de gauche. Sur l'antibiogramme comportant des phages, les plages de lyse autour de deux des antibiotiques (ceux marqués d'un « + », qui sont du  $\beta$ -lactames aztreonam et de la cefixime) sont plus larges que sur l'antibiogramme exempt de phages. Il s'agit du phénomène de « synergie phages-antibiotiques »

Enfin, l'utilisation de phages en association avec des antibiotiques pourrait également être indiquée dans le cadre des infections à biofilms. En effet, la capacité des phages à détruire les biofilms permettrait de rendre les bactéries accessibles aux antibiotiques et aux phages (Ryan *et al.*, 2012). Une étude atteste de plus que certains antibiotiques favoriseraient la synthèse de biofilm par les bactéries (Hoffman *et al.*, 2005), mettant en évidence l'intérêt d'une utilisation de phages et d'antibiotiques lors de telles infections.

Il faut cependant encore vérifier si une utilisation en synergie fonctionnerait avec tous les antibiotiques et tous les phages et sinon identifier quels duos fonctionnent réellement. Néanmoins, on peut penser qu'une application en synergie serait plus facile à faire accepter en traitement d'un point de vue éthique qu'une phagothérapie seule (Dublanquet, 2009).

#### 4.1.3.2.4 Alternative à l'utilisation de virus vivants : utiliser des fragments de phages

De manière à éviter les problèmes d'élimination rapide des phages hors de l'organisme ou à rassurer les utilisateurs, l'utilisation de fragments ou de dérivés de phages au lieu de phages entiers a été envisagée. Les travaux sur ce sujet ont mis en lumière l'intérêt de certaines lysines codées par l'ADN phagique.

Certains procédés étudiés permettent *in vitro* de bloquer la synthèse des peptidoglycanes de la paroi bactérienne, de manière à affaiblir cette paroi et détruire la bactérie. Ils emploient pour cela soit la capsidie protéique d'un phage (Bernhardt *et al.*, 2001), soit une lysine synthétisée *via* le génome phagique (Nelson *et al.*, 2001) et (Schuch *et al.*, 2002). Ces études ne constituent, à ce stade, que des pistes, mais leur exploration pourrait s'avérer intéressante dans le cadre des « enzybiotiques », traitements antibactériens expérimentaux réalisés à partir d'enzymes (principalement d'enzymes de phages) (Loeffler *et al.*, 2001) et (Hermoso *et al.*, 2007)

#### 4.1.3.2.5 Études pour éviter les toxines liées à la lyse bactérienne

D'après (Goodridge, 2010 ; Hagens et Bläsi, 2003).

Diverses recherches tentent d'établir une méthode pour conserver une létalité envers les bactéries sans pour autant les lyser, de manière à éviter la libération de toxines bactériennes. Cela est possible en employant soit des phages lytiques dont on aurait éliminé de leur génome les gènes responsables de la lyse, soit des phages filamenteux naturellement dépourvus de capacité lytique. Cependant cet emploi présente 2 risques :

- la perte potentielle de la capacité de multiplication phagique (concernant les phages virulents modifiés uniquement) ;
- le risque de transfert potentiel de gènes à partir de la bactérie non lysée (Debarbieux, communication personnelle).

## 4.2 Traitement anti-infectieux

### 4.2.1 Traitement des infections antibiorésistantes

En 2003, Inal indiquait que plus de cinq millions d'êtres humains mouraient chaque année d'infections contre lesquelles les antibiotiques n'avaient aucun effet (Inal, 2003). Actuellement, on estime que les bactéries résistantes tuent chaque année au moins 25 000 personnes en Europe (ECDC et EMA, 2009). Aux États-Unis d'Amérique, deux millions de personnes contractent annuellement une infection à bactéries antibiorésistantes, et parmi elles 23 000 personnes en décèdent. Le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) tue à lui seul 18 000 personnes par an aux États-Unis d'Amérique, soit plus de décès que suite au sida (CDC, 2013).

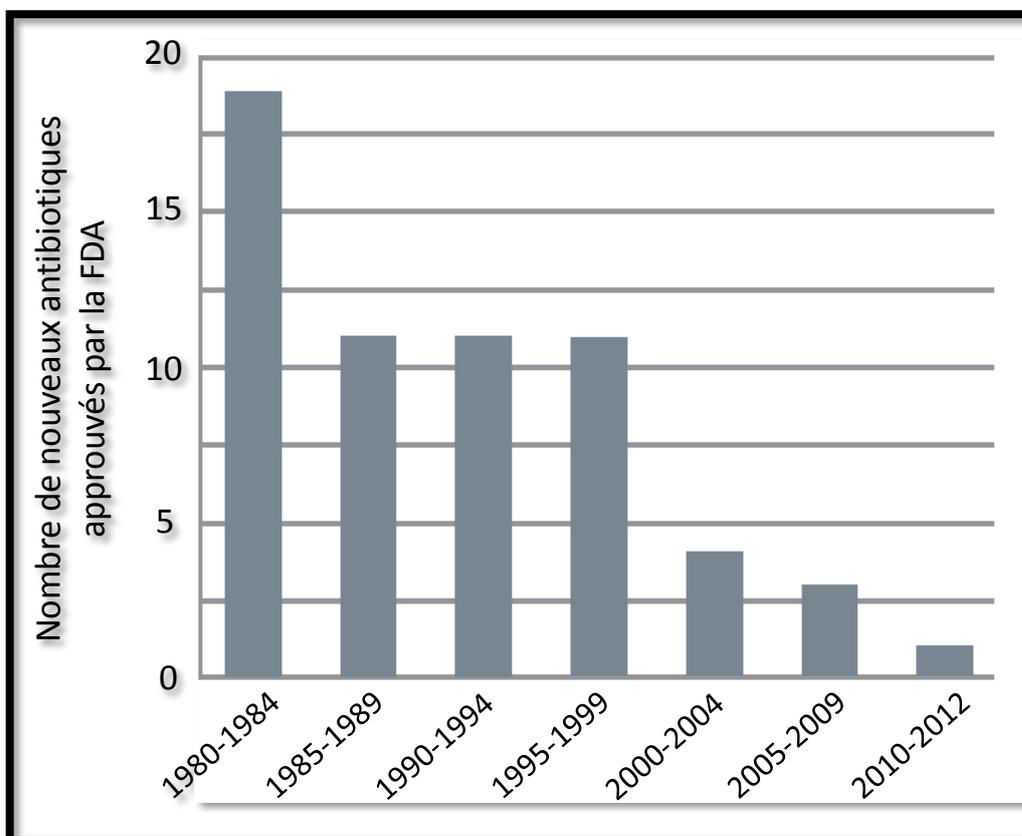
La résistance bactérienne aux antibiotiques représente de nos jours une forte menace sur nos capacités à traiter les infections d'origine bactérienne. En effet, certaines bactéries ont acquis la capacité de faire fi de nombreux antibiotiques, notamment la pénicilline et l'amoxicilline, mais aussi la vancomycine et certaines céphalosporines de troisième génération. On parle par exemple de 25 % de patients adultes atteints d'infections résistantes à la pénicilline G, l'ampicilline et les sulfaméthazole-triméthoprim, et 41 % d'enfants. De plus, le nombre de ces résistances continue d'augmenter : on a par exemple observé, entre les années 1985 et 1995, une multiplication par un facteur 1 000 du nombre de bactéries résistantes aux médicaments traitant les pneumocoques (Hofmann *et al.*, 1995 ; Pallares *et al.*, 1995).

La gamme des antibiotiques compte actuellement 15 classes d'antibiotiques. On rencontre des phénomènes de résistance dans chacune de ces classes (Levy et Marshall, 2004). En France, de 1999 à 2009, le nombre d'antibiotiques disponible est passé de 101 à 86, soit une diminution de 15 %. En effet, 25 ont été retirés du marché, contre seulement dix nouvelles commercialisations (ANSM, 2011).

Les mises sur le marché de nouveaux antibiotiques se sont effectivement raréfiées (figure 29). À titre d'exemple, la FDA n'a approuvé que deux nouveaux antibiotiques entre 2008 et 2012, contre 30 entre 1983 et 1992. Hormis les oxazolidinones, et malgré les

recherches pharmaceutiques, aucune classe thérapeutique nouvelle n'a vu le jour depuis près de quarante ans. De plus, en dépit d'une amélioration constante de la compréhension des mécanismes d'irruption des résistances, il est pour l'instant impossible de rebrousser chemin. Des efforts considérables sont déployés pour trouver de nouvelles molécules antibactériennes comme le témoigne le volume colossal de publications récentes. Certains champs d'investigation pourraient s'avérer prometteurs, comme l'utilisation d'inhibiteurs de facteurs de virulence, de la communication cellulaire, l'emploi de peptides antimicrobiens, ou justement la phagothérapie (Projan, 2002).

Figure 29 : Nouveaux antibiotiques approuvés aux États-Unis d'Amérique entre 1980 et 2012



D'après

(CDC, 2013). Ce diagramme permet d'observer la diminution progressive de mise sur le marché de nouveaux antibactériens injectables approuvés par la FDA aux États-Unis d'Amérique entre 1980 et 2012

L'avantage que présentent les bactériophages de pouvoir attaquer même les bactéries devenues résistantes aux antibiotiques est clairement non négligeable (Dublanche et Patey, 2011). D'après l'équipe d'Abedon, au vu des circonstances actuelles par rapport à la pratique de l'antibiothérapie, l'emploi de la phagothérapie est particulièrement envisageable dans trois domaines (Abedon *et al.*, 2011) :

- lors d'infections impliquant des bactéries résistantes aux antibiotiques (en particulier les bactéries multi-résistantes) ;
- lors d'infections impliquant des bactéries sensibles aux antibiotiques *in vitro* mais non sensibles *in vivo* à cause de leur localisation *in vivo* rendant difficile la diffusion des antibiotiques ou à cause de tout autre élément entrant en compétition avec la pharmacocinétique des antibiotiques (c'est par exemple le cas pour les ostéomyélites, pour les ulcères chez les diabétiques et pour les infections ancrées par des biofilms, comme nous le verrons par la suite) ;
- lors d'infections où l'utilisation des antibiotiques est contre-indiquée, par exemple chez des patients allergiques ou qui ont des intestins facilement irritables, ou lors de risques de voir se développer des infections antibiorésistantes comme dans le cas des infections à *Clostridium difficile*, ou encore de manière à réduire la quantité d'antibiotiques employés dans l'industrie agro-alimentaire et ainsi restreindre leur exposition vis-à-vis des consommateurs et de l'environnement.

#### 4.2.2 Traitement des infections à biofilm

Les infections à biofilm sont une plaie dans le domaine médical actuel. Actuellement, 65 % des infections recensées chez l'homme dans les pays développés sont causées ou entretenues par des biofilms. Plus de 80 % des infections bactériennes sont chroniques à cause de ces biofilms. Parmi ces infections, les plus courantes sont les infections dentaires, pulmonaires et urinaires, ainsi que de nombreuses maladies nosocomiales liées à l'usage de matériel médical contaminé par des biofilms (cathéters, prothèses cardiaques, matériel orthopédique, ...) (Høiby *et al.*, 2010).

Dès lors qu'un biofilm est installé, les bactéries qu'il héberge échappent aux défenses immunitaires de l'hôte et aux thérapeutiques antimicrobiennes, et notamment antibiotiques. Les antibiotiques vont détruire les bactéries circulantes, supprimant ainsi les symptômes, mais

ne pourront pas atteindre celles enchâssées dans le biofilm. Sans traitement efficace, le biofilm va alors servir de nid à partir duquel les infections vont récidiver. La seule thérapeutique actuellement efficace est le retrait chirurgical de la zone de biofilm (Høiby *et al.*, 2010).

Comme vu auparavant, l'utilisation des bactériophages semble indiquée lors de présence de biofilms, puisqu'ils seraient capables d'en détruire la matrice. Une fois ce biofilm éliminé, les bactéries qui s'y protégeaient sont de nouveau exposées aux antimicrobiens et peuvent alors être détruites par les phages.

#### 4.2.3 Multiplicités des voies d'administration et des formes galéniques

Dès les débuts de la pratique de la phagothérapie, les voies d'administrations se sont fortement diversifiées (Dublanche, 2009 ; Loc-Carrillo et Abedon, 2011 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001):

- voie entérale ;
- voie locale (cutanée, oculaire, muqueuses nasale, vésicale ou rectale, plaies, ...) ;
- voie parentérale (sous-cutanée, intramusculaire, intrapéritonéale, intraveineuse, intrapleurale, intrarachidienne, ...).

Cependant, bien que de nombreuses voies d'administrations aient été explorées, il semble plus judicieux de se limiter à l'administration locale plutôt qu'intraveineuse, pour des raisons de sécurité vis-à-vis des toxines bactériennes, pour ne pas diluer les phages et pour éviter l'inactivation potentielle des phages par le système immunitaire (Dublanche, 2009 ; Debarbieux, communication personnelle).

Selon les voies d'administration, les médecins ont mis au point de nombreuses formes pharmaceutiques : sirops (suspensions), comprimés ou gélules, suppositoires, pommades, lotions, solutions de nébulisation, tissus auto-résorbables imprégnés, etc. Les phages étant relativement dégradés par l'acidité gastrique, l'administration per os passe soit par une inhibition de cette acidité soit par des formes galénique gastro-résistantes (Dublanche, 2009 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001).

## 4.3 Autres utilisations potentielles

### 4.3.1 Utilisation en prophylaxie

En étudiant les maladies diarrhéiques telles que la dysenterie bacillaire ou le choléra, d'Hérelle a observé la guérison d'individus lorsqu'ils étaient au contact de malades en phase de rémission de ces diarrhées. Il a appelé ce phénomène la « guérison contagieuse ». Il remarqua par la suite que des bactériophages étaient émis dans les selles diarrhéiques de ces malades et émit l'hypothèse que les phages libérés dans l'environnement s'étaient ensuite introduits dans le corps des autres malades, *via* une eau de boisson contaminée ou un simple contact, et avaient permis le rétablissement de ces derniers ainsi qu'une protection pour les individus non encore malades. Ce dernier cas n'est autre qu'une utilisation prophylactique des bactériophages, parfois appelée « phagoprophylaxie » (Dublanche et Patey, 2011).

Il semble possible que l'évolution de certaines épidémies qu'a connu l'histoire s'explique par ce phénomène : l'épidémie survient et se propage, puis un bactériophage lytique se développe et est répandu dans l'environnement, permettant une extinction de l'épidémie en protégeant les individus non encore atteints et en permettant une guérison accélérée des malades. Une autre étude récente montre que ce déroulement s'applique tout à fait à ces épidémies (Faruque *et al.*, 2005).

### 4.3.2 Utilisation en agro-alimentaire

Les antibiotiques sont à l'heure actuelle très largement utilisés dans l'industrie agricole tant pour la prophylaxie que pour les traitements de maladies infectieuses. Cette sur-utilisation contribue fortement à l'apparition croissante de résistances bactériennes face aux antibiotiques. Dès lors, il serait intéressant de privilégier une faible utilisation des antibiotiques et de préférer l'emploi de bactériophages (Inal, 2003).

#### 4.3.2.1 Traitement des animaux de rente

L'emploi des bactériophages pour traiter les animaux destinés à l'alimentation humaine est de plus en plus envisagé. Il permettrait de diminuer la quantité d'antibiotiques utilisés en prophylaxie et en traitement de ces animaux et donc d'abaisser leur taux dans la chaîne alimentaire pour l'homme.

La majorité des études concernant ce sujet a été menée chez les volailles, pour lutter contre *Salmonella enterica*, responsable de gastro-entérites sévères, de bactériémie et de fièvre entérique (aussi appelée « fièvre typhoïde ») chez l'homme. Les deux premiers symptômes touchent chaque année 1,3 milliards de personnes dans le monde, tandis que la fièvre entérique est responsable de 16 millions de cas de malades et de 600 000 décès par an (OMS, 2008). Les différentes publications scientifiques relatent une diminution de la quantité de bactéries présentes chez les poules (Goodridge et Bisha, 2011). Fiorentin et ses collaborateurs ont par exemple démontré qu'après cinq jours de traitement par un cocktail de phage aillant pour cible *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4, les volailles traitées présentaient, dans leur *cæcum*, une réduction de 3,5 logs par rapport à la population initiale de ces bactéries (Fiorentin *et al.*, 2005). D'autres scientifiques travaillent sur d'autres infections zoonotiques importantes qui peuvent résulter de la consommation de viande de volaille insuffisamment cuite : les infections à *Campylobacter*. L'équipe scientifique de l'Université de Nottingham (Royaume-Uni) menée par Connerton a indiqué la potentialité d'un traitement alternatif avec des bactériophages contre *Campylobacter spp*, dont *Campylobacter jejuni*, bactéries présentes dans la flore intestinale de la majorité des volailles. Elle a montré qu'il était possible pour les phages de réduire la forte incidence de *Campylobacter* chez les volailles (Connerton *et al.*, 2011)

D'après Goodridge et Bisha, les bactériophages seraient également indiqués pour réduire la population bactérienne d' *Escherichia coli* O157:H7 colonisant le tractus gastro-intestinal des troupeaux de ruminants, réservoir principal de cette bactérie (Goodridge et Bisha, 2011). Quelques études ont aussi été réalisées chez les porcs contre *Salmonella*, et certaines se sont révélées efficaces, comme par exemple celles de l'équipe de Wall contre *Salmonella enterica* (Wall *et al.*, 2010).

La meilleure introduction des bactériophages en agro-alimentaire se trouve dans le domaine de l'aquaculture. Les phages utilisés sont parfaitement adaptés à cet environnement, puisqu'ils se trouvent habituellement dans les milieux aquatiques, et cela permet de plus que les phages soient en contact étroit et continu avec leur hôte (Karunasagar *et al.*, 2007 ; Nakai et Park, 2002 ; Park *et al.*, 2000).

#### 4.3.2.2 Assainissement des denrées

Malgré les nombreuses précautions mises en œuvre pour les assainir, les denrées alimentaires demeurent d'excellents milieux de culture pour les micro-organismes, pathogènes ou non. On estime que plus de 90 % des toxi-infections d'origine alimentaire auraient pour cause des bactéries. Parmi ces toxi-infections, 75 % seraient dues uniquement aux trois principales bactéries souillant les aliments, à savoir *Salmonella enterica*, *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus*. D'autres bactéries pathogènes (voir annexe 3) telles que *Escherichia coli* ou *Listeria monocytogenes* sont également fréquemment présentes sur les aliments et peuvent s'avérer très pathogènes pour l'homme (China *et al.*, 2002)

Face à ces menaces bactériennes envers la santé publique, les scientifiques ont montré que les phages pouvaient avoir leur utilité en étant employés en industrie agro-alimentaire dans l'assainissement des denrées directement, c'est-à-dire des carcasses et autres produits alimentaires (Gilmore, 2012).

Concernant les viandes, les principales bactéries étudiées sont *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* et *Salmonella* (Goodridge et Bisha, 2011).

Prenons par exemple le cas de *Listeria monocytogenes* qui a particulièrement été étudié. Cette bactérie provoque la listériose, maladie de répartition mondiale, plutôt rare et sporadique (3,2 cas/millions d'habitants en Europe en 2011 dont environ 300 cas par an en France, et 2,5 cas/millions d'habitant aux États-Unis d'Amérique en 2012), mais relativement grave (sa létalité peut atteindre 30 %) et dont les symptômes sont des septicémies, des méningites et chez les femmes enceintes, la mort du fœtus. Parmi les malades, 80 % correspondent à des YOPI (*Young, old pregnant, immunodepressed*) c'est-à-dire à des personnes présentant une déficience immunitaire (Bornert, 2000 ; China *et al.*, 2002 ; EFSA et ECDC, 2013).

Les études portant sur l'assainissement des denrées contre *Listeria monocytogenes* par bactériophagie démontrent que l'utilisation de bactériophages contre ces bactéries s'avère efficace pour réduire quantitativement le nombre de bactéries, tout en préservant les qualités organoleptiques des aliments (Guenther *et al.*, 2009 ; Holck et Berg, 2009 ; Soni *et al.*, 2010).

Les fruits et légumes frais, et les produits transformés (poudre de lait, charcuterie, ...) sont également concernés par la nécessité d'un assainissement bactérien, contre les mêmes bactéries que celles contaminant les viandes. Par exemple, les contaminations des produits maraîchers ont été responsables entre 1990 et 2003 de 28 000 cas de maladies (Dewaal *et al.*, 2006). Là encore, les résultats des travaux sur l'utilisation des phages s'avèrent encourageants (Goodridge et Bisha, 2011 ; Holck et Berg, 2009).

#### 4.3.3 Utilisation comme probiotiques

Autrefois peu connus, les probiotiques sont de nos jours en plein essor dans de nombreux domaines. Là encore, les phages constituent une piste intéressante pour de nouvelles avancées.

La définition donnée en 2001 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO, *Food and Agriculture Organization*) pour le terme « probiotique » est : « un micro-organisme vivant qui, lorsqu'administré dans des quantités adéquates, exerce des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels » (WHO et FAO, 2001). Le principe est de soutenir et favoriser la flore commensale de l'organisme de manière à ce qu'elle soit plus compétitive face aux agents pathogènes.

Comme expliqué précédemment, les bactériophages présentent une excellente spécificité d'hôtes. Cette caractéristique s'avère très intéressante à exploiter pour la création de probiotiques à partir de phages (bien qu'en tant que virus, ils n'appartiennent pas au monde des vivants à proprement parler), et ce pour deux raisons principales (Abedon *et al.*, 2011 ; Górski *et al.*, 2006b) :

- les bactériophages permettraient d'éliminer uniquement une espèce de bactérie sans modifier la microflore commensale du tractus gastro-intestinal et donc sans effets délétères sur celle-ci. De plus ces bactéries ne seraient plus phagocytées par les cellules dendritiques, soustraction qui, ajouté à l'effet inhibiteur des phages sur les cellules dendritiques, permettrait alors d'éviter inflammation du tractus gastro-intestinal due aux bactéries et à l'activité pro-inflammatoire des cellules dendritiques au contact de ces bactéries ;
- en consommant régulièrement des probiotiques composés de phages et, si nécessaire, de bactéries particulières, la microflore commensale du tube digestif pourrait très légèrement être modifiée de telle sorte qu'elle soit plus efficace dans la compétition contre des bactéries pathogènes spécifiques (en particulier celles produisant des diarrhées).

Toutefois, de manière à optimiser l'application des bactériophages en tant que probiotiques, il conviendrait plus de les employer en prophylaxie et non pas en thérapeutique. En effet, la différence entre des probiotiques de type bactérien et ceux de type phagique réside dans le fait que les premiers apportent dans l'organisme des bactéries non pathogènes qui entrent directement en concurrence avec la bactérie pathogène, tandis que les seconds visent directement la bactérie pathogène dans le but de rééquilibrer les forces en présence en aidant la flore gastro-intestinale à se redévelopper et à concurrencer cette bactérie. Il est donc essentiel que cette flore soit encore en quantité suffisante pour se multiplier de nouveau, recoloniser le tractus gastro-intestinal et entrer en compétition avec la bactérie pathogène.

Il semble que les applications les plus appropriées pour ces probiotiques de type phagique soient lors d'infections à *Salmonella spp*, *Clostridium difficile*, les pathotypes d'*Escherichia coli* responsables de diarrhées et d'autres bactéries dont la contamination se fait par ingestion et qui nécessitent un certain temps de colonisation du tractus gastro-intestinal avant de pouvoir provoquer une maladie (Abedon *et al.*, 2011).

De nombreuses recherches sont en cours dans le domaine ; on peut citer par exemple les expériences menées par l'équipe de Mai, dont la conclusion est en faveur d'une utilisation potentielle de phages en tant que probiotiques puisque capables de réduire le nombre de bactéries pathogènes présentes dans le tractus gastro-intestinal, en particulier *Listeria monocytogenes* (Mai *et al.*, 2010).

#### 4.3.4 Désinfection des surfaces inertes

Dans le même ordre d'idées que pour l'assainissement des denrées, l'usage des bactériophages est envisagé pour l'assainissement de l'environnement. En effet, les phages se sont avérés efficaces en application sur des surfaces inertes pour les débarrasser des bactéries ou des biofilms. Leur usage serait particulièrement indiqué pour traiter l'intérieur des réseaux hydrauliques, comme par exemple les tuyaux de circulation d'eau de boisson pour les volailles, qui regorgent généralement de bactéries (surtout des bactéries générant des infections entériques, comme *Campylobacter spp.*) et de biofilms (Inal, 2003). C'est ce qu'ont tenté *in vitro* certains scientifiques. Les bactériophages appliqués sur les surfaces contre *Campylobacter jejuni* et contre les biofilms associés se sont révélés très efficaces, en particulier les phages CP8 et CP 30 (Scott *et al.*, 2007 ; Siringan *et al.*, 2011).

L'action des bactériophages pourrait également s'appliquer à l'aseptisation du matériel médical et des surfaces en milieu hospitalier, comme le démontre l'équipe de Carson dans une étude sur l'élimination des biofilms présents sur le matériel médical (Carson *et al.*, 2010).

## 4.4 Rentabilité

Le fait de pouvoir obtenir très facilement des phages dans l'environnement et les traiter à faible coût fait de la phagothérapie un traitement vraiment peu onéreux en comparaison des sommes déboursées pour la production des antibiotiques. Concernant la production de suspensions, il ne suffit que d'une culture bactérienne pour tester les phages et de matériel pour purifier les suspensions. Le coût nécessaire à la purification se réduit apparemment de plus en plus avec les améliorations technologiques et bien que le coût de la culture bactérienne puisse varier selon la bactérie étudiée, il en résulte généralement une

production relativement abordable pour une substance pharmacologique. Enfin, la capacité des phages à se multiplier au sein des bactéries, ne nécessitant donc qu'une faible dose de phages, permet également de réduire le coût du traitement antimicrobien (Loc-Carrillo et Abedon, 2011).

D'après un rapport du Centre Européen pour la Prévention et le Contrôle des Maladies (ECDC) et de l'Agence européenne des médicaments (EMA), la facture annuelle concernant les infections par des bactéries multirésistantes s'élèverait à 1,5 milliard d'euros (ECDC et EMA, 2009).

Considérant le coût de production d'une suspension de phages, les cliniciens de l'hôpital Lariboisière à Paris auraient calculé un surcoût de 530 000 euros pour les traitements antibiotiques de leurs patients en comparaison avec un traitement par phagothérapie (Rivasi, 2013). L'article ne précise cependant pas sur quelle durée ce surcoût a été calculé.

## 5 Limites

### 5.1 Une redécouverte compliquée

#### 5.1.1 Mauvaise image du passé

La phagothérapie souffre d'une image de médecine archaïque et se heurte à beaucoup de scepticisme vis-à-vis de son passé. Tantôt échec thérapeutique tantôt guérison miraculeuse, la phagothérapie ne renvoie pas une image de fiabilité.

##### 5.1.1.1 Protocoles mal décrits dans les publications

Tout d'abord, les protocoles utilisés n'étaient généralement qu'en partie rédigés. Il manquait souvent des informations à propos des méthodes employées ou des doses choisies, ou ces informations n'étaient pas indiquées de façon claire. L'historique des traitements (notamment des antibiotiques) mis en place sur les patients avant phagothérapie n'est souvent pas correctement décrit. Par exemple, certaines des publications soviétiques indiquaient les quantités en mL/kg sans mentionner la concentration en phages des préparations employées (Alisky *et al.*, 1998).

##### 5.1.1.2 Méthodologie expérimentale insuffisante

Pour qu'une méthodologie soit rigoureuse, il faut qu'elle suive certaines règles. Elle doit s'avérer représentative (échantillons homogènes et en nombre suffisant), reproductible (fournir des résultats similaires en l'appliquant dans des milieux différents, avec des manipulateurs et du matériel différents) et répétable (fournir des résultats similaires pour un laboratoire donné et pour un équipement et un personnel donné).

Il s'avère que les expériences passées sont difficilement représentatives, reproductibles et répétables.

La mauvaise représentativité provient d'un défaut d'homogénéisation des cas. En effet, il s'agissait souvent de la description d'un ou de plusieurs cas cliniques particuliers avec un passé thérapeutique tumultueux et non pas d'un lot de cas présentant tous les mêmes caractéristiques et les même symptômes. Cette difficulté d'homogénéiser les cas demeure encore un problème actuellement.

Ensuite, le principal facteur de mauvaise répétabilité provient de l'inconstance des résultats.

C'est cette inconstance des résultats additionnée à la mauvaise description des protocoles expérimentaux précédemment évoquée qui aboutit à une mauvaise reproductibilité

#### 5.1.1.3 Résultats inconstants

##### 5.1.1.3.1 Absence de *placebos*

Une raison importante de cette controverse est le manque d'études convenablement réalisées et contrôlées par *placebos*. Cette défaillance a été instaurée dès le départ par d'Hérelle lui-même puisqu'il mit en place un usage thérapeutique des phages immédiatement après ses découvertes et sans passer par des essais cliniques comportant des *placebos*. Cette lacune peut peut-être s'expliquer par le fait que d'Hérelle ait eu le souci éthique de ne pas priver un groupe (témoin) de ses patients de phagothérapie pour éviter le risque de ne pas les sauver. On peut aussi simplement penser que cette pratique n'était pas dans ses habitudes, puisque lors d'expériences sur des poulets, où les considérations éthiques étaient moindres, il n'utilisa pas non plus de groupes témoins. Mais d'Hérelle n'est pas le seul en cause dans ce manque d'expériences avec *placebos*, puisque de nombreuses études qui suivirent les siennes n'en comportèrent pas non plus (Pirisi, 2000 ; Sulakvelidze *et al.*, 2001 ; Van Helvoort, 1992).

#### 5.1.1.3.2 Erreurs thérapeutiques et anomalies de préparations

Il faut admettre que, par le passé, les connaissances n'étant pas aussi développées qu'aujourd'hui, les erreurs thérapeutiques et les anomalies de préparations étaient également plus récurrentes.

De plus, les phages étant très spécifiques par nature, le risque de ne pas employer le bon phage était encore plus présent. Enfin, la phagothérapie était souvent utilisée en dernier recours sur des cas d'infections graves, souvent en échec thérapeutique depuis une période plus ou moins importante ce qui ne permettait pas toujours des conditions de rétablissement correctes (Dublanche et Patey, 2011).

Concernant les préparations de phages, les principales erreurs étaient l'absence d'élimination des endotoxines dans les préparations virales, et la mauvaise ou l'absence de contrôle de la viabilité des phages après ajout de substances stérilisantes aux préparations (Carlton, 1999 ; Pirisi, 2000). Il faut également garder à l'esprit que les chercheurs ne disposaient pas forcément des moyens financiers ou du matériel nécessaire à une bonne réalisation des préparations et des expériences (Dublanche et Patey, 2011).

#### 5.1.1.3.3 Évaluation subjective

L'efficacité n'était évaluée qu'à la lumière de la réussite thérapeutique et non pas sur des faits quantifiables, n'offrant pas un point de vue objectif des résultats. Il aurait par exemple été plus scientifique de se baser sur des dosages bactériens au début, pendant et en fin de traitement, ou d'évaluer l'évolution clinique de manière plus standardisée (et donc plus fiable) en utilisant un questionnaire se basant sur de nombreux critères précis et non pas uniquement sur l'observation ou non d'une guérison (Alisky *et al.*, 1998).

### 5.1.2 Victime des confrontations idéologiques du passé

La scission du monde en deux grands blocs après la seconde guerre mondiale, puis la Guerre Froide qui s'est ensuivie, a considération une dimension politique à la phagothérapie et a laissé des traces encore marquées aujourd'hui. Pour des raisons politiques et idéologiques découlant de ce passé, la phagothérapie, développée et améliorée par les pays de l'ex-Union

soviétique, est parfois encore mal perçue et difficilement acceptée par les pays occidentaux, notamment par les États-Unis d'Amérique (Pearson, 2002). La transmission du savoir de l'Est souffre encore aujourd'hui de cette image comme le montrent certains titres d'articles (Osborne, 2000 ; Stone, 2002).

### 5.1.3 Peu d'informations dans l'enseignement médical

À l'heure actuelle, en France et dans de nombreux autres pays, il est à noter que l'enseignement médical ne dispense aucune information au sujet des bactériophages et de leur utilisation thérapeutique, au point que le terme même de phagothérapie est généralement méconnu des étudiants. Les cours informent de façon extrêmement succincte de l'existence des bactériophages, mis à part dans le cadre de la recherche en génétique pour leur application dans l'étude des enzymes de restrictions et du génome.

## 5.2 Absence de réglementation adaptée

### 5.2.1 Des particules non considérées par le règlement pharmaceutique

#### 5.2.1.1 Absence d'AMM

En France, autrefois inscrits au Vidal, les bactériophages ne bénéficient plus de leur ancienne Autorisation de Mise sur le Marché (AMM). En effet, conformément aux articles R. 5121-36-1 et R. 5121-102 du code de la santé publique, issues respectivement des décrets n° 2008-435 et n° 2008-436 du 6 mai 2008, une AMM devient caduque au bout de 3 ans d'arrêt de commercialisation. Suite au retrait du marché, une nouvelle AMM est désormais nécessaire, répondant aux critères actuels de sécurité sanitaire (ANSM, 2013 ; *Article R5121-102*, 2008, *Article R5121-36-1*, 2008).

En fin 2007, l'équipe d'Alain Dublanquet avait demandé à l'ANSM (nommée à cette époque AFSSAPS, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) s'il était

possible de définir les bactériophages comme des médicaments. L'ANSM avait répondu « un avis réglementaire a été demandé en 2004 à l'Agence Européenne du Médicament (EMA, *European medicines Agency*) sur deux produits à base de bactériophages. Sur la base des informations fournies pour ces deux produits, il avait été conclu que ces deux produits pouvaient répondre à la définition de médicament » (Dublanche, 2009).

La définition de « médicament » est donnée par l'article L5111-1 du Code de la santé publique. Il s'agit de « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » (*Article L5111-1*, 2007). Si l'on applique cette définition, les bactériophages sont tout à fait aptes à être considérés en tant que médicaments. Néanmoins ces considérations ne sont pas encore effectives et la réglementation demeure floue.

Au niveau européen, la réglementation est régie par le *Committee for Medicinal Products for Human Use* (CHPM), sous-commission de l'EMA. Là encore, la qualification des bactériophages demeure brumeuse.

Malgré ce cadre réglementaire peu clair, les bactériophages sont soumis à la nécessité d'obtention de mise sur le marché pour que leur usage thérapeutique soit autorisé. Cependant, les procédures d'AMM sont conçues pour encadrer des médicaments inertes et fixes, sans nécessité de mise à jour régulière de la composition de phages dans les cocktails. De plus, les procédures sont longues et coûteuses et impliquent un investissement de la part de firmes pharmaceutiques, lesquelles sont pour l'instant peu intéressées par ce produit. La réglementation en place dans le cadre de la mise sur le marché d'un nouveau médicament apparaît donc comme inadaptée à la phagothérapie (CAS, 2012 ; Dublanche et Patey, 2011).

#### 5.2.1.2 Essais cliniques difficiles à mettre en place selon les critères actuels

Pour envisager la validation réglementaire de la phagothérapie, des essais cliniques selon les règles actuellement en vigueur sont nécessaires. Seuls trois essais cliniques ont jusqu'à présent remplis les critères réglementaires imposés. Il s'agit de ceux réalisés aux

États-Unis d'Amérique, en Belgique et au Royaume-Uni, présentés précédemment (CAS, 2012).

De manière à étudier correctement la phagothérapie et la comparer à l'antibiothérapie, l'idéal serait bien sûr d'homogénéiser les cas, c'est-à-dire de réaliser des expériences de comparaisons directes avec les mêmes paramètres. Malheureusement, la plupart des autres études actuelles traitant de phagothérapie sont des études de cas et non des essais cliniques. Lorsque ces études de cas impliquent un groupe de malades, de nombreux biais persistent entre ces malades, comme le type d'infection, l'âge, le sexe ou le passé thérapeutique du patient. De plus, les cas sont souvent issus de patients souffrant d'infections à bactéries antibiorésistantes, parfois depuis très longtemps, et ayant souvent reçu de nombreux autres traitements avant de partir sur une phagothérapie (Abedon *et al.*, 2011).

Enfin, la mise en place d'essais cliniques nécessite des fonds qui manquent pour l'instant.

#### 5.2.1.3 Quelles procédures possibles sans AMM ?

Cherchant à traiter par phagothérapie des patients en échec thérapeutique, une équipe belge du Centre des Brûlés de l'Hôpital Militaire de Bruxelles a réfléchi aux différents moyens de faire accepter ce traitement hors AMM. Après avoir bien étudié la position des bactériophages vis-à-vis de tous les textes de loi, voici les différents moyens qu'elle a envisagés :

- référencer les maladies en « maladies orphelines de traitement », mais cela ne s'applique qu'aux maladies comptant moins de 2000 malades et qui ne sont pas nosocomiales ;
- considérer les préparations de phages comme des préparations « magistrales », mais ces préparations ne sont faites qu'à partir de produits référencés ;
- appliquer le paragraphe 35 (anciennement 32) du chapitre C de la Déclaration d'Helsinki indiquant que « dans le cadre du traitement d'un patient, faute d'interventions avérées ou faute d'efficacité de ces interventions, le médecin, après avoir sollicité les conseils d'experts et avec le consentement éclairé du patient ou de son représentant légal, peut recourir à une intervention non avérée si, selon son

appréciation professionnelle, elle offre une chance de sauver la vie, rétablir la santé ou alléger les souffrances du patient. Dans toute la mesure du possible, cette intervention devrait faire l'objet d'une recherche pour en évaluer la sécurité et l'efficacité. Dans tous les cas, les nouvelles informations devraient être enregistrées et, le cas échéant, rendues publiques ». C'est ce paragraphe sur lequel s'appuie l'Institut Ludwik Hirszfild en Pologne (Association médicale mondiale, 1964) ;

- considérer les bactériophages comme des probiotiques, c'est-à-dire des molécules destinées à renforcer le système immunitaire. Il s'agit habituellement de compléments alimentaires contenant des bactéries vivantes aidant la flore commensale de l'organisme. Cependant les probiotiques ont un rôle uniquement préventif et non curatif ;
- appliquer l'article 83 du règlement 726/2004 du Parlement Européen, par lequel il est possible d'employer, dans une démarche d'application compassionnelle (« Compassionate use »), un médicament en cours d'essais cliniques ou un médicament n'ayant pas d'AMM et dont une demande d'AMM a été déposé. Une application compassionnelle correspond à la mise à disposition de ce type de médicament « à un groupe de patients souffrant d'une maladie invalidante, chronique ou grave, ou d'une maladie considérée comme mettant la vie en danger, ces patients ne pouvant pas être traités de manière satisfaisante par un médicament autorisé » (Article 83, 2004).

C'est en s'appuyant sur cette dernière possibilité que l'équipe belge a proposé une application thérapeutique compassionnelle de phagothérapie à des grands brûlés (Dublanche, 2009). Leur proposition a reçu un avis favorable de la part d'un comité d'éthique local, cependant le règlement ne permettait que des essais ponctuels pour des applications limitées, comme explicité dans le document explicatif associé au règlement (EMA, 2007).

Dans ce même cadre d'utilisation compassionnelle, des centres de recherche européens se sont lancés dans des essais cliniques de phagothérapie. Des essais sur des otites ont été engagés en Angleterre, d'autres ont été engagés en Allemagne (Dublanche, 2009).

La Pologne reste un cas à part au sein de l'Europe vu qu'elle n'a jamais cessé ses applications thérapeutiques de phages (Institut de Wroclaw), bien qu'entrée en Europe le 1<sup>er</sup> mai 2004. Une clinique, nommé Institut d'immunologie et de thérapie expérimentale Ludwik

Hirszfeld (“IITD PAN Wrocław - Bacteriophage research and therapy,” n.d.), destinée à soigner les patients étrangers y a été ouverte en 2005. Son autorisation à pratiquer la phagothérapie s’appuie sur l’article 35 de la Déclaration d’Helsinki (Association médicale mondiale, 1964) et sur l’aval obtenu auprès du Comité d’éthique de son académie en juin 2005.

### 5.2.2 Un accès difficile aux soins

D’après (Dublanche, 2009).

L’Institut Eliava à Tbilissi (Géorgie) produit de très nombreuses spécialités à base de bactériophages et tente de s’ouvrir aux pays de l’ouest de l’Europe. Cependant, les problèmes administratifs d’exportation/importation du fait de la nature virale des phages ne facilitent pas les échanges de préparations.

Ces problèmes de douane obligent les malades ayant la volonté de se faire soigner par phagothérapie à partir se faire hospitaliser dans une clinique géorgienne. Le *Phage Therapy Center* (tenu par une société nord-américaine de Californie) situé à Tbilissi se propose d’accueillir ces patients courageux d’avoir fait le voyage.

Cependant, face à la recrudescence de patients osant le voyage, les tarifs des hôpitaux n’ont fait qu’augmenter également, et les tarifs pratiqués sont, à l’heure actuelle, de plus en plus chers, rendant là encore l’accès aux soins difficiles pour les personnes n’ayant pas les moyens financiers suffisants (Biofutur et GEEPhage, 2013).

### 5.2.3 Règlementation en agro-alimentaire

L’intérêt des phages dans l’industrie agro-alimentaire est de détruire certaines bactéries (principalement *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *Escherichia coli*) susceptibles de contaminer les produits alimentaires frais.

Aux États-Unis d'Amérique, la FDA a récemment émis des directives pour lutter contre l'expansion des antibiorésistances. Ces textes tendent à bannir l'utilisation prophylactique sur le bétail d'antibiotiques destinés à l'usage en médecine humaine. Pour mieux lutter contre les antibiorésistances, elle a autorisé en 2006 la pulvérisation sur la viande d'un cocktail de six phages anti-*Listeria monocytogenes* nommé ListShield™ (anciennement LMP 102), fabriqué et conditionné par la société Intralytix. (FDA, 2013). Depuis, d'autres produits du même type ont rejoint l'arsenal (voir annexe 4) et sont classés sous le concept *Generally recognized as safe* (GRAS), qui indique l'approbation par la FDA après reconnaissance de la non dangerosité du produit par des experts, et qui permet de contourner l'habituelle loi fédérale d'autorisation des additifs pour les aliments. C'est le cas du Listex™ P100 (contre *Listeria monocytogenes* pour la viande, le fromage, le poisson et les fruits et légumes) produit par la firme Micros Food Safety (<http://www.micreos.com/>) ainsi que d'autres produits provenant d'Intralytix (<http://www.intralytix.com/>) tels que l'EcoShield™ (contre *Escherichia coli* O157:H7 pour la viande rouge) et le SalmoFresh™ (contre *Salmonella spp.* pour la volaille, les poissons, les coquillages, les fruits et les légumes) (Housby et Mann, 2009).

En Europe, la réglementation sur l'assainissement des denrées, régie par la directive 89/107/CEE (« Additifs alimentaires et conditions d'emploi ») permet uniquement l'utilisation de produits chimiques, d'autres substances ou de procédures de traitements approuvés par l'Union européenne. Pour l'instant, l'application de bactériophages en tant que décontaminant n'a pas été autorisée. Elle doit donc encore faire ses preuves avant que cette autorisation ne soit donnée, laquelle par ailleurs pourrait classer les phages comme étant à la fois des additifs alimentaires et des procédés de traitement (Commission Européenne, 1988 ; Dublanche, 2009).

## 5.3 Désintérêt des laboratoires et des gouvernements politiques

Dernier point notable, l'effort témoigné actuellement par la masse considérable de publications scientifiques et par les tentatives de communications sur le sujet des bactériophages ne trouve pas d'écho notable auprès des décideurs.

### 5.3.1 Absence actuelle d'un modèle économique viable

D'un point de vue légal, un bactériophage est un agent thérapeutique difficile à encadrer d'un brevet pour deux raisons (Biofutur et GEEPhage, 2013 ; Debarbieux, communication personnelle) :

- les phages et leur utilisation thérapeutique ont été décrits il y a maintenant bien longtemps ; il ne s'agit donc pas d'un nouveau produit ni d'une thérapie innovante. Or, un brevet encadre des éléments novateurs. Pour valider ce critère il faudrait proposer une nouvelle niche particulière de phages jamais décrite auparavant ;
- si un phage jamais décrit auparavant était proposé, il serait nécessaire de séquencer totalement son génome et de breveter cette séquence précise. Or il existe habituellement de nombreux autres phages aux génomes quasi similaires à quelques nucléotides près, et ces autres phages, bien que proches génétiquement et physiologiquement, ne seraient pas protégés par le brevet déposé auparavant. Les industriels n'auraient donc plus qu'à utiliser ces autres phages plutôt que celui breveté pour éviter les problèmes de brevet. De plus, une mise à jour des phages étant nécessaire pour suivre l'évolution bactérienne, l'obligation de présenter une séquence génomique précise auprès de l'office des brevets serait incompatible avec cette mise à jour.

Les contraintes actuelles pour breveter les bactériophages empêchent l'existence d'une propriété individuelle les concernant ; il n'y a donc pas de possibilité de tirer suffisamment de profits pour les laboratoires. Ceux-ci ne se donnent donc pas les moyens de mettre en place des essais cliniques suffisants. Le manque d'investissement de la part des industries pharmaceutiques provient également de la constatation qu'en phagothérapie, une petite dose de phages et une faible fréquence d'administration sont généralement suffisantes, la

production ne rapporterait donc pas autant que les bénéfices réalisés actuellement grâce aux antibiotiques.

### 5.3.2 Peu de démarches gouvernementales appuyant la recherche

Malgré le combat de la communauté appuyant la phagothérapie pour obtenir son autorisation, leurs appels restent sans réponse. Peu de démarches sont mises en places par les gouvernements sur cette question.

L'intérêt suscité par les bactériophages auprès des politiques reste très limité et restreint au cercle d'hyper-spécialistes et de commissions d'experts. À ce jour, sur les 15 dernières années, seules deux questions au gouvernement ont porté sur la réhabilitation de la phagothérapie dans le système de santé français, et ce uniquement au Sénat. Sur les deux questions, toutes deux posées par Maryvonne Blondin, sénatrice du Finistère (Parti Socialiste), une seule a obtenu une réponse de la part du Ministère de la Santé, dont voici un extrait :

*« La dimension de cette problématique impose d'interpeller les partenaires européens que sont l'Agence européenne des médicaments et la Commission européenne, car la position de l'ANSM ne peut se limiter à une approche uniquement nationale. »*, Mme Michèle Delaunay, ministre déléguée auprès de la ministre des affaires sociales et de la santé, chargée des personnes âgées et de l'autonomie (Sénat, 2013).

Toutefois, les choses commencent à évoluer lentement. Le Centre d'Analyse Stratégique (CAS) du gouvernement français, institution d'expertise et d'aide à la décision qui dépend des services du Premier ministre, annonce, dans une note de novembre 2012, que « parmi les pistes de recherche de complément ou d'alternative aux antibiotiques, l'une d'entre elles [la phagothérapie] nécessite d'être évaluée rapidement (...) la phagothérapie, le traitement des infections bactériennes avec des bactériophages permet dans un certain nombre de cas, de traiter les infections à bactéries les plus résistantes ». Elle attire l'attention sur la recrudescence de patients se rendant en Géorgie, au centre de phagothérapie de Tbilissi pour recevoir un traitement et sur l'absence de procédure d'AMM adaptée au cas des phages : « les procédures d'AMM actuelles ne sont adaptées ni au développement « industriel » de cocktails de phages préparés à l'avance, ni à une approche « sur-mesure » à petite échelle, qui consiste à

isoler et préparer (en quelques semaines) un phage spécifique de la bactérie du patient. Les procédures d'AMM sont conçues pour des médicaments inertes et fixes ne permettant pas la mise à jour régulière de cocktails de phages que l'on doit adapter en fonction des bactéries. ». Enfin, elle envisage l'adaptation du Code de Santé publique à l'instar de la réglementation sur les vaccins, permettant de réadapter les cocktails (après obtention préalable d'une AMM pour ces cocktails) selon l'évolution des bactéries ciblées sans devoir repasser à chaque fois par la procédure d'AMM. Cette adaptation nécessiterait la création, dans l'*Advanced Therapy Medicinal Product*, d'une section spécifique pour la phagothérapie du même modèle que celui que la directive européenne 2003/63/CE (qui modifie la directive 2001/83/CE) a introduit pour les thérapies génique, les produits à base de cellules et les vaccins. Cette adaptation est actuellement envisagée par l'Union européenne et par la FDA. La note d'analyse préconise également la mise en place et le financement de programmes de recherches sur l'innocuité, l'efficacité et le champ d'application potentiel de la phagothérapie, ainsi que sur la faisabilité d'une production de cocktails répondant aux exigences sanitaires actuelles (CAS, 2012 ; Commission Européenne, 2003 ; Dublanche, 2009 ; EMA, 2013).

Toujours en France, face à un Ministère de la Santé qui semble réticent, le Ministère de la Défense commence à s'intéresser de très près aux bactériophages, pour leur potentielle utilisation dans la détection, la désinfection et le traitement thérapeutique de menaces bactériennes liées au bioterrorisme. Pour exemple, la Direction Générale de l'Armement (DGA), branche de ce Ministère, coordonne actuellement le projet de recherche de phagothérapie sur les surinfections bactériennes de brûlures résistantes aux antibiotiques nommé « Phagoburn » et participe à son financement (BCISSA, 2013).

Dernièrement, le 17 septembre 2013, la députée européenne Michèle Rivasi (Europe Ecologie Les Verts), qui, lors du congrès « Le renouveau de la phagothérapie, pourquoi ? Comment ? », avait affirmé que « Les Politiques n'étaient pas au courant de l'existence de cette thérapie et du débat actuel qu'elle suscite », a organisé, au Parlement européen à Bruxelles, une réunion pour travailler ensemble sur le futur réglementaire de la phagothérapie, en association avec la sénatrice Maryvonne Blondin (Parti Socialiste). Y étaient conviés les principaux acteurs européens concernés : la Commission Européenne (Direction Générale de la Santé et des Consommateurs (DG Sanco), DG Recherche, Centre Commun de Recherche), l'Agence Européenne des Médicaments (EMA), l'Agence Nationale de Sécurité des Médicaments (ANSM), plusieurs professeurs et médecins français et belges tels qu'Alain

Dublanchet, Olivier Patey (Hôpital Villeneuve-Saint Georges), Patrick Jault (Hôpital Percy), Jean-Paul Pirnay et Gilbert Verbeken (Hôpital Queen Astrid), ainsi que des PDG d'entreprise qui développent des produits thérapeutiques à base de phages (dont celui de Pherecydes Pharma). Cette réunion a abouti à une demande de proposition écrite sur les critères de qualité exigés par EMA pour les bactériophages, de manière à démontrer la qualité des préparations phagiques et à parvenir enfin à l'obtention d'une AMM. Une seconde réunion avec les mêmes participants devrait se tenir en 2014 pour avancer sur cette question (Pherecydes Pharma, 2013 ; Rivasi, 2013).

Aux États-Unis d'Amérique, c'est dans l'espoir de trouver un remède à l'anthrax que l'armée s'est intéressée à la phagothérapie. La DTRA (*Defense Threat Reduction Agency*), une agence du Département américain de la défense chargé de protéger les États-Unis d'Amérique contre les armes de destruction massive, notamment biologiques, a donné en 2007 près d'un million de dollars à l'institut Eliava, le principal centre de phagothérapie en Géorgie (Maruchitch et Savolainen, 2012).

# CONCLUSION

---

La phagothérapie est une thérapie ancienne et passablement oubliée que de nombreux scientifiques tentent de remettre au goût, et surtout aux critères scientifiques et réglementaires, du jour. Cette thérapie est à la fois riche et victime d'un incroyable passé de traitements et de recherches, fructueux ou moins fructueux, rigoureux ou moins rigoureux. Au vu des différents avantages que présente ce « médicament intelligent », son pouvoir bactéricide efficace, sa multiplication *in situ*, l'élimination de la bactérie ciblée à l'exclusion des autres, le très faible nombre d'effets secondaires, etc. justifie indéniablement son positionnement comme une alternative crédible à l'antibiothérapie ou en utilisation conjointe. Sa réhabilitation nécessite cependant encore quelques étapes avant de pouvoir être effective.

Tout d'abord, des approfondissements semblent nécessaires pour évaluer d'une part son incidence sur l'organisme, notamment son interaction avec le système immunitaire à long terme, et, d'autre part, la co-évolution des phages administrés avec les bactéries, qui nécessiterait un contrôle, également sur le long terme, de la portée des phago-résistances et de l'impact potentiel de la thérapie sur l'évolution générale des bactéries.

Ces explorations futures nécessitent de réaliser des recherches *in vitro*, mais également *in vivo*, et ce chez l'animal comme chez l'homme. C'est ici qu'arrive la deuxième étape à prendre en compte pour la réhabilitation de la phagothérapie. En effet, le cadre légal actuel ne semble pas permettre une exploitation correcte de cette alternative thérapeutique par les laboratoires pharmaceutiques. En découle une difficulté notoire à mettre en place des essais thérapeutiques chez l'homme. Ces essais sont cependant nécessaires à l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché de bactériophages en tant que médicaments. Une possibilité pour briser ce cercle vicieux serait potentiellement de modifier la réglementation en instaurant une clause particulière pour les bactériophages, à l'instar de celle mise en place pour les vaccins.

Néanmoins, de fil en aiguille, une perte de temps s'instaure face à l'émergence préoccupante d'antibiorésistances multiples qui empirent chaque jour. La liste des patients souffrant d'infections en échec thérapeutique ne cesse de grossir. Ce problème mondial se fait de plus en plus sentir, et les choses évoluent progressivement pour en sortir. Des programmes

de recherche à large échelle ont été instaurés ces six dernières années. Le dernier en date, nommé Phagoburn donnera ses premiers résultats d'ici environ un an et demi.

En attendant, les bactériophages n'ont pas fini de dévoiler leurs secrets, tant en phagothérapie que dans bien d'autres domaines où ils sont étudiés. Parmi ces domaines, on retrouve la biologie moléculaire et la génétique, mais ils sont également explorés dans le cadre de vaccinations (Clark et March, 2006), de transplantation de peau, de traitements de patients immunodéprimés par leur pouvoir immunomodulateur (Górski *et al.*, 2006a, 2012) ou en traitement de tumeurs (Bar *et al.*, 2008).

# BIBLIOGRAPHIE

---

- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, **1**, 66–85.
- Abedon ST, LeJeune JT (2005). Why bacteriophage encode exotoxins and other virulence factors. *Evolutionary bioinformatics online*, **1**, 97–110.
- Ackermann H-W (2003). Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, **154**, 245–251.
- Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N (1998). Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *Journal of Infection*, **36**, 5–15.
- Andersson AF, Banfield JF (2008). Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science*, **320**, 1047–1050.
- ANSM (2011). Consommation des antibiotiques en France : bilan de dix ans d'évolution *In: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé en France* [en ligne]. [<http://www.ansm.sante.fr/S-informer/Presse-Communique-Points-presse/Consommation-des-antibiotiques-en-France-bilan-de-dix-ans-d-evolution-Communique>] (Consultation le 25/11/13).
- ANSM (2013). Caducité des AMM et des enregistrements *In: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé* [en ligne]. [[http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Caducite-des-AMM-et-des-enregistrements/\(offset\)/2](http://ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/Caducite-des-AMM-et-des-enregistrements/(offset)/2)] (Consultation le 28/11/13).
- Appelmans R (1921). Le bacteriophage dans l'organisme. *CR Seances Soc Biol Fil*, **85**, 722–724.
- Arber W (1966). Host Specificity of DNA produced by *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol*, **20**, 483–496.
- Article 83 (2004)., *Règlement 726/2004 du Parlement Européen*,.
- Article L5111-1 (2007)., *Code de la santé publique*,.
- Article R5121-102 (2008)., *Code de la santé publique*,.
- Article R5121-36-1 (2008)., *Code de la santé publique*,.
- Arts Décoratifs (2013). Musée de la publicité *In: Les Arts Décoratifs* [en ligne]. [<http://www.lesartsdecoratifs.fr/francais/publicite/>] (Consultation le 23/2/13).
- Association médicale mondiale (1964). Déclaration d'Helsinki de L'AMM - Principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains.
- Bar H, Yacoby I, Benhar I (2008). Killing cancer cells by targeted drug-carrying phage nanomedicines. *BMC biotechnology*, **8**, 37.
- Barfoot R, Denham S, Gyure LA, Hall JG, Hobbs SM, Jackson LE, *et al.* (1989). Some properties of dendritic macrophages from peripheral lymph. *Immunology*, **68**, 233–239.
- Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, *et al.* (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712.
- Barrow PA, Soothill JS (1997). Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in microbiology*, **5**, 268–271.
- BCISSA (2013). Lancement du 1er projet de recherche clinique européenne PHAGOBURN *In: Ministère Français de la Défense - Service de santé des armées* [en ligne]. [<http://www.defense.gouv.fr/sante/a-la-une/une-2013/lancement-du-1er-projet-de-recherche-clinique-europeenne-phagoburn>] (Consultation le 25/10/13).
- Beckerich A, Hauduroy P (1922a). Le bacteriophage de d'Herelle: Ses applications therapeutiques. *Journal of bacteriology*, **8**, 163–171.

- Beckerich A, Hauduroy P (1922b). Le bactériophage dans le traitement de la fièvre typhoïde. *Compt. rend. Soc. Biol.*, **86**, 168–170.
- Berche P (2007). Une histoire des microbes. John Libbey Eurotext.
- Bergh Ø, Børshem KY, Bratbak G, Heldal M (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467–468.
- Bernhardt TG, Wang I-N, Struck DK, Young R (2002). Breaking free: “protein antibiotics” and phage lysis. *Research in microbiology*, **153**, 493–501.
- Bernhardt TG, Wang N, Struck DK, Young R (2001). A protein antibiotic in the phage Q $\beta$  virion: diversity in lysis targets. *Science*, **292**, 2326–2329.
- Biofutur et GEEPhage (2013). Le renouveau de la phagothérapie. Pourquoi? Comment? - Institut Mutualiste Montsouris-Paris In: *Supbiotech* [en ligne]. [<http://blogs.supbiotech.fr/2013/01/forum-phagothérapie-2013.html>] (Consultation le 25/10/13).
- Biologie marine (2006). Bactériophage In: *Biologie marine.com* [en ligne]. [<http://www.biologiemarine.com/micro/bacphage.htm>] (Consultation le 28/11/13).
- Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, *et al.* (2002). Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infection and immunity*, **70**, 204–210.
- Biswas SK, Chowdhury R, Das J (1992). A 14-Kilodalton inner membrane protein of *Vibrio cholerae* biotype El Tor confers resistance to group IV cholera phage infection to classical vibrios. *Journal of bacteriology*, **174**, 6221–6229.
- Blower TR, Salmond GP, Luisi BF (2011). Balancing at survival’s edge: the structure and adaptive benefits of prokaryotic toxin–antitoxin partners. *Current opinion in structural biology*, **21**, 109–118.
- Bordet J (1931). Theories of the bactériophage. *Proceedings of the Royal Society of London*, **107**, 398–417.
- Bordet J, Ciuca M (1921). Remarques sur l’historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **84**, 745–747.
- Bornert G (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires. *Revue Méd. Vét.*, **151**, 1003–1010.
- Bruttin A, Brüßow H (2005). Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **49**, 2874–2878.
- Bruynoghe R, Maisin J (1921). Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage. *Compt Rend Soc Biol*, **85**, 1120–1121.
- Bull JJ, Levin BR, DeRouin T, Walker N, Bloch CA (2002). Dynamics of success and failure in phage and antibiotic therapy in experimental infections. *BMC microbiology*, **2**, 35–44.
- Calendar R, Abedon ST (2006). *The Bacteriophages* 2nd edition. Oxford University Press.
- Capparelli R, Nocerino N, Iannaccone M, Ercolini D, Parlato M, Chiara M, *et al.* (2010). Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy. *Journal of Infectious Diseases*, **201**, 52–61.
- Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Iannelli D (2007). Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **51**, 2765–2773.
- Carlton RM (1999). Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, **47**, 267–274.
- Carson L, Gorman SP, Gilmore BF (2010). The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **59**, 447–455.

- CAS (2012). Les bactéries résistantes aux antibiotiques : Note d'analyse 299 In: *Centre d'analyse stratégique du Premier Ministre français* [en ligne]. [<http://www.strategie.gouv.fr/content/bacteries-resistantes-antibiotiques-na299>] (Consultation le 11/11/13).
- CDC (2013). Antimicrobial resistance threats in the United States, 2013 In: *Center for Disease Control and prevention* [en ligne]. [<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>] (Consultation le 25/11/13).
- Ceglarek I, Piotrowicz A, Lecion D, Miernikiewicz P, Owczarek B, Hodyra K, *et al.* (2013). A novel approach for separating bacteriophages from other bacteriophages using affinity chromatography and phage display. *Scientific reports*, **3**.
- Chamberland C (1884). Sur un filtre donnant de l'eau physiologiquement pure. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **99**, 247–248.
- Chanishvili N (2011). Experience of the Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology in development of the innovative bio-preparations and their commercialization. Presented at the Innovative Drug Discovery Workshop, ISTC, Toronto, Canada.
- Chanishvili N, Chanishvili T, Tediashvili M, Barrow PA (2001). Phages and their application against drug-resistant bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **76**, 689–699.
- Chen P (2008). Lysogenic cycle - Phage lambda In: *Biology 1151, Principles of Biological Science* [en ligne]. [<http://bio1151b.nicerweb.net/>] (Consultation le 28/11/13).
- China B, Ghafir Y, Daube G (2002). Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.*, **147**, 99–109.
- Chopra I, Hodgson J, Metcalf B, Poste G (1996). New approaches to the control of infections caused by antibiotic-resistant bacteria. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, **275**, 401–403.
- CHUPS (2006). Pharmacologie - DCEM1 In: *Faculté de médecine Pierre et Marie Curie* [en ligne]. [<http://www.chups.jussieu.fr/polys/pharmaco/poly/cinetique.html>] (Consultation le 14/7/13).
- Clark JR, March JB (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in biotechnology*, **24**, 212–218.
- Clark L, Greenbaum C, Jiang J, Lernmark A, Ochs H (2006). The antibody response to bacteriophage is linked to the lymphopenia gene in congenic BioBreeding rats. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **32**, 205–209.
- Clinical Trials (2011). A prospective, randomized, double-blind controlled study of WPP-201 for the safety and efficacy of treatment of venous leg ulcers In: *ClinicalTrials.gov, a service of the U.S. National Institutes of Health* [en ligne]. [<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00663091#wrapper>] (Consultation le 27/11/13).
- Clinical Trials (2013). Recherches d'études cliniques comptenant le terme "phage therapy" In: *ClinicalTrials.gov, a service of the U.S. National Institutes of Health* [en ligne]. [<http://clinicaltrials.gov/ct2/results/map?term=phage+therapy>] (Consultation le 27/11/13).
- Comeau AM, Tétart F, TRAJET SN, Prère M-F, Krisch HM (2008). La «synergie phages-antibiotiques» : un enjeu pour la phagothérapie. *MS. Médecine sciences*, **24**, 449–451.
- Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prere M-F, Krisch HM (2007). Phage-antibiotic synergy (PAS) :  $\beta$ -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One*, **2**, e799.
- Commission Européenne (1988). Directive européenne 89/107/CEE.
- Commission Européenne (2003). Directive européenne 2003/63/CE.

- Connerton PL, Timms AR, Connerton IF (2011). *Campylobacter* bacteriophages and bacteriophage therapy. *Journal of applied microbiology*, **111**, 255–265.
- CORDIS (2013). Projects PHAGOBURN : Evaluation of phage therapy for the treatment of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections (phase I-II clinical trial) In: *European Commission : Community Research and Development Information Service* [en ligne]. [[http://cordis.europa.eu/projects/rcn/108695\\_en.html](http://cordis.europa.eu/projects/rcn/108695_en.html)] (Consultation le 25/10/13).
- D' Hérelle F (1911). Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **152**, 1413–1415.
- D' Hérelle F (1912). Sur la propagation, dans la République Argentine, de l'épizootie des sauterelles du Mexique. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **154**, 623–625.
- D' Hérelle F (1915). La campagne contre les sauterelles en Tunisie en 1915. *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*, **8**, 629–33.
- D' Hérelle F (1916). Contribution à l'étude de la dysenterie. Nouveaux bacilles dysentériques, pathogènes pour les animaux d'expérience. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, **76**, 425–8.
- D' Hérelle F (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **165**, 373–375.
- D' Hérelle F (1918). Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (Bacteriophagum intestinale). *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **81**, 1160–1162.
- D' Hérelle F (1921a). Le microbe bactériophage, agent d'immunité dans la peste et le barbone. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, **172**, 99–100.
- D' Hérelle F (1921b). Le bactériophage; son rôle dans l'immunité. Masson et cie.
- D' Hérelle F (1926). Le bactériophage et son comportement. Masson.
- D' Hérelle F (1928). Le choléra asiatique, Masson. ed.
- Debarbieux L, Leduc D, Maura D, Morello E, Criscuolo A, Grossi O, *et al.* (2010). Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *Journal of Infectious Diseases*, **201**, 1096–1104.
- Dewaal CS, Hicks G, Barlow K, Alderton L, Vegosen L (2006). Foods associated with foodborne illness outbreaks from 1990 through 2003. *Food Protection Trends*, **26**, 466–473.
- Dixon B (2004). New dawn for phage therapy. *The Lancet infectious diseases*, **4**, 186.
- Dublanchet A (2009). Des virus pour combattre les infections - la phagothérapie : renouveau d'un traitement au secours des antibiotiques. Favre.
- Dublanchet A, Patey O (2011). La phagothérapie: passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, **26**, 165–175.
- Dubos RJ, Straus JH, Pierce C (1943). The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. *The Journal of experimental medicine*, **78**, 161–168.
- Eaton MD, Bayne-Jones S (1934). Bacteriophage therapy : review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *Journal of the American Medical Association*, **103**, 1769–1776.
- ECDC, EMA (2009). The bacterial challenge : time to react.
- Edlinger E, Faguet M (1950). Antibiotiques et lyse bactériophagique. IV-Etude, au microbiophotomètre, de l'action conjuguée du bactériophage et de la streptomycine sur la culture d'un staphylocoque blanc. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **78**, 144–146.
- Edlinger E, Faguet M (1951). Antibiotiques et lyse bactériophagique. IX-L'action de la terramycine sur la lyse bactériophagique étudiée au microbiophotomètre. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **81**, 221–224.

- EFSA, ECDC (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, **11**.
- EMA (2007). Guideline on compassionate use of medicinal products.
- EMA (2013). Advanced-therapy-medicinal-product classification *In: European Medicines Agency* [en ligne].  
[[http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general\\_content\\_000296.jsp&mid=WC0b01ac058007f4bc](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000296.jsp&mid=WC0b01ac058007f4bc)] (Consultation le 28/11/13).
- Evans AC (1933). Inactivation of antistreptococcus bacteriophage by animal fluids. *Public Health Reports*, **48**, 411–426.
- Fachgruppe Pharmazeutische Erzeugnisse der Wirtschaftsgruppe Chemische Industrie (1940). Preisverzeichnis deutscher pharmazeutischer Spezialpräparate - Rote Liste. Berlin.
- Faguet M, Edlinger E (1949). Antibiotiques et lyse bactériophagique. III-Retard de la lyse bactériophagique par la streptomycine, observé au microbiophotomètre. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **77**, 204–207.
- Faguet M, Edlinger E (1951). Antibiotiques et lyse bactériophagique. VIII-L'action de l'auroémocine sur la lyse bactériophagique étudiée au microbiophotomètre. *Ann Inst Pasteur (Paris)*, **80**, 281–286.
- Faruque SM, Islam MJ, Ahmad QS, Faruque ASG, Sack DA, Nair GB, *et al.* (2005). Self-limiting nature of seasonal cholera epidemics : role of host-mediated amplification of phage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **102**, 6119–6124.
- FC2M (2011). 1er Workshop français sur la phagothérapie *In: FC2M panel médical et marketing personnalisé* [en ligne]. [<http://panel-marketing-medical.blogspot.fr/2011/04/1er-workshop-francais-sur-la.html>] (Consultation le 27/11/13).
- FDA (2013). Food additives permitted for direct addition to food for human consumption : *Listeria*-specific bacteriophage preparation *In: U.S. Food and Drug Administration* [en ligne].  
[<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.785>] (Consultation le 25/11/13).
- Fenster A (2013). Qui a découvert la pénicilline *In: Science Presse* [en ligne]. [<http://www.sciencepresse.qc.ca/blogue/2013/03/23/decouvert-penicilline>] (Consultation le 20/11/13).
- Filippov AA, Sergueev KV, He Y, Huang X-Z, Gnade BT, Mueller AJ, *et al.* (2011). Bacteriophage-resistant mutants in *Yersinia pestis* : identification of phage receptors and attenuation for mice. *PloS one*, **6**, e25486.
- Fineran PC, Blower TR, Foulds IJ, Humphreys DP, Lilley KS, Salmond GP (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein–RNA toxin–antitoxin pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 894–899.
- Fiorentin L, Vieira ND, Barioni Jr W (2005). Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella Enteritidis* PT4 in caecal contents of broilers. *Avian Pathology*, **34**, 258–263.
- Fischer CR, Yoichi M, Unno H, Tanji Y (2004). The coexistence of *Escherichia coli* serotype O157: H7 and its specific bacteriophage in continuous culture. *FEMS microbiology letters*, **241**, 171–177.
- Garneau J (2009). Caractérisation du système CRISPR-cas chez *Streptococcus thermophilus*. Université Laval.
- Geier MR, Attallah AFM, Merrill CR (1975). Characterization of *Escherichia coli* bacterial viruses in commercial sera. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **11**, 55–58.
- Geier MR, Trigg ME, Merrill CR (1973). Fate of bacteriophage lambda in non-immune germ-free mice. *Nature*, **246**, 221–222.

- Gilmore BF (2012). Bacteriophages as anti-infective agents: recent developments and regulatory challenges. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, **10**, 533–535.
- Gómez P, Buckling A (2011). Bacteria-phage antagonistic coevolution in soil. *Science*, **332**, 106–109.
- Goodridge LD (2010). Designing phage therapeutics. *Current pharmaceutical biotechnology*, **11**, 15–27.
- Goodridge LD, Bisha B (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, **1**, 130–137.
- Google Ngram Viewer (2013). % de publications contenant le term “phage therapy” parmi l’ensemble des publications recensées par Google Books, entre 1910 et 2008 *In: Application Google Books Ngram Viewer* [en ligne]. [https://books.google.com/ngrams/graph?content=phage+therapy&year\_start=1910&year\_end=2008&corpus=15&smoothing=1&share=&direct\_url=t1%3B%2Cphage%20therapy%3B%2Cc0] (Consultation le 27/11/13).
- Górski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Dabrowska K, Wierzbicki P, Ohams M, *et al.* (2012). Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy. *Advances in virus research*, **83**, 41–71.
- Górski A, Weber-Dabrowska B (2005). The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cellular and molecular life sciences*, **62**, 511–519.
- Górski, Kniotek M, Perkowska-Ptasińska A, Mróz A, Przerwa A, Gorczyca W, *et al.* (2006a). Bacteriophages and transplantation tolerance. *Transplantation proceedings*, **38**, 331–333.
- Górski, Wazna E, Dabrowska K, Switala-Jelen K, Miedzybrodzki R (2006b). Bactériophage translocation. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **46**, 313–319.
- Gratia A, Fredericz P (1937). Comparaison entre la reproduction en série des bactériophages et virus des plantes et l’activation en série du fibrin-ferment. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **126**, 906–908.
- Grossi O (2006). Évaluation de l’efficacité d’une suspension de bactériophages anti-staphylococciques : corrélation in vitro-in vivo. Université de Médecine de Nantes.
- Guenther S, Huwyler D, Richard S, Loessner MJ (2009). Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Applied and environmental microbiology*, **75**, 93–100.
- Hagens S, Bläsi U (2003). Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents : a pilot study. *Letters in applied microbiology*, **37**, 318–323.
- Hankin ME (1896). L’action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du cholera. *Ann. Inst. Pasteur*, **10**, 511–523.
- Häusler T (2006). Viruses vs. superbugs - A solution to the antibiotics crisis? Palgrave Macmillan.
- Hermoso JA, García JL, García P (2007). Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current opinion in microbiology*, **10**, 461–472.
- Hershey AD, Chase M (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of general physiology*, **36**, 39–56.
- Hoffman LR, D’Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, **436**, 1171–1175.
- Hofmann JO, Cetron MS, Farley MM, Baughman WS, Facklam RR, Elliott JA, *et al.* (1995). The prevalence of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Atlanta. *New England Journal of Medicine*, **333**, 481–486.
- Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, **35**, 322–332.

- Holck A, Berg J (2009). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cooked ham by virulent bacteriophages and protective cultures. *Applied and environmental microbiology*, **75**, 6944–6946.
- Horvath P, Barrangou R (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, **327**, 167–170.
- Housby JN, Mann NH (2009). Phage therapy. *Drug discovery today*, **14**, 536–540.
- Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM, Donoghue AM (2004). Therapeutic efficacy of bacteriophage and Baytril (enrofloxacin) individually and in combination to treat colibacillosis in broilers. *Poultry science*, **83**, 1944–1947.
- Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV (1998). Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, **144**, 3039–3047.
- Hyman P, Abedon ST (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*, **70**, 217–248.
- ICTV (2012). Virus Taxonomy: 2012 Release In: *International Committee on Taxonomy of Viruses* [en ligne]. [<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>] (Consultation le 9/5/13).
- IDSA (2004). Bad bugs, no drugs: As antibiotic discovery stagnates...a public health crisis brews. *Report of the Infectious Diseases Society of America*, 1-37.
- IITD PAN Wrocław - Bacteriophage research and therapy (n.d.). [<http://www.iitd.pan.wroc.pl/en/Phages/index.html>] (Consultation le 7/3/13).
- Inal JM (2003). Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, **51**, 237–244.
- Inchley CJ (1969). The activity of mouse Kupffer cells following intravenous injection of T4 bacteriophage. *Clinical and experimental immunology*, **5**, 173–187.
- Institut Pasteur (2012). Unité de Biologie Moléculaire du Gène chez les Extrémophiles - Interactions bactériophages-bactéries chez l'animal In: *Pasteur* [en ligne]. [<http://www.pasteur.fr/ip/easysite/pasteur/fr/recherche/departements-scientifiques/microbiologie/unites-et-groupes/unite-de-biologie-moleculaire-du-gene-chez-les-extremophiles/themes-de-recherche/interactions-bacteriophages-bacteries-chez-l-animal>] (Consultation le 25/10/13).
- INVS (2012). Infections à *Clostridium difficile* In: [en ligne]. [<http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Infections-associees-aux-soins/Surveillance-des-infections-associees-aux-soins-IAS/Clostridium-difficile-CD>] (Consultation le 30/10/13).
- Jacquet S (2007). Viruses: Conductors of aquatic ecosystems? Presented at the Infectiologie bactérienne: quelle place pour la phagothérapie?, Institut Pasteur de Paris, France.
- Jerne NK (1956). The presence in normal serum of specific antibody against bacteriophage T4 and its increase during the earliest stages of immunization. *The Journal of Immunology*, **76**, 209–216.
- Kabeshima T (1920). Sur un ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature du dit "microbe filtrant bactériophage" de d'Hérelle. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **83**, 219–21.
- Karunasagar I, Shivu MM, Girisha SK, Krohne G, Karunasagar I (2007). Biocontrol of pathogens in shrimp hatcheries using bacteriophages. *Aquaculture*, **268**, 288–292.
- Kasman LM, Kasman A, Westwater C, Dolan J, Schmidt MG, Norris JS (2002). Overcoming the phage replication threshold: a mathematical model with implications for phage therapy. *Journal of virology*, **76**, 5557–5564.
- Kaur T, Nafissi N, Wasfi O, Sheldon K, Wettig S, Slavcev R (2012). Immunocompatibility of bacteriophages as nanomedicines. *Journal of Nanotechnology*, **ID 247427**, 1-13.

- Kelsall BL, Leon F (2005). Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunological reviews*, **206**, 132–148.
- Khenkine J (2009). La phagothérapie : virus contre bactéries *In: Allo docteurs - France 5* [en ligne]. [<http://www.allodocteurs.fr/article.asp?IdArticle=1168#>] (Consultation le 25/10/13).
- Krueger AP, Cohn T, Smith PN, McGuire CD (1948). Observations on the effect of penicillin on the reaction between phage and staphylococci. *The Journal of general physiology*, **31**, 477–488.
- Krueger AP, Scribner EJ (1941). The Bacteriophage, its nature and its therapeutic use. *Journal of the American Medical Association*, **116**, 2160–2167.
- Kumari S, Harjai K, Chhibber S (2010). Evidence to support the therapeutic potential of bacteriophage Kpn5 in burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* in BALB/c mice. *Journal of microbiology and biotechnology*, **20**, 935–941.
- Kurzepa A, Dabrowska K, Skaradziński G, Górski A (2009). Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy. *Clinical and experimental medicine*, **9**, 93–100.
- Kutateladze M, Adamia R (2010). Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in biotechnology*, **28**, 591–595.
- Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, *et al.* (2010). Phage therapy in clinical practice : treatment of human infections. *Current pharmaceutical biotechnology*, **11**, 69–86.
- L'Indépendant (2013a). Les phages, tueurs de bactéries *In: L'Indépendant* [en ligne]. [<http://www.lindependant.fr/2013/02/13/les-phages-tueurs-de-bacteries,1727157.php>] (Consultation le 25/10/13).
- L'Indépendant (2013b). Des programmes de recherche lancés sur les bactériophages - Phagespoirs, pour promouvoir la recherche *In: L'Indépendant* [en ligne]. [<http://www.lindependant.fr/2012/01/26/des-programmes-de-recherche-lances-sur-les-bacteriophages-phagespoirs-pour-promouvoir-la-recherche,110735.php>] (Consultation le 25/10/13).
- Labrie SJ, Samson JE, Moineau S (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 317–327.
- Lammertyn E, Voorde JV, Meyen E, Maes L, Mast J, Anné J (2008). Evidence for the presence of *Legionella* bacteriophages in environmental water samples. *Microbial ecology*, **56**, 191–197.
- Landes Bioscience (2013). Bacteriophage: Meetings 2013 *In: Landes Bioscience.com* [en ligne]. [<https://www.landesbioscience.com/journals/bacteriophage/article/24584/>] (Consultation le 29/11/13).
- Lenski RE (1984). Two-step resistance by *Escherichia coli* B to bacteriophage T2. *Genetics*, **107**, 1–7.
- Letkiewicz S, Midzybrodzki R, Ktak M, Jończyk E, Weber-Dakabrowska B, Górski A (2010). The perspectives of the application of phage therapy in chronic bacterial prostatitis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **60**, 99–112.
- Levin BR, Bull JJ (2004). Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 166–173.
- Levy SB, Marshall B (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature medicine*, **10**, S122–S129.
- Loc-Carrillo C, Abedon ST (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, **1**, 111–114.
- Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, **294**, 2170–2172.

- Mai V, Ukhanova M, Visone L, Abuladze T, Sulakvelidze A (2010). Bacteriophage administration reduces the concentration of *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal tract and its translocation to spleen and liver in experimentally infected mice. *International journal of microbiology*, **ID 624234**, 1-6.
- Maruchitch R, Savolainen A (2012). Les phages, des virus guérisseurs *In: Le Monde* [en ligne]. [http://www.lemonde.fr/sciences/article/2012/06/14/les-phages-des-virus-guerisseurs\_1718745\_1650684.html] (Consultation le 25/10/13).
- Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, *et al.* (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PloS one*, **4**, e4944.
- Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, *et al.* (1996). Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **93**, 3188–3192.
- Merril CR, Friedman TB, Attallah AFM, Geier MR, Krell K, Yarkin R (1972). Isolation of bacteriophages from commercial sera. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, **8**, 91–93.
- Meyer A, Deiana J, Bernard A (2004). Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés. Wolters Kluwer France.
- Meyer JR, Agrawal AA, Quick RT, Dobias DT, Schneider D, Lenski RE (2010). Parallel changes in host resistance to viral infection during 45,000 generations of relaxed selection. *Evolution*, **64**, 3024–3034.
- Miedzybrodzki R, Switala-Jelen K, Fortuna W, Weber-Dabrowska B, Przerwa A, Lusiak-Szelachowska M, *et al.* (2008). Bacteriophage preparation inhibition of reactive oxygen species generation by endotoxin-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Virus research*, **131**, 233–242.
- Miller ES, Kutter E, Mosig G, Arisaka F, Kunisawa T, Rüger W (2003). Bacteriophage T4 genome. *Microbiology and molecular biology reviews*, **67**, 86–156.
- Monds RD, O'Toole GA (2009). The developmental model of microbial biofilms : ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*, **17**, 73–87.
- Morello E, Saussereau E, Maura D, Huerre M, Touqui L, Debarbieux L (2011). Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains : first steps towards treatment and prevention. *PLoS One*, **6**, e16963.
- Nakai T, Park SC (2002). Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Research in microbiology*, **153**, 13–18.
- Nale JY, Shan J, Hickenbotham PT, Fawley WN, Wilcox MH, Clokie MR (2012). Diverse temperate bacteriophage carriage in *Clostridium difficile* 027 strains. *PLoS One*, **7**, e37263.
- NCBI (2005). *Enterobacteria* phage T4 *In: National Center for Biotechnology Information* [en ligne]. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/4266] (Consultation le 10/5/13).
- NCBI (2013). Result by year for “phage therapy” in Pubmed - U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health *In: National Center for Biotechnology Information* [en ligne]. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/?term=phage+therapy] (Consultation le 28/11/13).
- Nelson D, Loomis L, Fischetti VA (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A *streptococci* by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **98**, 4107–4112.
- Nungester WJ, Watrous RM (1934). Accumulation of bacteriophage in spleen and liver following its intravenous inoculation, *in: Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*,. pp. 901–905.
- OMS (2008). Vaccins antityphoïdiques. *Relevé épidémiologique hebdomadaire*, **83**, 49–60.

- Örmälä A-M, Jalasvuori M (2013). Phage therapy : Should bacterial resistance to phages be a concern, even in the long run? *Bacteriophage*, **3**, e24219.
- Osborne L (2000). A Stalinist Antibiotic Alternative - NYTimes.com In: *The New York Times* [en ligne]. [<http://www.nytimes.com/2000/02/06/magazine/a-stalinist-antibiotic-alternative.html%5D?pagewanted=all>] (Consultation le 22/7/13).
- Pallares R, Liñares J, Vadillo M, Cabellos C, Manresa F, Viladrich PF, *et al.* (1995). Resistance to penicillin and cephalosporin and mortality from severe pneumococcal pneumonia in Barcelona, Spain. *New England Journal of Medicine*, **333**, 474–480.
- Park SC, Shimamura I, Fukunaga M, Mori K-I, Nakai T (2000). Isolation of bacteriophages specific to a fish pathogen, *Pseudomonas plecoglossicida*, as a candidate for disease control. *Applied and environmental microbiology*, **66**, 1416–1422.
- Payne RJ, Jansen VA (2000). Phage therapy: The peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, **68**, 225–230.
- Payne RJ, Jansen VA (2001). Understanding bacteriophage therapy as a density-dependent kinetic process. *Journal of Theoretical Biology*, **208**, 37–48.
- Pearson H (2002). From russia with gloves : Ex-Soviet Union viruses could fill antibiotic gap. *Nature News Service - Experimental Biology*.
- Personnic S, Duhamel S, Bettarel Y, Sime-Ngando T, Jacquet S (2006). Les virus planctoniques : un compartiment biologique clé des milieux aquatiques. *Courrier de l'environnement*, 19–34.
- Pherecydes Pharma (2013). Bio-nano technologies innovantes : les bactériophages contre les infections In: *Start-up Pherecydes Pharma* [en ligne]. [<http://fr.pherecydes-pharma.com/>] (Consultation le 26/11/13).
- Pirisi A (2000). Phage therapy-advantages over antibiotics? *The Lancet*, **356**, 1418.
- Plouffe JF, Breiman RF, Facklam RR, Baird I, Barnishan J, Porterfield-Baxa J, *et al.* (1996). Bacteremia with *Streptococcus pneumoniae* : implication for therapy and prevention. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, **275**, 194–198.
- Pollitzer R (1959). Cholera. *WHO, monograph series, n°43*, 1019.
- Projan SJ (2002). New (and not so new) antibacterial targets – from where and when will the novel drugs come? *Current opinion in pharmacology*, **2**, 513–522.
- Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans : results of a phase I safety trial. *Journal of wound care*, **18**, 237–243.
- Rivasi M (2013). Faire revenir la phagothérapie In: *Michèle Rivasi, Députée européenne Europe Ecologie* [en ligne]. [<http://www.michele-rivasi.eu/au-parlement/faire-revenir-la-phagothérapie-en-europe-une-necessite-pour-lutter-contre-lantibioresistance/>] (Consultation le 30/10/13).
- Rolain J-M, Francois P, Hernandez D, Bittar F, Richet H, Fournous G, *et al.* (2009). Genomic analysis of an emerging multiresistant *Staphylococcus aureus* strain rapidly spreading in cystic fibrosis patients revealed the presence of an antibiotic inducible bacteriophage. *Biology Direct*, **4**, 1-15.
- Rountree PM (1947). Staphylococcal bacteriophages. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **25**, 203–212.
- RTS (2013). La tactique de la tique - Bactéries résistantes : des virus au secours des malades In: *RTS - Magazine Santé 36,9°C* [en ligne]. [<http://www.rts.ch/video/emissions/36-9/5204339-la-tactique-de-la-tique-bacteries-resistantes-des-virus-au-secours-des-malades.html>] (Consultation le 20/11/13).
- Ruska H (1940). Die Sichtbarmachung der bakteriophagen lyse im übermikroskop. *Naturwissenschaften*, **28**, 45–46.
- Ruska H (1943). Versuch zu einer Ordnung der Virusarten. *Archives of Virology*, **2**, 480–498.

- Ryan EM, Alkawareek MY, Donnelly RF, Gilmore BF (2012). Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **65**, 395–398.
- Sanchez C (2011). Bacterial evolution : Phage resistance comes at a cost. *Nat Rev Mic*, **9**, 398–399.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74**, 5463–5467.
- Sayamov RM (1963). Treatment and prophylaxis of cholera with bacteriophage. *Bulletin of the World Health Organization*, **28**, 361–367.
- Schuch R, Nelson D, Fischetti VA (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, **418**, 884–889.
- Scott AE, Timms AR, Connerton PL, Carrillo CL, Radzum KA, Connerton IF (2007). Genome dynamics of *Campylobacter jejuni* in response to bacteriophage predation. *PLoS pathogens*, **3**, e119.
- Sénat (2013). Question sur la phagothérapie In: *Question orale sans débat n° 0350S publiée dans le JO Sénat du 21/02/2013 - page 543 ; Réponse du Ministère chargé des personnes âgées et de l'autonomie publiée dans le JO Sénat du 22/05/2013 - page 4294* [en ligne]. [<http://www.senat.fr/questions/base/2013/qSEQ13020350S.html>] (Consultation le 11/11/13).
- Shera G (1970). Phage treatment of severe burns. *British Medical Journal*, **1**, 568–569.
- Siringan P, Connerton PL, Payne RJ, Connerton IF (2011). Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Applied and environmental microbiology*, **77**, 3320–3326.
- Skurnik M, Strauch E (2006). Phage therapy : facts and fiction. *International journal of medical microbiology*, **296**, 5–14.
- Slopek S, Weber-Dabrowska B, Dabrowski M, Kucharewicz-Krukowska A (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, **35**, 569–583.
- Smith HW, Huggins MB (1982). Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage : its general superiority over antibiotics. *Journal of General Microbiology*, **128**, 307–318.
- Smith HW, Huggins MB (1983). Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *Journal of General Microbiology*, **129**, 2659–2675.
- Smith HW, Huggins MB, Shaw KM (1987). The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *Journal of general microbiology*, **133**, 1111–1126.
- Soni KA, Nannapaneni R, Hagens S (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage Listex P100. *Foodborne pathogens and disease*, **7**, 427–434.
- Soothill JS (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of medical microbiology*, **37**, 258–261.
- Souza V, Espinosa-Asuar L, Escalante AE, Eguiarte LE, Farmer J, Forney L, *et al.* (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 6565–6570.
- Srivastava AS, Kaido T, Carrier E (2004). Immunological factors that affect the in vivo fate of T7 phage in the mouse. *Journal of virological methods*, **115**, 99–104.
- Stirm S, Bessler W, Fehmel F, Freund-Mölbert E (1971). Bacteriophage particles with endoglycosidase activity. *Journal of virology*, **8**, 343.
- Stone R (2002). Stalin's forgotten cure. *Science*, **298**, 1-4.

- Stratégies (2013). Grand Prix : Les antibiotiques... ça marche ! In: *Stratégies.fr* [en ligne]. [http://www.strategies.fr/etudes-tendances/dossiers/r31320/r31323W/grand-prix-les-antibiotiques-ca-marche.html] (Consultation le 27/11/13).
- Straub ME, Applebaum M (1933). Studies on commercial bacteriophage products. *Journal of the American Medical Association*, **100**, 110–113.
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**, 649–659.
- The National WWII Museum (2013). Thanks to penicilline... he will come home! The challenge of mass production In: *The National World War II Museum* [en ligne]. [http://www.nationalww2museum.org/learn/education/for-teachers/lesson-plans/pdfs/thanks-to-penicillin-lesson.pdf] (Consultation le 20/11/13).
- Twort FW (1936). Further investigations on the nature of ultra-microscopic viruses and their cultivation. *Journal of Hygiene*, **36**, 204–235.
- Uchiyama J, Maeda Y, Takemura I, Chess-Williams R, Wakiguchi H, Matsuzaki S (2009). Blood kinetics of four intraperitoneally administered therapeutic candidate bacteriophages in healthy and neutropenic mice. *Microbiology and immunology*, **53**, 301–304.
- Université Ottawa (2013). Essais cliniques In: *L'université d'Ottawa - La Société, l'Individu, et la Médecine* [en ligne]. [http://www.med.uottawa.ca/sim/data/Clinical\_trials\_f.htm] (Consultation le 27/11/13).
- Van Helvoort T (1992). Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon. *Med Hist*, **36**, 243–270.
- Waldor MK, Mekalanos JJ (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, **272**, 1910–1914.
- Wall SK, Zhang J, Rostagno MH, Ebner PD (2010). Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Applied and environmental microbiology*, **76**, 48–53.
- Weber-Dabrowska B, Zimecki M, Mulczyk M (2000). Effective phage therapy is associated with normalization of cytokine production by blood cell cultures. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, **48**, 31–37.
- Weber-Dabrowska B, Zimecki M, Mulczyk M, Górski A (2002). Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **34**, 135–138.
- Weld RJ, Butts C, Heinemann JA (2004). Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *Journal of theoretical biology*, **227**, 1–11.
- WHO, FAO (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *WHO Expert consultation*, 1-34.
- Wiggins BA, Alexander M (1985). Minimum bacterial density for bacteriophage replication : implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Applied and environmental microbiology*, **49**, 19–23.
- Wright A, Hawkins CH, Änggard EE, Harper DR (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*, **34**, 349–357.
- Zarzavatdjian R (2013). Phagothérapie : des virus naturels pour tuer les infections In: *Paris Match* [en ligne]. [http://www.parismatch.com/Actu/Sante/Phagothérapie-des-virus-naturels-pour-tuer-les-infections-162147] (Consultation le 25/10/13).
- Zimecki M, Weber-Dabrowska B, Lusiak-Szelachowska M, Mulczyk M, Boratynski J, Pozniak G, *et al.* (2003). Bacteriophages provide regulatory signals in mitogen-induced murine splenocyte proliferation. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **8**, 699–712.

---

# ANNEXES

---



**Annexe 1 : Liste des principaux travaux de phagothérapie en médecine humaine réalisées dans les pays de l'ancienne Union soviétique entre 1974 et 2002 (Abedon *et al.*, 2011).**

Authors	Year	Ref	Target organisms	Disease	n	Route	Success	Details
Markoishvili et al.	2002	83	<i>E. coli</i> Proteus Pseudomonas Staphylococcus	Ulcers and wounds	96	Phage BioDerm	70%	Healing associated with reduction or elimination of target organisms in 22 patients with ulcers
Lazareva et al.	2001	84	Proteus Staphylococcus Streptococcus	Burn wounds	54	Tablets		Pyophage; Reduced septic complications, better temperature normalization, two-fold reduction of staphylococci and streptococci, and a 1.5-fold Proteus with phage use
Perepanova et al.	1995	85	<i>E. coli</i> Proteus Staphylococcus	Acute and chronic urogenital inflammation	46		92%, 84%	92% for marked clinical improvement; 84% for bacteriological clearance
Miliutina and Vorotyntseva	1993	86	Salmonella Shigella	Salmonellosis				Phages versus combined phages and antibiotics was examined with combination effective but not antibiotics alone
Bogovazova et al.	1992	87	<i>K. ozaenae</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>K. rhinoscleromatis</i>		109			Adapted phages used; treatment reportedly effective; see also references 88 and 89
Sakandelidze et al.	1991	90	Enterococcus <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> Proteus Staphylococcus Streptococcus	Infectious allergoses	936		86%	Phages only, n = 360, 86% success; antibiotics only, n = 404, 48% success; antibiotics plus phages, n = 576, 83% success
Kochetkova et al.	1989	91	Pseudomonas Staphylococcus	Post-surgical wounds	65		82%	Cancer patients; treatment was successful in 61% of antibiotic-only treatment
Anpilov and Prokudin	1984	92	Shigella	Dysentery (prophylaxis)				Double-blinded; ca. 10-fold lower incidence of dysentery in phage-treated group
Martynova et al.	1984	93	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i>	Prophylactic	27 (10)	Mouth rinse		2 times/day for 3-5 days in 27 patients; normalization of microflora in infected sites with IgA production stimulated
Meladze et al.	1982	94	Staphylococcus	Infections of the lung parenchyma and pleura	223		82%	Full recovery seen with phages versus 64% with antibiotics only (n = 117)
Tolkacheva et al.	1981	95	<i>E. coli</i> Proteus Dysentery		59			Immunosuppressed leukemia patients treated with improved results in combination with bifidobacteria
Ioseliani et al.	1980	95	<i>E. coli</i> Proteus Staphylococcus Streptococcus	Lung and pleural infections	45			Successful phage use in combination with antibiotics
Litvinova et al.	1978	97	<i>E. coli</i> Proteus	Antibiotic-associated dysbacteriosis	500		successful	Premature/low-birth-rate infants; phages used in combination with bifidobacteria
Zhukov-Verezhnikov et al.	1978	98	<i>E. coli</i> Proteus Staphylococcus Streptococcus	S.I.	60			Improved efficacy using phages selected against bacterial strains isolated from individual patients versus commercial phage preparations
Pipiia et al.	1976	99		Abscessing pneumonia		Parenteral		Multiple treatment approaches including use of phages
Sakandelidze et al.	1974	100	Proteus Staphylococcus Streptococcus		236	Subcutaneous or through surgical drainage	92%	Success = elimination of infections

## Annexe 2 : Liste des principaux rendez-vous à travers le monde concernant le sujet de la phagothérapie (Landes Bioscience, 2013).

Bacteriophage 2:3, 135–136; July/August/September 2012; © 2012 Landes Bioscience

MEETINGS

### Upcoming meetings

#### January 2013

##### **SFAM Winter Meeting**

January 9, 2013  
London, UK  
[www.sfam.org.uk/en/events/index.cfm/Winter\\_meeting](http://www.sfam.org.uk/en/events/index.cfm/Winter_meeting)

#### February 2013

##### **The Gut Microbiome: The Effector/Regulatory Immune Network**

February 10–15, 2013  
Taos, NM USA  
[www.keystonesymposia.org/index.cfm?e=web.Meeting.  
Program&meetingid=1231](http://www.keystonesymposia.org/index.cfm?e=web.Meeting.Program&meetingid=1231)

##### **Biodefense and Emerging Diseases Research Meeting**

February 25–27, 2013  
Washington, DC USA  
[www.asmbiodefense.org](http://www.asmbiodefense.org)

#### March 2013

##### **Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology (VAAM)**

March 10–13, 2013  
Bremen, Germany  
[www.conventus.de/vaam-kongress/?L=1](http://www.conventus.de/vaam-kongress/?L=1)

#### April 2013

##### **1st International Probiotics Prebiotics and Functional Food Congress**

April 11–13, 2013  
Antalya, Turkey  
[www.ppd2013.org/eng](http://www.ppd2013.org/eng)

##### **The 7th International Yakult Symposium/ The Intestinal Microbiota and Probiotics: Exploiting Their Influence on Health**

April 22–23, 2013  
London, UK  
[www.yakultsymposium.com](http://www.yakultsymposium.com)

##### **23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**

April 27–30, 2013  
Berlin, Germany  
[www.congrex.ch/eccmid2013.html](http://www.congrex.ch/eccmid2013.html)

##### **Positive Strand RNA Viruses**

April 28–May 3, 2013  
Boston, MA USA  
[www.keystonesymposia.org/index.cfm?e=web.  
Meeting.Program&meetingid=1230](http://www.keystonesymposia.org/index.cfm?e=web.Meeting.Program&meetingid=1230)

#### May 2013

##### **Viruses and Cells**

May 5–10, 2013  
Lucca, Italy  
[www.grc.org/programs.aspx?year=2013&program=viruses](http://www.grc.org/programs.aspx?year=2013&program=viruses)

##### **ASM 113th General Meeting**

May 18–21, 2013  
Denver, CO USA  
[www.gm.asm.org](http://www.gm.asm.org)

##### **Microbiome and Host Health**

May 12–14, 2013  
Lisbon, Portugal  
[https://vicinity.picsrv.net/3186/  
d32221faefee5e21be06cd416883cea0/2886](https://vicinity.picsrv.net/3186/d32221faefee5e21be06cd416883cea0/2886)

##### **Probiotics and their Applications**

May 31–June 1, 2013  
Hanoi, Vietnam  
<http://probioticsconference.com>

#### June 2013

##### **International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics IPC2013**

June 11–13, 2013  
Kosice, Slovakia  
[www.probiotic-conference.net/Conference](http://www.probiotic-conference.net/Conference)

##### **ISAPP 2013:**

##### **11th Meeting of the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, in collaboration with the New York Academy of Sciences and the Sackler Institute of Nutrition Sciences**

June 12–14, 2013  
New York, NY USA  
[www.nyas.org/Events/Detail.aspx?cid=c60ea8d5-44f0-  
4aaa-a8ff-3e5f008186f6](http://www.nyas.org/Events/Detail.aspx?cid=c60ea8d5-44f0-4aaa-a8ff-3e5f008186f6)

---

### June 2013 (continued)

#### **63rd Annual Conference of the Canadian Society of Microbiologists**

June 17–20, 2013  
Ottawa, Canada  
[www.csm-scm.org/english/wn\\_meetings\\_det.asp?id=44](http://www.csm-scm.org/english/wn_meetings_det.asp?id=44)

#### **CRISPR: Evolution, Mechanisms and Infection**

June 17–19, 2013  
St. Andrews, UK  
[www.biochemistry.org/Conferences/AllConferences/tabid/379/View/Conference/MeetingNo/SA148/Default.aspx](http://www.biochemistry.org/Conferences/AllConferences/tabid/379/View/Conference/MeetingNo/SA148/Default.aspx)

#### **Swiss Society for Microbiology Annual Congress**

June 26–27, 2013  
Interlaken, Switzerland  
[www.swissmicrobiology.ch/Framesets/fr\\_annual\\_congress.htm](http://www.swissmicrobiology.ch/Framesets/fr_annual_congress.htm)

### July 2013

#### **SFAM Summer Conference**

July 1–4, 2013  
Cardiff, UK  
[www.sfam.org.uk/en/events/index.cfm/summer\\_conference](http://www.sfam.org.uk/en/events/index.cfm/summer_conference)

#### **Applied and Environmental Microbiology**

July 7–12, 2013  
South Hadley, MA USA  
[www.grc.org/programs.aspx?year=2013&program=applied](http://www.grc.org/programs.aspx?year=2013&program=applied)

#### **ASM Adelaide 2013**

July 7–10, 2013  
Adelaide, Australia  
[www.theasm.org.au/meetings/asm-adelaide-2013/](http://www.theasm.org.au/meetings/asm-adelaide-2013/)

#### **5th Congress of European Microbiologists**

July 21–25, 2013  
Leipzig, Germany  
[www2.kenes.com/fems2013/pages/home.aspx](http://www2.kenes.com/fems2013/pages/home.aspx)

### August 2013

#### **Society for Industrial Microbiology and Biotechnology Annual Meeting**

August 11–15, 2013, San Diego, CA USA  
[www.simhq.org/annual](http://www.simhq.org/annual)

#### **20th Biennial Evergreen International Phage Meetings**

August 11–16, 2013  
Olympia, WA USA  
<http://blogs.evergreen.edu/phage/meetings/2013-2>

### September 2013

#### **Probiotics, Prebiotics and New Foods**

September 8–10, 2013  
Rome, Italy  
[www.probiotics-prebiotics-newfood.org/home.php](http://www.probiotics-prebiotics-newfood.org/home.php)

#### **ICAAC 2013**

September 10–13, 2012  
Denver, CO USA  
[www.icaac.org/index.php/scientific-program/meeting-resources/icaac-online](http://www.icaac.org/index.php/scientific-program/meeting-resources/icaac-online)

### October 2013

#### **New Approaches and Concepts in Microbiology**

October 14–16, 2013  
Heidelberg, Germany  
[www.embo-embl-symposia.org/symposia/2013/EES13-05](http://www.embo-embl-symposia.org/symposia/2013/EES13-05)

**Annexe 3 : Principales toxi-infections bactériennes (China *et al.*, 2002).**

Espèce	Pathologie	fréquence	danger	dose infectieuse (Log10)
<i>Salmonella choleraesuis</i>	gastro-entérite, diarrhée, crampes abdominales, fièvre, nausées, vomissements, céphalées septicémie avec envahissement des tissus (rare) fièvre entérique grave typhoïde (très rare)	+++	++/+++	1 à 7
<i>Clostridium perfringens</i>	Diarrhée, douleurs abdominales entérite nécrosante (rare)	+++	++	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vomissements et crampes abdominales violentes diarrhée et céphalée (parfois)	+++	+	>6
<i>Bacillus cereus</i>	diarrhée, crampes abdominales (type A) Vomissement (type B)	++	+	5 à 9 4 à 5
<i>Campylobacter jejuni</i>	gastro-entérite, diarrhée, douleurs abdominales, fièvre, céphalées envahissement des tissus, méningites (rare) syndrome pseudoappendiculaire (rare)	++	++	3
<i>Shigella spp.</i>	shigellose: douleurs abdominales, diarrhée dysenterie bacillaire: fortes fièvres, vomissements, douleurs abdominales vives, dysenterie.	++	++	1 à 2
<i>Escherichia coli</i>	diarrhées des touristes (ETEC) vomissements, crampes abdominales, dysenterie, HUS (EHEC) fièvres, vomissements, crampes et diarrhées (EIEC) Diarrhée, nausées, vomissements, crampes abdominales, céphalée et fièvre (EPEC)	++	++/+++	6 à 10 3
<i>Streptococcus spp.</i>	groupe A: maux de gorge, fièvre, rougeurs cutanées, diarrhée, vomissements. Groupe C: pharyngites groupe G: pharyngites	++	+	>8
<i>Vibrio vulnificus</i>	fièvre, baisse de la pression sanguine, problèmes hépatiques.	++	+++	4 à 6
<i>Listeria monocytogenes</i>	fatigue, fièvre modérée, Individus immunodéprimés: avortement, méningites, encéphalites.	++	+++	faible mais variable
<i>Yersinia enterocolitica</i>	fièvre, douleurs abdominales, diarrhées, syndrome pseudoappendiculaire	++	+	6
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra: diarrhée abondante, crampes abdominales, vomissements, déshydratation.	++	++	6 à 10
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	diarrhées liquides, douleurs abdominales, nausées, vomissements	++	++	5 à 9
<i>Clostridium botulinum</i>	botulisme: problèmes de vision, nausées, douleurs abdominales, constipation, asphyxie, paralysie généralisée.	+	+++	
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	Diarrhée, Dysenterie	+	+	6
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Diarrhée	+	+	6

## Annexe 4 : Principales entreprises élaborant (ou en cours d'élaboration)

des suspensions commercialisables à base de bactériophages (Housby et Mann, 2009).

Company	Primary location	Primary product area	Phage technology	Stage of development
<b>BigDNA</b> ( <a href="http://www.bigdna.com/">http://www.bigdna.com/</a> )	Edinburgh, UK	Bacteriophage DNA vaccination via phage encoded DNA delivered intravenously or orally	Bacteriophage DNA vaccines	R&D
<b>Blaze Venture Technologies</b> ( <a href="http://www.blaze-vt.com/">http://www.blaze-vt.com/</a> )	Hertfordshire, UK	Phage immobilisation technology, MRSA, licensing	Immobilisation onto solid supports	Licensing
<b>JSC Biochimpharm</b> ( <a href="http://www.biochimpharm.ge/">http://www.biochimpharm.ge/</a> )	Tbilisi, Republic of Georgia	Various phage lysates are mixed and used for intestinal problems, for example, Dysentery, salmonellosis, dyspepsia, colitis and enterocolitis and for bacterial infections.	Whole phage	Phage tablet or liquid production facility
<b>Biopharm L Limited</b> ( <a href="http://www.biopharm.ge/">http://www.biopharm.ge/</a> ) that owns Advanced Biophage Technologies ( <a href="http://advancedbiophagetechnologies.com/">http://advancedbiophagetechnologies.com/</a> )	Tbilisi, Republic of Georgia	Products include Pyobacteriophage and Intesti-bacteriophage that are mixtures of phage lysates for bacterial intestinal and infection control—sold to pharmacies as Over The Counter drugs.	Whole Phage, patented and licensed.	Liquid and tablet phage products
<b>BioControl</b> ( <a href="http://www.biocontrol-ld.com/">http://www.biocontrol-ld.com/</a> )	Southampton, UK	<i>Pseudomonas</i> infections of the ear	Whole Phage	Phase II trial completed
<b>Biophage Pharma Inc.</b> ( <a href="http://www.biophagepharma.net/">http://www.biophagepharma.net/</a> )	Montreal, Canada	Environmental therapies and diagnostics, phage products geared towards antibacterial resistance problems and as a weapon against bioterrorism	Whole phage	Research and development
<b>EBI Food Safety</b> ( <a href="http://www.ebifoodsafety.com/">http://www.ebifoodsafety.com/</a> )	Wageningen, Netherlands	Food Safety. A cocktail of phage against <i>Listeria</i>	Whole Phage	LISTEX P100™, product available
<b>Gangagen</b> ( <a href="http://www.gangagen.com/">http://www.gangagen.com/</a> )	Bangalore, India and Palo Alto, California, USA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Whole Phage	Pre-clinical
<b>Innophage</b> ( <a href="http://www.innophage.com/">http://www.innophage.com/</a> )	Porto, Portugal	Environment, Cosmetic and Medical bacteria infections	Unknown	Unknown
<b>Intralytix</b> ( <a href="http://www.intralytix.com/">http://www.intralytix.com/</a> )	Baltimore, USA	Food safety, <i>Listeria</i>	Whole Phage	FDA and EMEA approval on ready to eat meats and cheeses
<b>Neurophage Pharmaceuticals</b> ( <a href="http://www.neurophage.com/">http://www.neurophage.com/</a> )	Cambridge, Massachusetts USA	Brain changes, for example Alzheimers	Unknown	Start up company
<b>Novolytics</b> ( <a href="http://www.novolytics.co.uk/">http://www.novolytics.co.uk/</a> )	Coventry, UK	Prevention and treatment of MRSA infection	Whole Phage	Pre-clinical
<b>Omnilytics</b> ( <a href="http://www.omnilytics.com/">http://www.omnilytics.com/</a> )	Salt Lake City, Utah, USA	AgriPhage is a natural, safe, effective treatment that prevents and controls harmful bacteria on tomato and pepper plants	Unknown	Product available
<b>Phage-Biotech</b> ( <a href="http://www.phage-biotech.com/">http://www.phage-biotech.com/</a> )	Rehovot, Israel	Anti- <i>Pseudomonas</i> infectives	Whole Phage	R&D
<b>Phico Therapeutics</b> ( <a href="http://www.phicotherapeutics.co.uk/">http://www.phicotherapeutics.co.uk/</a> )	Cambridge, UK	Anti MRSA products	Genetically Modified Organism used as a delivery vehicle	Pre-clinical
<b>Phage International</b> ( <a href="http://www.phageinternational.com/">http://www.phageinternational.com/</a> )	San Ramon, California, USA; Trinidad, West Indies and Tbilisi, Republic of Georgia	Phage treatment centre	Whole Phage	Distributor
<b>Special Phage Holdings Pty Ltd</b> ( <a href="http://www.specialphageservices.com.au/">http://www.specialphageservices.com.au/</a> )	Brookvale, NSW, Australia	R&D	Whole phage	Prototype products, some entering clinical trials
<b>Targanta Therapeutics</b> ( <a href="http://www.targanta.com/">http://www.targanta.com/</a> )	Cambridge, Massachusetts, USA	Antibiotics	Phage peptides	R&D
<b>Viridax</b> ( <a href="http://www.viridax.com/">http://www.viridax.com/</a> )	Boca Raton, Florida, USA	<i>Staphylococcal aureus</i> —respiratory, systemic, topical, wound care	Whole Phage	Pre-clinical



# **LA PHAGOTHÉRAPIE : HISTORIQUE ET POTENTIELLE UTILISATION CONTRE LES INFECTIONS À BACTÉRIES MULTIRÉSISTANTES**

**Magali Berger Savin**

## **Résumé**

Les infections dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques s'avèrent, partout dans le monde, de plus en plus nombreuses actuellement, laissant en échec thérapeutique de nombreux patients. Peu d'antibiotiques nouveaux sont élaborés pour faire face à cette crise majeure. Face à la menace grandissante d'un futur sans antibactériens efficaces, les scientifiques recherchent de nouvelles pistes. L'une de ces pistes est nommée « phagothérapie ». La phagothérapie est la mise en pratique médicale de virus de bactéries appelés bactériophages, ou plus communément phages, contre les infections bactériennes. Ces bactériophages ont la capacité de se multiplier au sein de leur cellule hôte bactérienne et de la détruire en libérant de nouveaux virions. Il s'agit d'une thérapie ancienne, découverte au début du XX<sup>ème</sup> siècle et en grande partie oubliée lors de l'avènement des antibiotiques, hormis par les pays de l'ancien bloc communiste. Cette thérapie refait surface aujourd'hui et pourrait être une candidate intéressante dans la lutte contre les bactéries multirésistantes. Mon travail a consisté à retracer l'histoire de cette phagothérapie depuis son émergence il y a un siècle, puis à expliquer son fonctionnement, et enfin à analyser sa place de traitement antibactérien potentiel dans la médecine moderne humaine et vétérinaire. Cette dernière partie m'a permis de cerner les avantages et les inconvénients de la phagothérapie, ainsi que les points nécessitant encore un travail de recherche et les difficultés rencontrées pour sa réhabilitation dans le domaine médical.

## **Mots clés**

INFECTION BACTÉRIENNE / ANTIBIORÉSISTANCE / BACTÉRIE  
MULTIRÉSISTANTE / TRAITEMENT ANTIBACTÉRIEN / PHAGOTHÉRAPIE /  
BACTÉRIOPHAGE / PHAGE / ANTIBACTÉRIEN / BACTÉRIOLYTIQUE / HISTOIRE  
DE LA MÉDECINE

## **Jury**

Président : Pr.

Directeur : M. Marc ELOIT

Assesseur : M. Pascal ARNÉ

# **PHAGE THERAPY : HISTORY AND POTENTIAL USE AGAINST MULTI-RESISTANT BACTERIA INFECTIONS**

**Magali Berger Savin**

## **Summary**

Currently all around the world, antibiotic-resistant bacterial infections are increasing and are more and more associated with therapeutic failures. Few new antibiotics have been developed to cope with this major crisis. Faced with the growing threat of future without effective antibacterial drugs, scientists are looking for alternatives. One of these approaches is called "phage therapy". Phage therapy is the medical use of bacterial viruses called bacteriophages, or more informally phages, against bacterial infections. These phages have the ability to multiply within their bacterial host cells and to destroy them while releasing new viruses. It is an old therapy, discovered at the beginning of the XXth century and largely forgotten during the advent of antibiotics, except by the countries of the former Communist Bloc. This therapy resurfaces today and could be an interesting candidate for the fight against multi-resistant bacteria. My project aimed at recounting the history of phage therapy since its emergence one century ago, then at explaining how it works and finally at analyzing its place as a potential antibacterial treatment in the human and veterinary modern medicine. In this last part, I have defined the pros and cons of phage therapy, as well as the points still requiring more research together with the difficulties encountered for its restoration in the medical domain.

## **Keywords**

BACTERIAL INFECTION / ANTIBIOTIC RESISTANCE / MULTIDRUG RESISTANTE BACTERIA / ANTIBACTERIAL TREATMENT / PHAGE THERAPY / BACTERIOPHAGE / PHAGE / ANTIBACTERIAL DRUG / BACTERIOLYTIC DRUG / HISTORY OF MEDICINE

## **Jury**

President : Pr.

Director : Mr Marc ELOIT

Assessor : Mr Pascal ARNÉ