



Université de Strasbourg  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**

N° d'ordre: \_\_\_\_\_

**MÉMOIRE DE DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

—

**BACTERIOPHAGES : LA PLACE DE LA  
PHAGOTHERAPIE DANS LA LUTTE CONTRE  
L'ANTIBIORESISTANCE.**

Présenté par

**Imane ACHOUR**

Soutenu le 15/02/2024 devant le jury constitué de

GEORGEL Philippe, Président du jury et Directeur de thèse

BOUTANT Emmanuel, Membre du jury

THIPHINE Muriel, Membre du jury

LETRILLARD Thomas, Membre du jury

Approuvé par le Doyen et  
par le Président de l'Université de Strasbourg



<b>Doyen</b>	Esther KELLENBERGER
<b>Directeurs adjoints</b>	Julien CODET Blatrice HEURTAULT Emilie DICK
<b>Directeur adjoint étudiant</b>	Luis FERRERA-MOURIAUX

### LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT

#### Professeurs :

Philippe	BOLCHER	Physiologie
Nathalie	BOULANGER	Parasitologie
Line	BOUREL	Chimie thérapeutique
Pascal	DIDIER	Biophysique
Saïd	ENNAÏAR	Chimie analytique
Valérie	GEOFFROY	Microbiologie
Philippe	GEORGE	Bactériologie, Virologie
Jean-Pierre	SIES	Pharmacologie moléculaire
Blatrice	HEURTAULT	Pharmacie galénique
Esther	KELLENBERGER	Bio-informatique
Maxime	LEHMANN	Biologie cellulaire
Erik	MANCHON	Chimie analytique
François	MESERLIN	Droit et économie pharm.
Yves	MELY	Physique et Biophysique
Jean-Yves	PARIST	Droit Economie pharm.
Françoise	PONS	Toxicologie
Valérie	SCHN-KERTH	Pharmacologie
Florence	TOTI	Pharmacologie
Thierry	VANDAMME	Biopénitque
Catherine	VONTHRON	Pharmacognosie
Pascal	WEHLE	Pharmacie galénique

#### Professeurs-praticiens hospitaliers

Julien	CODET	Biostatistiques - science des données
Jean-Marc	LESINGER	Biochimie
Bruno	MICHEL	Pharm. clinique santé publique
Pauline	SOLLAS-SPRADEL	Immunologie
Geneviève	USCARD-SÉGUER	Pharmacocinétique

#### Enseignants contractuels

Alexandra	CHAMBERT	Pharmacie d'officine
Mathieu	FOHRET	Pharmacie d'officine
Philippe	GALAS	Droit et économie pharm.
Philippe	NAMDE	Ingénierie pharmaceutique
Caroline	WILLER - WEHLE	Pharmacie d'officine

#### Maîtres de Conférences :

Nicolas	ANTON	Pharmacie biogénérique
Faresha	BATOOL	Biochimie
Martina	BERGENTZLE	Chimie analytique
Elisa	BOMBARDI	Biophysique
Auréli	BOURGEROLX	Pharmacochimie
Emmanuel	BOUTANT	Virologie et Microbiologie
Véronique	BRUBAN	Physiologie et physiopath.
Anne	CAISSET	Toxicologie
Thierry	CHATAIGNEAU	Pharmacologie
Manuela	CHER	Pharmacie biogénérique
Gillaume	CONZATTI	Pharmacie galénique
Marcella	DE-GIORGI	Pharmacochimie
Serge	DUMONT	Biologie cellulaire
Divale	HAAN-ARCHIDOFF	Plantes médicinales
Céline	JACQUEMARD	Chimie pharmaceutique
Julie	KARPENKO	Pharmacochimie
Sonia	LURDEL	Chimie analytique
Caroline	MACHUNG	Chimie physique
Rachael	MATZ-WESTPHAL	Pharmacologie
Cherifa	MEHALE	Chimie
Nathalie	NIEDERHOFER	Pharmacologie
Sergie	ORTIZ AGUIRRE	Pharmacognosie
Sylvie	PERRIET	Parasitologie
Romain	PERTSCH	Chimie en flux
Frédéric	PRZYBYLA	Biostatistiques
Patrice	RASSAM	Microbiologie
Stéphane	REAL	Biochimie
Andreas	RESCH	Biophysique
Ludvine	REFFAULT-VALOS	Analyse du médicament
Carole	ROZAN	Toxicologie
Emilie	DICK	Pharmacologie
Yamibe	SQUARDO	Pharmacognosie
Maria-Victoria	SPAREDDA	Chimie thérapeutique
Jérôme	TEHRANI	Physiopathologie
Nassera	TOUNI	Chimie physique
Auréli	URBAN	Pharmacognosie
Bruno	VAN OVERLOOP	Physiologie
Marie	ZENOU	Chimie génomique

#### Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers

Julie	BRUNET	Parasitologie
Nafy	ETIENNE-SELLOUM	Pharmacologie - pharm. clinique

#### Assistant hospitalier universitaire

Danielle	REITA	Biochimie
----------	-------	-----------

# SERMENT DE GALIEN

## JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,  
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens  
et de mes condisciples :

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

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

De ne dévoiler à personne les secrets  
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu  
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,  
que je sois moi-même honoré  
et estimé de mes confrères  
et de mes patients.

# Table des matières

Liste des abréviations	7
Liste des figures et tableaux	9
<b>1. Introduction</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Définitions et origines des termes</b>	<b>12</b>
1.1.1. Bactérie	12
1.1.2. Bactériophage	12
1.1.3. Infection	12
<b>1.2 Histoire de l'antibiothérapie</b>	<b>13</b>
1.2.1. L'infection à l'ère pré-antibiotiques	13
1.2.2. Émergence de l'antibiothérapie	14
1.2.3. Marché des antibiotiques aujourd'hui	15
<b>1.3 Contexte de l'antibiorésistance</b>	<b>17</b>
1.3.1. Définition	17
1.3.2. L'antibiorésistance en chiffre	17
1.3.3. Problématiques liées à l'antibiorésistance	18
<b>1.4 Présentation de la phagothérapie</b>	<b>19</b>
1.4.1. Découverte des virus et des bactériophages	19
1.4.2. Histoire des phages	21
1.4.3. Domaines d'application	21
1.4.3.1. En médecine humaine	21
1.4.3.2. En médecine vétérinaire	22
1.4.3.3. Dans l'industrie agro-alimentaire	22
<b>1.5 Objectifs de la thèse</b>	<b>23</b>
<b>2. Infection bactérienne et phénomène de résistances aux antibiotiques</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Bactéries et infections</b>	<b>25</b>
2.1.1. Structure	25
2.1.2. Virulence bactérienne	27
<b>2.2. Antibiotiques et antibiothérapies</b>	<b>28</b>
2.2.1. Principales classes et familles d'antibiotiques	28
2.2.1.1. Les bêtalactamines	28
2.2.1.2 Les aminosides	28

2.2.1.3. Les macrolides	28
2.2.1.4. Les cyclines	29
2.2.1.5. Les quinolones et fluoroquinolones	29
2.2.2. Résistances aux antibiotiques	29
2.2.2.1. Résistance acquise et résistance naturelle	29
2.2.2.2. Mécanismes de résistances	30
2.2.2.2.1. Imperméabilité	30
2.2.2.2.2. Efflux	30
2.2.2.2.3. Inactivation de l'antibiotique	30
2.2.2.2.4. Perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible	31
<b>2.3. Quelles solutions aujourd'hui contre l'antibiorésistance ?</b>	<b>31</b>
2.3.1 Mesures mises en place en France	31
2.3.2. Alternatives thérapeutiques	32
<b>3. Bactériophages et phagothérapie</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Qu'est qu'un bactériophage ?</b>	<b>35</b>
3.1.1. Morphologie et classification	35
3.1.2. Reproduction et propagation	37
3.1.3. Cycles phagiques	38
3.1.3.1. Cycle lytique	39
3.1.3.2. Cycle lysogénique	39
<b>3.2. Interactions bactériophages, bactéries et hôte</b>	<b>39</b>
3.2.1. Importance de la réponse immunitaire de l'hôte	39
3.2.2. Systèmes de défenses des bactéries contre les phages et contournement par les phages de ces systèmes	43
3.2.2.1. Adsorption des phages	43
3.2.2.2. Bloquer l'entrée de l'ADN phagique	44
3.2.2.3. Restriction/ modification de l'ADN du phage	45
3.2.2.4. Système CRISPR - Cas	45
3.2.2.5. Interruption du cycle infectieux	46
3.2.2.6. Interférence avec l'assemblage viral.	47
3.2.2.7. Le système BREX	47
<b>3.3 La phagothérapie en pratique</b>	<b>47</b>
3.3.1. Aspects réglementaires	47
3.3.2. Préparation magistrale d'une suspension de bactériophage	48

3.3.3. Pharmacologie appliquée aux bactériophages	50
3.3.3.1. Pharmacocinétique	50
3.3.3.2. Absorption	50
3.3.3.3. Distribution	51
3.3.3.4. Métabolisation	52
3.3.3.5. L'élimination	52
3.3.3.4. Pharmacodynamie	53
3.3.3.4.1. Efficacité des bactériophages	53
3.3.3.4.2. Sécurité	54
<b>4. Utilisation actuelle des bactériophages et perspectives en clinique</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Recherches et études cliniques</b>	<b>56</b>
4.1.1. Essai PhagoBurn pour les grands brûlés [81]	56
4.1.1.1. Présentation et objectifs de l'étude	56
4.1.1.2. Méthodologie	56
4.1.1.3. Présentation du cocktail de phages	59
4.1.1.4. Résultats obtenus	59
4.1.1.5. Problèmes soulevés par cette étude	62
4.1.1.7. Conclusion	63
4.1.2. Procédure PhagoDAIR pour le traitement des infections ostéoarticulaires [83]	64
4.1.2.1. Présentation de la procédure PhagoDAIR	64
4.1.2.2. Méthodologie	65
4.1.2.3. Présentation du cocktail de phages	66
4.1.2.4. Résultats du phagogramme	66
4.1.2.5. Présentations des patients	68
4.1.2.6. Résultats obtenus	68
4.1.2.7. Conclusion	68
<b>4.2. Antibiothérapie vs phagothérapie</b>	<b>69</b>
<b>4.3. Discussion</b>	<b>71</b>
<b>5. Conclusion</b>	<b>74</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>75</b>

## Liste des abréviations

**ABI** Abortive Infection Systems

**AMM** Autorisation de Mise sur le Marché

**ANMV** Agence Nationale de Médicament Vétérinaire

**ANSM** Agence Nationale de Sécurité du Médicament

**ARN** Acide Ribonucléique

**BMR** Bactéries Multi-Résistantes

**BPF** Bonnes Pratiques de Fabrication

**BREX** Bactériophage Exclusion

**CNRP** Centre National de Référence des Pneumocoques

**CRISPR** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées

**CRISPR/Cas** Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated (Système associé aux Courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées)

**DAIR** Debridement, Antibiotics and Implant Retention – Débridements, Antibiotiques et Conservation de l'Implant

*E. Coli Escherichia Coli*

**EOP** Efficiency Of Plating (Efficacité de Plaquage)

**EPS** Exopolysaccharide

**HMC** Hydroxyméthylcytosines

**ICTV** International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité International de Taxonomie des Virus)

**IL2rg** Interleukin 2 Receptor Gamma (Récepteur Gamma de l'Interleukine 2)

**IM** Intra Musculaire

**IPA** Infection de la Prothèse Articulaire

**IV** Intra Veineuse

**LOD** Limit Of Detection (Limite de Détection)

**LPS** Lipopolysaccharide

**MDS** Modification Dependant Systems

**MOI** Multiplicity Of Infection (Multiplicité de l'Infection)

**MyD88** Myeloid Differentiation primary response 88

**OGM** Organisme Génétiquement Modifié

**OMEDIT** Observatoire du Médicament, des Dispositifs Médicaux et de l'Innovation Thérapeutique

**ORL** Oto-Rhino-Laryngologie

**PCV** Vaccin anti-pneumococcique

**PLP** Protéines liant la Pénicilline

**PSDP** Pneumocoques de Sensibilité Diminuée à la Pénicilline

**Rag2** Recombination Activating Gene 2

*S. Aureus Staphylococcus Aureus*

**SIE** Systèmes d'Exclusion de la Surinfection

**SOFA** Sequential Organ Failure Assessment (Évaluation séquentielle de la défaillance d'organe)

**TLR** Toll-Like Receptor

**UFP** Unités Formatrices de Plaques

## Liste des figures et tableaux

- Figure 1** - Évolution du nombre d'antibiotiques commercialisés en France
- Figure 2** - Nombre de décès dans le monde attribuables et associés à la résistance bactérienne aux antimicrobiens, par agent pathogène, 2019
- Figure 3** - L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera, Annales de l'Institut Pasteur 1896; 10: 511–523
- Figure 4** - Illustration d'une bactérie
- Figure 5** - Principaux mécanismes de la résistance bactérienne
- Figure 6** - *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France d'après les données du CNRP. (1984-1997 : P. Geslin ; 2001-2019 : CNRP-ORP, E. Varon, L. Gutmann)
- Figure 7** - Représentation schématique des différentes familles de phages. Tirée de (Ofir et al 2018)
- Figure 8** - Morphologie des bactériophages et virus d'archées
- Figure 9** - Le bactériophage T4
- Figure 10** - les 2 types de bactériophages (lytiques et tempérés) et leur cycle (lytique et lysogénique)
- Figure 11** - Courbes de survie illustrant l'efficacité d'une phagothérapie dans différents contextes immunitaires
- Figure 12** - La phagothérapie est inefficace chez l'hôte présentant une déficience dans l'activation de l'immunité innée
- Figure 13** - Résultats de la simulation de l'efficacité d'une phagothérapie en fonction de la quantité de neutrophiles obtenus par modélisation in silico
- Figure 14** - Stratégies utilisées par les bactéries pour bloquer l'adsorption des phages
- Figure 15** - Mode d'action du système CRISPR-Cas9
- Figure 16** - Formation d'un biofilm
- Figure 17** - Technique d'ensemencement des 4 quadrants
- Figure 18** - Profil de l'essai
- Figure 19** - Temps nécessaire pour observer une réduction de la charge bactérienne pour toutes les zones
- Figure 20** - Effets indésirables observés chez la population saine
- Figure 21** - Étapes de la procédure DAIR
- Figure 22** - Phagogrammes réalisés à l'aide de l'essai cinétique (A–D) et de l'essai de plaque de spot (E)
- Figure 23** - Détails sur les antécédents d'infection de la prothèse du genou des trois patients traités par la procédure PhagoDAIR
- Tableau 1** - Tableau comparatif de l'antibiothérapie et de la phagothérapie

# **Partie 1**

# **INTRODUCTION**

## 1. Introduction

La découverte fortuite de la pénicilline en 1928 a permis de sauver des millions de vies à une époque où les infections bactériennes étaient l'une des principales causes de décès. Dès lors, il semblait possible d'éradiquer la mortalité par infection bactérienne. Or, ce miracle de la médecine est aujourd'hui limité par l'apparition de plus en plus de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, même si ceux-ci restent indispensables et continuent de sauver des vies.

*The Lancet* publiait en 2022 un article où il estimait à 1,3 millions, le nombre de décès au niveau mondial attribuable à l'antibiorésistance. Ce phénomène de résistance est donc devenu un enjeu de santé publique mondiale. Depuis plus de 20 ans, plusieurs mesures sont prises en France pour tenter d'éradiquer ce problème, desquelles découlent des avancées notables comme la réduction des prescriptions d'antibiotiques. Malheureusement, ces méthodes ne suffisent pas et il est essentiel aujourd'hui d'intensifier ces efforts. En janvier 2020, le gouvernement a notamment débloqué un fond de 40 millions d'euros d'investissement dans le but de promouvoir de nouvelles alternatives thérapeutiques à l'instar de la phagothérapie [2].

Cette thérapie, bien que présentée aujourd'hui comme une solution d'avenir, a pourtant été découverte bien avant la pénicilline. L'histoire remonte à 1917, lorsque Felix d'Hérelle utilise pour la première fois ce qu'il appellera un bactériophage dans un but thérapeutique. Largement utilisé au début du 20<sup>ème</sup> siècle, ce traitement sera ensuite progressivement oublié en raison de la découverte de la pénicilline qui s'avère alors être très efficace et plus simple d'utilisation.

Cette thèse vise à présenter les connaissances actuelles en matière d'antibiorésistance et de phagothérapie ainsi que la place éventuelle de cette approche dans la médecine de demain. Pour cela, je reviendrai d'abord sur l'histoire de la prise en charge des infections bactériennes puis j'aborderai les caractéristiques qui font des bactériophages de potentielles alternatives dans le traitement des infections d'origine bactérienne. Je m'appuierai également sur des études scientifiques récentes pour tenter de déterminer l'intérêt de l'utilisation de la phagothérapie dans le futur.

## 1.1 Définitions et origines des termes

### 1.1.1. Bactérie

La découverte des bactéries a été permise en 1668 par Antoni Van Leeuwenhoek un marchand de textile anglais faisant partie des pères fondateurs de la microscopie. Deux siècles plus tard, Pasteur découvre que ce qui était alors appelés des « animalcules » sont à l'origine de maladies et le médecin allemand Robert Koch découvrira en 1882 les premières bactéries pathogènes responsable de la tuberculose. La forme en bacille ou « bâton » de cette première bactérie est à l'origine même de ce mot, qui tire son étymologie du Grec *baktêrion* signifiant « bâtonnet » [3].

Aujourd'hui, une bactérie est définie comme un microorganisme vivant, procaryote et unicellulaire microscopique. Les bactéries sont ubiquitaires, on les trouve presque partout sur Terre et elles sont vitales dans notre écosystème : notre corps contient davantage de cellules bactériennes que de cellules humaines. Seulement une minorité de bactéries sont pathogènes pour l'homme : le corps humain est colonisé par de nombreuses bactéries indispensables à son bon fonctionnement [4] [5].

### 1.1.2. Bactériophage

Les bactériophages, du grec *bakteria* signifiant « bâton » et *phagein*, « manger », sont littéralement des « mangeurs de bactéries ». Ce sont des organismes parasites obligatoires qui se multiplient aux dépens d'une cellule hôte [6]. Ces virus bactériens sont ubiquitaires et particulièrement abondants dans les milieux où les bactéries pullulent à l'image des excréments, des sols ou des eaux d'égout, mais aussi dans des milieux plus hostiles comme le désert. Ils représentent une part importante de la biomasse avec un total de leur population estimé entre  $10^{30}$  et  $10^{32}$  phages dans la planète, soit 10 à 100 fois plus que le nombre de bactéries [7].

Le principe de la phagothérapie, ou thérapie par les phages, repose sur la capacité de ces bactériophages à détruire les bactéries [8].

### 1.1.3. Infection

Du latin *infectio* signifiant « action de teindre », une infection correspond à la pénétration et la prolifération dans un organisme d'un ou plusieurs agents pathogènes invisibles à l'œil nu (bactérie, virus, parasites, champignons), susceptibles d'être à l'origine de manifestations cliniques [9]. Ces agents

infectieux peuvent envahir différentes parties de l'organisme, et notamment les voies respiratoires, la peau, le système digestif, la circulation sanguine, etc. Les symptômes en découlant incluent des signes généraux comme de la fièvre ou de la fatigue et des signes spécifiques tels que des troubles respiratoires ou des maux de tête.

Une infection peut se transmettre par différents procédés :

- *Par contact* : soit par un contact physique, soit par l'intermédiaire d'un objet.

On distingue :

- Le contact direct correspondant à un contact physique sans intermédiaire, par exemple un contact peau à peau ;
- Et le contact indirect lorsque la contamination se fait par l'intermédiaire d'un objet contaminé par une tierce personne ;
- *Par un véhicule commun* : une source contaminée comme une pataugeoire transmet l'infection à plusieurs personnes ;
- *Par gouttelettes ou par voie respiratoire* : les gouttelettes sont transmises sur une distance de moins de 2 mètres lorsqu'une personne infectée tousse éternue, parle ou respire ;
- *Par voie aérienne* : ce sont alors de plus petites particules qui restent en suspension dans l'air et qui se déplacent donc sur de plus longues distances.
- *Par un vecteur* comme les insectes [10].

## **1.2 Histoire de l'antibiothérapie**

### **1.2.1. L'infection à l'ère pré-antibiotiques**

Dans les années 1800, de nombreux scientifiques, à l'instar de Pasteur ou Vuillemin ont constaté que certains micro-organismes étaient capables de combattre des maladies d'origine microbienne. Toutefois, c'est seulement au début des années 1900, avec la première guerre mondiale que les recherches s'accélérent et que la compréhension et le développement des traitements anti-infectieux s'intensifient.

Au 19<sup>ème</sup> siècle, les nombreux conflits mondiaux ont connu plus de morts par infections dues aux épidémies que de décès liés aux combats eux-mêmes. Par exemple, il apparaît que le nombre de décès en France suite à la guerre de Crimée (1853-1856) est d'environ 20 000 morts liés aux combats et de presque 50 000 morts suite à une infection [11].

Par la suite, les chercheurs ont donc tenté de tirer des enseignements de l'histoire et les recherches sur les infections se sont accélérées.

Prenons l'exemple de la fièvre typhoïde, une infection potentiellement mortelle causée par la bactérie *Salmonella typhi* [12]. La première guerre mondiale a commencé par une grande épidémie de fièvre typhoïde. La propagation rapide de cette maladie était due aux sources d'eau contaminées, aux contaminations secondaires liées au péril fécal mais aussi au portage sain qui rendait inutile l'isolement des soldats malades (seule technique alors utilisée pour éradiquer la maladie). Au total, cette guerre comptera 150 000 cas de fièvre typhoïde avec presque 100 % de décès au cours des 14 premiers mois.

Face à cette épidémie au début de la guerre, le microbiologiste et épidémiologiste français Hyacinthe Vincent fut missionné pour comprendre la virulence de cette maladie et mettre en place des actions dans le but de l'éradiquer. Il préconise alors des mesures hygiénistes et l'utilisation d'un vaccin anti typhique.

Ce vaccin avait été mis au point bien avant, en 1888, par André Chantemesse qui avait montré, avec son élève Fernand Vidal, que l'on pouvait mettre au point une immunité contre la typhoïde grâce à l'injection de doses élevées d'une culture de bacilles typhiques tués par la chaleur.

Dans ce contexte épidémique, la vaccination anti typhique est ainsi devenue obligatoire pour les soldats. Cette vaccination est un succès : durant la fin de l'année 1914, 5 479 soldats sont morts de la maladie contre seulement 1 678 durant toute l'année 1917 [13] [14].

### **1.2.2. Émergence de l'antibiothérapie**

Au 17<sup>ème</sup> siècle, John Parkington, un apothicaire anglais, décrit dans son livre *Thatrum Botanicum*, les effets curatifs des moisissures dans le traitement des infections. Il faudra ensuite attendre 200 ans pour découvrir de nouvelles avancées sur les infections bactériennes. Theodore Billroth, un chirurgien germano autrichien, a réalisé, dans les années 1800, des expériences sur des cultures bactériennes et des moisissures pour mesurer leurs effets sur les plaies infectées. Il découvre alors que, dans certains cas, lorsque *Penicillium* se développe dans une culture, les bactéries ne se développent pas mais il n'a cependant pas su en tirer les bonnes conclusions. Puis, en 1875, le médecin anglais John Tyndall, décrit des expériences avec des tubes de bouillons exposés à l'air afin d'étudier la contamination par des bactéries. Il confirme qu'en présence de *Penicillium*, on ne pouvait pas observer de croissance

bactérienne. A cette époque, la pathogénicité des bactéries n'étant pas prouvée, cette découverte n'a eu que peu d'écho.

Plus tard, Joseph Lister, un chirurgien anglais, développe la chirurgie antiseptique en utilisant des antiseptiques comme le phénol pour tuer les bactéries présentes sur le matériel médical et sur les plaies. C'est aussi le premier à avoir mis en culture une moisissure, *Penicillium glaucum*, avec des bactéries et a observé que celles-ci ne se développaient pas. Cependant, ces résultats n'ont pas été publiés et il n'a pas été en mesure d'isoler la substance active.

Plusieurs autres chercheurs et médecins ont aussi contribué à l'évolution des connaissances en matière de thérapie antibactérienne sans pour autant parvenir à une application de leurs découvertes [15].

C'est seulement en 1928 avec la découverte « officielle » et fortuite de la pénicilline que l'on entre enfin dans une ère de l'antibiothérapie. Cette découverte a été permise par Alexander Fleming, un médecin britannique, qui observe une inhibition de la croissance bactérienne sur les boîtes de Pétri dans lesquels il avait cultivé des staphylocoques contaminés par une moisissure verte, le *Penicillium*. Il publie en 1929 sa découverte et émet l'hypothèse que ce champignon est capable de synthétiser ce qu'il appelle la pénicilline, une substance aux propriétés antibactériennes. Il découvre que la pénicilline, dérivé du champignon *penicillium notatum*, est capable de désactiver la paroi de la cellule bactérienne, ce qui empêche la bactérie de se propager. Néanmoins, il ne parvient pas à extraire et à purifier cette substance pour en faire un médicament. Cette découverte sera ainsi sans suite pendant 10 ans, jusqu'en 1938 où une équipe de chercheurs dirigés par deux scientifiques Howard Florey et Ernst Boris Chain parviennent à reproduire et à stabiliser la pénicilline [15].

La pénicilline sera ensuite largement utilisée au cours de la seconde guerre mondiale pour traiter les soldats blessés. Au cours des années qui ont suivi, d'autres antimicrobiens ont été découverts. Toutes ces découvertes ont permis une baisse drastique de la mortalité ainsi que la morbidité liée aux infections bactériennes dans les pays développés [16] [17].

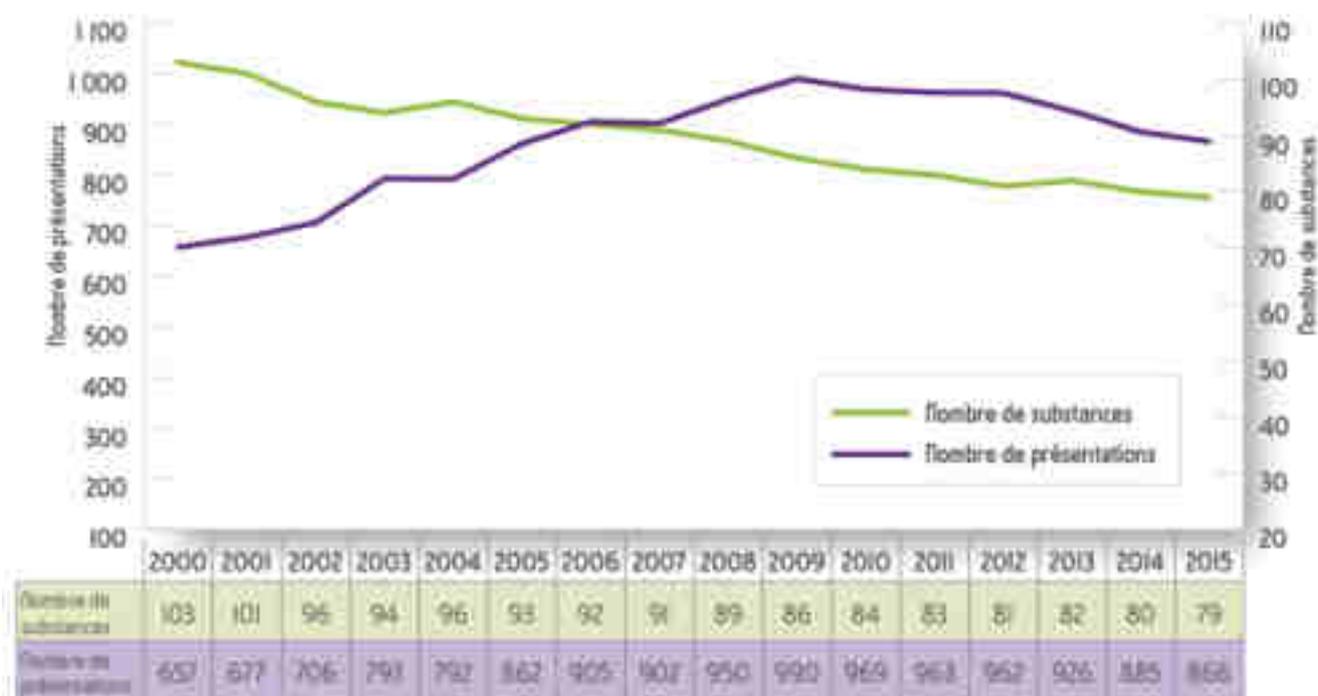
### **1.2.3. Marché des antibiotiques aujourd'hui**

Aujourd'hui, les antibiotiques sont très largement utilisés à travers le monde et on estime qu'ils auraient sauvé près de 80 millions de personnes depuis 1940. Leur utilisation connaît un accroissement constant : la consommation d'antibiotiques dans le monde a augmenté de 46% au cours des deux dernières décennies selon un article paru dans The Lancet [18].

Aujourd'hui, plus de 15 familles d'antibiotiques traitent efficacement diverses infections comme les pneumonies, les otites, les bronchites, les méningites, les infections urinaires, etc [19]. En raison de cette efficacité remarquable, les antibiotiques sont aujourd'hui victimes de leur propre succès. Leur utilisation

excessive, parfois inappropriée, depuis plus de 70 ans en médecine humaine et aussi dans le domaine agricole, a conduit au développement de résistances bactériennes [20].

De plus, depuis 30 ans, aucune nouvelle classe d'antibiotiques n'a malheureusement été découverte et le nombre d'antibiotiques disponibles sur le marché a diminué de 20% entre 2010 et 2015 [21].



**Figure 1 - Évolution du nombre d'antibiotiques commercialisés en France [21]**

Aujourd'hui, la France fait partie des pays dans lesquels la consommation d'antibiotique est très importante. On estime que 40 % des Français consomment des antibiotiques chaque année, même lorsque ces derniers n'ont pas d'utilité. Ces dernières années, les mesures prises par le gouvernement avaient permis une baisse de la consommation d'antibiotique, mais l'année 2021 avec l'épidémie de Covid-19 s'est accompagnée d'une hausse de la consommation d'antibiotiques à l'hôpital [22]. En effet, bien qu'aucune étude sérieuse n'ait réussi à prouver l'intérêt des antibiotiques dans le traitement de la Covid-19, ceux-ci ont été fréquemment prescrits et notamment l'azithromycine, un antibiotique de la famille des macrolides communément utilisé dans le traitement des infections sexuellement transmissibles et aussi pour les infections ORL.

## 1.3 Contexte de l'antibiorésistance

### 1.3.1. Définition

« Les espèces qui survivent ne sont pas les espèces les plus fortes, ni les plus intelligentes, mais celles qui s'adaptent le mieux aux changements. ». Cette théorie de Charles Darwin est aujourd'hui illustrée par le phénomène de résistance des bactéries aux antibiotiques.

L'antibiorésistance se définit comme la capacité d'une bactérie à se développer malgré la présence d'un antibiotique. Chaque bactérie est plus ou moins sensible à un antibiotique particulier. L'antibiorésistance pose un problème lorsqu'une bactérie généralement sensible à un type d'antibiotique devient peu à peu résistante à celui-ci suite à un mécanisme particulier (cf.2.2.2.).

En effet, l'utilisation massive des antibiotiques pour un usage humain et vétérinaire depuis la deuxième moitié du 20<sup>ème</sup> siècle a sélectionné les bactéries capables de développer une pléthore de mécanismes de résistances. Ce phénomène pose un problème de santé publique : le nombre d'antibiotiques efficaces pour traiter certaines pathologies diminue progressivement et on arrive même parfois à des impasses thérapeutiques.

Malheureusement, aujourd'hui, de nombreuses pathologies d'origine bactérienne sont impactées par l'antibiorésistance. Ce phénomène touche aussi des pathologies plutôt fréquentes comme les infections urinaires (incidence : 3 200/100 000 femmes en France) [23] ainsi que des pathologies moins communes comme les méningites d'origine bactérienne (incidence : 1 à 3 / 100 000 habitants en France) [24].

### 1.3.2. L'antibiorésistance en chiffre

Le phénomène d'antibiorésistance est un phénomène de santé publique majeur qui serait responsable en 2019 de 1 270 000 morts à l'échelle mondiale selon Murray et al [25]. Six agents pathogènes sont responsables de plus de 70% de ces décès : il s'agit de *E coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces 6 bactéries sont responsables de 929 000 décès attribuables à l'antibiorésistance en 2019 [25].



- Une utilisation d'antibiotiques toujours plus puissants, entretenant ce phénomène d'antibiorésistance si cette utilisation devait se généraliser.
- Des risques accrus lors d'interventions chirurgicales lors desquelles la prescription d'antibiotiques permettait de réduire le risque d'infections.

Les conséquences économiques liées à l'antibiorésistance sont, elles aussi, à prendre en compte, notamment dans le contexte économique actuel. Ces répercussions sont :

- Des consultations médicales supplémentaires pouvant notamment être dûes aux complications apparues suite à une prise d'antibiotique inefficace,
- Des médicaments plus chers, car plus à même de parvenir à un bénéfice thérapeutique pour le patient,
- Les coûts liés aux incapacités de travail.

Pour toutes ces raisons, l'antibiorésistance est aujourd'hui, et depuis plusieurs années, au cœur des politiques de santé publique [28].

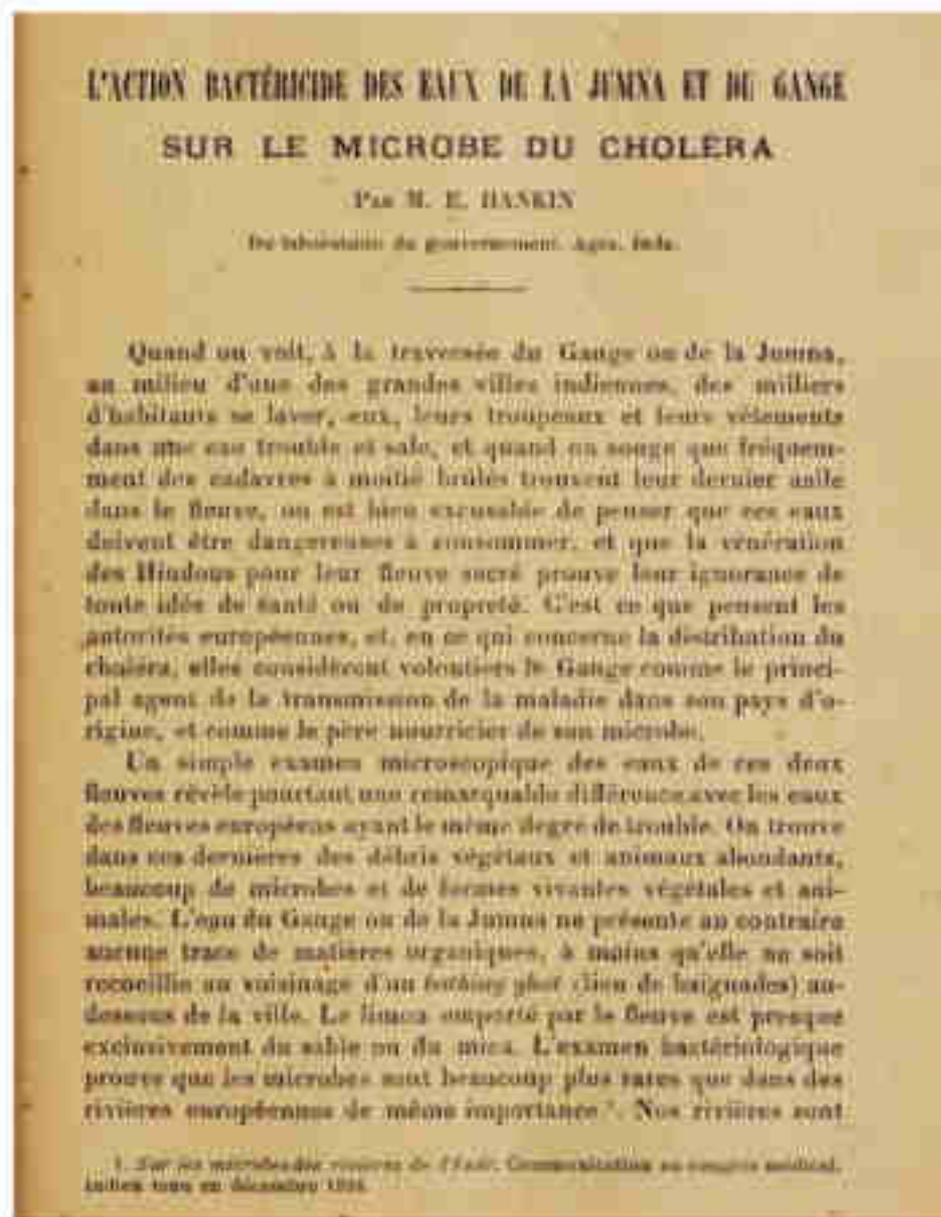
## **1.4 Présentation de la phagothérapie**

### **1.4.1. Découverte des virus et des bactériophages**

La découverte des bactériophages s'est étendue sur quelques années et en plusieurs étapes indépendantes l'une de l'autre.

En 1896, Ernest Hanbury Hankin, un chimiste anglais, est le premier à avoir mis en évidence l'existence des bactériophages. Alors qu'il travaillait sur les bacilles cholériques en Inde, il a déclaré que les eaux des fleuves Gange et Yamuna semblaient avoir des propriétés antibactériennes thermolabiles qui aideraient à lutter contre la bactérie responsable du choléra : *Vibrio cholerae*. Selon lui, cette découverte expliquait le taux plus faible d'infection au choléra dans les villages avoisinant le fleuve. Il a également démontré que cette activité est inactivée par la chaleur.

Cette découverte a fait l'objet d'un article intitulé « l'action bactéricide des eaux de la Junna et du Gange » publié dans les Annales de l'Institut Pasteur. Cette découverte est considérée comme une description précoce du fonctionnement des phages [29]. Néanmoins, à cette époque, cette découverte est discutée car elle serait sujette à interprétation [30].



**Figure 3 - L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera, Annales de l'Institut Pasteur 1896; 10: 511–523 [1].**

Ensuite, en 1915, Frédrick Twort, un bactériologiste anglais lui aussi, a été le premier à formuler l'hypothèse que cette activité bactéricide serait due à un virus, mais ses recherches ont été interrompues par un manque de financement et le début de la première guerre mondiale.

En 1917, Felix d'Hérelle, alors qu'il travaillait à l'institut Pasteur, a découvert un microbe invisible à l'œil nu qu'il présente comme un antagoniste du bacille de la dysenterie et qu'il nomme bactériophage. Cette découverte est le fruit d'une enquête menée sur une épidémie de dysenterie hémorragique grave dans les troupes françaises en 1915. A cette même époque, différents scientifiques

de l'Europe de l'Est ont pu observer des phénomènes similaires. Par exemple, en 1917, George Eliava un scientifique Géorgien, observe la disparition de *V. cholera* [31] [32].

### **1.4.2. Histoire des phages**

Hérelle est le premier à appliquer sa découverte en clinique : en 1919, il mène une étude à l'hôpital des Enfants malades de Paris et traite notamment un enfant souffrant d'une dysenterie sévère. Pour cela, il prépare un cocktail de phages qu'il va ingérer ainsi que ses confrères pour confirmer son innocuité. Ce traitement est un succès, une régression de l'infection est observée dans les 24h suivant son administration. Cette application de la phagothérapie ne sera cependant pas publiée et c'est à 2 scientifiques Richard Bruynoghe et Joseph Maisin que l'on attribuera en 1921 la première utilisation des phages en thérapeutique. Cette utilisation est également un succès. Les bactériophages ont été injectés dans et autour de lésions ouvertes chirurgicalement chez des patients présentant des infections cutanées aux staphylocoques. L'utilisation des phages s'est ensuite étendue et des milliers d'études ont été réalisés portant sur l'utilisation des phages sur diverses pathologies telles que le choléra ou la peste bubonique. De ces applications aboutira la création d'un centre industriel de production de phages contre le choléra en Inde, puis d'autres laboratoires dans d'autres régions du monde.

Malgré cela, l'utilisation des phages était soumise à controverse en occident car il n'y avait que très peu d'études suivant les normes de la recherche. Ceci a progressivement conduit à l'oubli des phages dans les pays occidentaux parallèlement à l'avènement des antibiotiques [30].

En Europe de l'Est, les phages continueront à susciter de l'intérêt. En 1933, Hérelle, aide George Eliava, à fonder un Institut des bactériophages, de la microbiologie et de la virologie, « The Eliava Institute of Bacteriophages » à Tbilissi en Géorgie.

### **1.4.3. Domaines d'application**

#### **1.4.3.1. En médecine humaine**

A l'heure actuelle, il n'existe pas de phages utilisés en thérapeutique en France disposant d'une autorisation de mise sur le marché. La phagothérapie est surtout utilisée dans le cadre d'essais cliniques dont nous décrivons certains résultats dans cette thèse. Il est également possible pour quelques patients de disposer d'un accès compassionnel à certains cocktails de phages qui font l'objet d'un essai clinique. Pour ces patients, il n'existe pas d'autre alternative thérapeutique et les effets d'une absence de traitement pourraient être délétères [33].

### 1.4.3.2. En médecine vétérinaire

Le nombre d'animaux de compagnie ne cesse de croître en France et dans le monde. La proximité de ces animaux avec leur propriétaire rend préoccupante la diffusion potentielle d'une antibiorésistance. A l'heure actuelle, plusieurs études sont en faveur de l'efficacité des bactériophages, notamment dans le traitement des otites et des pyodermites chez les animaux de compagnie.

Une seule application vétérinaire est aujourd'hui disponible aux États Unis. Il s'agit du médicament Staphage Lysate® (SPL), un vaccin staphylococcique contenant les composants de *S. aureus*, un bactériophage et des éléments de milieu de culture. Il permet de traiter et prévenir les pyodermites canines et l'hypersensibilité associée ainsi que les infections cutanées polymicrobiennes à composante staphylococcique [7] [34].

### 1.4.3.3. Dans l'industrie agro-alimentaire

L'accroissement de la population mondiale impose à l'industrie agro-alimentaire d'augmenter ses rendements. Cette intensification de la production demande aux industriels de limiter au maximum les contaminations microbiologiques pouvant affecter leur production. De plus, ces dernières années, l'industrie agro-alimentaire se voit astreindre des règles de plus en plus strictes en matière d'usage d'antibiotiques dans les élevages. Ces restrictions ont obligé les industriels à se pencher vers d'autres solutions, comme l'utilisation des phages. Des préparations de phages ciblés sur bactéries d'origine alimentaires sont d'ores et déjà sur le marché. Par exemple :

- Pour le contrôle des salmonelles : SalmoLyse®, composé de 6 monophages lytiques : BA-1781, SPT-1, SSE-121, STML-198, STML-13-1 et SKML-39. Selon une étude, ce cocktail de phage permet de réduire de 60 à 90% la contamination par *Salmonella* dans des aliments crus pour animaux de compagnie [35] [36].
- Pour le contrôle de *E. Coli* : EcoShield PX. Ce cocktail de phage cible en particulier les *E. Coli* producteurs de Shiga toxines. Il est composé de 3 à 8 monophages lytiques appartenant à la famille des Myoviridae. EcoShield a été testé sur 8 aliments différents avec une efficacité prouvée de 97% [37].
- Pour le contrôle de *Shigella* : ShigaShield. Il s'agit de 5 bactériophages lytiques ciblant les espèces de *Shigella* présentes dans les eaux et les aliments contaminés avec une efficacité de 90% [38].

Néanmoins, leur utilisation est complexe du fait des milieux très divers dans lesquels ils sont utilisés. Par exemple, en plein champ, les radiations UV ou même le pH de certains sols peuvent être un frein à un fonctionnement optimal des phages[39].

## **1.5 Objectifs de la thèse**

L'augmentation importante du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques a conduit à rendre inefficace de nombreux antibiotiques, parfois même ceux utilisés comme dernière option thérapeutique. De plus, ces dernières années, certains antibiotiques, comme l'amoxicilline, ont connus des pénuries dramatiques (les raisons évoquées par l'agence européenne des médicaments sont plurielles : augmentation soudaine du nombre d'infections respiratoires, retards de fabrication, réduction des capacités de production) [40]. Dans ce contexte, un retour à une ère pré-antibiotique, dans laquelle aucun antibiotique ne serait disponible pour traiter certains types d'infections, paraît inévitable [41]. C'est pourquoi, il paraît pertinent de s'intéresser de nouveau à la phagothérapie, pratique encore très peu utilisée en France et pourtant beaucoup pratiquée en Europe de l'Est.

Ainsi, il est légitime de s'interroger dans quelle mesure la phagothérapie pourrait être une alternative à l'usage des antibiotiques dans le traitement des infections bactériennes.

Les objectifs de cette thèse seront donc de présenter brièvement les antibiotiques de manière globale ainsi que les mécanismes à l'origine des phénomènes de résistance aux antibiotiques. Puis, on abordera plus en détail les bactériophages et la phagothérapie en discutant notamment des limites de cette thérapie et de ses aspects pratiques et réglementaires. On finira par présenter l'utilisation actuelle de la phagothérapie et les usages potentiels de cette thérapie en clinique.

## **Partie 2**

# **Infection bactérienne et phénomène de résistances aux antibiotiques**

## 2. Infection bactérienne et phénomène de résistances aux antibiotiques

### 2.1 Bactéries et infections

#### 2.1.1. Structure

La compréhension de la structure bactérienne est fondamentale avant d'étudier les bactériophages. Cela est notamment dû à la spécificité des phages envers certaines structures bactériennes pour exercer leur action, ainsi qu'à la coévolution constante entre bactéries et phages en matière de mécanismes de défense.

Les bactéries sont des petites cellules procaryotes qui mesurent de 0,5 à 10  $\mu\text{m}$ .

On distingue différentes morphologies :

- Coque sphérique (ex : *Staphylococcus aureus*) ou ovoïde (ex : *Enterococcus faecalis*)
- Bâtonnet ou bacille (ex : *Vibrio cholerae*)
- Arc (vibrion)
- Spirale (spirochète)

On peut les trouver sous forme de cellules uniques, de paires, de chaînes ou d'amas.

En plus de cette classification par la forme, les bactéries peuvent être classées selon leur couleur lors d'une coloration de Gram. Selon le résultat obtenu, qui dépend de la structure de la paroi bactérienne, on distingue les bactéries Gram + des Gram -.

Les bactéries Gram – ont, en partant de l'extérieur, une membrane externe, suivie d'un peptidoglycane fin (de l'ordre de 2 à 7 nm) et d'une membrane cytoplasmique.

Les Bactérie Gram +, au contraire, n'ont pas de membrane externe et ont un peptidoglycane plus épais (entre 20 et 80 nm), suivi également d'une membrane cytoplasmique. Le peptidoglycane forme une enveloppe rigide assurant l'intégrité de la bactérie et la protection vis à vis des variations de la pression osmotique.

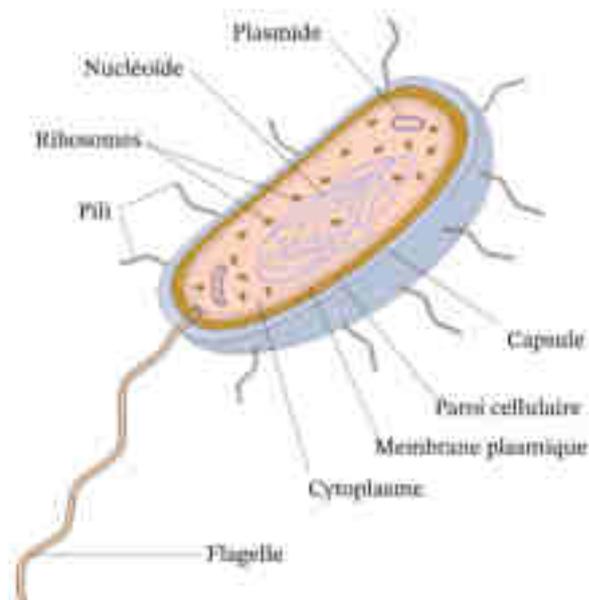
La membrane cytoplasmique a un rôle de barrière perméable, sélective et un rôle de transport des éléments nutritifs médiés par des perméases. C'est également le siège de plusieurs processus métabolique.

Pour pouvoir introduire leur matériel génétique, les bactériophages doivent pouvoir dépasser cette barrière constituée par la paroi cellulaire et la membrane plasmique.

Le matériel génétique est libre dans le cytoplasme et il consiste en 2 brins d'ADN formant un chromosome. Dans le cytoplasme, on retrouve également les ribosomes intervenants dans la synthèse des protéines.

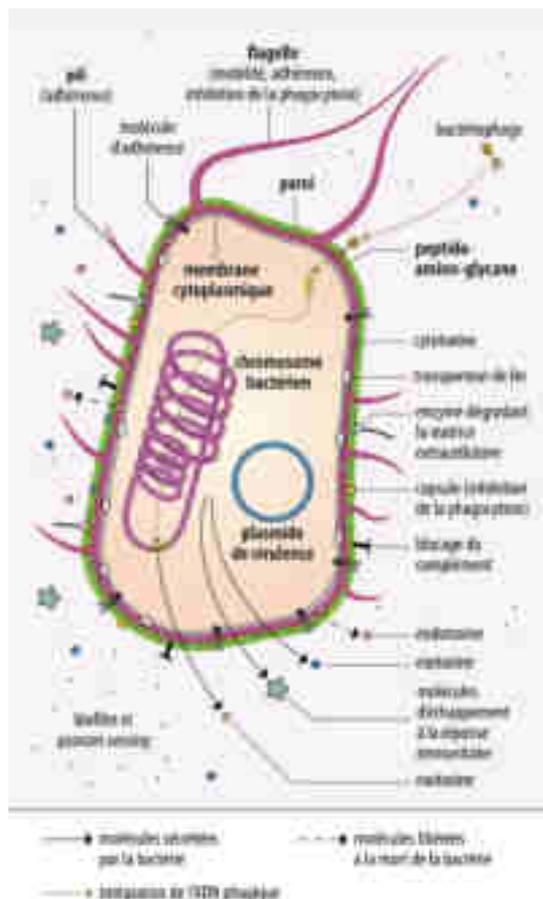
On peut noter cependant des distinctions dans l'architecture des bactéries. En plus de ces structures, dites obligatoires, certaines bactéries peuvent présenter des structures supplémentaires qui leur sont nécessaires, à savoir :

- Les flagelles, permettant aux bactéries d'être mobiles. Ce sont de longs et fins appendices de longueur variable et d'un diamètre variant de 10 à 20 nm.
- Les pili, des appendices de surfaces plus fines que les flagelles. On en distingue 2 sortes :
  - o Les pili communs qui jouent un rôle dans l'adhésion des bactéries sur les cellules et à ce titre agissent comme un facteur de virulence.
  - o Les pili sexuels, présents uniquement chez les bactéries mâles (F<sup>+</sup> ou Hfr). Ils interviennent dans l'attachement des bactéries entre elles au cours de la conjugaison et peuvent également faire office de support de fixation pour certains bactériophages.
- La capsule, de nature polysaccharidique ou polypeptidique, participe à l'attachement des bactéries et intervient également dans leur virulence.
- Les plasmides, qui lorsqu'ils sont présents, apportent des informations génétiques supplémentaires à la bactérie [42].



**Figure 4 - Illustration d'une bactérie [43]**

## 2.1.2. Virulence bactérienne



**Figure 5 - Principaux mécanismes de la résistance bactérienne [44]**

La virulence est une propriété intrinsèque des bactéries dépendante de leur génome. Une bactérie est dite virulente lorsqu'elle a la capacité de pénétrer et d'évoluer au sein d'un hôte en lui causant des dommages responsables d'une pathologie infectieuse. La virulence d'une bactérie est déterminée expérimentalement en évaluant le nombre de bactéries nécessaires pour induire un dommage dans un modèle animal [45].

Les facteurs de virulence sont les molécules permettant aux bactéries de coloniser leur hôte et qui, à ce titre, participent à leur pathogénicité.

On distingue 5 catégories de facteurs de virulence :

- Les structures d'adhérences permettant aux bactéries de pénétrer dans une cellule hôte ;
- Les mécanismes d'échappement au système immunitaire de l'hôte ;
- Les facteurs sécrétoires : les toxines ou les enzymes qui attaquent l'hôte ;
- Le détournement de nutriments au profit des bactéries ;
- La formation de biofilm [44].

## **2.2. Antibiotiques et antibiothérapies**

### **2.2.1. Principales classes et familles d'antibiotiques**

#### **2.2.1.1. Les bêtalactamines**

La famille des bêtalactamines regroupe une diversité importante de molécules utilisées en clinique, à savoir : les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et les monobactames. Ces antibiotiques ont tous en commun la présence constante d'un cycle bêta lactame associé à des cycles et des chaînes latérales variables qui définiront leurs propriétés pharmacocinétiques et leur spectre d'activité. Les  $\beta$ -lactamines fonctionnent en bloquant la synthèse du peptidoglycane, constituant majeur de la paroi des bactéries Gram – et Gram +. Ils ont l'intérêt d'être actifs sur de nombreuses espèces bactériennes, d'avoir une faible toxicité, une grande variété de modes d'administration avec une bonne diffusion tissulaire ce qui leur vaut d'être la famille d'antibiotiques la plus utilisée.

#### **2.2.1.2 Les aminosides**

Les aminosides sont des hétérosides polaires et polycationiques avec plusieurs cycles glycosidiques liés à un aminocyclitol. Ils sont classés en différents groupes selon leur structure chimique. Leur caractère polycationique leur confère la capacité de se fixer à des sites chargés négativement sur la paroi bactérienne puis de traverser les porines pour diffuser dans les bactéries, plus précisément dans l'espace périplasmique. Leur mode d'action repose sur leur capacité à perturber la synthèse protéique des bactéries par liaison au site aminoacyl de l'ARN ribosomal 16S dans la sous-unité 30S du ribosome. Cette famille d'antibiotiques s'utilise presque toujours en association dans le cadre d'infection sévère à une bactérie Gram– et à des staphylocoques [46].

#### **2.2.1.3. Les macrolides**

Les antibiotiques de la famille des macrolides sont constitués d'un macrocycle avec une fonction lactone sur laquelle vont se greffer 2 ou plusieurs sucres, dont 1 aminé. Ils sont actifs sur les bactéries Gram+. Leur mécanisme d'action repose sur leur capacité à se fixer sur les ribosomes pour perturber la synthèse protéique [47].

#### **2.2.1.4. Les cyclines**

Les cyclines sont constituées de 4 cycles accolés ce qui leur vaut également le nom de tétracyclines. Elles se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome ce qui conduit à l'inhibition de la synthèse protéique [48].

#### **2.2.1.5. Les quinolones et fluoroquinolones**

Ils agissent en formant un complexe entre l'ADN et des enzymes qui contrôlent la torsion de l'ADN. Leur activité sur les bactéries Gram – passe par l'inhibition de l'activité ADN gyrase et par le blocage de la topoisomérase IV pour les bactéries Gram + [49].

### **2.2.2. Résistances aux antibiotiques**

#### **2.2.2.1. Résistance acquise et résistance naturelle**

La résistance à un antibiotique correspond à la capacité d'une souche bactérienne à supporter une concentration en antibiotique plus importante que celle qui permet d'inhiber le développement de la majorité des souches de cette même espèce.

On distingue deux types de résistances : la résistance naturelle et la résistance acquise.

La résistance naturelle a lieu lorsque toutes les souches bactériennes d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'antibiotique n'aura alors aucun effet sur toutes les bactéries de cette espèce. C'est notamment le cas pour *Enterococcus spp* qui est insensible aux céphalosporines. Dans cette mesure, en thérapeutique, il est important de connaître le spectre d'activité d'un antibiotique, c'est-à-dire d'avoir connaissance de l'ensemble des bactéries sensibles au mode d'action d'un antibiotique. La résistance naturelle est dite intrinsèque, elle est toujours exprimée dans l'espèce et ne dépend pas d'une exposition à un antibiotique. Son origine est chromosomique et sa transmission à la descendance est verticale. L'origine de cette résistance peut être une réduction de la perméabilité de la membrane externe (généralement le LPS chez les bactéries Gram-), elle peut être liée à l'activité des pompes d'efflux ou à une inaccessibilité de la cible de l'antibiotique [50][51][52].

La résistance acquise, au contraire, fait suite au contact de la bactérie avec un antibiotique. Une souche bactérienne habituellement sensible à un antibiotique va y devenir résistante suite à des

modifications de son système génétique endogène (mutation) ou à une modification extra chromosomique. Contrairement, à la résistance naturelle, elle peut être transmise aussi bien aux descendants d'une même espèce que par transfert horizontal. Cette résistance est favorisée par la surconsommation d'antibiotiques, l'automédication en milieu communautaire et surtout la sélection en milieu hospitalier qui ensemble favorise l'évolution des bactéries vers la résistance [50].

### **2.2.2.2. Mécanismes de résistances**

4 mécanismes biochimiques sont essentiellement responsables de ces phénomènes de résistances naturelles et acquises.

#### **2.2.2.2.1. Imperméabilité**

L'imperméabilité permet aux bactéries d'empêcher l'entrée en leur sein d'antibiotiques. Ce mécanisme peut être naturel ou peut être le fruit :

- De modifications quantitatives ou qualitatives des protéines de la membrane externes des bactéries Gram - : les porines. Par exemple, *P. aeruginosa*, grâce à une mutation entraînant un déficit de la porine D2, est résistante à l'imipénème.
- De la perte d'un transporteur au niveau de la membrane cytoplasmique. On peut prendre l'exemple des bactéries anaérobies strictes qui sont naturellement résistantes aux aminosides du fait d'un défaut de transport actif [53].

#### **2.2.2.2.2. Efflux**

L'efflux représente un système actif de transport transmembranaire permettant de garantir à la bactérie un équilibre physico-chimique en éliminant les molécules potentiellement toxiques telles que les antibiotiques.

Ce mécanisme peut entraîner une résistance simultanée à des antibiotiques de structures différentes, ce qui peut rendre la bactérie multi-résistantes [53].

#### **2.2.2.2.3. Inactivation de l'antibiotique**

L'inactivation de l'antibiotique est le mécanisme de résistance le plus fréquent. Les bactéries vont produire des enzymes codées par des gènes chromosomiques ou plasmidiques ayant la capacité

d'inactiver, détruire ou de modifier l'antibiotique par ajout de radicaux bloquant ou diminuant la fixation de l'antibiotique à sa cible [54].

Par exemple, certaines bactéries produisent des enzymes, appelées bêta lactamases capables d'hydrolyser le cycle bêta lactame de l'antibiotique, responsable ainsi de la résistance aux bêta lactamines [54].

#### **2.2.2.2.4. Perte de l'affinité de l'antibiotique pour sa cible**

La perte d'affinité de l'antibiotique pour sa cible peut être secondaire à une absence de cible ou à une modification de la cible par mutations chromosomiques ou suite à l'action d'enzymes modificatrices. Par exemple, la modification des PLP chez les pneumocoques leur permet d'acquérir une résistance aux bêta lactamines expliquant l'existence de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) [54].

### **2.3. Quelles solutions aujourd'hui contre l'antibiorésistance ?**

#### **2.3.1. Mesures mises en place en France**

En France, de nombreux moyens sont mis en œuvre afin de suivre la consommation d'antibiotiques et l'évolution du nombre de BMR. Par exemple, en 2009 a été mis en place un réseau national de surveillance ATB-RAISIN, qui permet de suivre l'utilisation des antibiotiques à l'hôpital. Pour connaître, l'évolution de la consommation en antibiotiques en médecine humaine, l'ANSM étudie les déclarations de ventes des entreprises pharmaceutiques et de la Caisse d'Assurance Maladie. L'ANMV, l'Agence Nationale du Médicament Vétérinaire, suit également les ventes d'antibiotiques à usage vétérinaire [55].

Des mesures visant à améliorer la dispensation des antibiotiques ont également été mises en place. Les tests rapides d'orientation diagnostique de l'angine mis en place en 2002 permettent de différencier les angines virales et bactériennes. Ils sont distribués gratuitement aux professionnels de santé dans le but de limiter la prescription d'antibiotiques. Les antibiotiques sont, en effet, largement utilisés dans le traitement de l'angine, alors même que celles-ci sont d'origines bactériennes dans seulement 20 à 30% des cas [56].

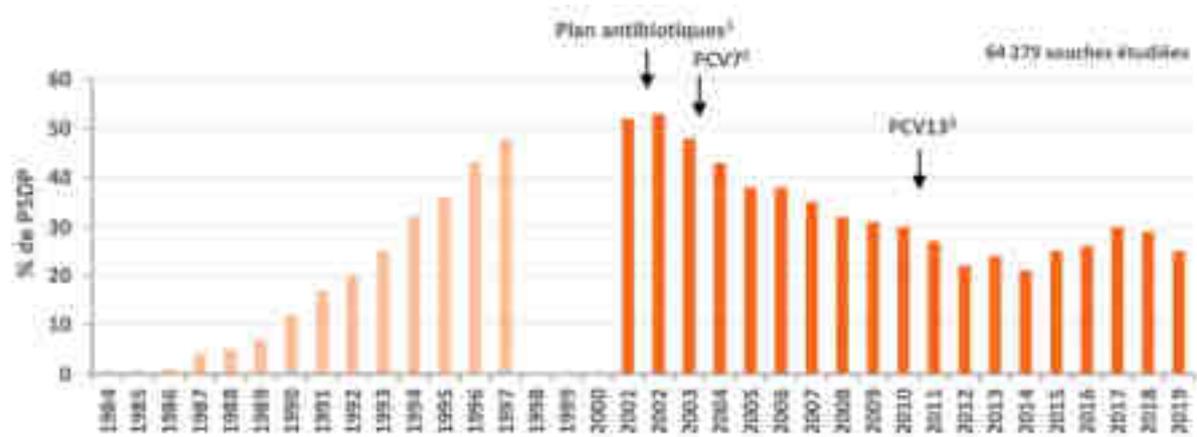
Un outil appelé « antibioclic » a également été mis en place par l'OMEDIT Grand Est afin d'aider les prescripteurs dans leurs décisions de prises en charge des infections bactériennes [55].

Plus récemment, la Stratégie Nationale 2022-2025 pour la prévention des infections et de l'antibiorésistance a été lancée. Orchestrée par le ministère des Solidarités et de la Santé et soutenue par les Agences Régionales de Santé, cette stratégie vise principalement à prévenir les infections courantes, à minimiser les risques d'infections associées aux soins et à sauvegarder l'efficacité des antibiotiques. L'initiative entend approfondir les connaissances et améliorer les pratiques en matière de prévention des infections et de lutte contre l'antibiorésistance. Elle encourage également un partage d'expériences enrichissant entre professionnels de santé, promeut l'utilisation et le partage de données de santé et de surveillance, soutient la recherche innovante et interdisciplinaire, et met en valeur les produits aidant à prévenir les infections et à contrôler l'antibiorésistance. Un des objectifs spécifiques est de réduire de 25 % la consommation d'antibiotiques en milieu ambulatoire d'ici 2025, s'attaquant ainsi directement à l'une des principales causes de l'antibiorésistance. Cette stratégie représente un engagement fort en faveur de la santé publique, en adoptant une approche globale et collaborative pour relever les défis posés par les infections résistantes aux traitements conventionnels.

### **2.3.2. Alternatives thérapeutiques**

Il n'existe, à l'heure actuelle, aucune alternative thérapeutique ayant un effet et une utilisation comparables aux antibiotiques. Néanmoins, d'autres stratégies peuvent être utilisées afin de contrôler ces bactéries multirésistantes.

La première et la plus pertinente à l'heure actuelle est la vaccination. Par exemple, 7 ans après la recommandation du vaccin anti pneumococcique pour les enfants de moins de 5 ans, la proportion de pneumocoques de sensibilité diminuée à la pénicilline est passé de 50 à 30% (figure). De manière générale, la vaccination de l'homme ou des animaux peut permettre de limiter l'usage des antibiotiques en réduisant le risque d'infection bactérienne [55].



**Figure 6 - *S. pneumoniae* de sensibilité diminuée à la pénicilline (PSDP) en France d’après les données du CNRP. (1984-1997 : P. Geslin ; 2001-2019 : CNRP-ORP, E. Varon, L. Gutmann) [57].**

- <sup>1</sup> Plan national pour préserver l'efficacité des antibiotiques ;
- <sup>2</sup> Introduction du vaccin anti-pneumococcique conjugué heptavalent (PCV7) ;
- <sup>3</sup> Remplacement du PCV7 par le vaccin conjugué 13-valent (PCV13).

Une autre stratégie pour combattre les infections bactériennes consiste à lutter contre les facteurs de virulence. Cette approche peut être mise en œuvre par l’utilisation d’agents spécifiquement dirigés contre les toxines et les systèmes de sécrétions bactériens. À titre d'exemple, le traitement ZIMPLAVA® est un anticorps monoclonal humain développé pour cibler *C. difficile*. Ce bacille à Gram positif anaérobie est responsable de diarrhées post-antibiothérapie associées à une morbi-mortalité significative. La capacité pathogène de cette bactérie est principalement due à la sécrétion des toxines A et B.

L'efficacité de ZIMPLAVA® a été démontrée dans le cadre de deux essais cliniques indépendants, MODIFY I et II. L'administration de bezlotoxumab (ZINPLAVA™), qui cible la toxine B, a permis une réduction notable du taux de récurrences de colite à *C. difficile* chez les patients adultes. Suite à ces résultats probants, le bezlotoxumab ZINPLAVA a obtenu l’AMM pour la prévention des récurrences d’infection à *Clostridium difficile* chez les adultes présentant un risque élevé de récurrence [58], [59].

# **Partie 3**

# **Bactériophages et**

# **Phagothérapie**

### 3. Bactériophages et phagothérapie

#### 3.1. Qu'est qu'un bactériophage ?

##### 3.1.1. Morphologie et classification

Il existe une grande variété de phages classés en ordres et familles selon la morphologie du virion et le type d'acides nucléiques dans la capsid (ADN ou ARN, simple brin ou double brin). Cette classification est proposée par l'*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Les phages les plus nombreux appartiennent à l'ordre des Caudovirales qui comprend 3 familles : les Myoviridae, les Siphoviridae et les Podoviridae. Ils représentent 96% des phages observés [60].

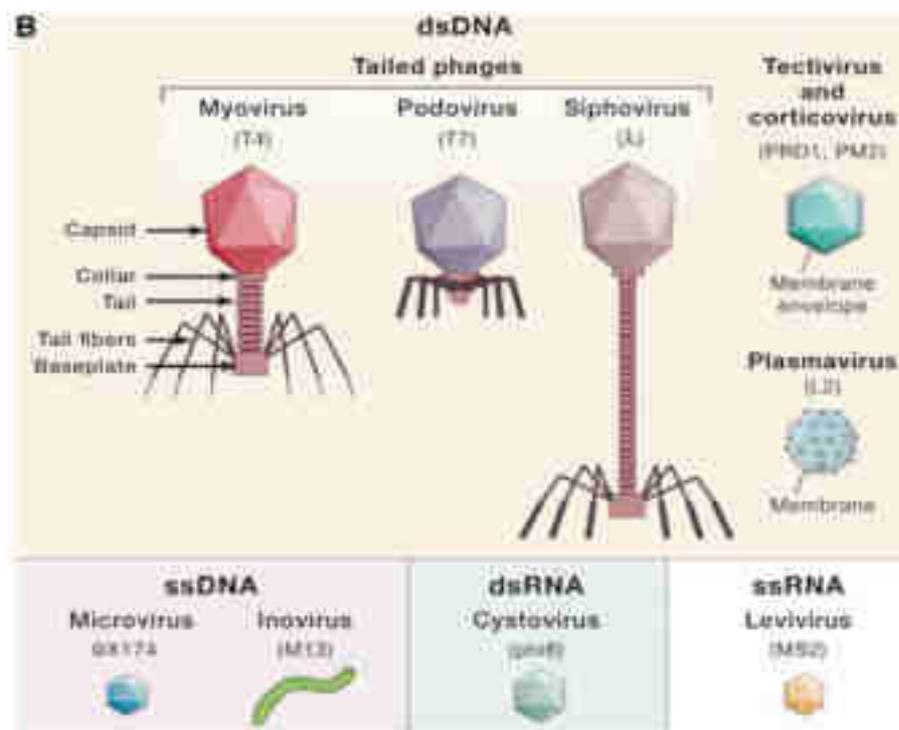
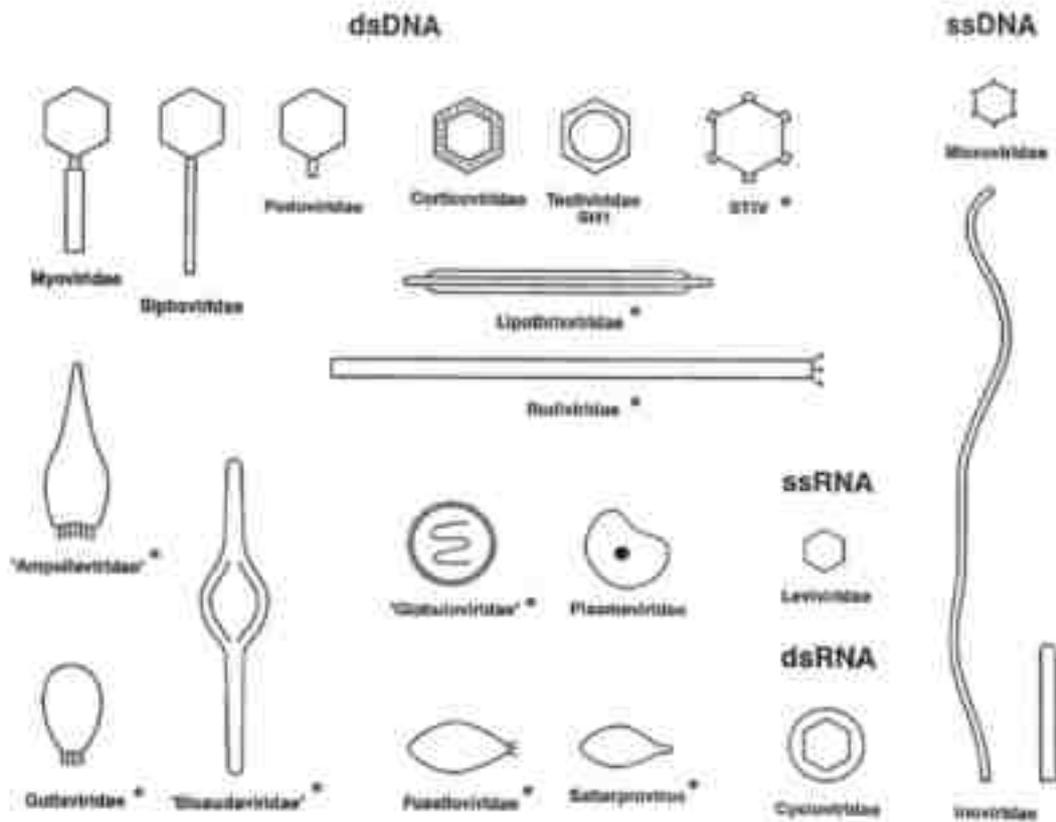


Figure 7 - Représentation schématique des différentes familles de phages. Tirée de (Ofir et al 2018) [60].

De même que leur génome, la morphologie des phages est aussi très variée. On retrouve des formes polyédriques avec ou sans queue, avec ou sans enveloppe lipidique, des formes filamenteuses, pléomorphes ; etc [61].



**Figure 8 - Morphologie des bactériophages et virus d'archées [61].**

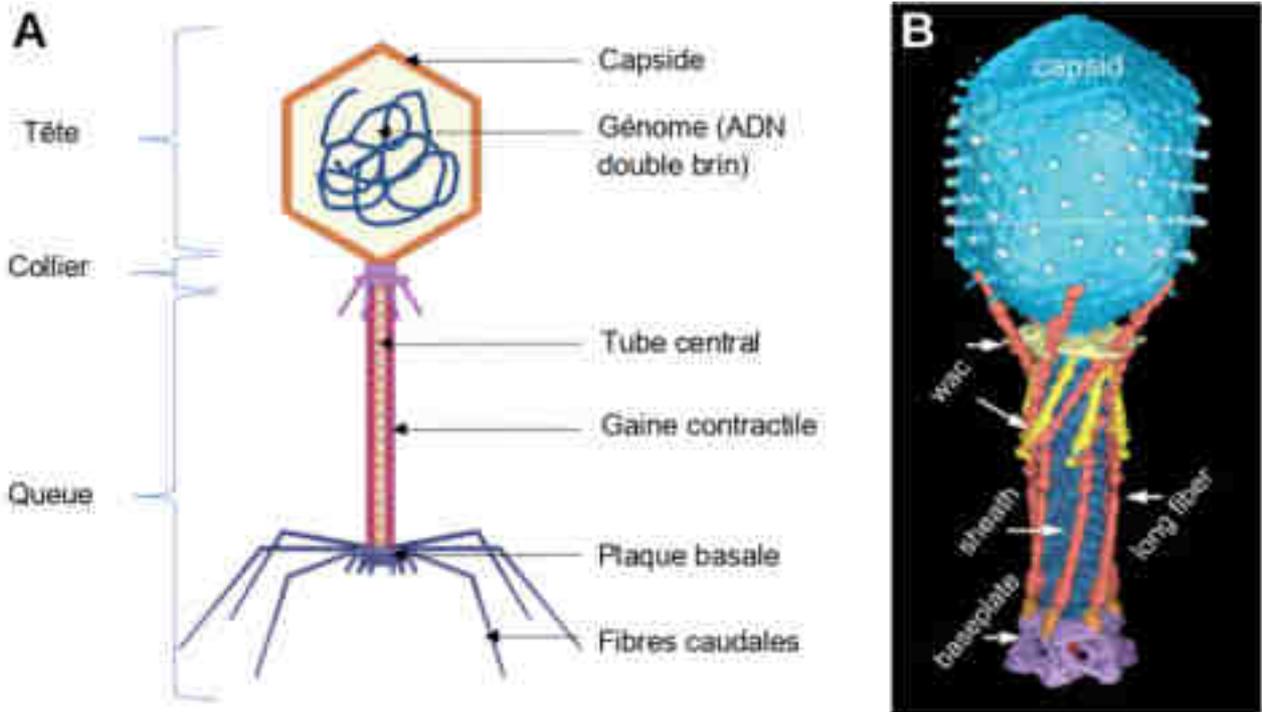
L'hétérogénéité de leur morphologie est une des caractéristiques principales des phages.

Les Caudés, représentant 96% des phages observés, sont composés d'une capsidie de forme icosaédrique avec un ADN double brin linéaire et une queue plus ou moins longue [61].

Pour étudier plus en détail la structure d'un phage, on s'appuiera sur le phage T4, le principal représentant de la famille de Myoviridae.

Le phage T4 mesure environ 150 nm et infecte *E. coli*. La structure se divise en 3 parties :

- Une tête : une capsidie icosaédrique entourant un ADN double brin linéaire
- Un collier reliant la tête et la queue
- Une queue constituée d'une gaine contractile avec un tube creux central permettant le passage du génome vers la cellule hôte lors d'une infection [62]. En partie terminale de la queue, on retrouve une plaque basale constituée de fibres et de crochets lui permettant de se fixer aux bactéries [63].



**Figure 9 - Le bactériophage T4**

A. Schéma d'un virion de bactériophage T4. La plaque basale porte à la fois des fibres caudales longues et courtes. Marie Gontier, à partir de l'outil Biorender

B. Reconstitution 3D d'un virion fondée sur des résultats de cryo-microscopie électronique. Cette image présente l'état d'une particule virale avant infection. La plupart des longues fibres caudales sont alors repliées contre la gaine. Hu et coll., 2015, PNAS [62].

En raison des recherches constantes sur les phages, leur classification est amenée à évoluer en fonction des nouvelles découvertes sur le sujet.

### 3.1.2. Reproduction et propagation

Pour cette partie, nous prendrons l'exemple du phage T4 qui infecte *E. coli*.

Un bactériophage isolé est appelé virion. À ce stade, il est inerte et doit parasiter une bactérie pour pouvoir se multiplier.

La fixation du bactériophage sur la bactérie est permise par les fibres, présentes en partie terminale, avec leur ligand spécifique qui sont situés sur la membrane externe des bactéries : les lipopolysaccharides ou les porines. Ceci entrainera un changement de conformation de la plaque basale du bactériophage avec

une libération des fibres courtes adhérant eux aussi à leurs ligands spécifiques au niveau des lipopolysaccharides. Cette fixation va conduire à la contraction de la gaine et à l'expulsion du tube central vers le périplasme où il y aura fusion entre les deux entités. La fusion va permettre la création d'un canal permettant le passage du génome du bactériophage vers la bactérie.

### 3.1.3. Cycles phagiques

Les bactériophages sont classés en 2 groupes selon leur cycle biologique. On distingue les phages lytiques, avec un cycle lytique, et les phages tempérés avec un cycle lysogénique.

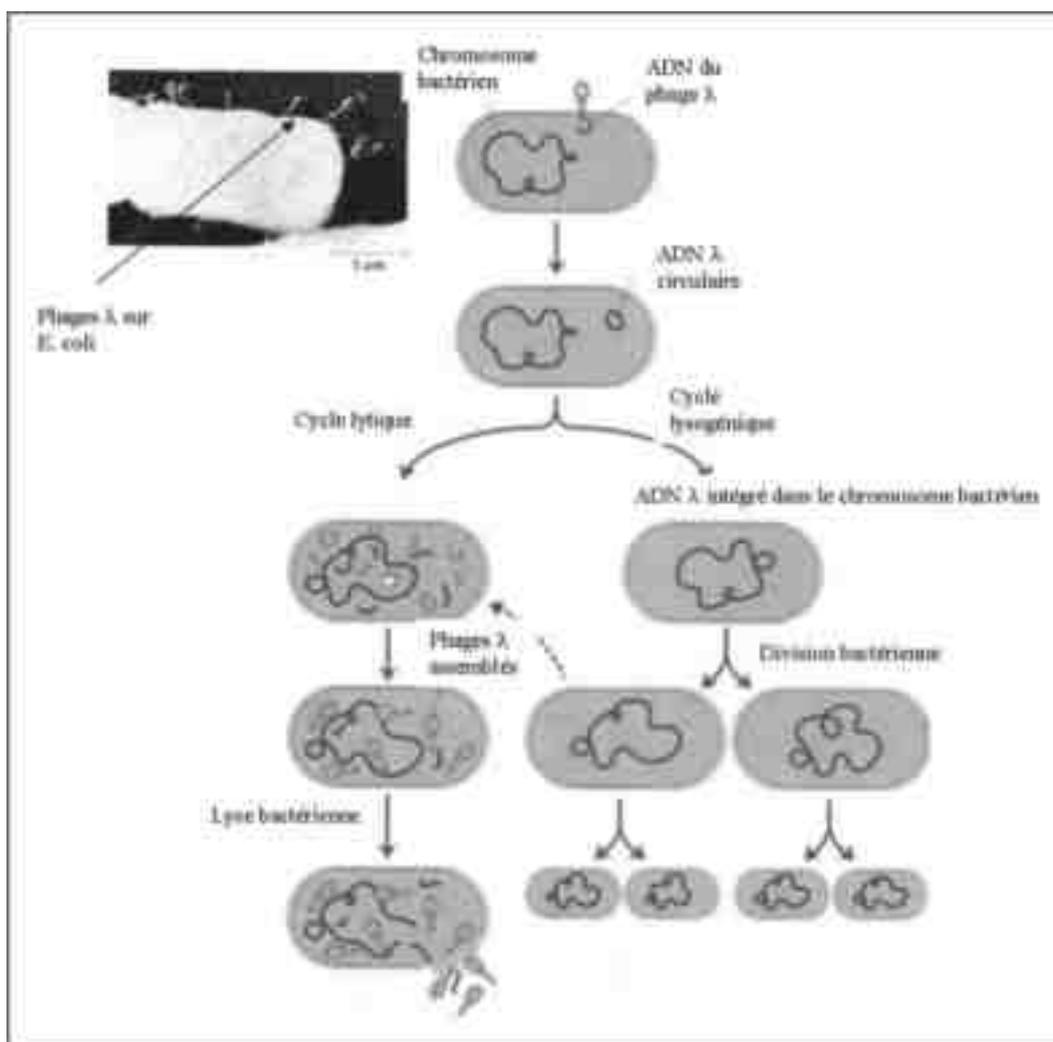


Figure 10 - les 2 types de bactériophages (lytiques et tempérés) et leur cycle (lytique et lysogénique) [7]

### **3.1.3.1. Cycle lytique**

Le cycle lytique comporte 6 phases :

1. L'arrimage ou fixation du phage à la bactérie tel que décrit précédemment
2. Formation d'un pore au niveau de la paroi de la bactérie grâce aux enzymes du phage
3. Passage de l'ADN du phage dans le cytoplasme bactérien
4. Fragmentation de l'ADN de l'hôte, suivie de l'utilisation de ces fragments pour assembler les composants nécessaires à la formation des nouveaux phages.
5. Maturation et assemblages de ces éléments
6. Éclatement de la bactérie et libération des bactériophages.

Un cycle permet de produire 50 à 100 nouveaux clones du phage.

Les phages lytiques vont ainsi tirer profit de la bactérie pour se reproduire et se multiplier. Le cycle lytique aboutit à l'éclatement de la bactérie, libérant ainsi des dizaines de phages capables, eux aussi de s'attaquer à de nouvelles bactéries de la même espèce. C'est ce cycle qui nous intéresse en thérapeutique [7].

### **3.1.3.2. Cycle lysogénique**

Les phages tempérés ont la capacité d'intégrer leur génome à celui des bactéries. Ce cycle lysogénique permet à la bactérie d'acquérir de nouvelles propriétés pouvant lui être bénéfique ou non. Les phages peuvent rester quiescents pendant un moment avant d'entrer dans un cycle lytique. Ce cycle ne permet pas au phage de se répliquer de manière autonome, mais la réplication se fait avec le chromosome bactérien et il est transmis aux cellules filles lors de la division de la bactérie mère [62].

## **3.2. Interactions bactériophages, bactéries et hôte**

### **3.2.1. Importance de la réponse immunitaire de l'hôte**

Les phages constituent la population principale de notre organisme avec une estimation de  $10^{16}$  phages, soit plus que les bactéries qui nous colonisent ou même que nos propres cellules. Néanmoins, l'interaction des phages avec notre système immunitaire est encore mal connue.

Pour tenter de comprendre l'importance du statut immunologique d'un patient dans le cadre d'une phagothérapie, une étude a été menée combinant un modèle animal pour déterminer l'efficacité *in vivo* des phages, associée à une modélisation mathématique.

Pour mener à bien cette étude, une équipe a étudié les effets de l'immunité sur l'efficacité de la phagothérapie par le bactériophage PAK\_P1 dans le traitement de la pneumonie aiguë causée par *Pseudomonas aeruginosa* chez différents modèles de souris : animaux immuno-compétent, déficients en protéine MYD88 (*Myeloid Differentiation Primary Response 88*) ou déficients en lymphocytes et appauvris en neutrophiles. La protéine MYD88 est une protéine participant à la signalisation induite par les récepteurs TLR qui permettent la reconnaissance de motifs microbiens et est donc essentielle au déclenchement de la réponse immunitaire innée [64]. Ces souris déficientes en MYD88 sont donc plus sensibles à une infection par *Pseudomonas aeruginosa*.

Comme en témoigne la figure 6, la survie des animaux, après une infection respiratoire aiguë, est dépendante de leur système immunitaire. Une immunité normale permet une survie des animaux de 100 % tout au long de l'expérience, un déficit d'activation immunitaire engendre une baisse de la survie des animaux avec un taux de survie d'environ 40 % à 14 jours et un déficit.

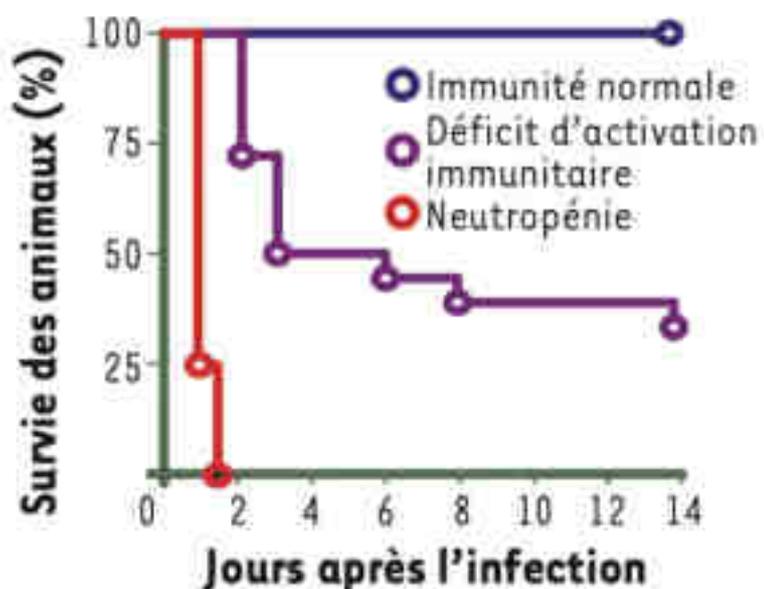
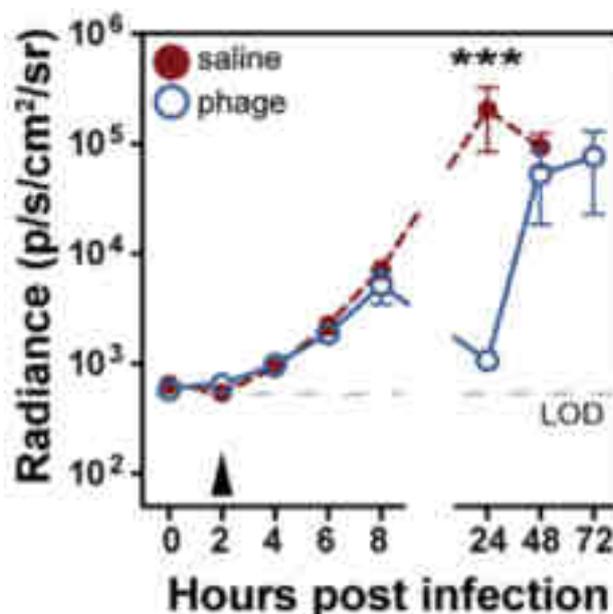


Figure 11 - Courbes de survie illustrant l'efficacité d'une phagothérapie dans différents contextes immunitaires [65].

Afin d'obtenir davantage de données et pouvoir quantifier l'infection au cours du temps, une souche de *Pseudomonas aeruginosa* bioluminescente a été utilisée. Le but était de mesurer l'intensité de lumière chez les animaux déficients en MYD88 traités par les bactériophages PAK\_P1. Il a été observé que la bioluminescence décline entre huit heures et 24 heures après infection, ce qui indique que le bactériophage est capable de réduire la charge microbienne chez la souris. Entre 24 et 48 heures, la bioluminescence augmente de nouveau sans qu'on puisse pour autant observer une nouvelle baisse d'intensité avant le décès des souris. Après analyse, il a été démontré que ces résultats étaient dus à l'apparition de bactéries résistantes au bactériophage PAK\_P1.



**Figure 12 - La phagothérapie est inefficace chez l'hôte présentant une déficience dans l'activation de l'immunité innée [66]**

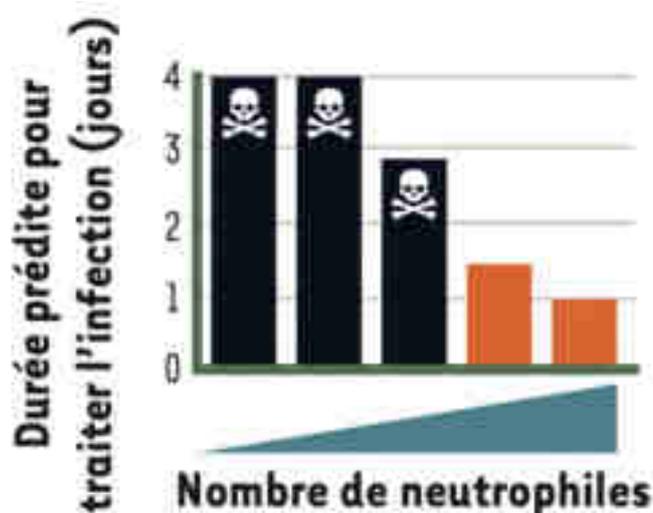
« Modèle de colonisation du pathogène bioluminescent dans les poumons de la souris représenté comme radiance moyenne (p/s<sup>2</sup>/cm<sup>2</sup>/sr) au fil du temps pour indiquer l'activité antibactérienne du phage par une brève réduction de la charge bactérienne, suivie par la croissance d'un clone résistant au phage après infection. La flèche indique le point de traitement; limite de détection de radiance *in vivo* (LOD); les barres d'erreur indiquent la SEM (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001). »

D'autres expériences ont été menées afin de déterminer les cellules impliquées dans la réponse immunitaire au traitement par bactériophages.

Chez des souris invalidées pour les gènes Rag2 (*Recombination Activating Gene 2*) et Il2rg (*Interleukin 2 Receptor gamma chain*), souris qui n'étaient donc pas en capacité de développer une réponse lymphocytaire, la réponse au traitement par phages était tout aussi efficace que chez des souris

immunocompétentes. Cette expérience a donc permis de démontrer que les cellules lymphoïdes n'ont pas d'impact dans une phagothérapie.

Chez les souris neutropéniques la phagothérapie n'a eu aucune utilité. Les neutrophiles représentent la première ligne de défense de l'organisme contre les infections [67]. Les souris neutropéniques, comme en témoigne la figure 7, ont une survie à 48 heures nulle ce qui démontre l'intérêt majeur des neutrophiles dans une réponse à la phagothérapie. Ces mêmes résultats ont été obtenus après avoir réduit la charge bactérienne de 100 fois par rapport aux souris immunocompétentes. Un pourcentage de 50 % de neutrophiles pulmonaires est estimé suffisant, après des études en silico, pour qu'une phagothérapie soit efficace.



**Figure 13 - Résultats de la simulation de l'efficacité d'une phagothérapie en fonction de la quantité de neutrophiles obtenus par modélisation in silico [65].**

Ces expériences permettent donc de démontrer l'importance de la synergie entre neutrophiles et bactériophages et, en conséquence, entre le système immunitaire et les phages [65] [66].

On peut ainsi s'interroger sur la nécessité d'inclure des critères immunologiques avant l'administration d'une phagothérapie au patient.

## 3.2.2. Systèmes de défenses des bactéries contre les phages et contournement par les phages de ces systèmes

### 3.2.2.1. Adsorption des phages

Pour pouvoir infecter une bactérie, les bactériophages passent par une première étape d'adsorption.

Les bactéries sont dotées d'une diversité importante dans la composition de leurs membranes et sont parvenues à développer des barrières pour empêcher l'absorption des bactériophages.

On distingue trois types de mécanismes : le blocage des récepteurs des bactériophages, la production d'une matrice extracellulaire et la production d'inhibiteurs compétitifs.

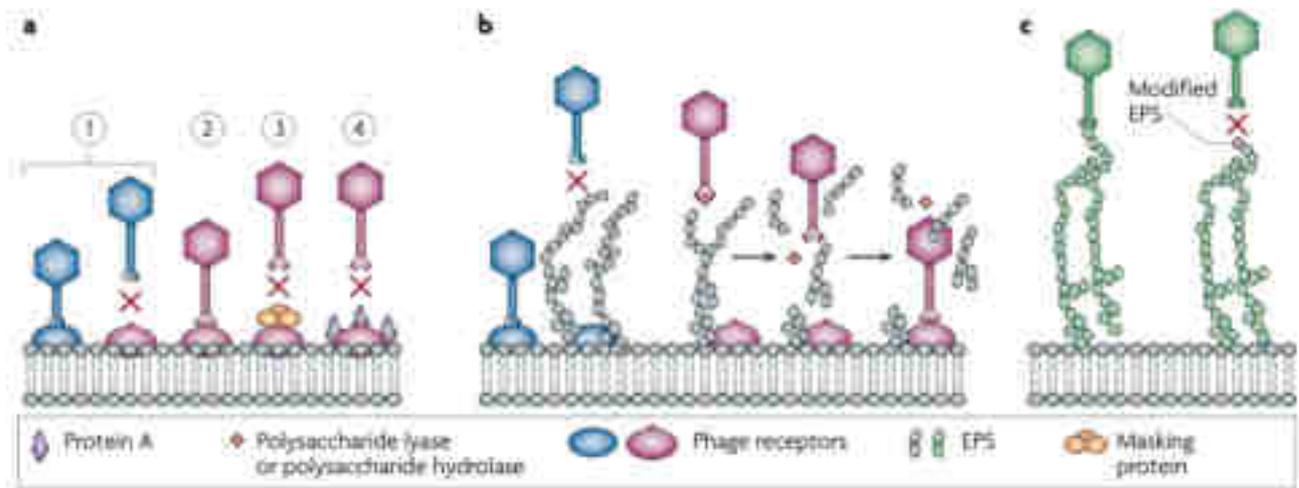
- **Blocage des récepteurs de bactériophages** : les bactéries ont la capacité d'adapter la structure de leurs récepteurs, par la production de protéines afin de ne plus être reconnues par les phages. Par exemple, pour *Staphylococcus aureus* l'adsorption des phages augmente lorsque les bactéries produisent moins de protéines A. La production par cette bactérie de ce facteur de virulence lui permet de contrer l'infection par un bactériophage par blocage du récepteur.

Le blocage des récepteurs de bactériophages peut également être permis par la présence d'exopolysaccharides qui permettent d'empêcher l'accès aux bactériophages.

- **Production de matrice extracellulaire** : ce mécanisme permet de favoriser la survie des bactéries en constituant une barrière physique entre les phages et le récepteur.

Face à ce mécanisme, les bactériophages ont mis en place des mécanismes d'échappement. La matrice extracellulaire est composée essentiellement de polysaccharides. Ainsi, une des stratégies utilisées par les phages est de produire des enzymes pouvant dégrader ces polysaccharides. Ces enzymes sont des lyases et des hydrolases dont l'action est de rompre les composants polysaccharidique de la matrice, permettant ainsi aux bactériophages de rejoindre la surface cellulaire de la bactérie.

- **Production d'inhibiteur compétitif** : FHU1, un transporteur de fer exprimé par certaines bactéries, entre en compétition avec les bactériophages qui utilisent également ce récepteur pour permettre leur adsorption par la bactérie [68].



**Figure 14 - Stratégies utilisées par les bactéries pour bloquer l'adsorption des phages.**

- (A) Échapper à l'infection par les phages à l'étape de l'adsorption. L'adsorption des phages à la surface des cellules bactériennes se produit par la reconnaissance d'un récepteur de phage à la surface. Les bactéries peuvent devenir résistantes aux phages en modifiant ces récepteurs de la surface cellulaire (étape 1) ; les phages peuvent s'adapter pour reconnaître ces nouveaux récepteurs (étape 2). Les bactéries peuvent également produire des protéines qui masquent les récepteurs des phages (étape 3). *Staphylococcus aureus* produit la protéine A, qui réduit l'adsorption des phages (étape 4).
- (B) L'adsorption des phages peut également être bloquée par la production d'exopolysaccharide (EPS), mais les phages surmontent la couche d'EPS en produisant une polysaccharide lyase ou une polysaccharide hydrolase pour cliver l'EPS.
- (C) Les phages ont également évolué pour reconnaître spécifiquement les polysaccharides tels que les antigènes O et les antigènes K.

### 3.2.2.2. Bloquer l'entrée de l'ADN phagique

Le blocage de l'entrée de l'ADN phagique est permis par les systèmes d'exclusion de la surinfection (SIE). Lorsque le bactériophage est attaché à son récepteur cellulaire sur une bactérie, il est capable d'injecter son ADN et d'utiliser la machinerie de l'hôte pour se répliquer. Le système SIE des bactéries est composé de protéines associées à la membrane et codées par le phage lui-même. Ce système permet à une bactérie d'éviter une nouvelle infection par un même type de phage.

### 3.2.2.3. Restriction/ modification de l'ADN du phage

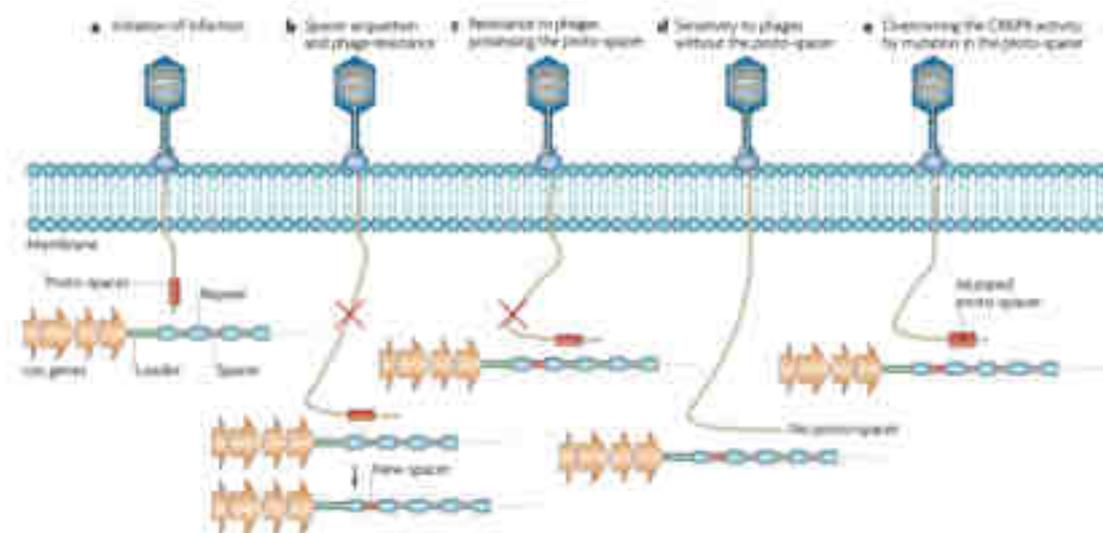
Ces systèmes de restriction / modification de l'ADN du phage sont présents chez la plupart des genres bactériens. Leur fonction est de protéger la cellule contre l'ADN envahissant y compris celui de virus comme les bactériophages. Lorsque le phage pénètre dans une cellule dotée de ce type de système, l'ADN phagique peut être reconnu par une enzyme de restriction et dégradé ou méthylé pour éviter la restriction, ce qui entraîne l'entrée du phage dans un cycle lytique. En général, l'enzyme de restriction prend le dessus et l'ADN du bactériophage est clivé.

Lorsque l'ADN du bactériophage est méthylé, les nouveaux virions deviennent insensibles à l'enzyme de restriction et infectent facilement les cellules voisines contenant le même système de restriction/modification de l'ADN.

Suite aux mécanismes de défense mis en place par la bactérie contre les bactériophages, ces derniers ont connus des mutations de leur génome permettant la suppression des sites de reconnaissance des endonucléases de restriction bactériennes. Par exemple chez le bactériophage T4, les cytosines ont été remplacées par de l'hydroxyméthylcytosine permettant d'échapper aux nucléases clivant spécifiquement les séquences contenant des cytosines. Les mécanismes de défense des bactéries et des phages ont évolué au fur et à mesure du temps. Pour contrer ce mécanisme de défense mis en place par les phages, les bactéries ont développé un autre mécanisme de défense leur permettant d'acquérir un système MDS ou *Modification Dependant Systems*. Ce mécanisme permet aux bactéries de cliver l'ADN contenant des bases hydroxyméthylcytosine. En réponse à ce mécanisme, les bactériophages ont été capables de glycosyler ces bases HMC pour contrer les systèmes MDS.

### 3.2.2.4. Système CRISPR - Cas

Le système CRISPR-Cas, «Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats» ou «courtes répétitions palindromiques regroupées et régulièrement espacées », couplés aux protéines Cas « CRISPR associated » est un système de défense de la bactérie contre les bactériophages. Ce système permet à la bactérie de garder en mémoire les infections par bactériophages en intégrant dans son génome des fragments d'ADN viral qui vont pouvoir être utilisés lors d'une seconde infection pour diriger les protéines Cas contre les bactériophages [69].



**Figure 15 - Mode d'action du système CRISPR-Cas9 [68]**



a | L'ADN du phage pénètre dans la bactérie et le cycle lytique du phage s'enclenche. La plupart des cellules bactériennes subissent une lyse à la fin du cycle lytique du phage.

b | Une petite partie des cellules infectées par le phage survivra à l'infection. Le système CRISPR d'un tel mutant insensible aux phages contient une répétition supplémentaire (dupliquée à partir du locus CRISPR) et un nouvel espaceur qui a été acquis à partir du génome du phage infectant.

c | L'unité répétition-espaceur nouvellement acquise est responsable de la résistance aux phages. Tout génome de phage entrant portant un protospacer avec 100% d'identité nucléotidique avec la nouvelle unité espaceur-répétition sera inactivé et le processus d'infection par le phage sera bloqué.

d | Ces mutants dits insensibles aux phages sont toujours sensibles aux phages qui ne possèdent pas ce protospacer spécifique dans leur génome.

e | Les mutants phagiques porteurs d'une mutation ponctuelle ou d'une délétion dans leur protospacer (ou dans le motif à côté du proto-spacer) peuvent contourner l'activité CRISPR et achever leur cycle lytique [16].

Certains bactériophages ont la capacité d'inactiver le système CRISPR-Cas grâce à la production de protéine anti-CRISPR appelé les Acrs.

### 3.2.2.5. Interruption du cycle infectieux

Le mécanisme d'interruption du cycle infectieux est appelé ABI pour « *Abortive Infection Systems* ». Lorsqu'une bactérie est infectée par un phage, le mécanisme ABI est activé, provoquant la

mort de la bactérie infectée. Cette action sacrifie la cellule infectée pour protéger le reste de la population bactérienne.

### **3.2.2.6. Interférence avec l'assemblage viral.**

Les îlots chromosomiques inductibles par des phages (PICIs, pour « *Phage-inducible chromosomal islands* ») sont une catégorie d'éléments génétiques hautement mobiles qui jouent un rôle essentiel dans le transfert génétique horizontal, l'adaptation de l'hôte et sa virulence. Lors d'une infection, ces îlots chromosomiques sont excisés, répliqués et empaquetés, perturbant ainsi le développement intracellulaire des phages. En conséquence, les capsides produites ne permettent pas l'encapsidation d'un génome viral fonctionnel.

### **3.2.2.7. Le système BREX**

BREX, pour « bacteriophages exclusion » est un système de défense permettant l'absorption du bactériophage et l'intégration de son ADN dans la bactérie, mais empêche ensuite sa réplication.

## **3.3 La phagothérapie en pratique**

### **3.3.1. Aspects réglementaires**

En France, un médicament est défini comme une « substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou pouvant lui être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier ses fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » [70]. Les bactériophages, répondant à cette définition, sont considérés comme des médicaments. Leur mise sur le marché serait donc possible uniquement après des essais cliniques avec un produit standardisé pour permettre des résultats contrôlables et quantifiables. Mais une préparation de bactériophages est un traitement personnalisable ne fonctionnant, généralement, spécifiquement que pour un patient et une pathologie donnée. Ceci rend difficile la tenue d'essais cliniques contrôlés randomisés nécessaires pour prétendre ensuite à une AMM.

Par ailleurs, le modèle économique des bactériophages n'intéresse pas les industries pharmaceutiques du fait de la nature des phages. En plus de constituer des traitements personnalisables ne permettant pas une production de masse, les phages ne sont pas brevetables en tant que tels, mais

seulement le procédé de sélection et le cocktail utilisé le sont. En France, les bactériophages font donc surtout l'objet de recherches académiques, ce qui ne permet pas de traiter un nombre suffisant de patients pour apporter des preuves suffisantes de leur innocuité et de leur efficacité [71].

Pour parvenir au développement de l'usage de la phagothérapie en France, deux alternatives sont envisagées pour permettre une utilisation sous un cadre juridique adapté :

- Créer un statut juridique spécifique
- Adapter le statut de « médicament » aux spécificités des phages pour caractériser leur action et leur balance bénéfice / risque [71].

A l'heure actuelle, l'utilisation des bactériophages est limitée aux essais cliniques et à un accès compassionnel autorisé par l'ANSM depuis 2022 à deux bactériophages anti-*Staphylococcus aureus* (PP1493 et PP1815) pour le traitement d'infections osseuses et ostéo-articulaires graves documentées à *Staphylococcus aureus*.

### **3.3.2. Préparation magistrale d'une suspension de bactériophage**

En France, il n'existe pas de collection de bactériophages, ou phagothèques. Généralement, les bactériophages sont trouvés dans les eaux usées comme les égouts ou dans divers cours d'eau (rivières, fleuves, etc).

La préparation des bactériophages consiste ensuite en quatre étapes successives : la propagation, la purification, la numérotation et le contrôle.

L'étape de propagation permet de sélectionner les éléments que l'on souhaite conserver dans l'échantillon d'eau prélevée. En effet, l'échantillon récupéré contient en plus des bactériophages de nombreux autres micro-organismes. La propagation se déroule comme suit :

1. Centrifugation et décantation. Les bactériophages se retrouvent dans le surnageant.
2. Filtration pour éliminer les bactéries : la solution contient alors les bactériophages voulus et non voulus.
3. Mise en présence d'une suspension de bactériophages avec la bactérie pathogène dans un milieu liquide.
4. Incubation quelques heures à 35° permettant la propagation des bactériophages recherchés.
5. Ajout de chloroforme permettant de stopper et de détruire les éventuelles bactéries résiduelles. L'usage de chloroforme n'a pas d'impact sur les bactériophages.
6. Centrifugation, puis filtration de nouveau pour éliminer les débris bactériens.

Cette étape de propagation permet de sélectionner le ou les bactériophages capables d'attaquer la bactérie pathogène. Pour s'assurer de l'efficacité des bactériophages sélectionnés, on peut déposer une goutte de cette préparation sur une boîte de Pétri.

Ensuite, pour isoler les différentes variétés de bactériophages, on procède à une étape de purification. La purification consiste à cloner les bactériophages, les séparer pour n'étudier que les descendants ayant la même origine. Les étapes de purification sont :

4. Dilution de la préparation précédente, de manière à obtenir une dispersion de bactériophages isolés.
5. Étaler les dilutions sur une boîte de Pétri comportant la bactérie cible : après incubation, les plages de lyses, correspondant chacune à un clone de bactériophage, apparaîtront.
6. Sélectionner un ou plusieurs phages, les prélever et les propager en répétant des étapes de propagation.
7. Répéter ses étapes jusqu'à obtenir un bon résultat de clonage. Généralement, deux ou trois répétitions suffisent.

Une fois notre suspension obtenue, on peut procéder à la numération de nos échantillons afin de connaître le nombre de bactériophages actifs contenus dans notre préparation. On estime qu'il est nécessaire d'avoir un titre supérieur ou égal à  $10^7$  UFP/ mL pour que la suspension soit efficace.

Enfin, avant d'appliquer les bactériophages au patient, il est nécessaire d'effectuer des contrôles. Cette étape permet de connaître les caractéristiques de la préparation, telles que l'activité et le nombre de particules virales actives. Plusieurs techniques peuvent être utilisées pour cette étape.

Pour étudier la sensibilité d'une bactérie aux phages, on peut utiliser ce qu'on appelle un antiphagogramme. Le principe de cet outil est le même que celui de l'antibiogramme : on dépose un tapis de bactéries sur une gélose en boîte de Pétri, auquel on ajoute une goutte de chaque suspension phagique à la place des disques de papier buvard habituel. On laisse incuber quelques heures puis on peut observer des trous dans le tapis bactérien qui témoignent de l'activité lytique des phages. Le bacteriophagogramme correspondra ensuite au rapport de l'ensemble des activités.

Une autre méthode de caractérisation est ce qu'on appelle la lysotypie. Elle permet de prouver l'identité ou la différence de plusieurs souches bactériennes d'une même espèce. La lysotypie est un test phénotypique qui va permettre de déterminer la sensibilité des bactéries à un panel de bactériophages.

Si le profil de sensibilité d'une bactérie diffère en fonction des bactéries. Cela signifie que les deux bactéries appartiennent à des clones différents.

Dans la même idée, on peut utiliser ce qui s'appelle la ribotypie, qui consiste ici en un test génotypique, basé sur le même principe que la lysotypie mais il est plus long à réaliser et plus coûteux.

### **3.3.3. Pharmacologie appliquée aux bactériophages**

La pharmacologie est la science qui étudie les médicaments. Elle englobe différents aspects, dont :

- La pharmacocinétique qui étudie le devenir du médicament dans l'organisme
- La pharmacodynamique qui étudie les effets du médicament sur l'organisme

#### **3.3.3.1. Pharmacocinétique**

Peu de recherches traitent de l'absorption des bactériophages chez l'homme. Ainsi, les données sont aujourd'hui insuffisantes pour avoir une connaissance parfaite du devenir des bactériophages dans l'organisme.

La pharmacocinétique correspond à la capacité d'un médicament à atteindre une concentration suffisante au niveau des tissus cibles pour obtenir des effets pharmacodynamiques. La pharmacocinétique se divise en quatre composantes :

- L'absorption
- La distribution
- La métabolisation
- L'élimination

Ces quatre composantes vont aboutir à la réduction ou à l'augmentation de la concentration des bactériophages.

#### **3.3.3.2. Absorption**

L'absorption correspond à l'ensemble des phénomènes permettant aux bactériophages d'être transférés depuis leur site d'administration jusqu'à la circulation sanguine.

En 1987, une étude a été réalisée montrant la présence de bactériophages dans le sang de deux patients après 10 jours de traitement par phagothérapie orale. D'autres travaux ont exploré le passage des bactériophages à travers la barrière gastro-intestinale. Ce processus, appelé translocation phagique, peut varier en durée, de quelques minutes à plusieurs jours selon les recherches [72].

Néanmoins, l'acidité gastrique limite l'assimilation par voie orale des bactériophages. Ainsi, la dose efficace à absorber par voie orale pour avoir un effet thérapeutique est indéterminée.

D'autres modes d'administration sont donc à envisager afin de permettre une meilleure absorption des bactériophages.

On peut, par exemple, envisager des administrations par injection intramusculaire ou intraveineuse, mais dans ce cas, il faut contrôler l'absence d'endotoxine dans les échantillons.

Une étude de 1965 a également révélé que l'administration intra rectale de phages entraînait une concentration de phages dans le sang aussi élevée que celle obtenue par une injection intramusculaire, mais de manière plus rapide.

Actuellement, les bactériophages sont surtout utilisés dans des traitements topiques (cf. 4.), ce qui permet de se passer de cette étape d'absorption [30] [72].

### **3.3.3.3. Distribution**

La distribution regroupe l'ensemble des étapes permettant le transport des bactériophages dans les différents tissus et organes. Elle détermine la concentration des bactériophages dans le sang, et dans les tissus cibles où ils exerceront leurs effets thérapeutiques.

Les mécanismes intervenant dans la distribution des bactériophages dans l'organisme sont encore mal connus. Certains auteurs suggèrent qu'il y aurait une possible liaison entre les bactériophages et les érythrocytes quand d'autres estiment le contraire.

Selon des études russes, suite à l'administration orale de bactériophages à des animaux de laboratoire, la présence de bactériophages dans la circulation sanguine a été constatée deux à quatre heures après, puis dix heures après dans de nombreux organes comme le foie. Une étude menée par Nungester et Watrous a également permis de démontrer que deux heures après une injection intraveineuse de bactériophages à des rats, la rate et le foie concentrent une plus grande quantité de bactériophages que le sang. Une autre étude a permis de démontrer que, lors de l'injection intrapéritonéale de bactériophages, ceux-ci se multiplient au niveau du lieu de l'infection [30] [73].

### 3.3.3.4. Métabolisation

La métabolisation regroupe les différentes transformations enzymatiques que va subir le bactériophage au niveau des différents organes pour mener à la formation d'une substance hydrosoluble plus facilement éliminable. Cette étape permet également la formation de métabolites actifs et inactifs ou toxiques. En 1933, Evans a montré que l'effet antibactérien des bactériophages était inhibé lorsque ceux-ci étaient en contact avec du sang, du pus, de la bile ou de la salive. Ces résultats suggèrent que les bactériophages sont inactivés *in vitro* [74].

Face à ces travaux, l'utilisation des bactériophages a été remise en cause, les scientifiques estimant que les bactériophages étaient trop fragiles *in vivo* et que l'effet antibactérien était dû non pas aux bactériophages, mais aux débris bactériens toujours présents dans les préparations [75].

Une autre étude menée en 1987, a permis de démontrer que les bactériophages sont inactivés au niveau gastrique en raison de trois phénomènes :

- L'acidité gastrique
- La présence d'anticorps spécifiques dirigée contre les bactériophages apparus suite à la rencontre antérieure avec les mêmes bactériophages. Un hôte dit « naïf » peut présenter des anticorps anti-phage avant même l'administration de phages, du fait de l'omniprésence des phages dans la nature [76].
- La température [77]

La compréhension du mécanisme de métabolisation chez les bactériophages et donc difficilement abordable du fait de l'intervention du système immunitaire.

### 3.3.3.5. L'élimination

L'élimination correspond à l'étape finale du devenir des bactériophages dans l'organisme. Selon plusieurs études, l'élimination des bactériophages se ferait dans l'urine ou dans les fèces.

L'élimination des bactériophages se ferait sur une période plus ou moins longue, les phages pouvant persister jusqu'à plusieurs jours dans l'organisme.

L'excrétion, si elle permet de diminuer la concentration des bactériophages dans l'organisme, pourrait également être mise à profit dans les infections urinaires car elle permet également d'augmenter la concentration de bactériophages dans la vessie [78] [79].

### 3.3.3.4. Pharmacodynamie

#### 3.3.3.4.1. Efficacité des bactériophages

L'efficacité des bactériophages peut être mesurée à partir de la réduction du nombre de bactéries, au niveau du site infectieux ou en terme d'amélioration des signes et symptômes cliniques.

L'efficacité des bactériophages repose sur leurs effets anti-infectieux et donc sur l'action bactéricide des bactériophages. L'action bactéricide est permise par le phénomène de lyse bactérienne tel que décrit précédemment.

Par ailleurs, il a été démontré qu'un seuil minimal de densité bactérienne était nécessaire afin de permettre la prolifération des bactériophages au sein du site infectieux.

L'efficacité des bactériophages repose également sur leur capacité à agir sur les biofilms bactériens. Un biofilm bactérien est une organisation tridimensionnelle et multicellulaire de bactéries créée en réponse à des conditions de vie hostile. La formation d'un biofilm permet aux bactéries de résister à la fois aux réponses immunitaires et aux antibiotiques du fait du caractère infranchissable de cette barrière physique.

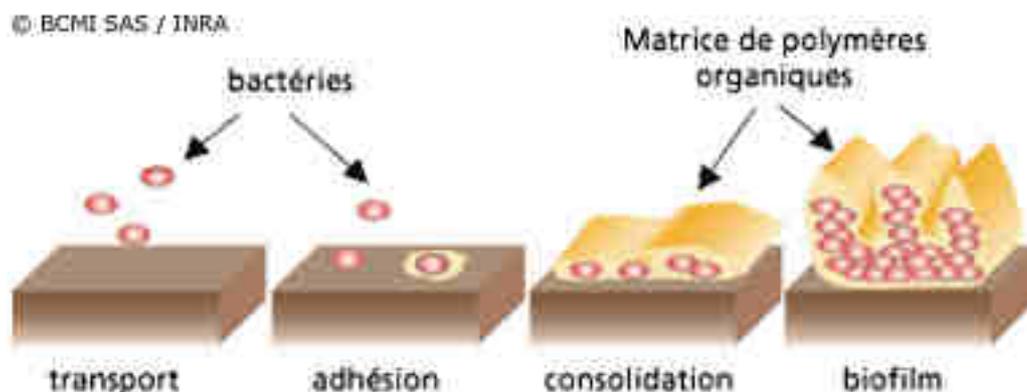


Figure 16 - Formation d'un biofilm [80]

Par exemple, lors d'une infection bactérienne chronique, les antibiotiques vont avoir un effet uniquement sur les bactéries circulantes et non sur les bactéries présentes à l'intérieur du biofilm. Ces dernières serviront ainsi de point de départ pour de nouvelles infections. En 1971, une étude a démontré que les bactériophages de *Escherichia coli* sont capables de synthétiser des enzymes spécifiques appelées les glycanases, qui vont induire la lyse de ces biofilms. Ces enzymes sont sécrétées lorsque le bactériophage se lie aux récepteurs secondaires présents au niveau de la capsule polysaccharidique du

biofilm. Les bactériophages sont ensuite en capacité de diffuser à travers le biofilm bactérien grâce à leurs propriétés enzymatiques.

#### **3.3.3.4.2. Sécurité**

La pratique actuelle de la phagothérapie n'entraîne que rarement des effets secondaires plutôt mineurs. Le risque avec les bactériophages est lié au fait qu'ils interagissent également avec des tissus non ciblés : ceci pourrait entraîner des conséquences non favorables comme c'est le cas pour les chimiothérapies conventionnelles.

À l'heure actuelle, la seule préoccupation concernant l'utilisation des bactériophages en thérapeutique est leur capacité à augmenter la pathogénicité des bactéries de l'hôte. Par exemple, les bactériophages tempérés ne doivent pas être utilisés à des fins thérapeutiques, en raison de leur lysogénie. Cette propriété confère aux bactériophages la capacité d'incorporer leur génome dans celui des bactéries qu'ils infectent, au lieu de tuer immédiatement la bactérie et de se multiplier.

La lysogénie résultant de l'intégration du génome phagique dans le chromosome bactérien pose 4 problèmes majeurs :

- La bactérie infectée ne meurt pas à la suite de l'infection
- Les bactéries deviennent résistantes aux bactériophages qui les ont infectés
- Les bactériophages, en modifiant le phénotype bactérien, permettent à ces derniers d'accroître leur virulence.
- Les bactériophages vont capter des gènes des bactéries qu'ils infectent et peuvent les transférer à des bactéries infectées ultérieurement sans les tuer.

**Partie 4**

**Utilisation actuelle des  
bactériophages et  
perspectives en clinique**

## 4. Utilisation actuelle des bactériophages et perspectives en clinique

### 4.1 Recherches et études cliniques

#### 4.1.1. Essai PhagoBurn pour les grands brûlés [81]

##### 4.1.1.1. Présentation et objectifs de l'étude

L'étude présentée ici découle du projet PhagoBurn qui s'inscrit dans le cadre d'un projet collaboratif européen. Son objectif est de comparer l'efficacité et la tolérabilité d'un cocktail de bactériophages lytiques ciblant *Pseudomonas aeruginosa* aux thérapies conventionnelles traitant une infection locale chez les patients gravement brûlés. L'intérêt majeur de cette étude est d'évaluer l'efficacité de la phagothérapie pour ces patients. Chez cette population, la morbidité et la mortalité liées aux brûlures sont exacerbées en raison d'infections des plaies qui peuvent entraîner des septicémies.

##### 4.1.1.2. Méthodologie

L'étude PhagoBurn est un essai clinique randomisé de phase 1/2 incluant des patients adultes recrutés dans neuf centres spécialisés dans le traitement des brûlures situés en France et en Belgique. Ces patients présentaient une infection confirmée par *Pseudomonas aeruginosa* au niveau de leur brûlure. Une plaie est considérée infectée par *Pseudomonas aeruginosa* si cette infection est confirmée par culture sur écouvillon, accompagnée ou non de signes généraux, et répondant à des critères cliniques d'infection tels que l'inflammation, la présence de pus, un retard de cicatrisation, une réouverture de la plaie, un débridement spontané, etc.

Durant la période de recrutement, de nouveaux critères d'éligibilité ont été ajoutés, parmi lesquels :

- Le score d'évaluation de la défaillance séquentielle des organes (*Sequential Organ Failure Assessment* ou SOFA) ne doit pas augmenter de plus de 2 points durant les 48 heures précédant l'inclusion du patient dans l'étude. Ce score est un outil clinique permettant d'évaluer la fonction des différents organes chez les patients en état critique ou hospitalisés en unité de soins intensifs. Chacun des 6 organes ou systèmes est évalué selon un score allant de zéro à quatre, basé sur des critères spécifiques : zéro indique une fonction normale et quatre une défaillance sévère.
- Les plaies peuvent également être colonisées marginalement par d'autres espèces bactériennes. Au début de l'étude, seuls les patients présentant une monoinfection par *Pseudomonas aeruginosa* étaient éligibles.

Chacun des 27 participants a reçu un des deux traitements suivants :

- Un cocktail de 12 bactériophages lytiques ciblant *Pseudomonas aeruginosa* appelé PP1131.
- Le traitement standard : une crème contenant de la sulfadiazine d'argent à 1 %.

Ces traitements ont été administrés sous forme topiques pendant 7 jours, suivis d'une période d'observation de 14 jours. En raison des différences visuelles entre les traitements, les cliniciens savaient quel traitement était administré à chaque patient. Cependant, les microbiologistes analysant les échantillons et les patients ignoraient le groupe auquel ils appartenaient.

Certains patients ont reçu, en complément du traitement topique, une antibiothérapie conforme aux recommandations de la Société Francophone de Brûlologie, sur une durée de 7 jours, dont seul le médecin traitant était informé.

L'évaluation de l'efficacité de ces traitements repose sur le temps médian nécessaire pour obtenir une réduction durable de la charge bactérienne d'au moins deux quadrants, selon la méthode d'ensemencement des quatre quadrants. Cette technique consiste à disperser les micro-organismes sur une boîte de Pétri dans le but d'obtenir des colonies distinctes.

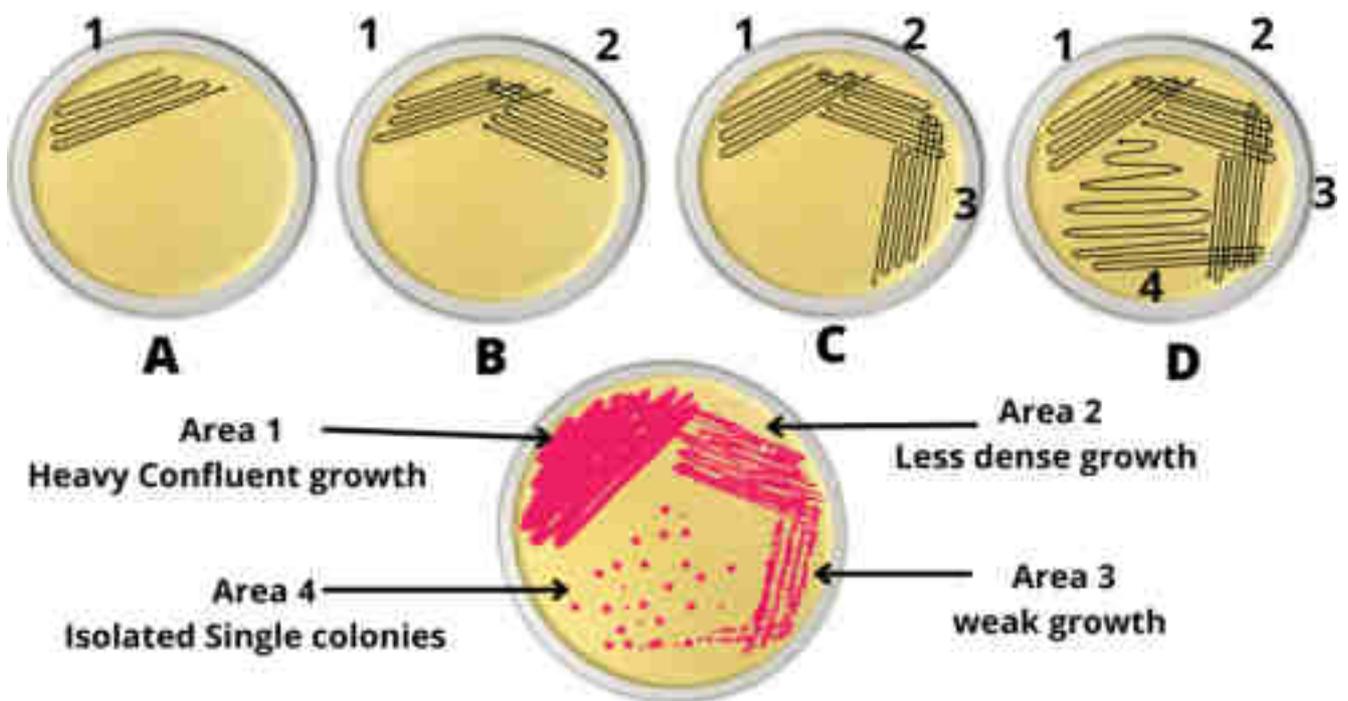
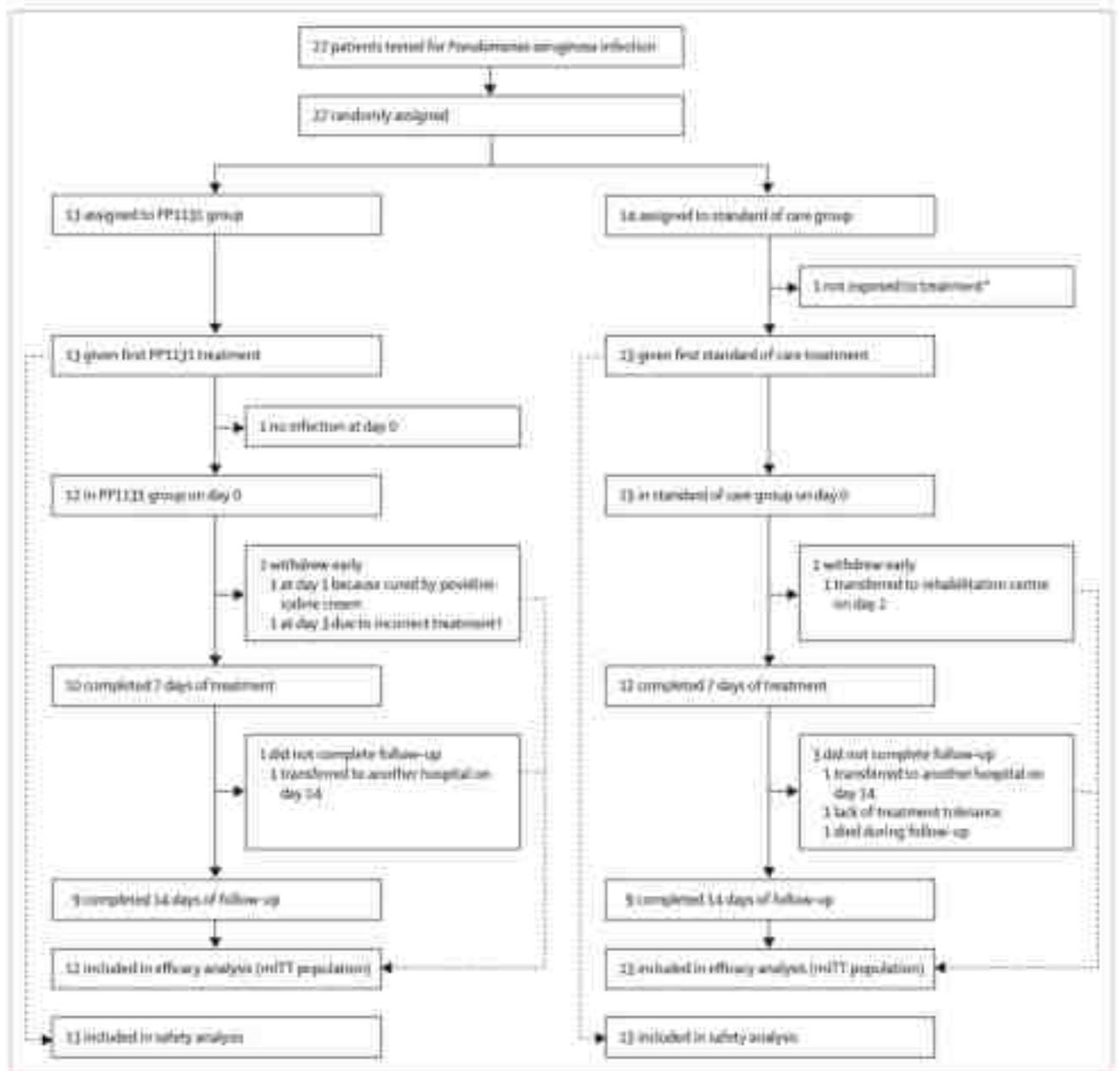


Figure 17 - Technique d'ensemencement des 4 quadrants



**Figure 18 - Profil de l'essai.**

« La population de sécurité comprend les participants qui ont reçu au moins un pansement. La population mITT comprend tous les patients de la population de sécurité présentant une infection microbiologiquement documentée au jour 0. mITT = intention de traiter modifiée.

PP1131 = cocktail de 12 bactériophages lytiques naturels anti-Pseudomonas aeruginosa.

\*Patient randomisé le jour de la suspension de l'essai (2 janvier 2016).

†Patient a été exposé au traitement pour une étude clinique différente. »

### **4.1.1.3. Présentation du cocktail de phages**

Le cocktail de phages, appelé PP1131, est constitué de 12 bactériophages lytiques ciblant *Pseudomonas aeruginosa*. Il a été élaboré et qualifié par le laboratoire Pherecydes Pharma. Tous les bactériophages inclus dans ce cocktail sont naturels. Ils ont été isolés à partir des eaux usées d'un hôpital, puis purifiés.

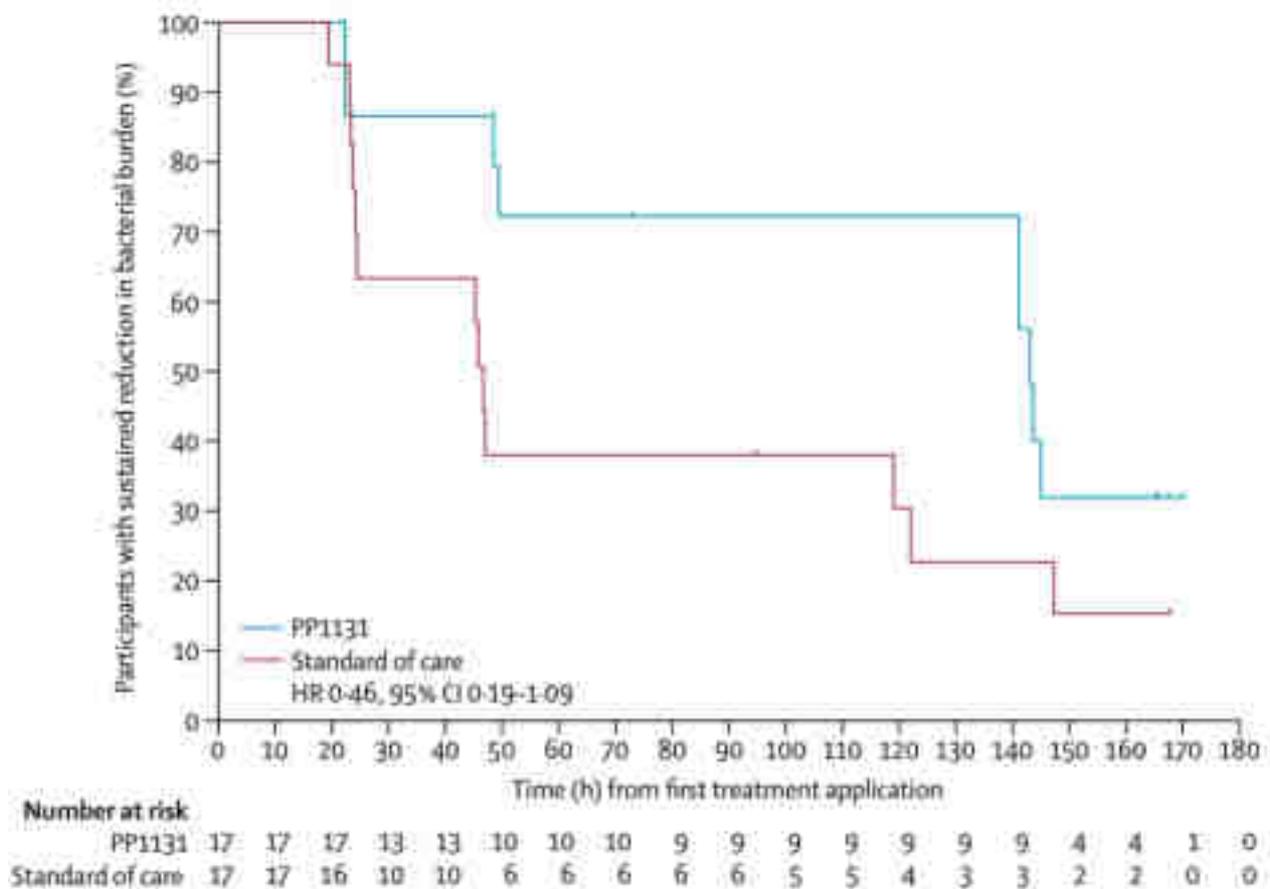
Ils appartiennent aux familles des Podoviridae ou des Myoviridae et ont été caractérisés par phénotypage et génotypage. La production du cocktail a ensuite été réalisée par la société Clean Cells, en suivant les Bonnes Pratiques de Fabrication. Un unique lot de ce cocktail a été employé pour l'étude.

Le titre global des phages, par flacon, a été établi à  $1 \times 10^9$  unités formatrices de plaques (UFP) par ml, et la concentration de chaque phage représente un douzième de cette concentration.

### **4.1.1.4. Résultats obtenus**

Les critères d'évaluation étaient les suivants :

- Le temps nécessaire pour obtenir une réduction durable de la charge bactérienne de deux cadrans ou plus ;
- L'évolution de la charge bactérienne pour toutes les plaies infectées ;
- L'évolution des critères cliniques de la Société Francophone de Brûlologie ;
- L'indication moment d'introduction du traitement antibiotique systémique ayant une activité sur *Pseudomonas aeruginosa* ;
- L'incidence et timing du premier diagnostic d'une nouvelle infection bactérienne intervenant lors des sept jours de traitement ;
- Les raisons pour lesquelles les participants se sont retirés de l'étude.



**Figure 19 : Temps nécessaire pour observer une réduction de la charge bactérienne pour toutes les zones**

Analyse de Kaplan-Meier du temps médian nécessaire pour obtenir une réduction semi-quantitative soutenue de deux quadrants ou plus de la charge bactérienne quotidienne par rapport au jour 0 pour toutes les plaies.

HR = rapport de risque.

PP1131 = cocktail de 12 bactériophages lytiques naturels anti-*Pseudomonas aeruginosa*.

Selon le premier critère mentionné, le temps pour réduire la charge bactérienne était plus long avec le cocktail de bactériophages (médiane 144h) comparé au traitement standard (47h). Au 7e jour, 50% du groupe ayant suivi la phagothérapie avait atteint ce critère contre 85% dans le groupe témoin. À 21 jours, lors de la période de suivi, 76% du groupe témoin avait obtenu des résultats positifs contre 53% du groupe PP1131.

Ainsi, la charge bactérienne quotidienne dans la plaie a été réduite de deux quadrants ou plus chez la moitié des participants traités par phagothérapie. Cependant, le délai pour parvenir à ce résultat était nettement plus long pour les participants du groupe expérimental que pour ceux suivant le traitement standard.

Parmi les critères secondaires, deux différences ont été notées :

- Au jour 14, 43% des participants du groupe PP1131 avaient du pus dans leurs plaies contre 100% du groupe standard.
- Concernant les plaies ouvertes, 29% des participants du groupe PP1131 avaient des plaies ouvertes contre 88% du groupe standard.

Un traitement antibiotique suivant les recommandations de la Société Francophone de Brûlologie a été administré à 17% des patients du groupe PP1131 et 38% du groupe standard,

En ce qui concerne les effets secondaires, 38% du groupe PP1131 et 54% du groupe standard en ont rapporté. Un décès non lié au traitement a été enregistré dans chaque groupe après le 21<sup>e</sup> jour.

En conclusion, la phagothérapie avec PP1131 permet une réduction de l'infection bactérienne, mais elle semble moins efficace que le traitement standard à base de sulfadiazine d'argent.

	PF1331 (n=43)	Standard of care (n=43)
All	3 (7%)	7 (16%)
<b>Blood and lymphatic system disorders</b>		
All	0	1 (2%)
Neutropenia	0	1 (2%)
<b>General disorders and administration site conditions</b>		
All	1 (2%)	2 (5%)
Hypertension	1 (2%)	1 (2%)
Impaired healing	0	1 (2%)
<b>Infections</b>		
All	3 (7%)	6 (14%)
Bacteraemia	1 (2%)	1 (2%)
Bronchitis	0	1 (2%)
Ear infection	1 (2%)	0
Fungal infection	0	1 (2%)
Pneumonia	0	1 (2%)
Pseudomonas sepsis	1 (2%)	0
Pseudomonas infection	0	1 (2%)
Septic shock	0	3 (7%)
Vein-graft infection	0	2 (5%)
Superinfection	1 (2%)	0
Urinary tract infection	1 (2%)	0
<b>Procedural complications</b>		
All	0	1 (2%)
Post-procedural haemorrhage	0	1 (2%)
<b>Investigations</b>		
All	1 (2%)	0
Oxygen saturation decreased	1 (2%)	0
<b>Renal and urinary disorders</b>		
All	1 (2%)	0
Haematuria	1 (2%)	0
Haemorrhage urinary tract	1 (2%)	0
<b>Respiratory, thoracic, and mediastinal disorders</b>		
All	1 (2%)	1 (2%)
Hypoxia	1 (2%)	0
Lung disorder	0	1 (2%)
<b>Skin and subcutaneous tissue disorders</b>		
All	0	1 (2%)
Urticaria	0	1 (2%)
<b>Vascular disorders</b>		
All	0	1 (2%)
Haemorrhagic shock	0	1 (2%)

Data are n (%). PF1331-cocktail of 12 natural lytic anti-Pseudomonas aeruginosa bacteriophages

Figure 20 - Effets indésirables observés chez la population saine

#### 4.1.1.5. Problèmes soulevés par cette étude

L'un des principaux défis rencontrés au cours de cette étude concernait la fabrication du cocktail de bactériophages en conformité avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Initialement estimée

à 14 mois, la fabrication du cocktail a finalement pris 25 mois, réduisant ainsi le temps alloué à l'étude clinique elle-même.

De plus, l'étude a dû être interrompue pendant cinq mois à la suite de la découverte d'une instabilité du cocktail de phages. Il a ensuite été constaté que bien que la concentration ait chuté de  $1 \times 10^9$  PFU/mL à  $1 \times 10^6$  PFU/mL, le titre des phages est resté stable pendant l'étude.

Ces défis en matière de stabilité ont conduit à l'administration d'une dose de phages actifs qui était entre 1 000 et 10 000 fois inférieure à la dose initialement prévue. Associée à une charge bactérienne élevée dans le groupe PP1131, cette faible dose a résulté en une multiplicité de l'infection extrêmement basse (1:10 000) au niveau de la plaie.

Cette réduction de dose pourrait également expliquer l'absence d'effets indésirables majeurs.

De plus, un critère d'inclusion initial était une monoinfection à *Pseudomonas*, ce qui a limité le nombre de patients éligibles à l'étude. Au final, seuls 27 patients ont été randomisés, créant un écart considérable par rapport au plan d'analyse statistique initial et compromettant la puissance de l'étude.

Il est également important de souligner que malgré la randomisation, il y a eu des disparités entre les groupes. Globalement, le groupe expérimental était constitué de patients moins gravement brûlés, plus âgés, et présentant une charge bactérienne plus importante que le groupe standard.

Un autre élément à prendre en compte est l'utilisation d'une interface d'alginate avant l'application du cocktail de phages sur la plaie. Bien que les tests *in vitro* n'aient pas montré d'impact de celle-ci sur la libération des bactériophages, elle pourrait avoir influencé les résultats en piégeant potentiellement les phages.

On peut également noter qu'aucune évaluation de la sensibilité des bactéries pathogènes au cocktail de phages n'a pas été réalisée avant de commencer le traitement.

#### **4.1.1.7. Conclusion**

Cette étude est le premier essai clinique démontrant une réduction pertinente de la charge bactérienne lors d'une application topique de bactériophages.

Elle cible le traitement des infections de plaies dues à des brûlures graves, une des principales causes de morbidité et de mortalité après un traumatisme. Ces infections sont souvent provoquées par des bactéries multirésistantes.

Toutefois, bien que prometteurs, les résultats n'ont pas été aussi concluants qu'espéré. Cette étude démontre qu'il est impératif d'orienter les recherches futures vers la production de cocktails de phages plus stables. Elle met en évidence la complexité et les défis associés au développement de cette nouvelle approche thérapeutique.

Même si cette étude n'a pas prouvé l'efficacité absolue de la phagothérapie, elle sert néanmoins de première preuve de concept en faveur de cette approche [82].

#### **4.1.2. Procédure PhagoDAIR pour le traitement des infections ostéoarticulaires [83]**

##### **4.1.2.1. Présentation de la procédure PhagoDAIR**

La procédure PhagoDAIR repose sur l'utilisation de bactériophages lors de la procédure « Debridement Antibiotics and Implant Retention », signifiant en français « Débridement, Antibiotiques et Conservation de l'Implant ». L'intérêt de cette procédure serait de combiner les avantages du traitement conventionnel, à savoir la chirurgie et les antibiotiques, aux bactériophages, pour traiter efficacement les infections de prothèse articulaire.

L'infection de la prothèse articulaire, ou IPA, est une complication grave des arthroplasties, majoritairement liée à *Staphylococcus aureus* (dans 60% des cas [84]). C'est une bactérie qui est une forte productrice de biofilm, facilitant sa persistance à la surface d'un implant.

Généralement, la stratégie utilisée chez les patients présentant une IPA chronique consiste à retirer la prothèse afin d'éradiquer le biofilm. Néanmoins, chez certains patients, cette procédure n'est pas réalisable, notamment chez les personnes âgées, avec de nombreuses comorbidités, et qui présentent un risque d'une perte de fonction importante, une réduction du stock osseux, une fracture ou un risque de décès. Chez ces patients, la procédure DAIR est à privilégier, mais le risque de rechute reste élevé en raison de la persistance du biofilm à la surface de l'implant, même si un traitement antibiotique suppressif y est combiné.

Dans ce contexte, la phagothérapie a le potentiel d'être utilisée en synergie avec les antibiotiques lors de cette procédure.

Afin d'illustrer le potentiel de cette stratégie, je m'appuierai sur un rapport présentant la procédure PhagoDAIR utilisée chez trois patients présentant une IPA récidivante du genou à *Staphylococcus aureus*

et dans un contexte d'impasse thérapeutique. Ce rapport a permis de soutenir la mise en place de l'essai clinique PhagoDAIR. L'étude PhagoDAIR est une étude multicentrique randomisée, non comparative et en double aveugle qui porte sur l'utilisation de la phagothérapie dans le traitement des infections à *Staphylococcus aureus* de prothèse de la hanche ou du genou. Les résultats de cette étude n'ont pas encore été publiés.

#### **4.1.2.2. Méthodologie**

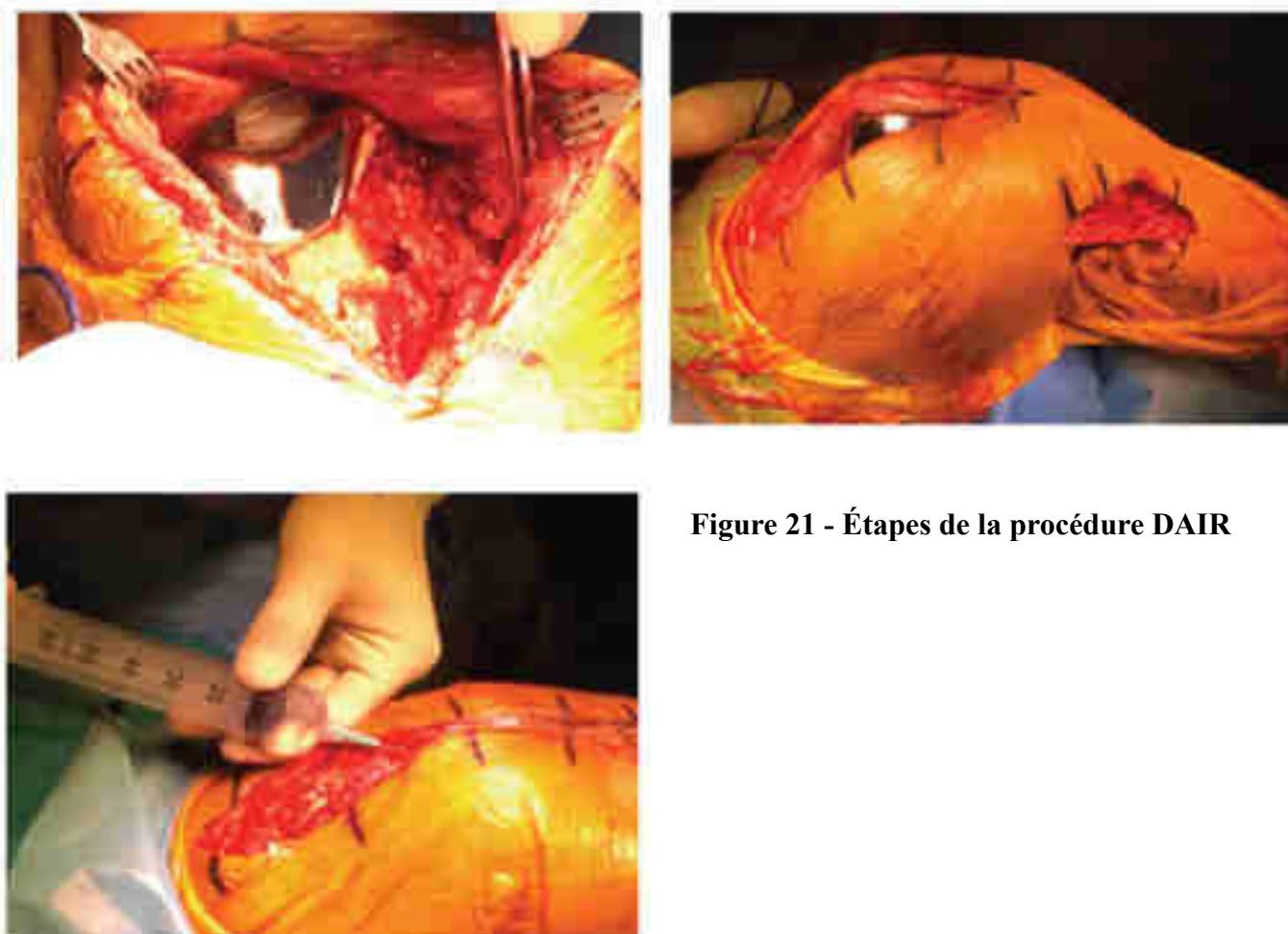
Les trois cas présentés dans le rapport ont fait l'objet d'une réunion multidisciplinaire et d'une étude par l'ANSM, afin de s'assurer qu'aucune autre option thérapeutique ne pouvait être proposée aux patients, sans risque de perte de fonction majeure ou de décès. Avant la chirurgie, un phagogramme a été réalisé en utilisant deux types de techniques complémentaires :

- Test de plaque spot permettant de déterminer la sensibilité d'une souche bactérienne à différents bactériophages ou à différentes dilutions d'un même cocktail de phages.
- Test cinétique qui permet d'évaluer la croissance bactérienne en présence de bactériophages [85].

Ces tests ont permis d'évaluer l'activité et l'efficacité des bactériophages sur des souches bactériennes prélevées lors de ponctions articulaires.

Après ces tests, l'intervention chirurgicale avec la procédure DAIR est menée. La chirurgie commence par une excision des marges de la plaie, puis le chirurgien, retire les tissus nécrotique et autres débris autour de la prothèse. Au cours de l'opération des échantillons sont récoltés pour culture et examen histologique. L'intégrité de la prothèse est ensuite évaluée. Tous les composants modulaires sont retirés et remplacés permettant de limiter la source d'infection.

Suite à l'intervention, les patients ont été traité avec des antibiotiques pendant six à 12 semaines. Ils ont ensuite été suivi. Les patients 1, 2 et 3 ont été suivi respectivement 7, 11 et 30 mois.



**Figure 21 - Étapes de la procédure DAIR**

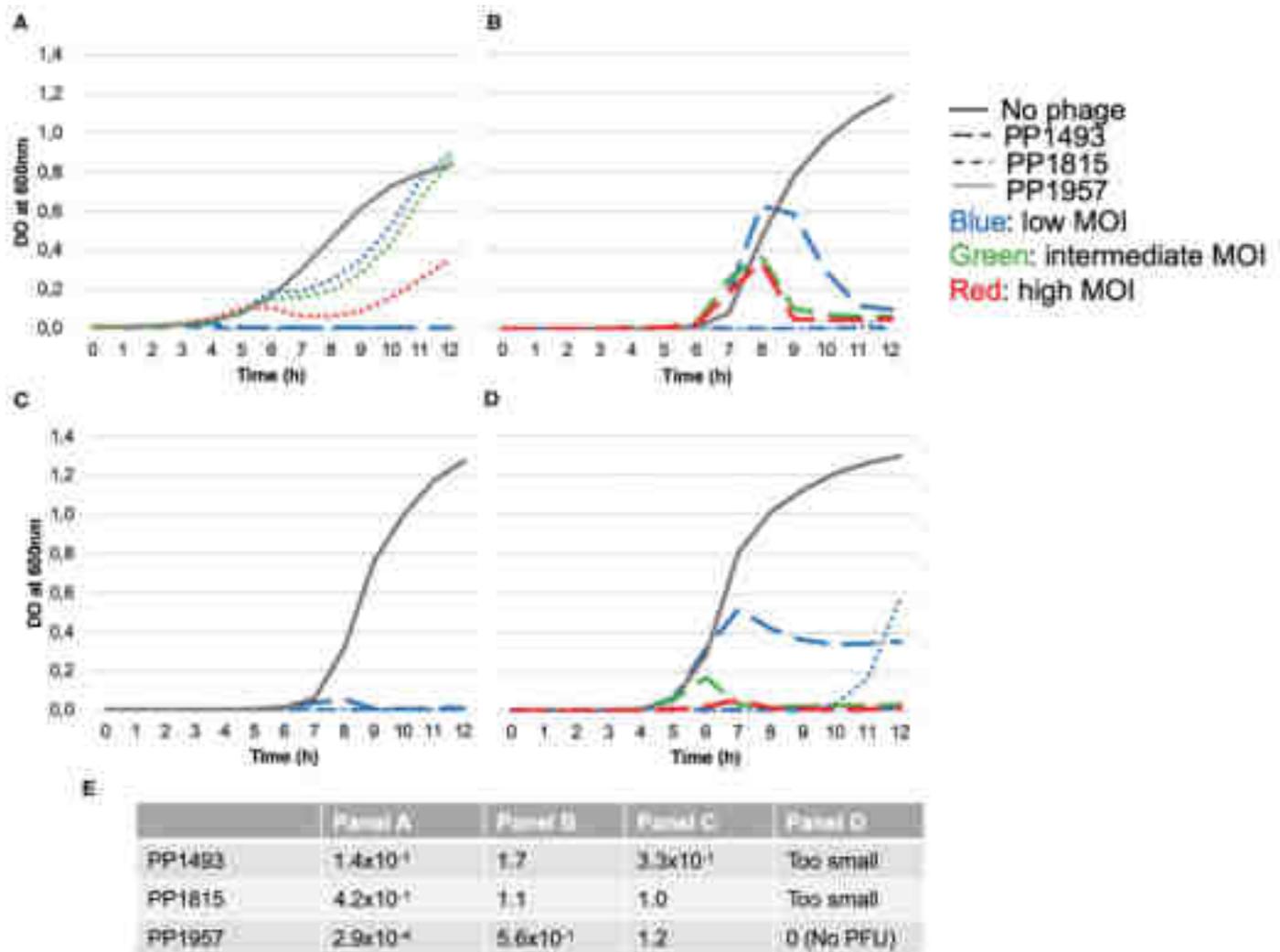
#### **4.1.2.3. Présentation du cocktail de phages**

Le cocktail de phages produit par Pherecydes Pharma regroupe les phages PP1493, PP1815 et PP1957 ciblant *Staphylococcus aureus*. Il s'agit de phages naturels lytiques obtenus à partir de sources environnementales. Ils appartiennent aux genres Silviavirus et Rosenblumvirus. Ces trois phages ont été assemblés de manière extemporanée par un pharmacien hospitalier (1ml de  $1 \times 10^{10}$  PFU/ml pour chaque phage) en tant que préparation « magistrale » (dilution finale  $1 \times 10^9$  PFU/ml). Chaque cocktail a ensuite été administré directement au niveau de l'articulation après la procédure DAIR.

#### **4.1.2.4. Résultats du phagogramme**

Les phagogrammes ont permis de déterminer que les souches bactériennes présentaient une haute susceptibilité à au moins deux des trois phages à un MOI élevé. Les phages ayant une activité lytique partielle, ou ceux actifs seulement à un MOI élevé, ont été conservés dans le cocktail final de phages. Ceci dans le but de prévenir l'apparition d'éventuelles résistances aux phages lors du traitement. Le

patient trois présentait deux souches bactériennes génétiquement différentes, montrant une susceptibilité différente aux phages.



**Figure 22 - Phagogrammes réalisés à l'aide de l'essai cinétique (A–D) et de l'essai de plaque de spot (E).** Pour l'essai cinétique, la bactérie a été incubée avec ou sans bactériophages, testés individuellement à trois concentrations initiales différentes pour obtenir une multiplicité d'infection (MOI, ratio phages/bactéries) faible, intermédiaire et élevée. (A) Correspond à la cinétique de croissance bactérienne (Densité Optique à 600 nm) obtenue pour la souche isolée chez le patient 1 ; (B) du patient 2 ; et (C,D) des deux souches différentes isolées chez le patient 3.

(E) Score EOP « Efficiency of plating » = nombre de PFU (plaque forming units) avec la souche testé/nombre PFU avec la souche de référence.

Plus le score est proche de 1, plus la bactérie est sensible aux bactériophages.

#### 4.1.2.5. Présentations des patients

Les patients sélectionnés sont au nombre de trois, tous âgés et en situation d'impasse thérapeutique.

Le patient 1 a bénéficié d'un remplacement de sa prothèse, suivi d'un traitement antibiotique suppressif.

Les patients 2 et 3 ont bénéficié d'une procédure DAIR, suivie d'un traitement antibiotique approprié.

Pour ces trois patients, l'échange de la prothèse n'était pas envisageable. Ils étaient tous dans une situation pathologique préoccupante, présentant des conditions défavorables au niveau de leur prothèse, notamment avec la présence de pus au contact de l'implant.

Patient ID	Age (yrs)	Prosthesis mechanism of loosening	Time since prosthesis implantation (months)	Duration of clinical symptoms before the PhagoDAIR procedure (days)	Delay from the previous surgery performed for the current infection to the PhagoDAIR procedure (days)	Antimicrobial resistance	Successive primary antimicrobial therapies after the PhagoDAIR procedure (duration in days)	Successive SIRT after the primary antimicrobial therapy(ies) until the last follow-up (duration in days)
Patient 1	80 (male)	Unipolar	40	375	One-stage exchange (1.27 h)	Penicillin G	Cloxacillin-clavulanate (21) Vancomycin-meropenem (22)	Doxycycline (22) Cloxacillin (22)
Patient 2	84 (male)	Bipolar	36	80	Open DAIR without PE exchange (7h)	Erythromycin	Clotrimazole-levofloxacin (14) Clindamycin-levofloxacin (12)	Doxycycline (12)
Patient 3	82 (female)	Unipolar	11	120	Open DAIR without PE exchange (9h)	Penicillin G	Dicloxacillin-levofloxacin (14) Vancomycin-meropenem (11)	Doxycycline (22)

**Figure 23 - Détails sur les antécédents d'infection de la prothèse du genou des trois patients traités par la procédure PhagoDAIR.**

#### 4.1.2.6. Résultats obtenus

La procédure PhagoDAIR a démontré ici des résultats significatifs, témoignant d'une amélioration clinique de la fonction pour les trois patients. Pour deux d'entre eux, une légère évacuation de liquide synovial a persisté, conduisant à la réalisation d'un nouveau DAIR. Cette condition n'était pas associée à une surinfection, mais uniquement à une légère inflammation synoviale, sans persistance bactérienne. Au terme de sept et onze mois de suivi pour les deux premiers patients, une disparition totale des signes d'infection a été constatée. Quant au troisième patient, qui présentait une susceptibilité différente au cocktail de phages en raison de l'infection par deux souches différentes de *Staphylococcus aureus*, une légère évacuation intermittente de liquide synovial a persisté malgré le DAIR itératif.

#### 4.1.2.7. Conclusion

Ce rapport fournit des résultats prometteurs quant à l'utilisation de la phagothérapie en complément d'une procédure PhagoDAIR pour les patients en situation d'impasse thérapeutique. Tous ces patients avaient déjà bénéficié de procédures conventionnelles adaptées au stade de leur pathologie. Néanmoins, aucune de ces options thérapeutiques n'a permis une amélioration de leur situation.

Chez les patients atteints d'une IPA chronique pour lesquels l'échange de prothèse n'est pas réalisable, une DAIR suivie d'un traitement antibiotique suppressif est généralement proposée, mais le taux de réussite reste faible (1-4). L'utilisation de la phagothérapie en tant que traitement adjuvant permet d'agir localement sur le biofilm. En effet, les phages anti-*Staphylococcus aureus* ont démontré une activité anti-biofilm dose-dépendante ainsi qu'une activité synergique avec les antibiotiques (6).

Même si ces résultats sont prometteurs, ce rapport présente de nombreuses limites :

- Aucun groupe témoin ne permet de comparer le traitement.
- Le nombre de patients est très faible.
- Les phages sont utilisés en plus de la chirurgie et des antibiotiques, ce qui amène à s'interroger sur la capacité intrinsèque de la phagothérapie à avoir un effet bénéfique.

On peut tout de même affirmer que chez ces patients, aucune autre approche thérapeutique n'aurait permis d'obtenir des résultats similaires en raison de la multitude de risques d'échec qu'ils présentaient (une IPA chronique à *Staphylococcus aureus* et la pratique d'une procédure DAIR ultérieure). Même si deux des patients ont dû de nouveau subir une DAIR, celle-ci était indiquée sur la base de la persistance d'une légère évacuation de liquide synovial, même si l'état des patients s'était largement amélioré.

## 4.2. Antibiothérapie vs phagothérapie

Afin de synthétiser les informations recueillies sur la phagothérapie, un tableau comparatif mettant en parallèle cette option thérapeutique avec l'antibiothérapie est présenté dans cette partie.

	<b>Antibiothérapie</b>	<b>Phagothérapie</b>
<b>Mode d'action</b>	Bactériostatique ou bactéricide.	Cycle lytique = bactéricide.
<b>Pharmacologie</b>	Mécanismes bien connus. Antibiotiques métabolisés <i>in vivo</i> . Modalités d'administration bien définies.	Mécanismes pharmacocinétiques et pharmacodynamiques mal connus.
<b>Spécificité</b>	Spectre large ou étroit selon l'antibiotique.	Spécificité étroite, aucune action hors de la cible.
<b>Efficacité</b>	En général, oui. Inefficace, si bactérie inconnue ou résistante. Certaines bactéries à large spectre très efficaces mais favorisent les résistances	Efficacité à documenter. Nécessité d'un seuil bactérien minimum pour être efficace.

<b>Résistances</b>	Nombreuses bactéries multi-résistantes. Émergence rapide.	Résistances possibles, mais les phages peuvent évoluer pour contourner la résistance + les bactériophages sont très nombreux permettant de pallier à ces résistances.
<b>Effets indésirables</b>	Nombreux, dépendants de l'antibiotique utilisé. Effet néfaste sur la flore commensale provoquant dysbioses et infections opportunistes secondaires.	Rares et non graves (sous réserve que la préparation soit correctement purifiée). Action uniquement sur la souche ciblée. Respect des flores commensales, même lors de l'utilisation d'un cocktail de bactériophages.
<b>Action sur les biofilms</b>	Difficile, nécessite des concentrations en antibiotiques trop importantes.	Action sur les biofilms, les enzymes de phages dégradent le biofilm.
<b>Stabilité</b>	Largement étudiée, très stable, conservation longue.	Peu de données et peu d'études.
<b>Indication</b>	Nombreuses indications, prescriptions standardisées.	Absence de standardisation.
<b>Production</b>	Méthode bien connue. Mise sur le marché longue.	Méthode à grande échelle à améliorer mais développement rapide. Adaptation à chaque souche.
<b>Coût</b>	Très coûteuse, notamment du fait de l'étape de développement.	Les bactériophages naturels sont peu coûteux.
<b>Réglementation</b>	Statut clairement définis.	Absents des textes réglementaires.
<b>Recherche et développement</b>	Recherche intensive mais découverte en déclin. Baisse de l'attrait pour les industriels.	Recherche en augmentation.

**Tableau 1 - Tableau comparatif de l'antibiothérapie et de la phagothérapie**

### 4.3. Discussion

L'antibiothérapie est considérée comme la référence en matière de traitement des infections bactériennes. Cependant, depuis plusieurs années maintenant, le monde fait face à l'émergence de souches bactériennes multi-résistantes. La nécessité de trouver des alternatives thérapeutiques pour traiter ce type d'infections s'impose. Le but de cette thèse était de se demander si la phagothérapie pouvait être éventuellement une alternative thérapeutique potentielle. Suite à l'écriture de cette thèse, il me paraît effectivement que la phagothérapie, bien qu'encore à ses débuts, peut être perçue comme une solution potentielle face à la montée des infections résistantes aux antibiotiques. Les études effectuées démontrent une efficacité certaine de cette thérapie. Néanmoins, bien que prometteuses, elles restent insuffisantes pour tirer des conclusions définitives sur l'efficacité et la sécurité de cette approche.

La procédure PhagoDAIR, par exemple, met en évidence l'intérêt de la phagothérapie lorsqu'elle est utilisée en complément de l'antibiothérapie. Cependant, il est à noter qu'aucune étude n'a encore été menée en utilisant exclusivement la phagothérapie, sans le soutien des antibiotiques dans le cadre des IPA chroniques. Cela soulève la question de savoir si la phagothérapie peut un jour remplacer complètement l'antibiothérapie ou si elle restera une solution adjuvante potentielle dans cette indication.

L'étude PhagoBurn quant à elle, a mis l'accent sur la difficulté et le temps nécessaire afin d'obtenir un cocktail de bactériophages stable.

De manière générale, la phagothérapie se heurte à de nombreux obstacles. D'un point de vue réglementaire, les Bonnes Pratiques de Fabrications bien qu'essentielles pour les médicaments conventionnels, semblent difficilement applicables *stricto sensu* à la phagothérapie. La conduite des études cliniques, étape obligatoire avant le passage à une autorisation de mise sur le marché est ainsi rendue compliquée. De plus, le statut actuel des bactériophages reste flou, ce qui rend difficile leur utilisation à grande échelle. Selon moi, il faudrait que le code de la santé publique prévoie un statut particulier pour les bactériophages et donc, redéfinir le statut du médicament afin d'y intégrer la phagothérapie.

Il est également important de considérer les implications économiques. La production de bactériophages est longue, coûteuse, et le retour sur investissement peut ne pas être aussi lucratif pour les laboratoires

pharmaceutiques par rapport aux médicaments conventionnels ; d'autant que seul le cocktail de phages et son procédé de fabrication sont brevetables.

Aussi, contrairement aux antibiotiques qui peuvent cibler un large éventail de bactéries, les phages sont hautement spécifiques et ne peuvent cibler qu'une seule souche bactérienne. Même si cela peut présenter un avantage, l'inconvénient est que cette spécificité nécessite une identification précise de la souche bactérienne causant l'infection.

Un autre défi majeur est la capacité des bactéries à évoluer. Si une souche bactérienne mute, le bactériophage spécifique utilisé pour la traiter pourrait devenir inefficace. Cela soulève des préoccupations quant à la durabilité de la phagothérapie à long terme. De plus, une utilisation massive de bactériophages pourrait-elle entraîner l'émergence de nouvelles résistances, tout comme cela s'est produit avec les antibiotiques ? Si aujourd'hui, les mécanismes de résistance développés par les bactéries face aux phages semblent être maîtrisables, qu'en sera-t-il si les bactériophages sont utilisés de manière massive et parfois inappropriée comme le sont aujourd'hui les antibiotiques ?

Ensuite, on peut se poser la question de l'accueil que susciterait une utilisation plus répandue de la phagothérapie aussi bien pour les soignants que pour les patients. Aujourd'hui, on peut constater de manière assez globale que les thérapies moins conventionnelles, comme peut l'être notamment le vaccin ARN du COVID-19, suscite la méfiance des patients et d'une partie de la communauté médicale, malgré le fait que ce dernier ait fait l'objet d'études poussées et soit le résultat de plusieurs années de recherche. La phagothérapie, même en étant connue depuis de nombreuses décennies, n'a pour le moment pas fait l'objet de recherches très poussées et les résultats dont on dispose à l'heure actuelle, bien que prometteurs, ne démontrent pas une efficacité absolue. On peut modérer ces propos en considérant que la gravité et les conséquences d'une absence de traitement peuvent être totalement différentes selon les patients, dans l'optique où la phagothérapie serait utilisée dans le cadre d'une impasse thérapeutique.

En l'état actuel des choses, il me semble compliqué aujourd'hui de voir les bactériophages comme un médicament classique prescrit par un médecin à différents patients présentant une même pathologie. L'approche la plus évidente, au vu des études, de la réglementation et de la fabrication d'un cocktail de phages serait une prescription pour une préparation magistrale de bactériophages administrée à un patient ou à une catégorie de patients pour une pathologie chronique. En effet, la nature persistante de ces maladies, la nécessité d'un traitement ciblé, et le temps requis pour développer un cocktail de phages adapté rendent cette approche individualisée particulièrement adaptée.

Pour pouvoir répondre à toutes ces questions et en savoir davantage sur le fonctionnement des bactériophages, il est primordial aujourd'hui de pouvoir procéder à de nouveaux essais cliniques. L'intérêt serait d'une part de prouver de manière plus juste l'efficacité de la phagothérapie, grâce à des essais à grande échelle, randomisées et contrôlées. Ces études permettraient également de confirmer la sécurité des bactériophages ainsi que l'absence d'effets secondaires graves. En plus de cela, il faudrait déterminer de manière plus précise les propriétés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques des bactériophages ainsi que leurs interactions avec le système immunitaire pour mieux évaluer les implications de ce type de traitement.

En conclusion, bien que la phagothérapie présente un potentiel considérable comme alternative ou complément à l'antibiothérapie, de nombreuses questions restent sans réponse. Des études supplémentaires, une réglementation claire et une collaboration entre les chercheurs et l'industrie sont essentielles pour réaliser pleinement le potentiel de la phagothérapie.

## 5. Conclusion

Face à l'antibiorésistance, la phagothérapie, longtemps oubliée, réapparaît dans le paysage de la recherche scientifique.

La phagothérapie intéresse aujourd'hui les scientifiques car elle semble démontrer une efficacité face aux infections résistantes aux antibiotiques. Cependant, elle attire encore trop peu les capitaux privés en raison d'un marché qui semble peu lucratif. Pherecydes Pharma est la première compagnie à avoir produit des bactériophages thérapeutiques en 2006 en suivant les Bonnes Pratiques de Fabrication et est à l'initiative du projet PhagoBurn. Ces initiatives, bien qu'encore rares, témoignent d'un regain d'intérêt pour l'utilisation des bactériophages. Néanmoins, les différentes études publiées n'ont pas démontré leur efficacité sur un grand nombre de patients et, de manière plus globale, n'ont pas été réalisées dans des conditions permettant d'affirmer avec certitude l'intérêt de cette option thérapeutique.

De nouvelles études sont donc nécessaires pour confirmer l'efficacité des bactériophages sur un plus grand nombre de patients.

Au-delà de cette approche classique d'utilisation des bactériophages, une autre alternative est envisagée. La start-up Eligo BioSciences, créée en 2014, s'intéresse à l'édition du génome des bactériophages. Elle vise à permettre à ces OGM d'attaquer sélectivement les bactéries selon leur séquence génomique, tout en laissant intact le reste du microbiome.

En somme, après un siècle d'oubli, la phagothérapie ressurgit comme une alternative prometteuse, nécessitant d'être davantage explorée, notamment en envisageant des innovations telles que l'édition génomique des bactériophages.

## Bibliographie

- [1] A. Górski, B. Weber-Dąbrowska, R. Międzybrodzki, et J. Borysowski, « A historical overview of the therapeutic use of bacteriophages ».
- [2] « Les antibiotiques, c'est fini ? » Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.leem.org/100-questions/les-antibiotiques-c-est-fini>
- [3] « Microscopes : observer le vivant pour combattre les maladies », Institut Pasteur. Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/dossiers/microscopes-observer-vivant-combattre-maladies>
- [4] « Bacteria », Genome.gov. Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Bacteria>
- [5] « Qu'est ce qu'une bactérie ? » Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.antibio-responsable.fr/bacteries/classification>
- [6] « Les virus - Ennemis ou alliés ? - Stéphane Biacchesi, Christophe Chevalier, Marie Galloux, Christelle Langevin, Ronan Le Goffic, Michel Brémont (EAN13 : 9782759226276) | Quae-Open : Des livres scientifiques en libre accès », Quae Open Access. Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.quae-open.com/produit/140/9782759226276/les-virus>
- [7] F. Ravat, P. Jault, et J. Gabard, « Bactériophages et phagothérapie: utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes », *Ann Burns Fire Disasters*, vol. 28, n° 1, p. 13-20, mars 2015.
- [8] <https://www.facebook.com/inserm.fr>, « Bataille de microbes : C'est quoi la phagothérapie ?  · Inserm, La science pour la santé », Inserm. Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/c-est-quoi/bataille-de-microbes-cest-quoi-la-phagotherapie/>
- [9] « Infection — acadpharm ». Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Infection>
- [10] « chap2.pdf ». Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://publications.msss.gouv.qc.ca/msss/fichiers/guide-garderie/chap2.pdf>
- [11] K. R. Lee, « Disease in Wartime », in *Editorial Research Reports 1942*, in CQ Researcher Online. , Washington, D.C., United States: CQ Press, 1942, p. 101-115. Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <http://library.cqpress.com/cqresearcher/cqresrre1942021000>
- [12] « Fièvre typhoïde ». Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/typhoid>
- [13] « Les Pasteuriens pendant la Grande Guerre : la typhoïde - L'actu de l'Institut Pasteur ». Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/actualites/pasteuriens-grande-guerre-typhoide>
- [14] « UPL4172926533056022098\_SansonettiLec\_\_on\_1.pdf ». Consulté le: 19 juin 2023. [En

- ligne]. Disponible sur: [https://www.college-de-france.fr/media/philippe-sansonetti/UPL4172926533056022098\\_SansonettiLec\\_\\_on\\_1.pdf](https://www.college-de-france.fr/media/philippe-sansonetti/UPL4172926533056022098_SansonettiLec__on_1.pdf)
- [15] K. I. Mohr, « History of Antibiotics Research », in *How to Overcome the Antibiotic Crisis : Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives*, M. Stadler et P. Dersch, Éd., in Current Topics in Microbiology and Immunology. , Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 237-272. doi: 10.1007/82\_2016\_499.
- [16] R. P. Wenzel et M. B. Edmond, « Managing antibiotic resistance », *N Engl J Med*, vol. 343, n° 26, p. 1961-1963, déc. 2000, doi: 10.1056/NEJM200012283432610.
- [17] A. Essilini, « Bon usage des antibiotiques en santé ambulatoire », These de doctorat, Université de Lorraine, 2021. Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2021LORR0278>
- [18] A. J. Browne *et al.*, « Global antibiotic consumption and usage in humans, 2000–18: a spatial modelling study », *The Lancet Planetary Health*, vol. 5, n° 12, p. e893-e904, déc. 2021, doi: 10.1016/S2542-5196(21)00280-1.
- [19] « lip85-resistance\_aux\_antibiotiques-institut-pasteur.pdf ». Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique\\_nous\\_soutenir/lip/lip85-resistance\\_aux\\_antibiotiques-institut-pasteur.pdf](https://www.pasteur.fr/sites/default/files/rubrique_nous_soutenir/lip/lip85-resistance_aux_antibiotiques-institut-pasteur.pdf)
- [20] « Surconsommation d’antibiotiques : Cause de l’antibiorésistance ? » Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.antibio-responsable.fr/antibioresistance/surconsommation-d-antibiotiques>
- [21] « ANSM-rapport-antibio\_2016\_bd2.pdf ». Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.omedit-grand-est.ars.sante.fr/system/files/2017-08/ANSM-rapport-antibio\\_2016\\_bd2.pdf](https://www.omedit-grand-est.ars.sante.fr/system/files/2017-08/ANSM-rapport-antibio_2016_bd2.pdf)
- [22] « La France encore trop consommatrice d’antibiotiques ». Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/presse/2022/la-france-encore-trop-consommatrice-d-antibiotiques>
- [23] L. Savoye-Rossignol, « Epidémiologie des infections urinaires communautaires ».
- [24] « Méningites à méningocoques », Institut Pasteur. Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/meningites-meningocoques>
- [25] C. J. L. Murray *et al.*, « Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis », *The Lancet*, vol. 399, n° 10325, p. 629-655, févr. 2022, doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
- [26] « Lutte contre l’antibiorésistance : choix et durée de prescription des antibiotiques dans les infections bactériennes courantes », Haute Autorité de Santé. Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/jcms/p\\_3283973/fr/lutte-contre-l-antibioresistance-choix-et-duree-de-prescription-des-antibiotiques-dans-les-infections-bacteriennes-courantes](https://www.has-sante.fr/jcms/p_3283973/fr/lutte-contre-l-antibioresistance-choix-et-duree-de-prescription-des-antibiotiques-dans-les-infections-bacteriennes-courantes)

- [27] « 160518\_Final paper\_with cover.pdf ». Consulté le: 19 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- [28] « L'antibiorésistance : pourquoi est-ce si grave ? », Ministère de la Santé et de la Prévention. Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://sante.gouv.fr/prevention-en-sante/les-antibiotiques-des-medicaments-essentiels-a-preserver/des-antibiotiques-a-l-antibioresistance/article/l-antibioresistance-pourquoi-est-ce-si-grave>
- [29] S. T. Abedon, C. Thomas-Abedon, A. Thomas, et H. Mazure, « Bacteriophage prehistory », *Bacteriophage*, vol. 1, n° 3, p. 174-178, mai 2011, doi: 10.4161/bact.1.3.16591.
- [30] M. P. Nikolich et A. A. Filippov, « Bacteriophage Therapy: Developments and Directions », *Antibiotics*, vol. 9, n° 3, Art. n° 3, mars 2020, doi: 10.3390/antibiotics9030135.
- [31] Bacteriophage.news, « Bacteriophages – An introduction to Phages | Bacteriophage.news ». Consulté le: 24 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.bacteriophage.news/bacteriophages-an-introduction-to-phages/>
- [32] N. Chanishvili, « Chapter 1 - Phage Therapy—History from Twort and d'Herelle Through Soviet Experience to Current Approaches », in *Advances in Virus Research*, vol. 83, M. Łobocka et W. Szybalski, Éd., in Bacteriophages, Part B, vol. 83. , Academic Press, 2012, p. 3-40. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
- [33] N. Benech *et al.*, « Les virus au service de la santé : les bactériophages », *Med Sci (Paris)*, vol. 38, n° 12, Art. n° 12, déc. 2022, doi: 10.1051/medsci/2022169.
- [34] <https://www.facebook.com/Drugscom>, « Staphage Lysate (SPL) », Drugs.com. Consulté le: 28 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.drugs.com/vet/staphage-lysate-spl.html>
- [35] N. Soffer *et al.*, « Bacteriophages safely reduce Salmonella contamination in pet food and raw pet food ingredients », *Bacteriophage*, vol. 6, n° 3, p. e1220347, août 2016, doi: 10.1080/21597081.2016.1220347.
- [36] S. Heyse, L. F. Hanna, J. Woolston, A. Sulakvelidze and, et D. Charbonneau, « Bacteriophage Cocktail for Biocontrol of Salmonella in Dried Pet Food », *Journal of Food Protection*, vol. 78, n° 1, p. 97-103, janv. 2015, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-041.
- [37] A. Vikram, J. I. Tokman, J. Woolston, et A. Sulakvelidze, « Phage Biocontrol Improves Food Safety by Significantly Reducing the Level and Prevalence of Escherichia coli O157:H7 in Various Foods », *Journal of Food Protection*, vol. 83, n° 4, p. 668-676, avr. 2020, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-19-433.
- [38] N. Soffer, J. Woolston, M. Li, C. Das, et A. Sulakvelidze, « Bacteriophage preparation lytic for Shigella significantly reduces Shigella sonnei contamination in various foods », *PLoS One*, vol. 12, n° 3, p. e0175256, mars 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0175256.
- [39] K. Fong, C. W. Y. Wong, S. Wang, et P. Delaquis, « How Broad Is Enough: The Host Range of

- Bacteriophages and Its Impact on the Agri-Food Sector », *Phage (New Rochelle)*, vol. 2, n° 2, p. 83-91, juin 2021, doi: 10.1089/phage.2020.0036.
- [40] « Pénurie d'amoxicilline : l'Agence européenne des médicaments fait le point ». Consulté le: 25 juin 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/actualites/30077-penurie-d-amoxicilline-l-agence-europeenne-des-medicaments-fait-le-point.html>
- [41] S. Ashkenazi, « Beginning and possibly the end of the antibiotic era », *Journal of Paediatrics and Child Health*, vol. 49, n° 3, p. E179-E182, 2013, doi: 10.1111/jpc.12032.
- [42] « STRUCTURE BACTERIENNE.pdf ». Consulté le: 6 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: [http://www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours\\_td/microbiosv3/COURS%20SV3/STRUCTURE%20BACTERIENNE.pdf](http://www.ucam.ac.ma/fssm/biologie/cours_td/microbiosv3/COURS%20SV3/STRUCTURE%20BACTERIENNE.pdf)
- [43] Nagwa, « Fiche explicative de la leçon : ADN chez les procaryotes | Nagwa ». Consulté le: 6 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.nagwa.com/fr/explainers/546169603010/>
- [44] « VIRULENCE BACTÉRIENNE, Facteurs et mécanismes de la virulence bactérienne - Encyclopædia Universalis ». Consulté le: 9 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/virulence-bacterienne/2-facteurs-et-mecanismes-de-la-virulence-bacterienne/>
- [45] « VIRULENCE BACTÉRIENNE - Encyclopædia Universalis ». Consulté le: 9 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/virulence-bacterienne/>
- [46] « Aminocyclitol ». Consulté le: 13 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/aminocyclitol>
- [47] « Macrolides ». Consulté le: 13 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/macrolides>
- [48] « Cyclines ». Consulté le: 16 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/cyclines>
- [49] « Quinolones ». Consulté le: 16 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/quinolones>
- [50] « La résistance aux antibiotiques », VIDAL. Consulté le: 2 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.vidal.fr/medicaments/utilisation/antibiotiques/resistance-antibiotiques.html>
- [51] S. Sadikalay, « Influence des rejets humains et animaux sur la diffusion de l'antibiorésistance à l'homme, aux animaux et à l'environnement en Guadeloupe », These de doctorat, Antilles, 2018. Consulté le: 2 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2018ANTI0251>
- [52] W. C. Reygaert, « An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria », *AIMS Microbiol*, vol. 4, n° 3, p. 482-501, juin 2018, doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.
- [53] FH, « Mécanismes de résistance aux agents anti-infectieux antibiotiques ». Consulté le: 4 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: [http://aemip.fr/?page\\_id=3765](http://aemip.fr/?page_id=3765)

- [54] FH, « Mécanismes de résistance aux agents anti-infectieux antibiotiques ». Consulté le: 13 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: [http://aemip.fr/?page\\_id=3765](http://aemip.fr/?page_id=3765)
- [55] A. Veyssiere, « La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019 ».
- [56] « Angine : encore trop de prescriptions d'antibiotiques - France Assos Santé ». Consulté le: 16 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.france-assos-sante.org/2017/06/14/angine-encore-trop-de-prescriptions-dantibiotiques/>
- [57] E. Varon, « Rapport d'activité 2020 ».
- [58] M. H. Wilcox *et al.*, « Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridium difficile Infection », *N Engl J Med*, vol. 376, n° 4, p. 305-317, janv. 2017, doi: 10.1056/NEJMoa1602615.
- [59] M.-J. Caballero et S. Figueiredo, « TRAITEMENT D'UNE INFECTION BACTÉRIENNE : QUELLES ALTERNATIVES AUX ANTIBIOTIQUES ? ».
- [60] J. Cornuault, « Impact des phages tempérés sur la stabilité du microbiote intestinal : la lysogénie n'est pas un long fleuve tranquille », Thèse de doctorat, Université Paris-Saclay (ComUE), 2018. Consulté le: 17 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.theses.fr/2018SACLA020>
- [61] « Vernhes - Maturation de la capsid du bactériophage T5 étud.pdf ». Consulté le: 17 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: [https://theses.hal.science/tel-01500099/file/71825\\_VERNHES\\_2016\\_archivage.pdf](https://theses.hal.science/tel-01500099/file/71825_VERNHES_2016_archivage.pdf)
- [62] « Les bactériophages, de leur découverte à leurs utilisations », Planet-Vie. Consulté le: 17 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/microbiologie/virologie/les-bacteriophages-de-leur-decouverte-a-leurs-utilisations>
- [63] L. Allard, « Le bactériophage au service de notre santé: phagothérapie, production d'anticorps monoclonaux thérapeutiques par `` Phage display `` et utilisation diagnostique en tant que détecteur de bactéries ».
- [64] J. Deguine et G. M. Barton, « MyD88: a central player in innate immune signaling », *F1000Prime Rep*, vol. 6, p. 97, 2014, doi: 10.12703/P6-97.
- [65] M. De Jode, D. Roach, et L. Debarbieux, « La synergie immunophage au cœur du succès de la phagothérapie pulmonaire », *Med Sci (Paris)*, vol. 34, n° 4, p. 291-293, avr. 2018, doi: 10.1051/medsci/20183404004.
- [66] D. R. Roach *et al.*, « Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen », *Cell Host Microbe*, vol. 22, n° 1, p. 38-47.e4, juill. 2017, doi: 10.1016/j.chom.2017.06.018.
- [67] G. L. Burn, A. Foti, G. Marsman, D. F. Patel, et A. Zychlinsky, « The Neutrophil », *Immunity*, vol. 54, n° 7, p. 1377-1391, juill. 2021, doi: 10.1016/j.immuni.2021.06.006.
- [68] S. J. Labrie, J. E. Samson, et S. Moineau, « Bacteriophage resistance mechanisms », *Nat Rev*

*Microbiol*, vol. 8, n° 5, p. 317-327, mai 2010, doi: 10.1038/nrmicro2315.

[69] J. P. Tremblay, « CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires », *Med Sci (Paris)*, vol. 31, n° 11, Art. n° 11, nov. 2015, doi: 10.1051/medsci/20153111016.

[70] « Article L5111-1 - Code de la santé publique - Légifrance ». Consulté le: 23 juillet 2023. [En ligne]. Disponible sur: [https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article\\_lc/LEGIARTI000045404922](https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000045404922)

[71] M. Krauth, « Les Notes scientifiques de l'Office – n° 24 ».

[72] A. Górski, E. Wazna, B.-W. Dabrowska, K. Dabrowska, K. Switała-Jeleń, et R. Miedzybrodzki, « Bacteriophage translocation », *FEMS Immunol Med Microbiol*, vol. 46, n° 3, p. 313-319, avr. 2006, doi: 10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x.

[73] R. Keller et F. B. Engley, « Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes », *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 98, n° 3, p. 577-580, juill. 1958, doi: 10.3181/00379727-98-24112.

[74] A. C. Evans, « Inactivation of Antistreptococcus Bacteriophage by Animal Fluids », *Public Health Reports (1896-1970)*, vol. 48, n° 16, p. 411-426, 1933, doi: 10.2307/4580757.

[75] J. J. Gill, J. C. Pacan, M. E. Carson, K. E. Leslie, M. W. Griffiths, et P. M. Sabour, « Efficacy and Pharmacokinetics of Bacteriophage Therapy in Treatment of Subclinical Staphylococcus aureus Mastitis in Lactating Dairy Cattle », *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 50, n° 9, p. 2912-2918, sept. 2006, doi: 10.1128/AAC.01630-05.

[76] A. Górski *et al.*, « Phage Therapy: Combating Infections with Potential for Evolving from Merely a Treatment for Complications to Targeting Diseases », *Front Microbiol*, vol. 7, p. 1515, sept. 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01515.

[77] H. W. Smith, M. B. Huggins, et K. M. Shaw, « The control of experimental Escherichia coli diarrhoea in calves by means of bacteriophages », *J Gen Microbiol*, vol. 133, n° 5, p. 1111-1126, mai 1987, doi: 10.1099/00221287-133-5-1111.

[78] « Phage treatment of human infections - PMC ». Consulté le: 15 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278644/>

[79] A. Bruttin et H. Brüssow, « Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy », *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49, n° 7, p. 2874-2878, juill. 2005, doi: 10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005.

[80] « Les biofilms ». Consulté le: 22 août 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.ultraproprete.com/dossiers-techniques/contaminants/biofilms.html>

[81] P. Jault *et al.*, « Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by Pseudomonas aeruginosa (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial », *Lancet Infect Dis*, vol. 19, n° 1, p. 35-45, janv. 2019, doi: 10.1016/S1473-3099(18)30482-1.

[82] « Bilan mitigé de l'efficacité de la phagothérapie sur les brûlures infectées », Bilan mitigé de

l'efficacité de la phagothérapie sur les brûlures infectées | Univadis. Consulté le: 5 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.univadis.fr/viewarticle/bilan-mitige-de-l-efficacite-de-la-phagotherapie-sur-les-brulures-infectees-642601>

[83] T. Ferry *et al.*, « Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing *S. aureus* Prosthetic Knee Infection », *Front. Med.*, vol. 7, p. 570572, nov. 2020, doi: 10.3389/fmed.2020.570572.

[84] « Accueil - SPILF - Infectiologie ». Consulté le: 30 septembre 2023. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.infectiologie.com/UserFiles/File/spilf/recos/inf-osseuse-long.pdf>

[85] V. Daubie *et al.*, « Determination of phage susceptibility as a clinical diagnostic tool: A routine perspective », *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 12, p. 1000721, 2022, doi: 10.3389/fcimb.2022.1000721.

# BACTERIOPHAGES : LA PLACE DE LA PHAGOTHERAPIE DANS LA LUTTE CONTRE L'ANTIBIORESISTANCE

## RÉSUMÉ

La découverte de la pénicilline en 1928 a marqué un tournant dans la lutte contre les infections bactériennes, offrant un espoir d'éradiquer la mortalité liée à ces infections. Mais, l'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques a remis en question cette innovation thérapeutique. En 2022, *The Lancet* a souligné l'ampleur du problème, estimant à 1,3 million le nombre de décès dus à l'antibiorésistance.

Face à ce défi, la phagothérapie, une approche thérapeutique basée sur l'utilisation de bactériophages pour cibler et détruire les bactéries, est revenue sur le devant de la scène. Bien qu'elle ait été découverte avant la pénicilline, elle avait été largement éclipsée en France par l'efficacité et la simplicité d'utilisation des antibiotiques. Malgré son potentiel, elle se heurte à divers obstacles, qu'ils soient réglementaires, économiques ou scientifiques. Les recherches actuelles, bien qu'encourageantes, ne permettent pas encore de confirmer son efficacité à grande échelle.

Cette thèse explore l'histoire, les défis et les perspectives de la phagothérapie face à l'antibiorésistance. Elle met en lumière les avancées récentes, comme la procédure PhagoDAIR et l'étude PhagoBurn, tout en soulignant la nécessité de nouvelles recherches.

La phagothérapie, après un siècle d'oubli, émerge comme une alternative potentielle à l'antibiorésistance, mais nécessite une exploration et une validation plus approfondies.

## Mots clés

Bactériophage, Phagothérapie, Antibiorésistance, Bactérie