

**THÈSE**  
**pour le**  
**DIPLÔME D'ÉTAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
**par**  
**Jérémy VALLOT**

-----

*Présentée et soutenue publiquement le 23 février 2015.*

**Intérêt des bactériophages dans les infections à  
*Pseudomonas aeruginosa* résistant aux antibiotiques,  
chez les patients atteints de la mucoviscidose.**

**Président :** Mme Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie

**Membres du jury :** Mme Jocelyne CAILLON, Directeur de thèse

Mme Dominique NAVAS-HOUSSAIS, Maître de Conférences en  
Pharmacie clinique et Santé publique

M. Alain HALOUN, Praticien Hospitalier pneumologue

Mme Fanny THOMAS, Pharmacien d'officine

# Sommaire

---

<b>Liste des abréviations</b> .....	6
<b>Liste des figures</b> .....	8
<b>Introduction :</b> .....	10
<b>I. Rappel historique : du bactériophage à la phagothérapie</b> .....	12
1. La découverte du bactériophage .....	12
2. Les premières polémiques .....	14
3. Le développement de la phagothérapie à travers le monde.....	15
4. Le déclin .....	18
5. Un nouvel essor .....	20
<b>II. Les bactériophages :</b> .....	24
1. Définition.....	24
2. Composition et structure.....	24
2.1. Génome viral ou phagique .....	25
2.2. Capside.....	25
3. Classification .....	27
3.1. L'ordre des <i>Caudovirales</i> .....	27
3.1.1. La famille des <i>Myoviridae</i> .....	27
3.1.2. La famille des <i>Siphoviridae</i> .....	27
3.1.3. La famille des <i>Podoviridae</i> .....	28
3.2. L'ordre des <i>Ligamenvirales</i> .....	28
3.2.1. La famille des <i>Lipothrixiviridae</i> .....	28
3.2.2. La famille des <i>Rudiviridae</i> .....	28
3.3. Les autres familles .....	28

3.3.1.	Phage à symétrie cubique ou icosaèdre.....	29
3.3.2.	Phage à symétrie hélicoïdale ou phage filamenteux .....	29
3.3.3.	Phage à symétrie complexe ou phage pléomorphe .....	29
4.	Cycles de reproduction phagique.....	31
4.1.	Cycle lytique .....	32
4.1.1.	Adsorption.....	32
4.1.2.	Exportation du génome .....	33
4.1.3.	Réplication virale .....	33
4.1.4.	Assemblage .....	33
4.1.5.	Libération et contamination .....	33
4.2.	Cycle lysogénique .....	34
4.2.1.	La conversion lysogénique.....	34
4.2.2.	La transduction.....	35
4.2.2.1.	La transduction généralisée et non spécifique.....	35
4.2.2.2.	La transduction abortive .....	35
4.2.2.3.	La transduction localisée et spécifique.....	35
5.	Habitat.....	36
6.	Obtention d'un bactériophage.....	37
6.1.	Première étape.....	37
6.2.	Deuxième étape.....	37
6.3.	Troisième étape .....	38
6.4.	Quatrième étape .....	38
6.5.	Cinquième étape.....	39
7.	Avantages et inconvénients .....	39
7.1.	Avantages.....	39

7.2. Inconvénients .....	40
8. Cadre réglementaire .....	41
9. Essais cliniques récents.....	43
<b>III. La mucoviscidose :</b> .....	<b>43</b>
1. Généralités .....	45
2. Épidémiologie .....	45
3. Génétique .....	49
4. Diagnostic .....	51
5. Symptomatologie .....	52
5.1. Au niveau respiratoire .....	52
5.2. Au niveau digestif .....	52
5.3. Au niveau des glandes sudoripares .....	53
5.4. Au niveau de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL) .....	53
5.5. Au niveau de la reproduction .....	53
6. Infections pulmonaires.....	54
6.1. Principales bactéries responsables d'infections pulmonaires .....	54
6.1.1. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	54
6.1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> (Staphylocoque doré) .....	54
6.1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Bacille pyocyanique) .....	55
6.1.4. <i>Burkholderia cepacia</i> .....	58
6.1.5. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> et <i>Archromobacter xylooxidans</i> .....	58
6.1.6. Mycobactéries atypiques .....	59
6.2. Principaux virus responsables d'infections pulmonaires.....	60
6.2.1. Grippe.....	60
6.2.2. Virus respiratoire syncytial ou VRS .....	61

6.3. Principaux champignons responsables d'infections pulmonaires .....	61
6.3.1. <i>Aspergillus fumigatus</i> .....	61
6.3.2. <i>Scedosporium apiospermum</i> .....	61
7. Traitements .....	62
7.1. Au niveau digestif .....	62
7.2. Au niveau respiratoire.....	63
7.2.1. La kinésithérapie respiratoire.....	64
7.2.2. L'aérosolthérapie.....	64
7.2.3. L'antibiothérapie .....	66
7.2.3.1. <i>Haemophilus influenzae</i> .....	66
7.2.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	67
7.2.3.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	67
<b>IV. Le bactériophage : alternative thérapeutique dans la mucoviscidose vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ? .....</b>	<b>69</b>
1. Efficacité des bactériophages sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lors d'infections pulmonaires .....	70
1.1. Efficacité des phages dans un modèle pulmonaire murin à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	70
1.2. Efficacité curative et prophylactique d'une solution de phages dans un modèle pulmonaire murin à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	72
2. Efficacité des bactériophages sur le biofilm de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	75
2.1. Dégradation du biofilm par les bactériophages .....	75
2.2. Activité anti-biofilm des phages sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	76
3. Synergie phage-antibiotique .....	77
3.1. Synergie <i>in vitro</i> phage-antibiotique.....	77

3.2. Synergie <i>in vivo</i> dans un modèle murin de pneumopathie à <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	77
4. Voie d'administration préférentielle.....	80
4.1. Aérosolthérapie de phages .....	80
4.2. Inhalation de poudre sèche contenant des phages .....	81
<b>Conclusion :</b> .....	82
<b>Bibliographie</b> .....	83

## Liste des abréviations

---

ABPA	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
API	Aspergillose Pulmonaire Invasive
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-Triphosphate
$\beta$ LSE	$\beta$ -Lactamases à Spectre Elargi
BMR	Bactérie Multi-Résistante
BPC	Bonne Pratique Clinique
BPF	Bonne Pratique de Fabrication
CAZ	Ceftazidime
CFU	Colony Forming Unit
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CRCM	Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
CSP	Code de la Santé Publique
ECBC	Examen Cytobactériologique des Crachats
EFR	Exploration Fonctionnelle Respiratoire
EPGP	Extraits Pancréatiques Gastro-Protégés
FDA	Food and Durg Administration
FQRP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Résistant aux Fluoroquinolones
HRB	Hyper-Réactivité Bronchique
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgA	Immunoglobuline A
IL-6	Interleukine 6
IPE	Insuffisance Pancréatique Exocrine
IV	Intraveineuse
JAMA	Journal of the American Medical Association
LBA	Lavage Broncho-Alvéolaire

LDH	Lactate Déshydrogénase
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
ONM	Observatoire National de la Mucoviscidose
ORL	Oto-Rhino-Laryngée
PAS	Phage Antibiotic Synergy
PFU	Plaque Forming Unit
PME	Petite et Moyenne Entreprise
RFM	Registre Français de la Mucoviscidose
RGO	Reflux Gastro-Œsophagien
rh-DNase	Désoxyribonucléase I Recombinante Humaine
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méricilline
SCV	Small Colony Variants
Stx	Shiga-toxine
TIR	Trypsine Immuno-Réactive
TNF- $\alpha$	Facteur de Nécrose Tumorale $\alpha$
VEMS	Volume Expiratoire Maximal Seconde
VRE	Entérocoques Résistants à la Vancomycine
VRS	Virus Respiratoire Syncytial



## Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Évolution du taux de résistance de bactéries impliquées dans la santé publique aux Etats-Unis depuis 1980 [38].	21
<b>Figure 2</b> : Pourcentage de staphylocoques dorés résistants à la méticilline (SARM) en 2012 en Europe [39].	21
<b>Figure 3</b> : Pourcentage de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> résistants aux fluoroquinolones en 2012 en Europe [39].	22
<b>Figure 4</b> : Nombre de nouveaux antibiotiques approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) [41].	23
<b>Figure 5</b> : Pourcentage de publications contenant le terme « phage therapy » entre 1910 et 2008 [42].	23
<b>Figure 6</b> : Représentation schématique typique d'un bactériophage (phage caudé) [47].	26
<b>Figure 7</b> : Diversité morphologique des bactériophages observés au microscope [48].	26
<b>Figure 8</b> : Morphotypes des différentes familles de bactériophages [49].	30
<b>Figure 9</b> : Schéma des cycles de reproduction phagique (lytique et lysogénique) [56].	32
<b>Figure 10</b> : Plages de lyse (nombreuses à gauche et faible à droite) sur une nappe de culture de <i>Staphylococcus aureus</i> en boîte de Petri [62].	38
<b>Figure 11</b> : Facteurs qui influent sur l'efficacité de l'utilisation des phages contre les bactéries pathogènes [69].	41
<b>Figure 12</b> : Prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100.000 habitants) en 2012 [80].	46
<b>Figure 13</b> : Évolution annuelle des principaux indicateurs [80].	47
<b>Figure 14</b> : Pyramide des âges en 2012 [80].	47
<b>Figure 15</b> : Nombre de patients vus dans l'année et pourcentage d'adultes, évolution depuis 1992 [80].	48
<b>Figure 16</b> : Nombre de décès dans l'année, évolution depuis 1992 [80].	48
<b>Figure 17</b> : Transmission de la maladie [82].	49

<b>Figure 18</b> : Le gène et la protéine CFTR [83].	50
<b>Figure 19</b> : Les différentes classes des mutations [83].	51
<b>Figure 20</b> : Modèle de formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [119].	56
<b>Figure 21</b> : Représentation de souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> non mucoïdes à gauche et mucoïdes à droite, cultivées sur gélose pendant 48 heures [97].	56
<b>Figure 22</b> : Répartition des germes respiratoires en 2001 et 2012 [80].	59
<b>Figure 23</b> : Répartition des micro-organismes en fonction de l'âge [80].	60
<b>Figure 24</b> : Thérapeutiques à visée hépatique, digestive et nutritionnelle [80].	63
<b>Figure 25</b> : Moyenne des VEMS (%) par âge en 1992, 2001 et 2012 [80].	64
<b>Figure 26</b> : Produits administrés en aérosolthérapie [80].	66
<b>Figure 27</b> : Réponse bactériologique pulmonaire et splénique à 24 heures d'une infection pulmonaire par les souches PAO1 et MucN2 après traitement par ceftazidime (CAZ) et/ou solution polyclonale de phages (Lydie Khatchatourian, Master 2, 2014).	79

## Introduction :

Jusqu'au début du XX<sup>ème</sup> siècle, toute infection causée par une bactérie était responsable d'une mortalité extrêmement importante. C'est grâce à la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, puis à son utilisation à grande échelle à partir des années 1940, que l'humanité est entrée dans l'ère de l'antibiothérapie. Par conséquent, la pénicilline ainsi que les autres antibiotiques mis au point au fil du temps ont permis d'enrayer de grandes maladies épidémiques bactériennes (tuberculose, lèpre, peste, etc.) et d'augmenter l'espérance de vie des personnes ayant accès à ces nouveaux traitements. Victimes de leurs succès, les antibiotiques sont souvent utilisés en trop grande quantité et parfois de façon inappropriée aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

De nos jours, l'augmentation croissante des bactéries multirésistantes aux antibiotiques (BMR), c'est-à-dire qu'elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques utilisables en thérapeutique, entraîne de grandes difficultés de prise en charge des patients et fait craindre un retour à l'ère pré-antibiotique. L'origine de cette multirésistance est due à la pression sélective exercée par l'utilisation abusive des antibiotiques ainsi qu'à l'accumulation de mécanismes de défense par la bactérie (résistance naturelle, mutation de gènes, transfert génétique, etc.). Ce phénomène, associé à la baisse régulière de mise sur le marché de nouvelles molécules actives, conduit de plus en plus vers une impasse thérapeutique mettant la vie du patient en jeu.

Une population est particulièrement impactée par ce phénomène de multirésistance, il s'agit des patients atteints de mucoviscidose. En effet, la répétition des cures d'antibiotiques à doses élevées tout au long de la vie des malades afin de traiter les infections pulmonaires chroniques, notamment à *Pseudomonas aeruginosa*, entraîne une pression sélective à l'origine de l'émergence de souches bactériennes résistantes à de nombreux antibiotiques.

La recherche d'alternatives thérapeutiques aux antibiotiques est donc une nécessité afin d'élargir les possibilités d'action pour le personnel soignant. Le salut pourrait venir d'une pratique découverte dans les années 1910-1920, mais délaissée par le monde occidental lors de l'avènement des antibiotiques, il s'agit de la phagothérapie. Cette technique consiste à utiliser des bactériophages dont la particularité est d'infecter uniquement les bactéries, afin de les détruire. Seuls certains pays appartenant à l'ancien bloc soviétique (Géorgie, Pologne, Russie, etc.) continuent à l'utiliser de nos jours.

Dans la première partie, nous ferons un rappel historique sur les bactériophages et la phagothérapie. Puis, dans la deuxième partie, nous détaillerons les multiples caractéristiques des phages. Ensuite, dans la troisième partie, nous ferons le point sur les différents aspects de la mucoviscidose. Enfin, dans la quatrième et dernière partie, nous montrerons la place des bactériophages lytiques dans le traitement de *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose.

# I. Rappel historique : du bactériophage à la phagothérapie

## 1. La découverte du bactériophage

La découverte des bactériophages s'est déroulée en plusieurs étapes, par l'intermédiaire de scientifiques différents et cela de façon indépendante les uns des autres.

La première observation d'une activité bactéricide est attribuée à Ernest Hanbury Hankin (bactériologiste britannique) en 1896. Il travaillait alors en Inde sur le microbe du choléra (*Vibrio cholerae*) et plus particulièrement sur deux rivières, le Gange et la Jumna. Il remarqua que la quantité de microbes dans celles-ci était très faible comparativement aux rivières européennes de même importance. De plus, il observa que lorsque le fleuve était contaminé par le microbe du choléra (cadavres des cholériques, baignades des Indous, drainage des villes, etc.), le nombre de microbes allait en décroissant rapidement en aval du fleuve. Ce phénomène n'était pas dû à un manque de nutriments dans la rivière, qui n'aurait pas permis d'entretenir la vie du microbe, mais bien à une action bactéricide puissante sur le vibrion du choléra provoquant une asepsie du fleuve. Enfin, il démontra que cette action bactéricide était présente uniquement avec de l'eau provenant de la rivière, filtrée sur un filtre Pasteur afin d'éliminer les microbes, mais dont l'effet disparaissait avec l'eau bouillie. Ernest Hanbury Hankin, malgré ses observations, ne parvint pas à découvrir la nature et l'origine de la substance active présente dans le Gange et la Jumna [1-2].

En 1915, Frederick William Twort (bactériologiste anglais) travaillait sur le virus de la vaccine. Il tentait de cultiver *in vitro*, dans des tubes de gélose inclinés (milieu inerte) le virus de la vaccine contaminé par la bactérie staphylocoque. Il observa des taches vitreuses (« *glassy areas* ») dans des colonies de microcoques qui contaminaient ses tubes et conclut rapidement qu'il s'agissait de zones de destruction de cellules bactériennes. Il effectua quelques expériences complémentaires et

remarqua qu'il pouvait transmettre d'une colonie bactérienne à une autre le phénomène de lyse, par l'intermédiaire d'un fil de platine préalablement piqué dans une aire vitreuse. De plus, il découvrit que l'élément actif garde son efficacité après avoir été filtré à travers une bougie Chamberland, qu'il ne se multiplie qu'en présence de bactéries vivantes et qu'il n'est détruit qu'à une température de 60°C. Il obtint des résultats analogues avec des colonies de *Salmonella enterica* isolées de l'intestin de chiens ou de selles d'enfants atteints de diarrhées. Pour expliquer ce phénomène lytique, Frederick Twort avança plusieurs hypothèses comme la présence d'une microbactérie (« *minute bacterium* »), d'amibes liées à la bactérie (« *amoeba* »), d'un virus microscopique parasitant le microbe (« *ultra-microscopic viruses* »), d'une enzyme, d'un protoplasme (« *protoplasm* ») ou encore d'un principe actif autolytique produit par le microbe lui-même. Enfin, malgré ses conclusions imprécises, il ne poursuivit pas ses recherches sur ce phénomène et envisagea encore moins une utilisation thérapeutique [3].

Il faut attendre 1917, pour que Félix Hubert d'Hérelle (biologiste franco-canadien) fasse la découverte d'un microbe invisible ayant des propriétés « antagonistes » et qu'il nommera par la suite : bactériophage. Il travaillait alors pour l'Institut Pasteur de Paris dans le service des sérums. C'est au cours de ses recherches qu'il fit une observation comparable à celle de Frederick Twort, et cela de façon indépendante, à savoir la formation de cercle de lyse dans des tubesensemencés par des bactéries. Contrairement à son homologue britannique, il poursuivit ses recherches afin de connaître la ou les causes de ce phénomène qui l'intriguait. Il parvint à isoler un microbe anti-Shiga (*Shigella dysenteriae*, bactérie responsable de la dysenterie bacillaire) à partir de selles de personnes atteintes de dysenterie qu'il filtra à la bougie Chamberland L<sub>2</sub>. Puis, il mit en contact le filtrat actif avec un bouillon de culture de bacilles de Shiga, ceci provoqua leur lyse dans un laps de temps très court. De plus, il fit d'autres expériences mettant en avant certaines caractéristiques de ce « microbe antagoniste » : l'action lytique est produite par un germe vivant et non par une substance chimique, il est filtrable, il est transmissible de culture en culture, l'action antagoniste est limitée primitivement à une seule espèce bactérienne, le microbe ne

cultive qu'en présence de la bactérie et enfin, le microbe n'exerce aucune action pathogène vis-à-vis des animaux [4]. Félix d'Hérelle était persuadé que ce micro-organisme était unique et qu'il appartenait à un genre nouveau, qu'il nomma « *Bacteriophagum intestinalis* » [5]. En outre, il supposa que ce microbe avait la capacité de s'adapter à toutes les espèces bactériennes et d'accroître son pouvoir lytique après de multiples contacts avec telles ou telles bactéries. Nous verrons plus tard que cette affirmation est inexacte. Enfin, il remarqua que le bactériophage ne se retrouvait pas dans les selles des patients sains ou en phase d'état mais uniquement lors de la phase de convalescence. Il associa donc rapidement le phénomène de guérison clinique avec la présence du bactériophage et il envisagea dès le début de ses découvertes d'utiliser le bactériophage pour combattre les épidémies bactériennes qui faisaient des ravages à cette époque. La phagothérapie ou bactériophagothérapie est née [6].

Félix d'Hérelle aura eu l'intuition et le mérite de découvrir le bactériophage ainsi que d'en promouvoir son utilisation en thérapeutique malgré une période où la technique ne permettait pas d'observer directement ce microbe, laissant la communauté scientifique perplexe sur l'existence réelle de ce micro-organisme.

## **2. Les premières polémiques**

Dès 1920, de nombreux scientifiques du monde entier remettent en question les conclusions de Félix d'Hérelle sur la cause exacte du phénomène de lyse. Plusieurs théories s'opposèrent à l'existence d'un microbe filtrant comme responsable du principe lytique et parfois au sein même de l'Institut Pasteur [7].

Deux scientifiques de l'Institut Pasteur, Jules Bordet (microbiologiste belge, nobélisé en 1919 pour ses travaux sur les mécanismes de l'immunité) et Mihai Ciuca (microbiologiste roumain) qui l'aidait dans ses recherches, attribuèrent le phénomène de lyse à une autolyse microbienne transmissible par l'hérédité. Afin de confirmer leur hypothèse, ils injectèrent par voie intra-péritonéale des colibacilles à des cobayes.

Après un ou deux jours d'incubation, ils ont extrait, par ponction, de l'exsudat péritonéal très riche en leucocytes. Ils constatèrent *in vitro* que l'exsudat était doué de propriété lytique vis-à-vis de cultures de colibacilles. Ils conclurent que cette lyse spontanée était due à une capacité intrinsèque de certaines bactéries à s'autolyser, sous l'effet d'un exsudat leucocytaire, et la dénommèrent « lysogénie » [8-9]. De plus, Jules Bordet et Mihai Ciuca s'efforcèrent de démontrer que la paternité de la découverte du principe lytique devait être attribuée à Frederick Twort et non à Félix d'Hérelle [10].

Le japonais Tamezo Kabeshima s'interrogea également sur la nature exacte du principe décrit par Félix d'Hérelle et il émit l'hypothèse d'un « ferment d'immunité bactériolysant ». En effet, pour lui, lorsque des microbes pathogènes pénètrent dans l'intestin, celui-ci sécrète un « catalyseur » qui a pour conséquence de stimuler la production d'un ferment par la bactérie elle-même provoquant son autolyse. Le principe lytique résulterait donc d'une réaction en cascade [11-12].

Malgré ces polémiques et en l'absence de technologies suffisantes à cette époque pour valider ou invalider les différentes opinions scientifiques, la phagothérapie connut une forte diffusion mondiale sous l'impulsion d'un Félix d'Hérelle qui poursuivit ses recherches [13].

### **3. Le développement de la phagothérapie à travers le monde**

En parallèle des débats existant autour de la nature exacte du phénomène lytique, les bactériophages furent rapidement utilisés pour soigner des infections bactériennes, d'abord chez l'animal puis très vite chez l'homme [14].

En 1919, Félix d'Hérelle est à la recherche d'épizooties, maladies épidémiques touchant les animaux, afin de tester le rôle du bactériophage sur l'animal. De ce fait, il traite dans toute la France des dizaines de poulaillers atteints de typhose aviaire, maladie extrêmement contagieuse et virulente avec un taux de mortalité de l'ordre de 95%, causée essentiellement par la bactérie *Salmonella gallinarum*. Pour ce faire, il



prépare une suspension de bactériophages *via* les déjections de poules guéries qu'il administre ensuite par voie sous-cutanée ou par voie orale. Dans toutes les expériences menées, les résultats sont sensiblement les mêmes : le taux de mortalité tombe à moins de 5%. De plus, l'épizootie cesse brusquement et définitivement après l'administration du ou des bactériophages. Enfin, il comprendra également la spécificité bactériophage-bactérie et donc la nécessité d'utiliser un mélange de phages actifs sur différentes souches bactériennes en cas d'échappement thérapeutique [15-16].

Félix d'Hérelle effectua au cours de l'été 1919, une première tentative à l'hôpital Necker-Enfants Malades sur des patients atteints de dysenterie bacillaire. Il administra *per os* (dans un verre d'eau) « son » bactériophage et observa une guérison rapide des enfants avec une disparition des selles sanglantes et une amélioration de l'état général en 6 à 24 heures. Ces résultats très positifs ne seront publiés que deux ans plus tard dans son livre : *Le bactériophage : son rôle dans l'immunité*.

En 1921, le scientifique belge Richard Bruynoghe et son élève d'alors Joseph Maisin, sont parvenus à traiter six patients souffrant d'infections staphylococciques (anthrax et furoncles) grâce à un bactériophage du staphylocoque. Les guérisons sont survenues rapidement en 24 à 48 heures après l'injection de bactériophages, le plus près possible des zones infectées. Enfin, ils n'ont observé qu'un seul effet indésirable, la fièvre qui est apparue essentiellement chez les malades atteints de vastes lésions et cela à cause de la lyse bactérienne importante qui a libéré une grande quantité de produits microbiens pyrogènes [17-18-19].

Toujours en 1921, André Gratia, un scientifique travaillant dans les laboratoires du *Rockefeller Institute for Medical Research* aux États-Unis, publia dans une revue scientifique américaine les découvertes effectuées par Félix d'Hérelle [20]. La rédaction de cet article a sûrement permis une diffusion mondiale et un accroissement de la renommée des phages et de Félix d'Hérelle lui-même. De plus en 1922, André Gratia a réussi à isoler un bactériophage dirigé contre la bactérie staphylocoque et à l'employer à des fins thérapeutiques, d'abord sur le lapin, puis sur l'homme. En effet,

il a pu soigner dans les hôpitaux de Bruxelles, une cinquantaine de patients atteints d'affections staphylococciques cutanées (abcès, furoncles, anthrax) grâce à l'application locale du bactériophage [21].

La même année, A. Beckerich et Paul Hauduroy effectuèrent le traitement de plusieurs patients atteints de la fièvre typhoïde ou paratyphoïde par un bactériophage. Ils obtinrent des résultats mitigés : sur sept patients, deux n'ont pas pu être guéris. Ils tentent d'expliquer leur échec par trois hypothèses : une intervention trop tardive, une dose administrée trop faible ou encore une infection polymicrobienne [22].

Les essais cliniques sur différentes pathologies (fièvre typhoïde ou paratyphoïde, infections urinaires hautes ou basses, affections staphylococciques ou streptococciques, etc.) se poursuivaient à travers le monde (France, Belgique, Italie, Angleterre, Allemagne, États-Unis, Brésil, etc.) et Félix d'Hérelle parcourait le globe afin de promouvoir et d'aider partout où on le sollicitait. Malheureusement, il serait trop long d'exposer toutes les publications réalisées pendant cette période, d'autant plus que les résultats des nombreuses expériences furent très variables et parfois même contradictoires. On pouvait observer une rémission totale et qualifiée de miraculeuse ou un échec complet avec parfois la mort du patient. Ces différences peuvent s'expliquer par un manque de standardisation et de protocole dans l'élaboration des suspensions de phages, des voies d'administration, des posologies, etc. [23].

Malgré tout, les bactériophages démontrèrent un potentiel inespéré pour lutter contre les infections bactériennes qui faisaient des ravages à cette époque. C'est ainsi que sont apparues dans les années 1920-1930 les premières commercialisations de préparations phagiques à usage thérapeutique *via* les entreprises pharmaceutiques, notamment Robert & Carrière en France où Félix d'Hérelle installa son laboratoire à partir de 1928. Cinq spécialités à base de phages seront créées et connurent un grand succès pendant les années 1930 : bacté-staphy-phage, bacté-intesti-phage, bacté-rhino-phage, bacté-coli-phage ou encore bacté-pyo-phage [24].

En 1933, Félix d'Hérelle rejoint son ancien élève de l'Institut Pasteur, Georgi Eliava (microbiologiste géorgien) à Tbilissi en Géorgie où se trouve l'Institut du bactériophage, de microbiologie et de virologie, fondé par ce dernier en 1923. Ils collaborèrent ensemble pendant dix-huit mois à la recherche et à la production de phages thérapeutiques. Aujourd'hui encore, l'Institut continue à avoir un rôle très important dans la phagothérapie, discipline qu'ils n'ont jamais cessé d'étudier [25].

#### 4. Le déclin

A partir de la fin des années 1930, bien que la phagothérapie soit installée et répandue dans le monde, plusieurs événements vont précipiter le déclin et l'abandon de celle-ci.

Tout d'abord, face au flou scientifique qui persistait à l'époque autour des bactériophages et de la phagothérapie, le *Council on Pharmacy Chemistry*, sorte d'agence du médicament aux Etats-Unis (ancêtre de la *Food and Drug Administration*) demanda en 1934 au microbiologiste Monroe Eaton et au bactériologiste Stanhope Bayne-Jones un rapport sur l'ensemble des publications, afin de juger de la pertinence de cette nouvelle thérapeutique. Le rapport fut publié dans le prestigieux journal médical JAMA (*Journal of the American Medical Association*) et rendit des conclusions sans appel pour la phagothérapie [26-27-28] :

- La nature du bactériophage à l'origine du principe lytique découvert par Félix d'Hérelle n'est pas prouvée.
- Il n'est pas démontré que le bactériophage soit une entité vivante, il semble plutôt indiquer qu'il s'agisse d'un principe inanimé ou d'une enzyme.
- Si l'action lytique du bactériophage est efficace *in vitro*, il le devient beaucoup moins *in vivo* car le sang et les fluides de l'organisme l'inhibent.
- Seul le traitement des infections locales à *Staphylococcus aureus* et des infections urinaires basses à *Escherichia coli* ou à *Staphylococcus aureus* par un bactériophage est efficace.

- Les autres résultats positifs décrits semblent être dus à l'action immunisante des protéines bactériennes contenues dans les suspensions utilisées.

Néanmoins, en l'absence d'alternative thérapeutique pour soigner les infections bactériennes, les recherches autour des bactériophages se poursuivent encore et toujours. En 1939, Emory Ellis et Max Delbrück démontrent que le bactériophage se duplique en une seule étape, accréditant ainsi l'origine virale de celui-ci [29]. De plus, en 1940, Helmut Ruska, grâce à l'avènement du microscope électronique, mit en évidence pour la première fois un bactériophage de la bactérie *Escherichia coli* ainsi que son action lytique [30]. Pourtant, malgré ces nouvelles découvertes rendant irréfutable la nature virale du bactériophage, un second rapport est de nouveau demandé par le *Council on Pharmacy Chemistry* et publié au JAMA. Encore une fois, deux scientifiques Albert Krueger et Jane Scribner sont mandatés et aboutissent sensiblement aux mêmes conclusions que le premier rapport. Le conseil préconise donc l'arrêt de la phagothérapie et affirme son caractère potentiellement dangereux [31-32]. C'est donc le premier revers majeur, il va laisser des séquelles dévalorisantes tenaces puis enclencher le lent chemin vers l'abandon et l'oubli.

Le deuxième tournant dans le déclin de la phagothérapie réside dans l'avènement des antibiotiques au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle. Si Sir Alexander Fleming remarqua dès 1928 l'effet inhibiteur du champignon *Penicillium notatum* sur des cultures bactériennes de staphylocoques, il faudra attendre 1940 pour voir le biochimiste Ernst Chain ainsi que le pharmacologiste Howard Florey découvrir, purifier et développer l'utilisation de masse de la pénicilline [33]. Puis en 1943, le microbiologiste Selman Waksman isole à partir d'une souche d'*Actinomyces griseus* une substance active sur les bactéries à Gram négatif, c'est la streptomycine [34]. Et ainsi de suite, de nombreuses autres molécules actives sont découvertes et le plus souvent, elles sont issues de bactéries du sol ou de champignons. Face aux résultats très probants des antibiotiques (facilité d'utilisation, stabilité et efficacité) la phagothérapie est abandonnée petit à petit par la communauté scientifique.

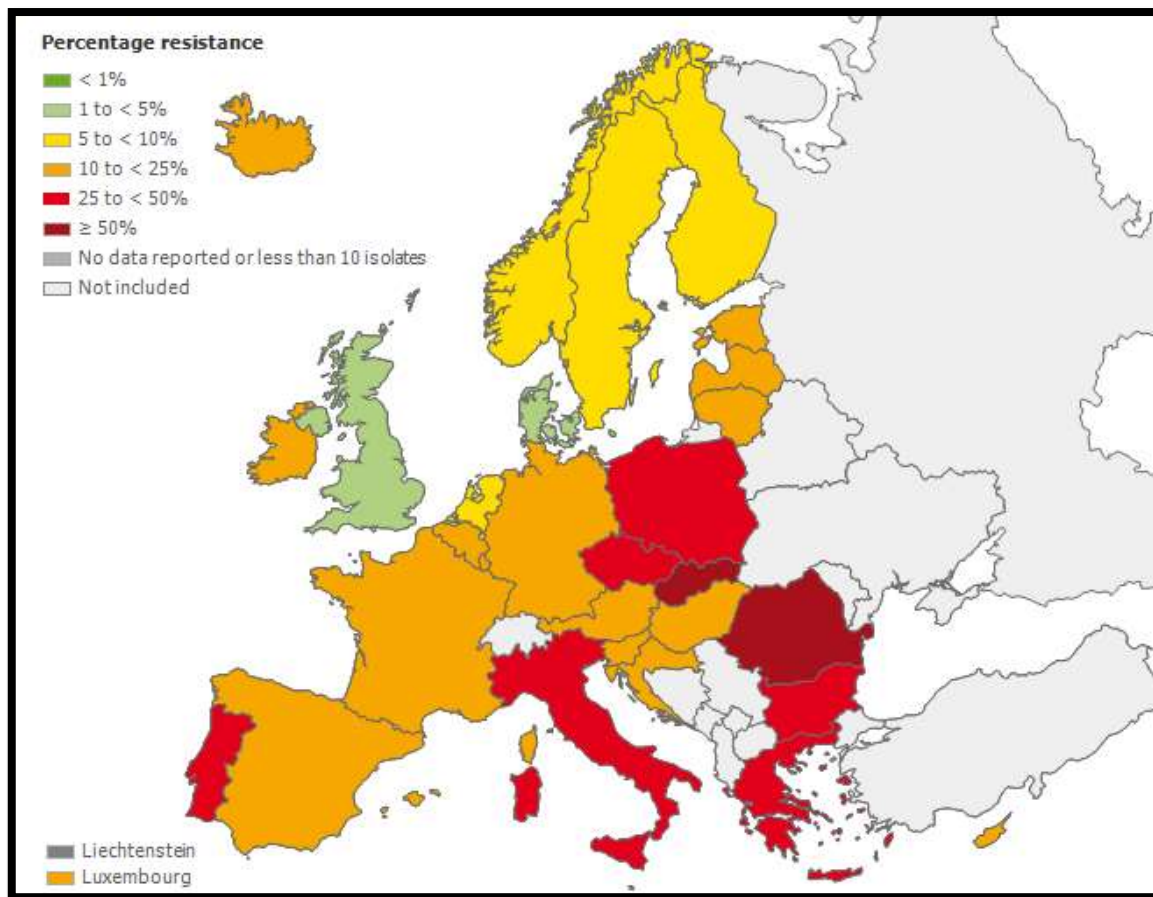
Cette période correspond également à la Seconde Guerre Mondiale prolongée par la Guerre froide qui coupa le monde en deux. Époque trouble durant laquelle les deux grands blocs s'opposèrent pendant des années limitant les contacts notamment scientifiques. Si les pays occidentaux ont favorisé l'antibiothérapie au détriment de la phagothérapie, certains pays de l'Europe de l'Est, notamment ceux de l'ex-Union Soviétique (Géorgie, Pologne et Russie) ont continué d'étudier et d'utiliser les bactériophages [35].

## **5. Un nouvel essor**

Avec la chute du mur de Berlin en 1989 et l'ouverture des frontières, les pays occidentaux ont redécouvert les bactériophages ainsi que la phagothérapie, technique qui a été maintenue dans les pays de l'ancien bloc soviétique notamment grâce aux nombreux Instituts. En parallèle, presque à la même époque, les alertes sur les bactéries multirésistantes se sont multipliées, devenant un sujet majeur de préoccupation en santé publique [36].

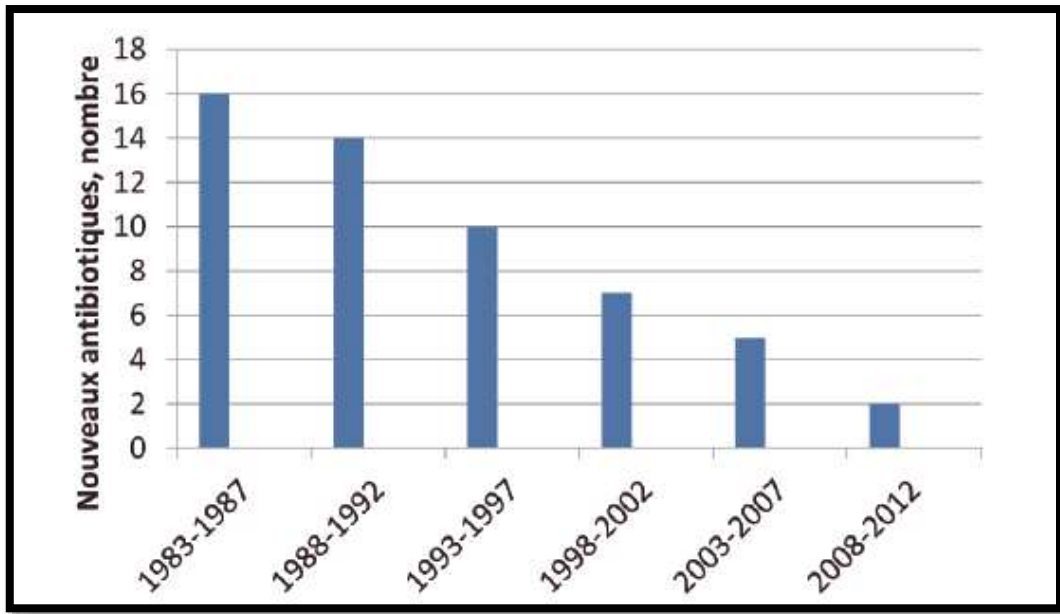
Bien que les infections bactériennes semblent définitivement maîtrisées et vaincues, l'accroissement de ce phénomène de résistance, dont les effets ont été dangereusement sous-estimés, fait craindre un retour à l'ère pré-antibiotique. Le développement de cette antibiorésistance s'explique par différents paramètres dont la mauvaise utilisation des antibiotiques aussi bien en médecine humaine qu'animale en est la première cause : traitement inapproprié, arrêt trop précoce, posologie inadaptée, surconsommation, etc. Ce sont autant d'éléments qui contribuent à exercer une pression sélective sur les bactéries pathogènes ou non, à l'origine de l'amplification des phénomènes de résistance (Figures 1, 2 et 3) [37].





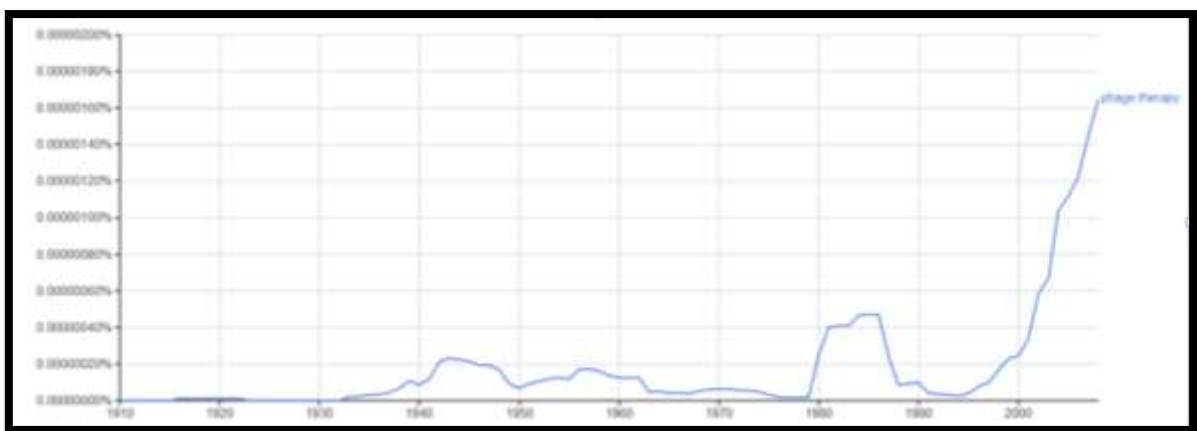
**Figure 3 :** Pourcentage de *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux fluoroquinolones en 2012 en Europe [39].

De plus, après une époque prospère, où pas moins d'une trentaine de nouvelles molécules anti-infectieuses furent mises sur le marché entre 1970 et 1990, on observe par la suite une raréfaction de la commercialisation de nouveaux antibiotiques (Figure 4). Ceci s'explique notamment par un déficit d'investissements de la part des entreprises pharmaceutiques dans la recherche, aussi bien sur le plan budgétaire qu'humain. Ainsi elles préfèrent se tourner vers les pathologies chroniques, plus rentables. En outre, parmi les nouveaux médicaments en phase de recherche, rares sont ceux qui représentent une nouvelle classe, la plupart étant seulement des modifications chimiques et structurales de molécules déjà existantes [40].



**Figure 4** : Nombre de nouveaux antibiotiques approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) [41].

Dans ce contexte délicat, où l'antibiothérapie semble atteindre ses limites, la recherche d'alternatives aux antibiotiques est indispensable afin d'éviter de se retrouver sans défense face aux futures infections et les bactériophages apparaissent alors comme une option thérapeutique plus que plausible. En effet, depuis le début des années 2000, le nombre d'articles scientifiques traitant de la phagothérapie a connu un véritable boom, reflétant le regain d'intérêt de la communauté scientifique pour cette discipline (Figure 5).



**Figure 5** : Pourcentage de publications contenant le terme « phage therapy » entre 1910 et 2008 [42].



## II. Les bactériophages :

### 1. Définition

Le terme bactériophage est formé à partir de deux mots d'origine grecque : *baktêria* qui signifie « bâton » et *phagos* qui signifie « manger » ; la notion de « bâton » faisant référence, pour l'époque, aux bactéries. C'est Félix d'Hérelle qui fut l'inventeur de ce nom pour qualifier ce nouveau micro-organisme découvert par lui-même, capable de « manger » des bactéries. Les bactériophages ou tout simplement phages, font partie de l'ensemble des virus. Par conséquent ce sont des entités qui ne peuvent se reproduire et donc se multiplier qu'aux dépens de cellules vivantes et plus particulièrement de cellules procaryotes bactériennes. Ils sont donc inoffensifs pour les cellules eucaryotes (humaines, animales et végétales). Les bactériophages sont présents quasiment partout sur Terre et peuplent tous les écosystèmes où l'on retrouve des bactéries (eaux d'égouts, eaux douces, sols, corps humain, etc.). On estime le nombre de bactériophages à environ  $10^{31}$  particules soit dix à cent fois plus que le nombre total de bactéries. Nous sommes donc en contact permanent avec ces entités microscopiques, de l'ordre de 20 à 200 nanomètres soit dix à cent fois plus petites que les bactéries [43].

### 2. Composition et structure

Le bactériophage est constitué systématiquement d'un seul type d'acide nucléique porteur de l'information génétique (ADN ou ARN) et d'une capsidie formée de protéines qui sont arrangées selon un motif précis permettant de protéger l'acide nucléique. L'association de l'acide nucléique et de la capsidie forme la nucléocapsidie ou la « tête » du bactériophage. Enfin, on retrouve dans certains cas une enveloppe constituée de lipides et de protéines virales qui entoure la nucléocapsidie. On parle alors de virus nus (résistants) ou de virus enveloppés (fragiles). Ce sont ces trois critères (type d'acide nucléique, symétrie de la capsidie et présence ou non d'enveloppe) qui permettent d'établir la classification des bactériophages [44].

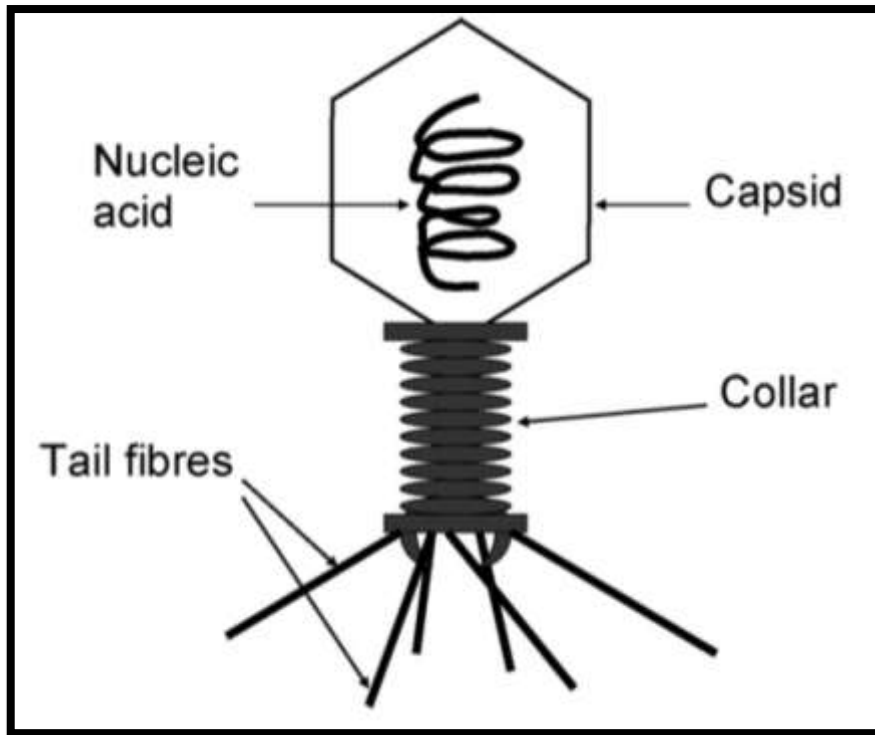
## 2.1. Génome viral ou phagique

Le génome viral est le porteur de l'information génétique permettant la synthèse de protéines virales. On distingue deux types de protéines : les protéines structurales et les protéines non structurales, intervenant dans la multiplication intracellulaire du phage. Il est constitué d'une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) qui peut être bicaténaire (double brin) ou monocaténaire (simple brin), segmenté ou non, mais également linéaire ou circulaire. La majorité des phages connus ont une molécule d'ADN bicaténaire. La taille du génome, qui varie de plusieurs dizaines à quelques centaines de paires de bases, est directement liée à la complexité morphologique du phage [45].

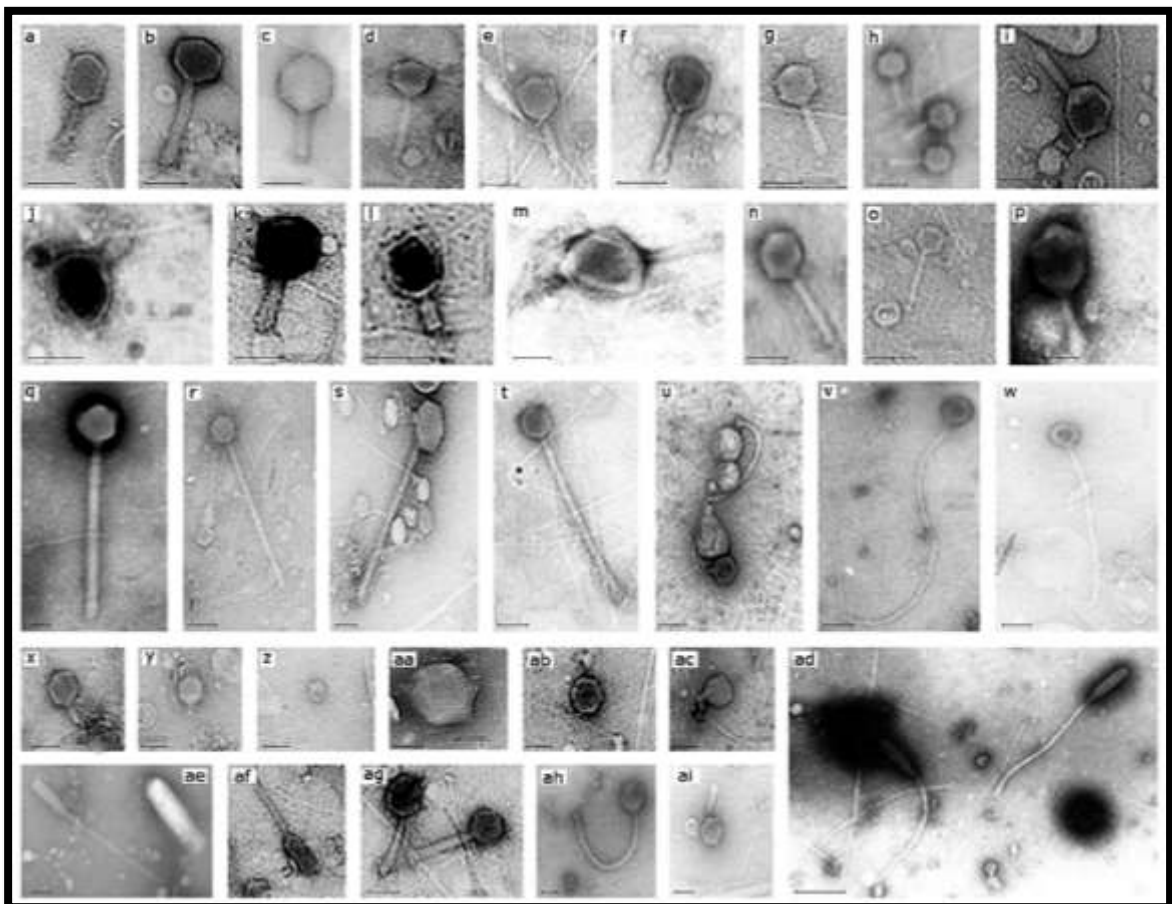
## 2.2. Capside

La forme de la capside est variable et généralement proportionnelle à la taille du génome qu'elle contient mais aussi protège. De plus, l'architecture de la capside est différente selon sa symétrie, que l'on peut classer en quatre groupes (Figure 8) [46] :

- Symétrie hélicoïdale : la capside est cylindrique. Les bactériophages ont alors une forme de filaments ou de bâtonnets.
- Symétrie cubique ou icosaèdre : la capside est à symétrie icosaédrique. Les bactériophages peuvent alors apparaître sphériques.
- Symétrie binaire ou phage caudé : la capside ou « tête » est à symétrie icosaédrique et la « queue » est à symétrie hélicoïdale.
- Symétrie complexe : la capside est de forme très diverse, on parle alors de phage pléomorphe.



**Figure 6** : Représentation schématique typique d'un bactériophage (phage caudé) [47].



**Figure 7** : Diversité morphologique des bactériophages observés au microscope [48].

### 3. Classification

Les bactériophages sont classés en fonction de la nature de leur acide nucléique (ADN ou ARN) et de leur structure générale (symétrie de la capsid, présence ou non d'enveloppe). A l'heure actuelle, la neuvième édition de taxonomie virale proposée par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) permet de classer pas moins de 6000 phages différents (Figure 8) [49].

#### 3.1. L'ordre des *Caudovirales*

On distingue un ordre principal, celui des *Caudovirales* qui regroupe la majorité des bactériophages (96%) et notamment tous ceux ayant une symétrie binaire (phage caudé). Par conséquent, les virions (particules virales) sont constitués d'une « tête » à symétrie icosaédrique et d'une « queue » à symétrie hélicoïdale. De plus, ils ne sont pas enveloppés et le génome est formé d'une molécule d'ADN bicaténaire, non segmentée et linéaire (Figures 6 et 7). Cet ordre est divisé en trois familles : les *Myoviridae*, les *Siphoviridae* et les *Podoviridae*.

##### 3.1.1. La famille des *Myoviridae*

Elle est caractérisée par la présence d'une « queue » longue et contractile. Cette famille étant elle-même subdivisée en trois sous-familles (*Pedovirinae*, *Spounavirinae* et *Tevenvirinae*) regroupant au total dix-huit genres pour quatre-vingt-six espèces. Exemple : le phage T4.

##### 3.1.2. La famille des *Siphoviridae*

Elle est caractérisée par la présence d'une « queue » longue mais non contractile. Cette famille étant elle-même subdivisée en dix genres pour trente et une espèces. Exemple : le phage  $\lambda$ .

### **3.1.3. La famille des *Podoviridae***

Elle est caractérisée par la présence d'une « queue » courte et non contractile. Cette famille étant elle-même subdivisée en deux sous-familles (*Autographivirinae* et *Picovirinae*) regroupant au total onze genres pour quarante-quatre espèces. Exemple : le phage T7.

## **3.2. L'ordre des *Ligamenvirales***

Un second ordre, celui des *Ligamenvirales*, regroupe deux familles dont les phages possèdent une capsidie à symétrie hélicoïdale :

### **3.2.1. La famille des *Lipothrixiviridae***

Il s'agit de phages à ADN bicaténaire, linéaire et possédant une enveloppe lipoprotéique (quatre genres pour neuf espèces). Exemple : le phage TTV1.

### **3.2.2. La famille des *Rudiviridae***

Il s'agit de phages à ADN bicaténaire, linéaire et dépourvu d'enveloppe (un genre pour trois espèces). Exemple : le phage SIRV-1.

## **3.3. Les autres familles**

Toutes les autres familles existantes ne sont pas rattachées à un ordre, mais on peut regrouper les familles en fonction de la géométrie de leur capsidie, comme premier critère, établi de façon arbitraire.

### 3.3.1. Phage à symétrie cubique ou icosaèdre

- *Corticoviridae* : phage à ADN bicaténaire, circulaire et possédant une capsidie complexe (un genre pour une espèce). Exemple : le phage PM2.
- *Cystoviridae* : phage à ARN bicaténaire, linéaire, segmenté et possédant une enveloppe lipidique (un genre pour une espèce). Exemple : le phage  $\phi 6$ .
- *Leviviridae* : phage à ARN monocaténaire, linéaire et ne possédant pas d'enveloppe (deux genres pour quatre espèces). Exemple : le phage MS2.
- *Microviridae* : phage à ADN monocaténaire, circulaire et possédant une petite capsidie non enveloppée (quatre genres pour douze espèces). Exemple : le phage  $\phi X174$ .
- *Tectiviridae* : phage à ADN bicaténaire, linéaire et dépourvu d'enveloppe (un genre pour cinq espèces). Exemple : le phage PRD1.

### 3.3.2. Phage à symétrie hélicoïdale ou phage filamenteux

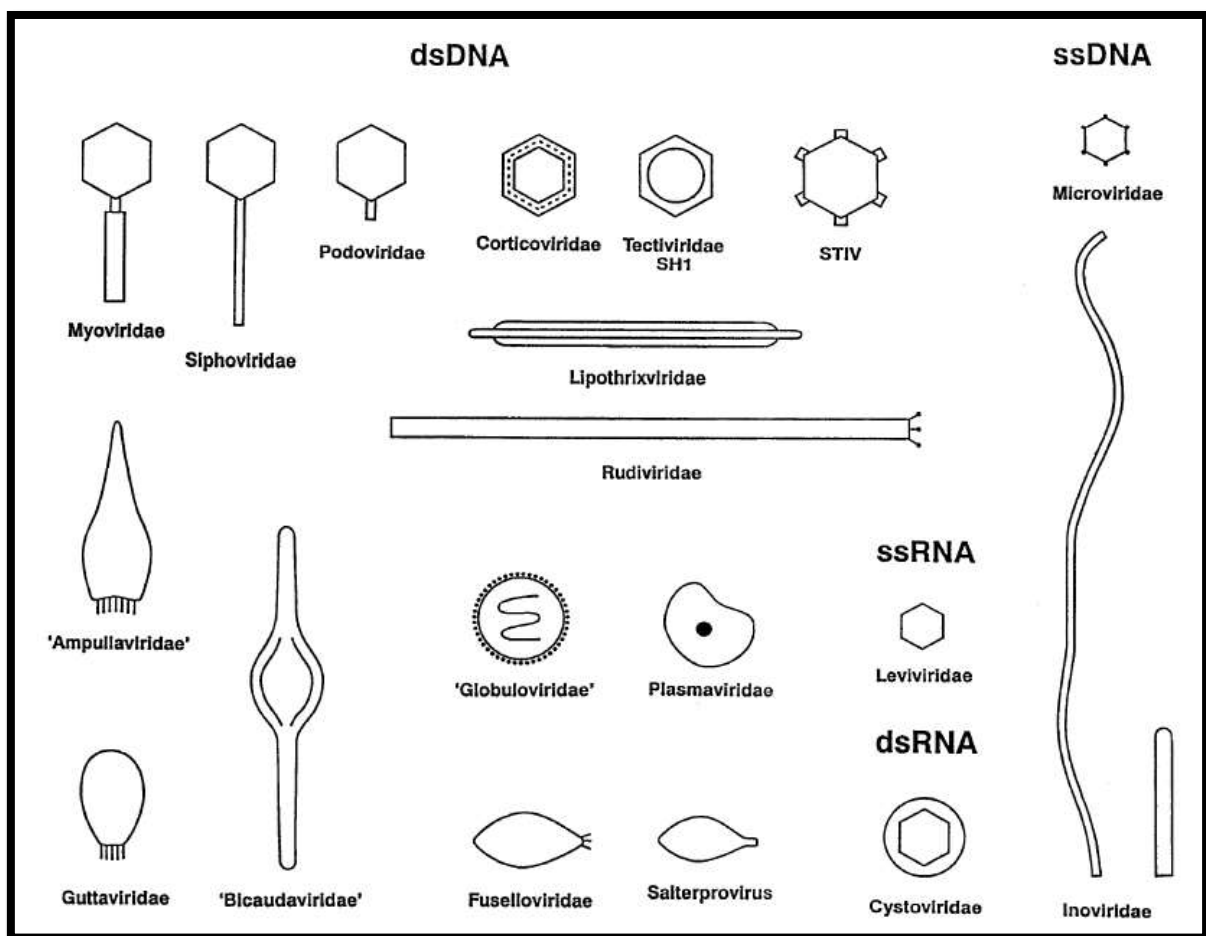
- *Inoviridae* : phage à ADN monocaténaire, circulaire et dépourvu d'enveloppe (deux genres pour quarante-trois espèces). Exemple : le phage M13.

### 3.3.3. Phage à symétrie complexe ou phage pléomorphe

- *Plasmiviridae* : phage à ADN bicaténaire, circulaire et possédant une enveloppe lipidique mais dépourvu de capsidie (un genre pour une espèce). Exemple : le phage L2.
- *Fuselloviridae* : phage à ADN bicaténaire, circulaire et possédant une enveloppe lipidique mais dépourvu de capsidie (deux genres pour neuf espèces). Exemple : le phage SSV1.
- *Salterprovirus* : phage à ADN bicaténaire et linéaire (non rattaché à une famille donc ce genre pour une espèce). Exemple : le phage His 1.
- *Guttaviridae* : phage à ADN bicaténaire et possédant une enveloppe lipidique (deux genres pour deux espèces). Exemple : le phage SNDV.

- *Ampullaviridae* : phage à ADN bicaténaire et linéaire (un genre pour une espèce).  
Exemple : le phage ABV.
- *Bicaudaviridae* : phage à ADN bicaténaire et circulaire (un genre pour une espèce). Exemple : le phage ATV.
- *Globuloviridae* : phage à ADN bicaténaire et linéaire (un genre pour deux espèces). Exemple : le phage PSV.

La classification est indispensable pour simplifier et généraliser l'étude des phages. En effet, le classement par ordre, famille, sous-famille, genre et espèce, bien que fastidieux, facilite les comparaisons, la recherche et la compréhension des bactériophages. Aujourd'hui, les taxonomistes travaillent à standardiser la dénomination des phages [50].



**Figure 8 :** Morphotypes des différentes familles de bactériophages [49].

## 4. Cycles de reproduction phagique

Les phages, comme nous l'avons vu, sont des parasites obligatoires des bactéries. Ils doivent donc utiliser les enzymes et la machinerie cellulaire de leur hôte pour se répliquer. Il existe principalement quatre cycles distincts [51]:

- Cycle lytique : le phage dit « virulent » provoque la lyse bactérienne après s'être répliqué, libérant un grand nombre de virions (Figure 9) [52]. Exemple : phage T4 (*Myoviridae*).
- Cycle lysogénique : le phage dit « tempéré » intègre son génome à celui de la bactérie sous la forme d'un prophage. Il reste latent, sans tuer la bactérie, jusqu'à l'induction d'un cycle lytique (Figure 9) [53]. Exemple : phage  $\lambda$  (*Siphoviridae*).
- Cycle pseudo-lysogénique : le phage injecte son génome dans la cellule hôte mais celui-ci ne s'intègre pas et reste latent dans le cytoplasme. Ce cycle reste mal compris et interviendrait chez les bactéries ne possédant pas assez d'énergie disponible pour le phage, cela lui permettrait ainsi de survivre dans des environnements défavorables en attendant des conditions plus propices pour mettre en place un cycle lytique ou un cycle lysogénique [54].
- Cycle chronique : le phage s'intègre au génome de l'hôte, se réplique, libère des virions par bourgeonnement mais cela sans lyser la bactérie. Exemple : phage M13 (*Inoviridae*). Ce cycle étant rarissime et sans intérêt en phagothérapie, il ne sera pas développé par la suite [55].

Seuls les deux premiers cycles (lytique et lysogénique) seront davantage détaillés par la suite car ils permettent de mieux comprendre l'importance de l'utilisation des phages virulents par rapport aux phages tempérés dans la phagothérapie.



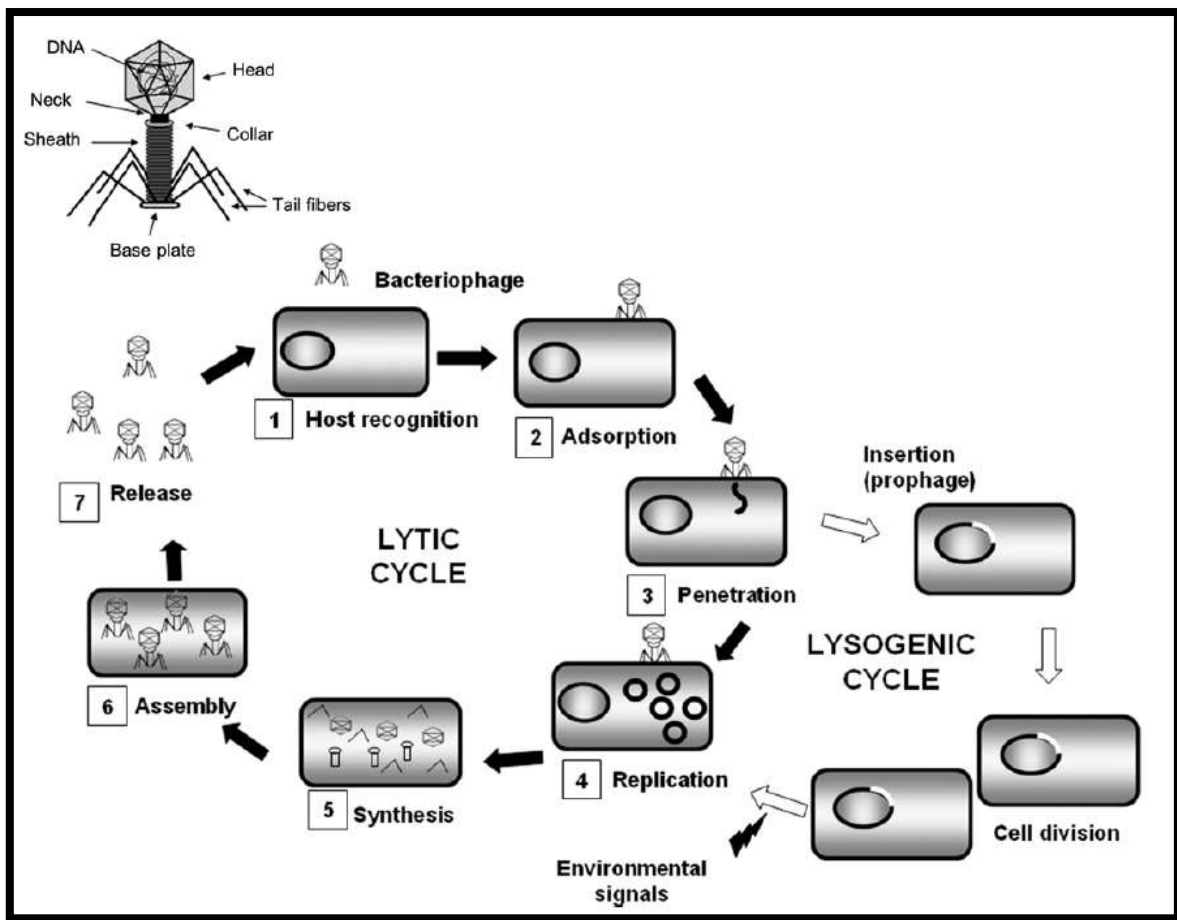


Figure 9 : Schéma des cycles de reproduction phagique (lytique et lysogénique) [56].

## 4.1. Cycle lytique

### 4.1.1. Adsorption

En premier lieu, il faut que la concentration en phages soit élevée proportionnellement à celle des bactéries afin d'augmenter les « chances » de collision phage-bactérie. Puis, il faut une complémentarité étroite entre le récepteur bactérien et le site d'interaction phagique. Le récepteur bactérien peut être situé au niveau de sa paroi (lipopolysaccharides, protéines, etc.) ou au niveau de ses appendices (flagelles et pili) et le site d'interaction phagique peut être situé au niveau des fibres caudales ou au niveau de la capsid. Cette fixation, réversible à son début *via* des interactions électrostatiques, devient rapidement irréversible.

#### **4.1.2. Exportation du génome**

Ensuite, grâce à un équipement enzymatique, le phage diminue fortement la rigidité de la paroi bactérienne au niveau du site de fixation. Le bactériophage peut alors exporter son génome contenu dans la capsidie vers le cytoplasme de la cellule hôte. Le reste du phage reste à l'extérieur de la bactérie. Chez les *Myoviridae*, l'introduction du génome est réalisée par la contraction de la gaine de la « queue ».

#### **4.1.3. Réplication virale**

Une fois le génome viral à l'intérieur de la bactérie, tout le métabolisme cellulaire et les ressources de l'hôte sont détournés en sa faveur. Les gènes viraux sont alors immédiatement répliqués et transcrits, aboutissant à la synthèse des protéines virales servant à la fabrication de virions. On distingue deux types de protéines, les protéines précoces qui sont responsables de la multiplication du phage (enzymes) ainsi que les protéines tardives qui regroupent les protéines structurelles (capsidie, « queue », fibres, etc.) et les enzymes responsables de la libération des virions.

#### **4.1.4. Assemblage**

Les éléments de structure phagique produits en grande quantité à l'intérieur de la bactérie s'assemblent spontanément et l'acide nucléique est empaqueté dans la capsidie, formant un grand nombre de virions identiques au phage infectant.

#### **4.1.5. Libération et contamination**

Enfin, les enzymes nouvellement synthétisées (lysozyme) ont pour rôle de détruire la paroi bactérienne, faisant éclater la cellule permettant ainsi la libération par la même occasion de tous les virions produits et ceux-ci pourront alors infecter d'autres bactéries à proximité, selon le même schéma. A noter que le cycle lytique complet se déroule en quelques minutes seulement, montrant ainsi l'efficacité redoutable des phages virulents.

## 4.2. Cycle lysogénique

Les premières étapes (adsorption et exportation du génome) sont identiques au cycle lytique. Cependant, une fois l'acide nucléique viral introduit dans le cytoplasme, celui-ci est alors intégré au génome bactérien, *via* une intégrase, sous la forme d'un prophage. Le prophage reste dormant et se réplique avec le génome bactérien. Il est donc transmis de génération en génération bactérienne et cela de façon silencieuse. La cellule hôte est alors appelée lysogène et elle ne peut plus être surinfectée par le même bactériophage, on dit qu'elle est immunisée. L'état quiescent et l'immunité sont maintenus par la synthèse en continu d'un répresseur spécifique des fonctions virales et lytiques. Néanmoins, en cas de chute du niveau du répresseur, le prophage est libéré du génome bactérien et enclenche un cycle lytique, c'est l'induction [57]. Cette induction peut survenir occasionnellement de façon spontanée mais elle résulte le plus souvent de facteurs externes qui endommagent l'ADN (rayons ultraviolets, rayons X, agents chimiques, etc.).

Il faut d'ores et déjà noter que les phages tempérés sont impliqués dans l'évolution des bactéries par l'intermédiaire de deux phénomènes importants : la conversion lysogénique et la transduction (généralisée, abortive ou localisée).

### 4.2.1. La conversion lysogénique

L'intégration du prophage au génome bactérien peut modifier les propriétés de la cellule hôte et induire de nouvelles caractéristiques. Par exemple, une bactérie lysogène peut acquérir la possibilité de produire des toxines pathogènes : *Corynebacterium diphtheriae* avec la toxine diphtérique, *Streptococcus pyogenes* avec la toxine érythrogyène responsable de la scarlatine, *Escherichia coli* avec les toxines Stx (Shiga-toxines ou vérotoxines) ou encore *Staphylococcus aureus* avec la staphylokinase et la leucocidine de Panton-Valentine [58]. On peut également observer des modifications antigéniques de surface chez des Salmonelles (*Salmonella sp.*), ce qui a pour conséquence d'accentuer leur virulence.

## 4.2.2. La transduction

C'est le transfert indirect de matériel génétique bactérien entre deux bactéries plus ou moins proches phylogénétiquement, par l'intermédiaire d'un bactériophage, qui joue donc le rôle de vecteur. Ces échanges de gènes peuvent être à l'origine de la dissémination dans la population bactérienne de gènes de résistance aux antibiotiques ou de facteurs de pathogénicité [59]. On distingue trois types de transduction :

### 4.2.2.1. La transduction généralisée et non spécifique

L'ADN bactérien est fragmenté par une nucléase phagique, par conséquent, lors de l'assemblage des virions dans la cellule hôte, des morceaux d'ADN bactérien peuvent s'incorporer, au hasard, dans la capsidie d'un bactériophage. Puis, le phage peut transférer cet ADN bactérien à une autre bactérie réceptrice, où il sera intégré et recombiné à son génome. La transduction est alors complète. Il faut noter que cette transduction généralisée peut également être effectuée par un phage virulent.

### 4.2.2.2. La transduction abortive

C'est le même mécanisme que la transduction généralisée, cependant l'ADN injecté dans la cellule réceptrice n'est pas intégré au génome bactérien et ne sera donc pas transmis à la descendance de la bactérie. Néanmoins, il reste fonctionnel et s'exprime normalement mais il sera dilué au cours des divisions cellulaires successives.

### 4.2.2.3. La transduction localisée et spécifique

Cette transduction n'est réalisée que par les phages tempérés. Lors de la libération du prophage du génome bactérien pour réaliser un cycle lytique, on observe parfois, une excision anormale aboutissant à un prophage contenant une partie du

génomique de l'hôte. Les gènes bactériens peuvent donc être transmis à une autre bactérie lors d'une nouvelle infestation.

Après avoir développé les deux cycles majoritaires des phages, on comprend bien l'intérêt de sélectionner des bactériophages lytiques en thérapeutique. En effet, en plus de leur inefficacité pour lyser les bactéries, les bactériophages lysogéniques peuvent être les vecteurs de gènes de pathogénicité ou de résistance aux antibiotiques. Bien qu'ils jouent un rôle majeur dans l'évolution des bactéries, la part des phages tempérés ne représenterait qu'environ 10% des bactériophages [60].

## **5. Habitat**

Comme nous l'avons vu auparavant, les bactériophages sont des parasites obligatoires des bactéries, par conséquent, nous les retrouvons dans tous les milieux où celles-ci sont présentes. Dès 1920, J. Dumas mit en évidence la présence de phages dans les matières fécales humaines, dans la terre du sol ainsi que dans l'eau (de ville, de rivière et de conduite) [61]. De plus, les bactériophages sont de très loin l'entité biologique la plus abondante sur Terre, en effet, leur nombre total est de l'ordre de  $10^{30}$  à  $10^{32}$  soit environ dix fois plus que la population bactérienne [62].

Dans la nature, les bactériophages jouent un rôle très important et encore mal étudié. Les phages lytiques seraient responsables d'environ 10% à 50% de la mortalité bactérienne journalière, contribuant ainsi au renouvellement de la masse bactérienne. Tandis que les phages tempérés sont eux responsables des échanges de génome entre les bactéries, contribuant ainsi à l'évolution bactérienne en leur permettant d'acquérir de nouvelles caractéristiques : virulence, résistance, etc. [63].

En résumé, les phages sont présents partout sur Terre et leurs rôles dans les différents écosystèmes sont encore mal connus, rendant dangereux la modification des équilibres préexistants [64].

## **6. Obtention d'un bactériophage**

Comme nous venons de le démontrer, les bactériophages sont présents partout autour de nous, il n'est donc pas difficile de les trouver. Cependant, c'est dans les milieux liquides que l'on peut le plus facilement les extraire : eaux usées, eaux de rivière, eaux d'égouts, etc. La technique actuelle d'isolement du phage ne diffère que très peu de celle employée par Félix d'Hérelle à ses débuts et elle se base sur l'effet visible du phénomène lytique [65].

### **6.1. Première étape**

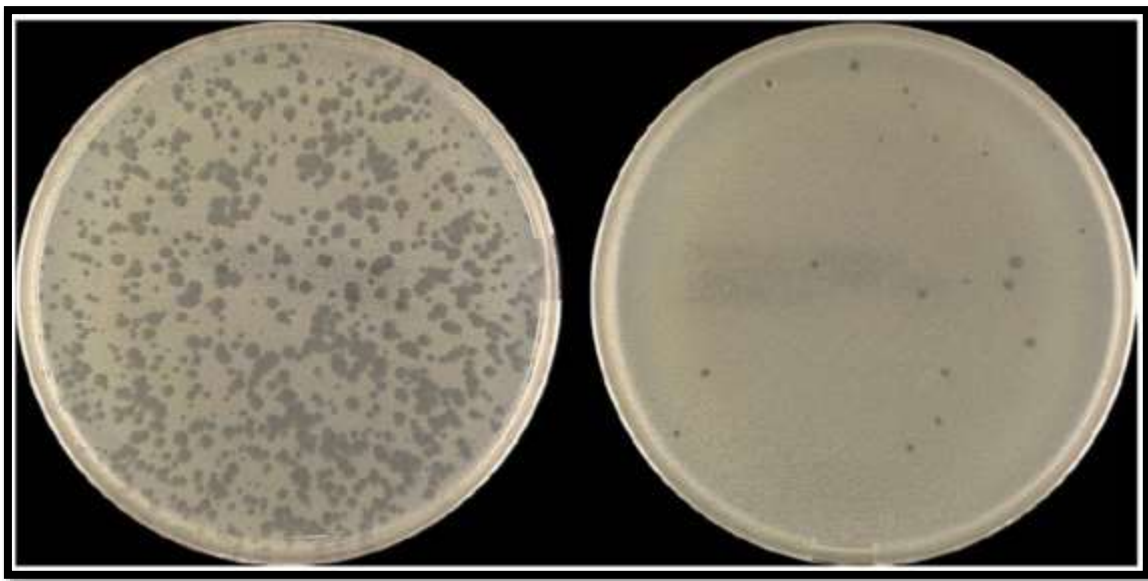
Il faut éliminer tous les débris de l'eau sale par centrifugation et décantation. Puis on filtre le surnageant *via* un filtre de 0.2  $\mu\text{m}$  qui va stopper les bactéries mais laisser passer les virus donc les bactériophages.

### **6.2. Deuxième étape**

On réunit dans un bouillon de culture, la bactérie pathogène dont on recherche un ou des phages actifs, avec le filtrat obtenu dans la première étape. Ensuite, on incube le bouillon de culture sous agitation douce et à une température de 35°C pendant plusieurs heures. Quelques heures suffisent connaissant la croissance exponentielle des bactériophages en présence de bactéries compatibles. Lorsque les heures sont écoulées, on ajoute du chloroforme dans le bouillon afin de détruire les bactéries résiduelles, sans que cela n'altère les phages. Enfin, on centrifuge et on filtre de nouveau pour éliminer les débris bactériens. On obtient alors un filtrat contenant un ou des bactériophages virulents vis-à-vis de la même bactérie.

### 6.3. Troisième étape

On étale des dilutions successives du filtrat obtenu dans la deuxième étape sur une gélose en boîte de Pétri où la bactérie ciblée est initialement déposée en tapis régulier. Après plusieurs heures d'incubation, on observe des taches claires sur la surface de la gélose, qui correspondent à des plages de lyse, c'est-à-dire à des colonies de bactériophages qui ont lysé la bactérie (Figure 10).



**Figure 10** : Plages de lyse (nombreuses à gauche et faible à droite) sur une nappe de culture de *Staphylococcus aureus* en boîte de Petri [62].

### 6.4. Quatrième étape

On ponctionne les plages de lyse que l'on va propager chacune de leur côté sur une suspension fraîche de la bactérie cible comme dans la deuxième étape. On recommence l'opération plusieurs fois afin d'optimiser la virulence du ou des bactériophages.

## **6.5. Cinquième étape**

Une fois l'isolement et la purification effectués, il faut vérifier le titre, c'est-à-dire, le nombre de particules phagiques lytiques par unité de volume qui s'exprime en PFU (Plages Formant Unité) par millilitre. En effet, un titre trop faible, à savoir inférieur à  $10^5$  PFU/ml, est gage d'un pouvoir lytique limité ne garantissant pas le succès thérapeutique. Pour déterminer le titre, il suffit de compter le nombre de plages claires induites par la suspension de bactériophages sur un tapis de culture bactérienne d'une boîte de Petri.

Ainsi, l'obtention d'un bactériophage lytique spécifique d'une bactérie fait appel à des procédés simples, peu coûteux, faciles à mettre en œuvre et parfaitement connus de tout biologiste [66].

## **7. Avantages et inconvénients**

Si l'on compare les caractéristiques des bactériophages vis-à-vis des antibiotiques, la référence thérapeutique des agents antibactériens, on comprend aisément tous les avantages que l'on peut en tirer, pour des inconvénients relativement mineurs et contournables (Figure 11) [67].

### **7.1. Avantages**

- Action bactéricide puissante et rapide avec une forte spécificité bactérienne : pas de déséquilibre de la flore commensale à l'origine d'effets iatrogènes ni de sélection de résistance chez d'autres bactéries comme cela peut être le cas avec les antibiotiques bactériostatiques.
- Très peu d'effets secondaires avec les préparations phagiques, à condition qu'elles soient purifiées des endotoxines produites lors de l'amplification des bactériophages sur des cultures de bactéries vivantes. Par conséquent, l'usage de



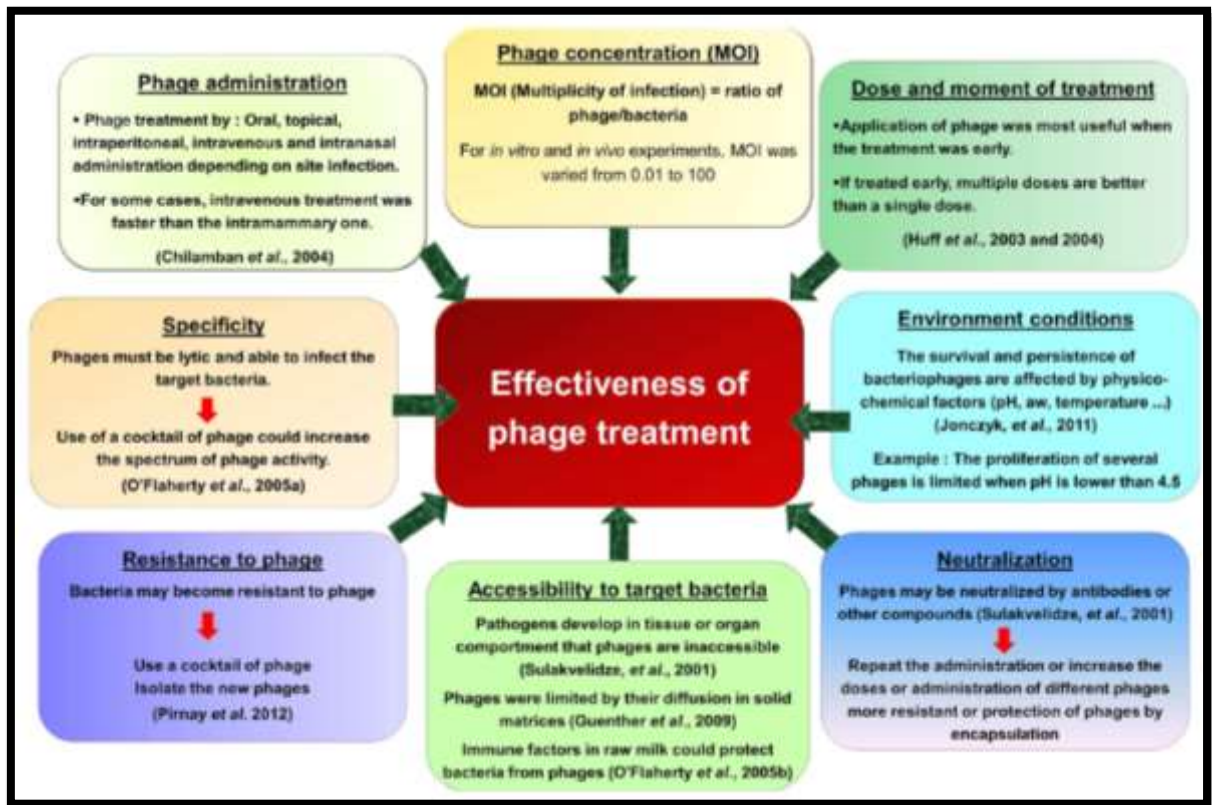
phages est intéressant chez les personnes allergiques à certains antibiotiques ou chez celles subissant de lourds effets indésirables.

- Pas d'interaction médicamenteuse nécessitant un réajustement des traitements concomitants ni d'adaptation posologique en fonction de l'âge ou du poids du patient.
- La réplication des phages s'effectue uniquement au niveau du site infectieux, en fonction de la densité microbienne, augmentant ainsi l'efficacité du traitement. Les cellules eucaryotes sont totalement ignorées par les bactériophages.
- Une synergie phage-antibiotique qui permet d'augmenter la virulence des phages.
- Une facilité de fabrication avec un coût de production faible, notamment grâce à un vivier de bactériophage quasi inépuisable et facilement accessible.

## **7.2. Inconvénients**

- Spécificité étroite avec le germe, nécessitant l'isolement et l'identification précise de la bactérie pathogène. Ce qui explique la difficulté d'un traitement probabiliste ainsi que la complexité des infections à germes multiples. Néanmoins, les infections polymicrobiennes peuvent être traitées par l'utilisation de cocktails de phages [68].
- Nécessité d'utiliser un bactériophage lytique et non un bactériophage tempéré car en plus d'être inefficace il peut être à l'origine de transfert de gènes pathogènes vers les bactéries. Cependant, grâce à la biologie moléculaire et au séquençage du génome viral, on peut rapidement éliminer les phages contenant des séquences génomiques potentiellement dangereuses (gènes de toxines, gènes de virulence, gène de résistance aux antibiotiques, etc.).

- Le traitement des infections autres que locales (plaies, brûlures, otites, etc.) est délicat car les phages sont considérés comme des éléments extérieurs à l'organisme et peuvent être détruits par le système immunitaire.



**Figure 11** : Facteurs qui influent sur l'efficacité de l'utilisation des phages contre les bactéries pathogènes [69].

## 8. Cadre réglementaire

Bien que la phagothérapie soit expérimentée depuis maintenant presque un siècle, il existe aujourd'hui un véritable vide juridique sur cette thérapeutique aussi bien en Europe qu'aux Etats-Unis. Cela a pour conséquence de freiner la recherche en limitant les études cliniques sur l'homme qui permettraient de générer des données de sécurité et d'efficacité. C'est pourquoi, il faut rapidement mettre en place un cadre réglementaire spécifique aux bactériophages afin d'accélérer et de faciliter leurs analyses [70].

A l'heure actuelle, les bactériophages sont pourtant bien inclus dans la définition du médicament selon le Code de la santé publique (CSP) en vigueur en France : « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique » (Article L.5111-1). En effet, même les micro-organismes conviennent au terme « substance » qui correspond à toute matière quelle que soit son origine (humaine, animale, végétale ou chimique).

Cependant, si les bactériophages sont définis comme étant des médicaments, il implique de suivre la procédure d'autorisation de mise sur le marché (AMM) assurant la qualité, l'efficacité et l'innocuité de la spécialité pharmaceutique définie comme « tout médicament préparé à l'avance, présenté sous un conditionnement particulier et caractérisé par une dénomination spéciale » (Article L.5111-2 du Code de la santé publique).

Or, les procédures d'autorisation de mise sur le marché actuelles qui sont conçues pour des médicaments inertes et fixes ne sont pas adaptées au développement industriel de cocktails de phages préparés à l'avance, ni à une approche au cas par cas pour un patient donné. En effet, cela ne permet pas une mise à jour régulière des suspensions de phages que l'on doit adapter en fonction des bactéries pour une efficacité optimale [71].

Par conséquent, en l'absence de produits agréés sur le marché pharmaceutique, la phagothérapie n'est employée que ponctuellement dans des cas d'impasses thérapeutiques en s'appuyant sur la Déclaration d'Helsinki qui autorise le médecin, avec le consentement éclairé du patient, à utiliser des méthodes non éprouvées ou nouvelles si elles offrent un espoir de guérison ou permettent de soulager les souffrances du malade. C'est à partir de cette Déclaration d'Helsinki que l'Institut Ludwik Hirszfeld en Pologne se rattache pour pratiquer la phagothérapie auprès de ses

patients. Cependant, dans ce cas, il ne s'agit que d'une utilisation de dernier recours, une fois que toutes les autres possibilités thérapeutiques ont été envisagées.

D'autres alternatives sont possibles mais aucune n'est viable au long cours. Par exemple le recours à la préparation magistrale qui est définie comme « tout médicament préparé extemporanément selon une prescription médicale destinée à un malade déterminé en raison de l'absence de spécialité pharmaceutique disponible disposant d'une autorisation de mise sur le marché » (Article L.5121-1 du Code de la santé publique). Cependant, les préparations magistrales doivent être effectuées en utilisant des produits référencés, ce qui n'est pas le cas pour les bactériophages. Une autre alternative aurait été d'utiliser les phages pour les maladies dites « orphelines de traitement » mais cela ne concerne que les maladies comptant moins d'une personne sur 2000 dans une population, ce qui n'est donc pas applicable pour les utilisations possibles de la phagothérapie (les grands brûlés, les infections nosocomiales, etc.).

Même si quelques alternatives existent, permettant une utilisation à court terme de la phagothérapie, aucune d'elles n'est réellement satisfaisante à long terme. L'unique solution serait de créer un cadre spécifique à la phagothérapie comme ce fut le cas pour un certain nombre de produits dits « frontières » tels que les thérapies géniques, les thérapies cellulaires ou encore les vaccins. La réglementation doit être adaptée afin de donner une chance à la phagothérapie d'être mise en œuvre et pour exploiter pleinement tout son potentiel entrevu depuis maintenant plusieurs décennies [72].

## **9. Essais cliniques récents**

En France, la société Pherecydes Pharma® va participer à la première étude clinique européenne sur la phagothérapie en collaboration avec la Belgique et la Suisse, à travers sept hôpitaux civils ou militaires en 2015 [73]. Coordonné par le Service de santé des Armées (Ministère de la Défense), l'objectif de l'étude Phagoburn est d'évaluer l'efficacité ainsi que l'innocuité des bactériophages pour traiter les infections cutanées chez les patients brûlés, provoquées par les bactéries *Escherichia*

*coli* et/ou *Pseudomonas aeruginosa* (Phase I/II) [74]. En effet, ces infections représentent la première cause de mortalité chez les grands brûlés car elles sont à l'origine de pathologies graves et difficiles à traiter à l'heure actuelle. Cette étude va inclure environ 200 patients et fait suite aux essais précliniques sur des modèles animaux (souris) qui ont attesté d'une très bonne efficacité du produit. La BioTech Pherecydes Pharma® est la seule société au monde capable de maîtriser la technique de répliation accélérée et ciblée des phages *in vitro*, technologie protégée par trois brevets. Son rôle est donc de mettre au point des cocktails de bactériophages très différents afin d'éradiquer le plus efficacement possible la bactérie visée [75]. C'est la PME Clean Cells®, établissement pharmaceutique basé à Boufféré en Vendée qui assure la production de ces cocktails en respectant les bonnes pratiques cliniques (BPC) et les bonnes pratiques de fabrication pharmaceutique (BPF) indispensables pour effectuer les essais cliniques sur l'homme [76].

De plus, en 2014 l'Institut Pasteur, en collaboration avec l'association « PhagEspoirs » et grâce notamment au financement de l'association « Vaincre la mucoviscidose » ont évalué l'efficacité d'un cocktail de dix phages (PAK-P1, PAK-P2, PAK-P3, PAK-P4, PAK-P5, P3-CHA, CHA-PI, PhiKZ, Luz19 et LBL3) sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* présente dans les expectorations de patients atteints de la mucoviscidose. Cette étude transversale multicentrique porte sur les crachats de 58 patients infectés chroniquement et provenant de trois hôpitaux différents : Montpellier (23), Nancy (20) et Paris (15). Sur les 58 échantillons récoltés, uniquement 48 contenaient réellement des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats de cette expérience montrent que dans près de 85% des cas (41 sur 48) on observe une augmentation du nombre de bactériophages, associée à une diminution du nombre de bactéries. Enfin, l'analyse statistique des données cliniques ne démontre aucune corrélation entre l'âge ou le sexe du patient, le VEMS, le dernier traitement antibiotique, la date de colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*, et l'efficacité des phages. Cette étude *ex vivo* pionnière représente une étape importante vers le développement de la phagothérapie pour traiter les infections pulmonaires chroniques, quelles que soient les caractéristiques cliniques du patient [77].

### **III. La mucoviscidose :**

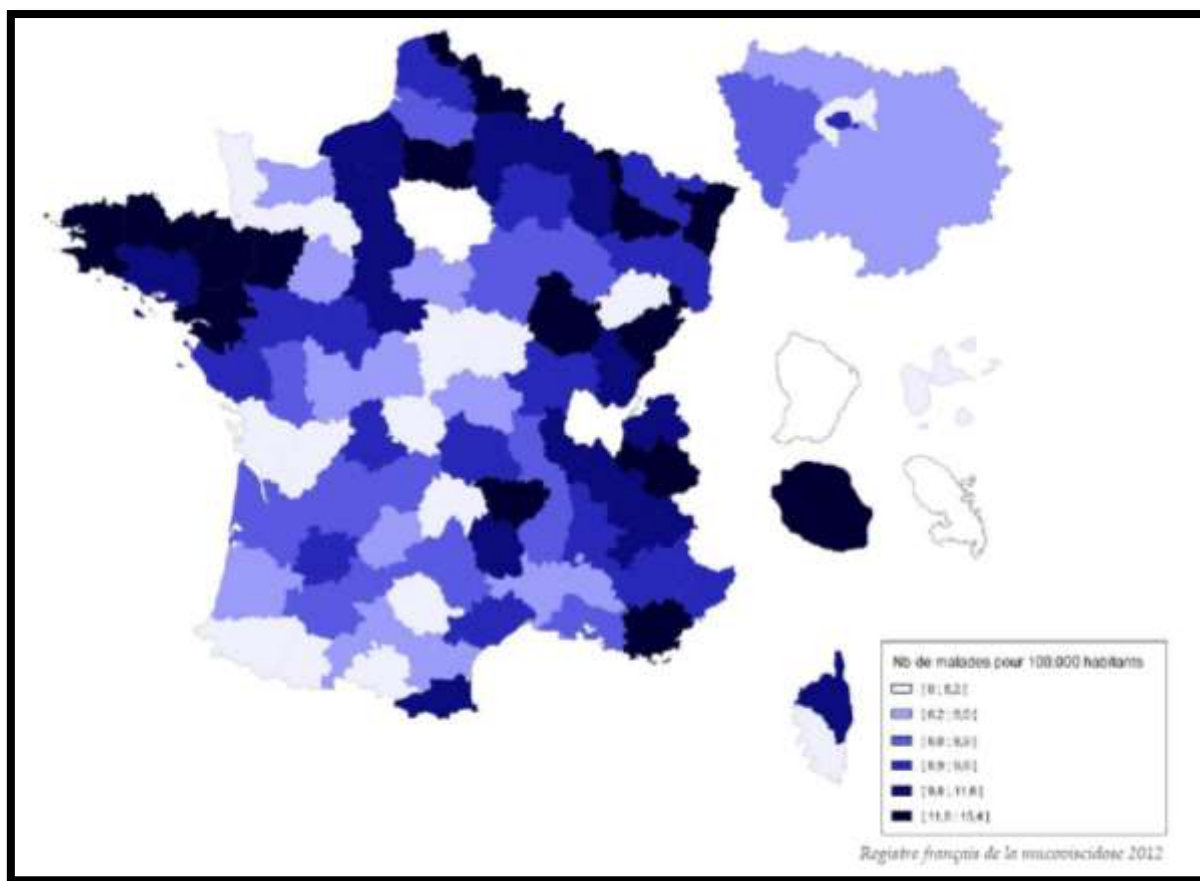
#### **1. Généralités**

La mucoviscidose ou « fibrose kystique du pancréas » est une maladie génétique rare qui touche, à l'heure actuelle, entre 6000 et 6500 patients en France. C'est donc la maladie génétique héréditaire grave la plus fréquente, avec environ un enfant atteint sur 4200 naissances, ce qui représente 200 nouveaux malades chaque année. Elle provoque des dysfonctionnements de nombreux organes, notamment au niveau du système respiratoire, du système digestif mais également au niveau des glandes sudoripares et de l'appareil génital [78].

#### **2. Épidémiologie**

En 1992, l'association Vaincre la Mucoviscidose met en place un Observatoire National de la Mucoviscidose (ONM) afin de promouvoir l'information à autrui, d'appréhender le coût socio-économique de la maladie et d'améliorer la connaissance des caractéristiques médicales et sociales. Puis, l'ONM s'est transformé en Registre Français de la Mucoviscidose (RFM) regroupant les personnes atteintes de la mucoviscidose et suivies dans les centres de soins aussi bien en France métropolitaine qu'à la Réunion ou encore à la Guadeloupe [79].

Les régions les plus touchées par la maladie sont situées au nord-ouest (Bretagne, Pays de la Loire, Nord-Pas-de-Calais, Haute et Basse Normandie) et dans l'est de la France (Lorraine, Alsace, Franche-Comté, Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte d'Azur) (Figure 12) [80].



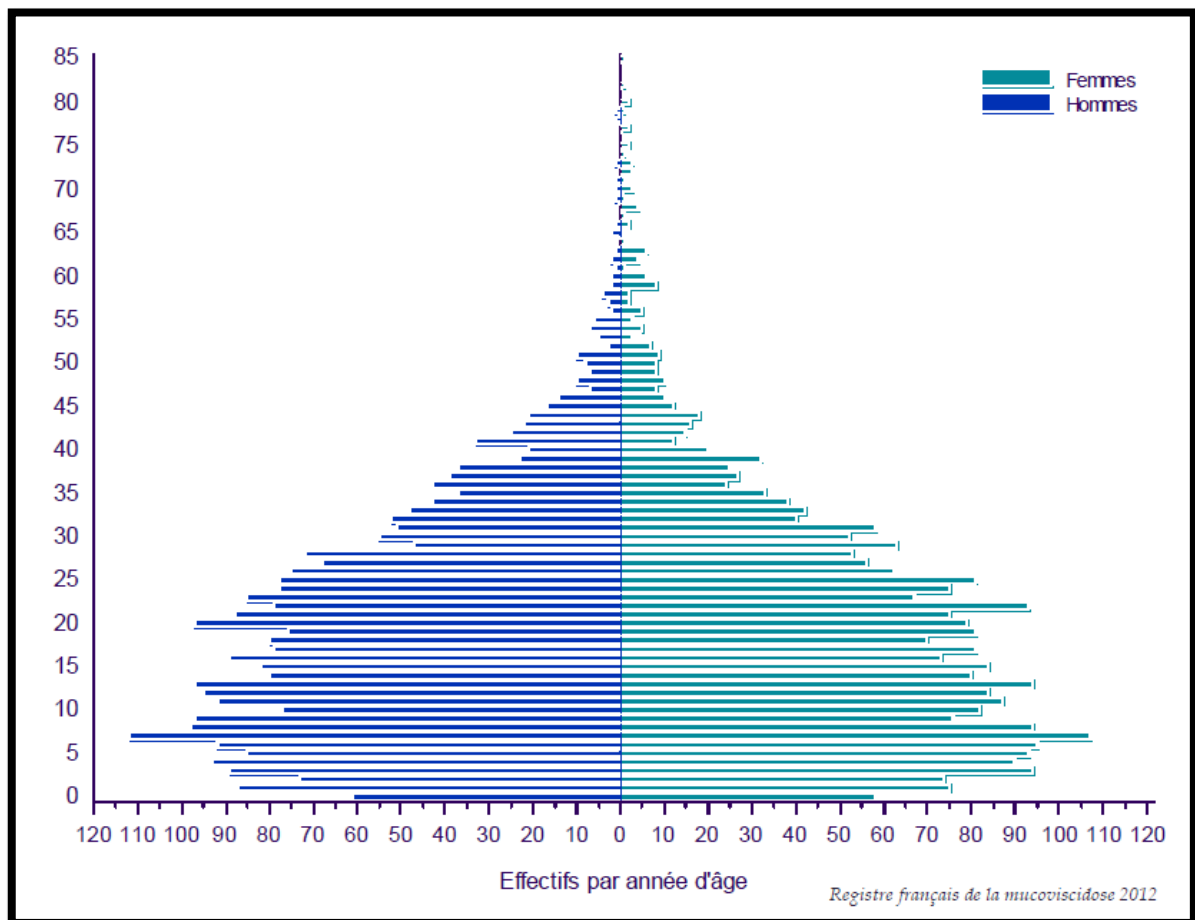
**Figure 12** : Prévalence de la mucoviscidose par département (nombre de patients pour 100.000 habitants) en 2012 [80].

On observe un accroissement constant du nombre de patients en vingt ans, passant d'environ 1500 malades en 1992 à plus de 6000 en 2012. De plus, sur les mêmes périodes, l'âge moyen ainsi que l'âge médian des patients ont gagné plus de trois ans, évoluant respectivement de 15.8 à 19.2 ans et de 14 à 17 ans. Le pourcentage d'adultes a progressé, passant de 20% à près de 50%, avec une augmentation de la population des plus de quarante ans de 124 à 469 patients. Enfin l'espérance de vie en France était estimée en 1965 à 7 ans et en 2005 à 47 ans (Figures 13, 14, 15 et 16) [80].

Indicateurs	Années d'enquête									
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Patients recensés*	4117	4549	4755	5003	5148	5379	5650	5792	6046	6196
Patients vus dans l'année**	4111	4544	4745	4994	5140	5357	5628	5758	5993	6145
Enfants	2550	2799	2812	2932	2935	2971	3049	3040	3074	3099
Adultes	1561	1745	1933	2062	2205	2386	2579	2718	2919	3046
+ de 40 ans	124	160	175	196	226	272	329	358	415	469
Hommes	2157	2368	2497	2595	2686	2786	2916	2958	3100	3171
Femmes	1954	2176	2248	2399	2454	2571	2712	2800	2893	2974
Age moyen (années)	15,8	16	16,3	16,4	16,8	17,3	17,7	18,1	18,7	19,2
Age médian (années)	14	14	15	15	15	16	16	16	17	17
Age minimum (années)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Age maximum (années)	77	78	74	76	77	78	79	80	87	86

*Registre français de la mucoviscidose 2012*

**Figure 13 :** Évolution annuelle des principaux indicateurs [80].



**Figure 14 :** Pyramide des âges en 2012 [80].





Figure 15 : Nombre de patients vus dans l'année et pourcentage d'adultes, évolution depuis 1992 [80].

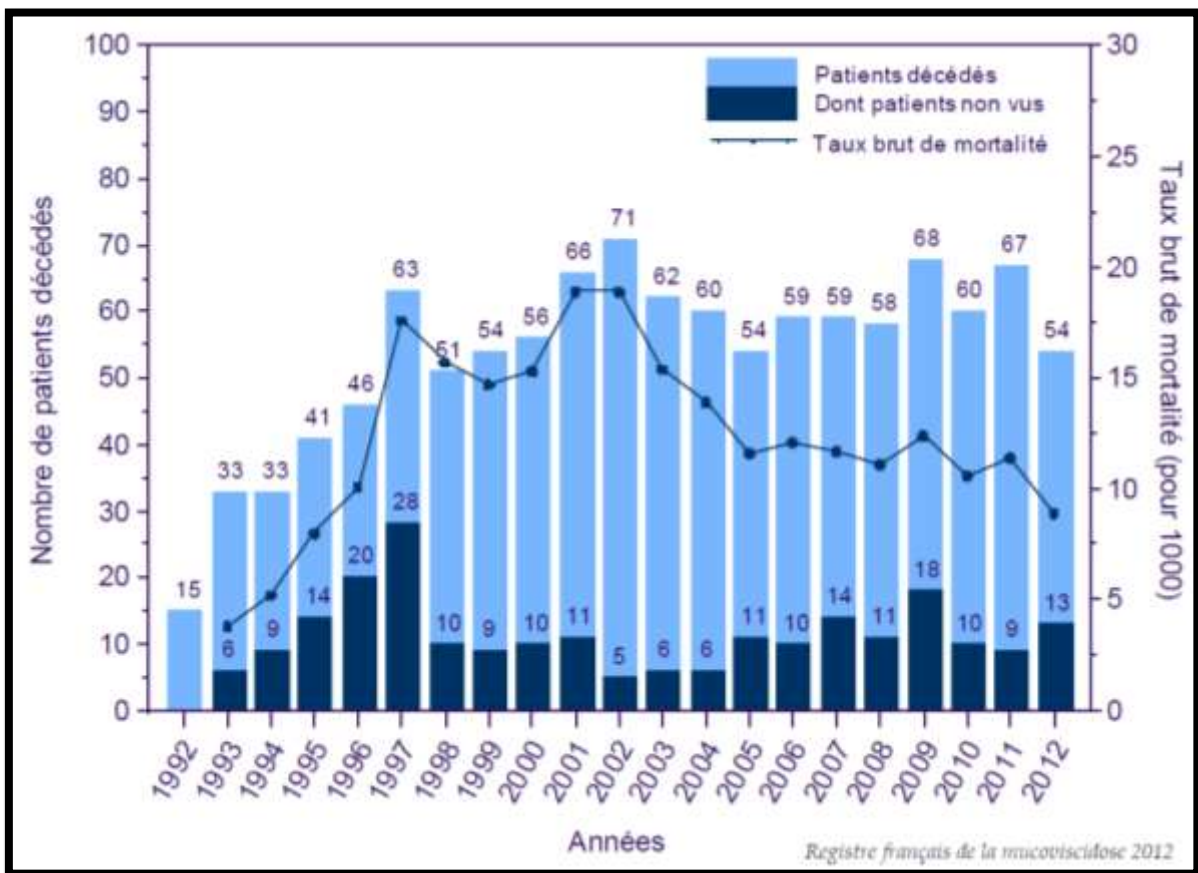


Figure 16 : Nombre de décès dans l'année, évolution depuis 1992 [80].

### 3. Génétique

Le mode de transmission de la maladie est autosomique récessif ; en d'autres termes, le gène muté se trouve sur un chromosome non sexuel et l'enfant doit recevoir les deux gènes mutés, celui de son père et celui de sa mère pour déclarer la maladie (homozygotes). Par conséquent, il existe des porteurs sains qui ne possèdent qu'un seul gène muté sur les deux, ils ne sont donc pas affectés par la maladie mais ils peuvent la transmettre (hétérozygotes). En France, environ deux millions de personnes sont des porteurs sains, et dans la plupart des cas sans le savoir (Figure 17) [81].

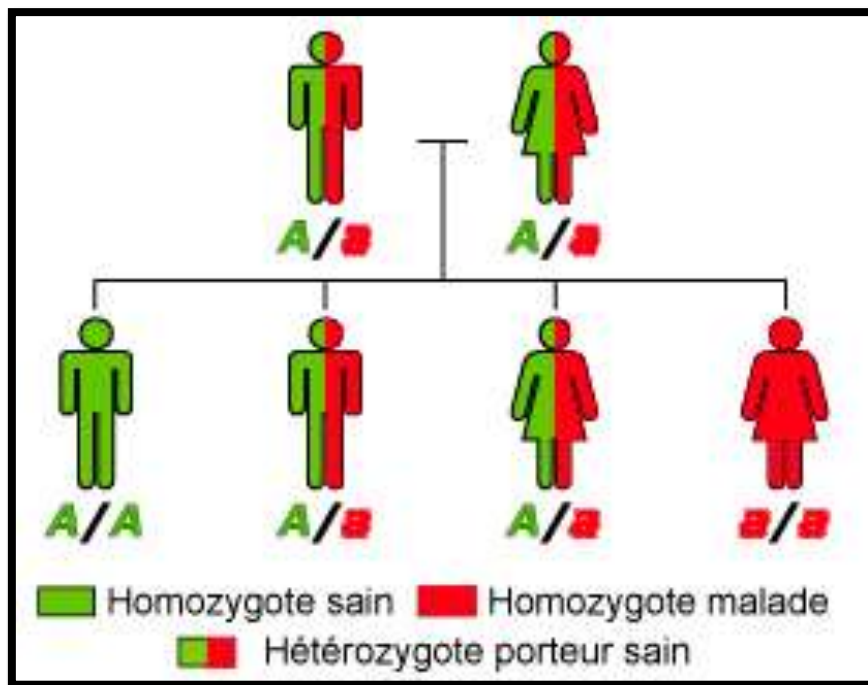
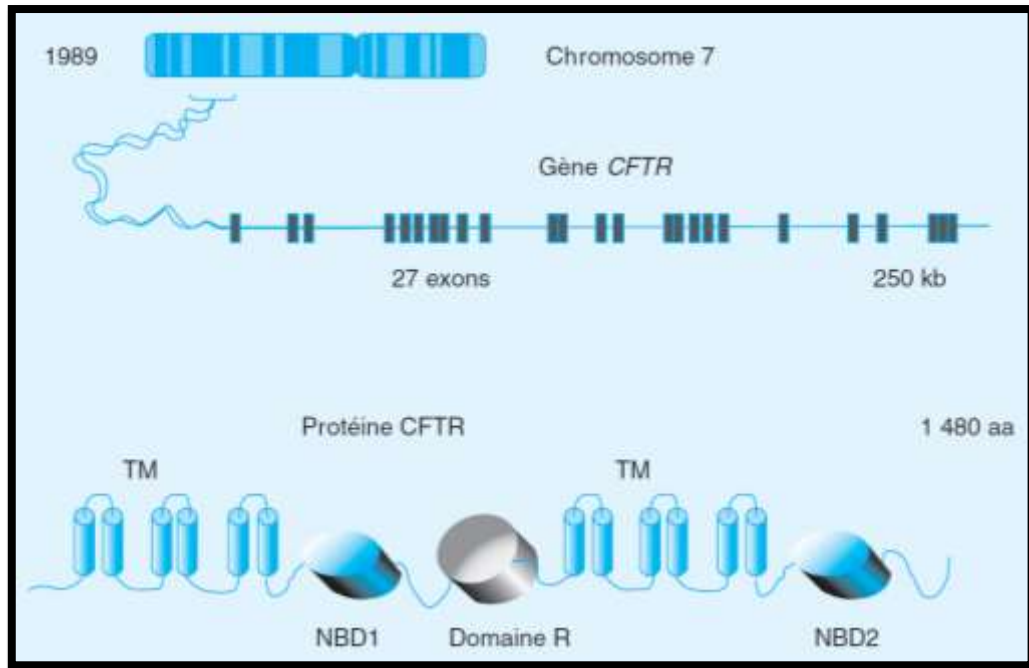


Figure 17 : Transmission de la maladie [82].

L'origine de la mucoviscidose réside dans les mutations d'un gène appelé CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) localisé au niveau du bras long du chromosome 7 (7q31). Ce gène, découvert en 1989, code pour une protéine membranaire du même nom (CFTR) qui permet notamment de réguler les échanges d'ions chlorures et sodiques à travers la membrane des cellules épithéliales de tout l'organisme (voies aériennes, épithélium intestinal, pancréas, voies biliaires, glandes sudoripares, glandes salivaires, etc.) (Figure 18) [83-84].

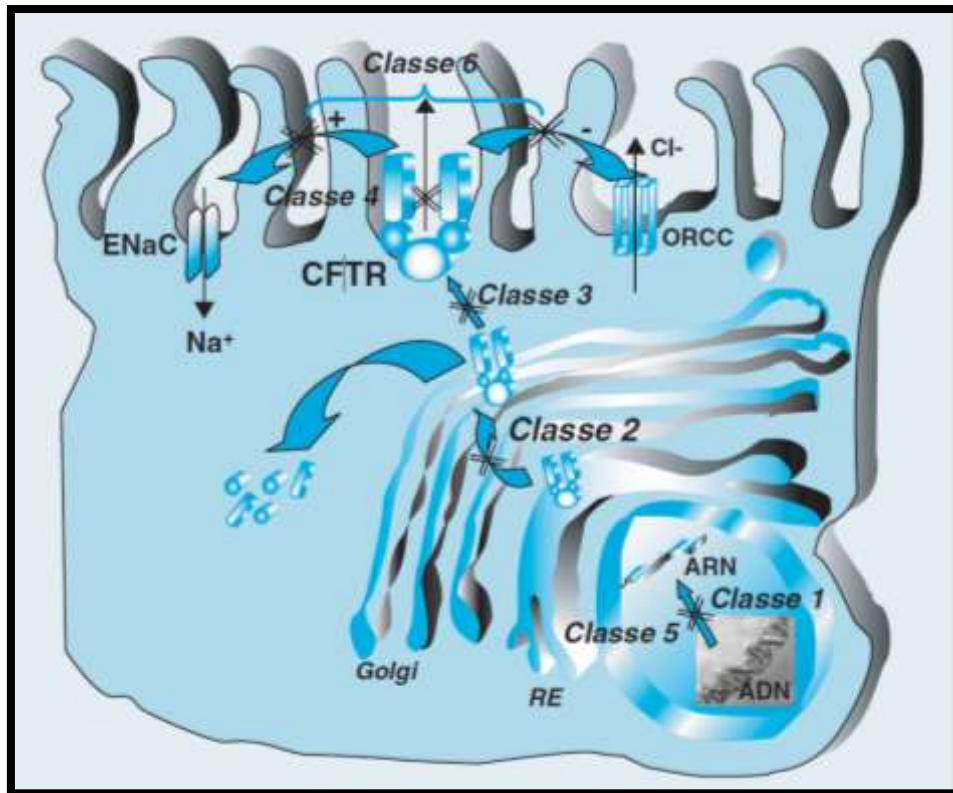


**Figure 18** : Le gène et la protéine CFTR [83].

Il existe des milliers de mutations différentes de ce gène qui sont réparties en six classes distinctes (Figure 19) :

- Classe 1 : défaut de synthèse de la protéine CFTR.
- Classe 2 : perturbation de la maturation cellulaire de la protéine CFTR.
- Classe 3 : perturbation de la régulation par l'ATP du canal chlore.
- Classe 4 : altération de la conduction ionique et des mécanismes d'ouverture ou de fermeture du canal.
- Classe 5 : diminution du taux de protéine CFTR fonctionnelle par instabilité de l'ARNm CFTR.
- Classe 6 : diminution de la stabilité de la protéine CFTR.

La mutation la plus fréquente en France est la mutation  $\Delta F508$  (classe 2) qui représente environ 70% des mutations, puis on retrouve quatre autres mutations avec une fréquence d'environ 1 à 2% : G542X (Classe 1), G551D (Classe 3), N1303K (Classe 2) et W1282X (Classe 1).



**Figure 19** : Les différentes classes des mutations [83].

## 4. Diagnostic

Depuis 2002, il existe un dépistage systématique à la naissance de tous les nouveau-nés. En effet, au troisième jour de vie de l'enfant, on dose une enzyme pancréatique, la trypsine immuno-réactive (TIR), à partir de sang séché prélevé au niveau du talon. En cas d'augmentation de cette enzyme, pour un taux supérieur à 65 microgrammes par litre, des examens complémentaires doivent être réalisés [85].

On effectue alors un test à la sueur afin de déterminer la concentration en ions chlorures présents dans celle-ci. Il s'agit du test de référence pour le diagnostic de la mucoviscidose et il se base sur la méthode de Gibson et Cooke. Il faut prélever un poids de sueur suffisant, environ 100 mg, pour obtenir un résultat fiable. En cas de concentration en ions chlorures supérieure ou égale à 60 mmol par litre, sur deux tests successifs, le diagnostic est alors confirmé. Dès lors, une recherche des mutations les plus fréquentes du gène CFTR (une trentaine) est effectuée [86-87].

## **5. Symptomatologie**

La symptomatologie générale découle de l'absence ou de l'altération de la protéine CFTR provoquant une rétention intracellulaire d'ions chlorures engendrant par la même occasion une augmentation de l'absorption de sodium et donc d'eau. Cela a pour conséquence de déshydrater les sécrétions et le mucus qui deviennent visqueux. Cependant, au niveau des glandes sudoripares, l'orientation des ions est inversée ce qui explique la concentration élevée d'ions chlorures dans la sueur. Il en résulte des manifestations multi-viscérales qui sont très variables d'un malade à un autre tant pour la chronologie d'apparition que pour la sévérité des symptômes [88].

### **5.1. Au niveau respiratoire**

La présence de ce mucus épais qui s'écoule difficilement ralentit la clairance muco-ciliaire et fournit un milieu propice à la multiplication des micro-organismes (bactéries, virus et champignons) à l'origine d'infections respiratoires aiguës et chroniques. Les signes que l'on rencontre le plus souvent sont : un encombrement bronchique, une toux, des expectorations chroniques, des hémoptysies, une insuffisance respiratoire, etc. De plus, les patients développent une inflammation au niveau pulmonaire augmentant la synthèse de mucus visqueux, à l'origine de l'aggravation des symptômes. La sévérité de l'atteinte respiratoire conditionne souvent le pronostic vital du malade [89].

### **5.2. Au niveau digestif**

On observe une insuffisance pancréatique exocrine due à l'obstruction des canaux excréteurs par ce mucus épais. On a alors un défaut de libération des enzymes pancréatiques au niveau de l'intestin provoquant une malabsorption des graisses et des protéines à l'origine de carences multiples (vitamines liposolubles, acides gras essentiels, etc.) et d'un retard de croissance staturo-pondéral. Non traitée, elle se manifeste par une stéatorrhée et des douleurs abdominales.

De plus, l'altération du pancréas peut aboutir à une insuffisance de sécrétion de l'insuline à l'origine de la survenue d'un diabète. On peut également observer une atteinte du foie pouvant aboutir à une hépatomégalie voire à une cirrhose biliaire [90].

### **5.3. Au niveau des glandes sudoripares**

On observe un excès de perte de chlorure de sodium pouvant être à l'origine de déshydratation notamment en cas de forte chaleur ou d'exercice physique intense [88].

### **5.4. Au niveau de la sphère oto-rhino-laryngée (ORL)**

On observe des infections rhino-sinusiennes chroniques ainsi qu'une polypose naso-sinusienne chez de nombreux patients [88].

### **5.5. Au niveau de la reproduction**

La quasi-totalité des hommes (plus de 95%) sont infertiles à cause de l'absence des canaux déférents empêchant le cheminement des spermatozoïdes produits au niveau des testicules jusqu'à la prostate. C'est donc une azoospermie obstructive, cependant les testicules sont normaux et la spermatogenèse reste active. Chez les femmes, la stérilité est plus rare car il n'y a pas d'anomalie morphologique, mais elle peut être présente à cause de l'épaississement de la glaire cervicale rendant plus difficile la montée des spermatozoïdes vers l'utérus [88].

## 6. Infections pulmonaires

La vie des patients est rythmée par les surinfections bronchiques à répétition qui entraînent une dégradation progressive des poumons aboutissant à l'insuffisance respiratoire. D'abord aiguës, ces infections évoluent vers la chronicité, le patient est alors colonisé par une ou plusieurs bactéries, l'une des plus récurrentes étant *Pseudomonas aeruginosa* (Figures 22 et 23). Cette atteinte respiratoire est responsable de la majorité des décès chez les malades [91-92].

### 6.1. Principales bactéries responsables d'infections pulmonaires

#### 6.1.1. *Haemophilus influenzae*

Cette bactérie est en général la première à coloniser le tractus respiratoire dès le plus jeune âge car elle est commensale des voies aériennes supérieures. C'est un coccobacille à Gram négatif dont le pouvoir pathogène repose sur ses propriétés d'adhérence aux cellules de l'arbre respiratoire ainsi que sur son activité protéasique vis-à-vis des immunoglobulines A sécrétées (IgA) constituant la première ligne de défense contre les micro-organismes au niveau des muqueuses. Bien que précoce, l'infection par *Haemophilus influenzae* reste peu délétère pour le malade [93].

#### 6.1.2. *Staphylococcus aureus* (Staphylocoque doré)

Cette bactérie est un coque à Gram positif qui se retrouve notamment au niveau des muqueuses (naso-pharynx, intestin, etc.) et de la peau. Très souvent, c'est le premier micro-organisme pathogène responsable d'infection respiratoire chez l'enfant. En effet, *Staphylococcus aureus* possède de nombreux facteurs de virulence [93] :

- Echappement aux défenses immunitaires *via* la production d'enzymes (protéase, hyaluronidase, hémolysine, etc.).
- Attachement aux cellules grâce à des adhésines ou à la production de slime.

- Production de toxines (entérotoxines, exfoliatines, leucocidine de Panton-Valentine, etc.).

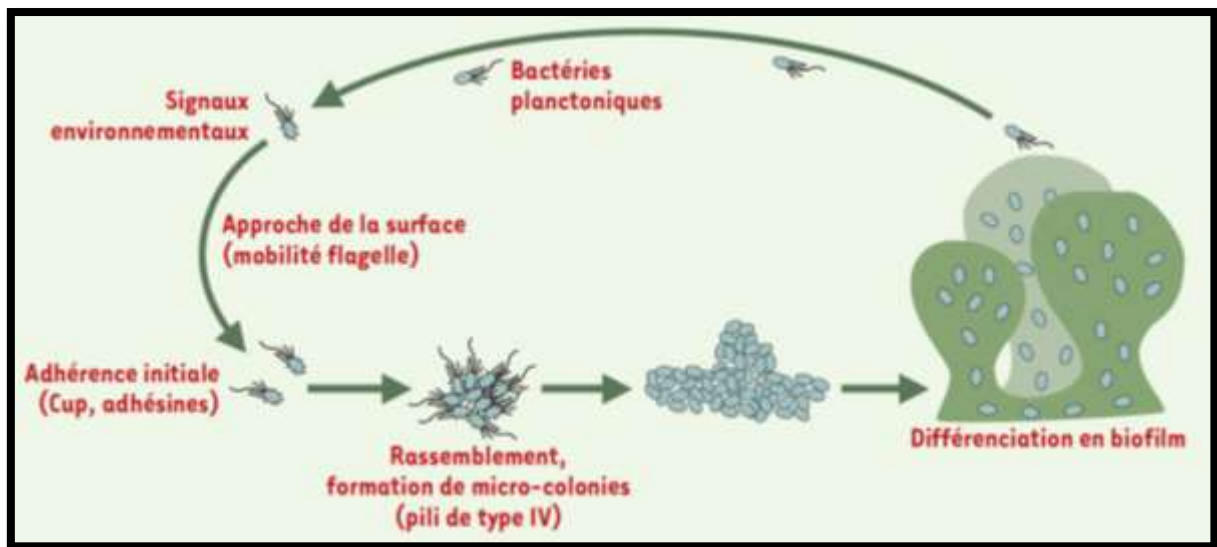
La présence de colonies naines (*Small Colony Variants* ou SCV) ayant un métabolisme ralenti ainsi qu'une origine intracellulaire favorise la persistance et la récurrence des infections engendrant le passage à la chronicité. Enfin, on retrouve de plus en plus de souches résistantes à la méticilline (SARM) limitant encore un peu plus le choix du traitement antibiotique [94].

### **6.1.3. *Pseudomonas aeruginosa* (Bacille pyocyanique)**

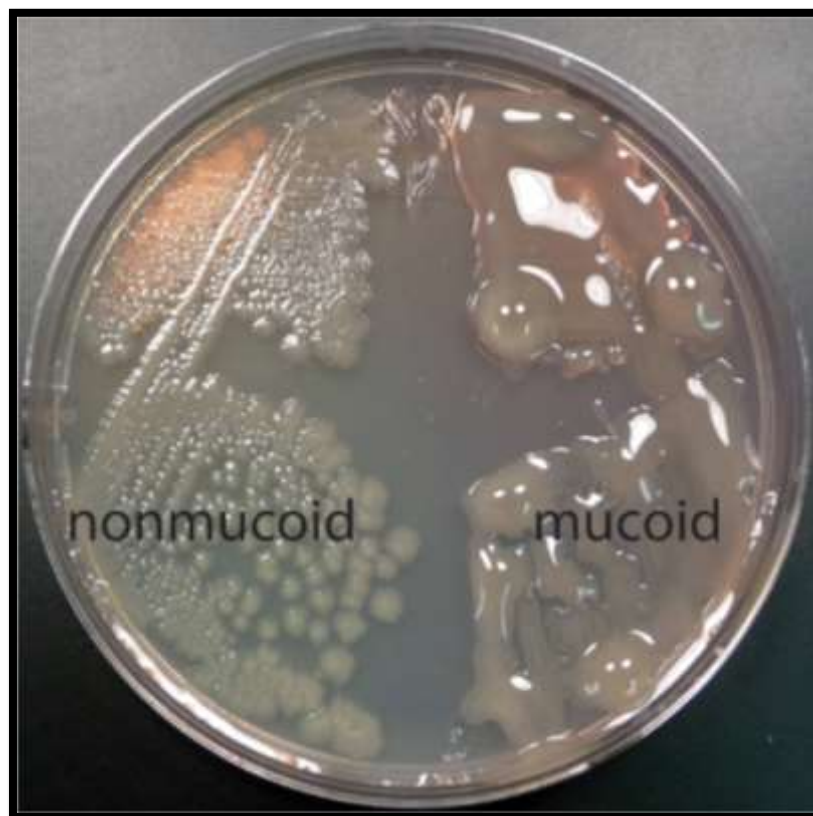
C'est un bacille à Gram négatif saprophyte et ubiquitaire vivant dans les milieux humides (eau, végétaux, sols humides, etc.). *Pseudomonas aeruginosa* est doué d'une grande capacité à s'adapter et à survivre dans des milieux hostiles. C'est une bactérie opportuniste, car si elle reste très peu virulente chez les individus en bonne santé, elle devient très pathogène chez les sujets possédant une défense immunitaire diminuée, ce qui est notamment le cas pour les patients atteints de la mucoviscidose. *Pseudomonas aeruginosa* est la bactérie associée à une morbidité et une mortalité élevées chez ces patients en raison de l'accélération de la dégradation de la fonction respiratoire [95].

D'abord intermittente à l'enfance, la colonisation des poumons par *Pseudomonas aeruginosa* devient chronique et malgré l'utilisation d'antibiotiques, l'éradication est quasi impossible. En effet, si lors de la primo-infection les bactéries sont de phénotype non mucoïde et sensibles aux antibiotiques, elles finissent par se transformer progressivement sous la pression de l'environnement pulmonaire pour devenir mucoïdes. Le passage à la mucoïdie se caractérise par la production en grande quantité d'alginate formant ainsi un biofilm qui lui permet d'échapper à l'action des antibiotiques notamment aux aminosides et de diminuer l'efficacité de la réponse immunitaire du patient sur la bactérie (Figures 20 et 21) [96].





**Figure 20** : Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* [119].



**Figure 21** : Représentation de souches de *Pseudomonas aeruginosa* non mucoïdes à gauche et mucoïdes à droite, cultivées sur gélose pendant 48 heures [97].

En plus de la formation de biofilm, *Pseudomonas aeruginosa* possède une tolérance naturelle à de nombreux antibiotiques et une grande capacité à acquérir des mécanismes de résistance. La multirésistance de *Pseudomonas aeruginosa* se traduit par une inefficacité ou une diminution de la sensibilité à au moins trois des quatre classes d'antibiotiques actifs sur ce germe : les  $\beta$ -lactamines hors carbapénèmes (pénicillines, céphalosporines et monobactames), les carbapénèmes, les aminosides et les fluoroquinolones. Les souches multirésistantes accumulent au fil du temps plusieurs mécanismes de résistance par mutations ou par acquisitions de gènes. On peut observer : l'apparition d'efflux actif transmembranaire qui rejette hors de la cellule bactérienne les molécules, la survenue de modification de cible ou de diminution de perméabilité et la synthèse d'enzymes inactivant l'antibiotique (pénicillinases, céphalosporinases, carbapénémases et  $\beta$ -lactamases à spectre élargi ou  $\beta$ LSE) [98]. Il faut néanmoins souligner que les  $\beta$ LSE et les carbapénémases restent à ce jour rares chez les patients atteints de la mucoviscidose.

La grande pathogénicité de *Pseudomonas aeruginosa* est également due aux nombreux facteurs de virulence qui interviennent à différents stades du processus infectieux [93] :

- Facteurs impliqués dans l'adhérence : l'adhérence de la bactérie aux cellules épithéliales de la muqueuse pulmonaire met en jeu différentes adhésines comme les pili, le flagelle, l'exoenzyme S, l'alginate et les protéines de la membrane externe.
- Facteurs impliqués dans la nécrose tissulaire : exotoxine A, protéases, lipases, hémolysines, phosphatase alcaline, cytotoxine, élastase, etc.

Face à un *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant, les options thérapeutiques afin de soigner le malade sont rares. A l'heure actuelle, un seul antibiotique (la colistine) reste efficace sur quasiment toutes les souches de cette espèce bactérienne ; en effet, quelques résistances à ce médicament ont été décrites récemment [99]. Il est donc nécessaire de trouver des alternatives efficaces pour combattre cette bactérie.

#### 6.1.4. *Burkholderia cepacia*

On parle de complexe *Burkholderia cepacia* afin de rassembler les neuf génomovars (variétés génétiques) existants. C'est un bacille à Gram négatif ubiquitaire et saprophyte (eau, sol, plantes, etc.). Comme *Pseudomonas aeruginosa*, c'est une bactérie opportuniste responsable d'infections nosocomiales et d'infections sévères chez les sujets immunodéprimés ou atteints de la mucoviscidose [93]. *Burkholderia cepacia* possède de nombreux facteurs de virulence :

- Les pili impliqués dans l'adhésion aux cellules respiratoires.
- La sécrétion d'enzymes (une protéase qui provoque des lésions cellulaires, l'hémolysine impliquée dans l'apoptose, une phospholipase C, etc.).

Cette bactérie est particulièrement redoutée, en effet, elle possède un haut niveau de transmissibilité, une multirésistance naturelle aux antibiotiques ainsi qu'aux antiseptiques et peut provoquer un « syndrome *cepacia* » caractérisé par une pneumopathie nécrosante associée à une bactériémie, entraînant le décès rapide du patient [100].

#### 6.1.5. *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans*

Ce sont des bacilles à Gram négatif, saprophytes et opportunistes. Ces germes sont peu présents dans la mucoviscidose mais leurs fréquences d'isolement dans les expectorations sont en forte augmentation ces dernières années. De plus, ces bactéries possèdent des résistances naturelles et/ou acquises à de nombreux antibiotiques notamment aux céphalosporines et aux aminosides [101].

### 6.1.6. Mycobactéries atypiques

Chez les patients atteints de la mucoviscidose, on identifie principalement des espèces à croissance lente (*Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* et *M. kansasii*) ainsi qu'une espèce à croissance rapide *M. abscessus*. Ce sont des bactéries opportunistes retrouvées dans l'environnement, essentiellement dans l'eau. Cependant, leur rôle dans l'aggravation de la fonction respiratoire serait limité [102-103].

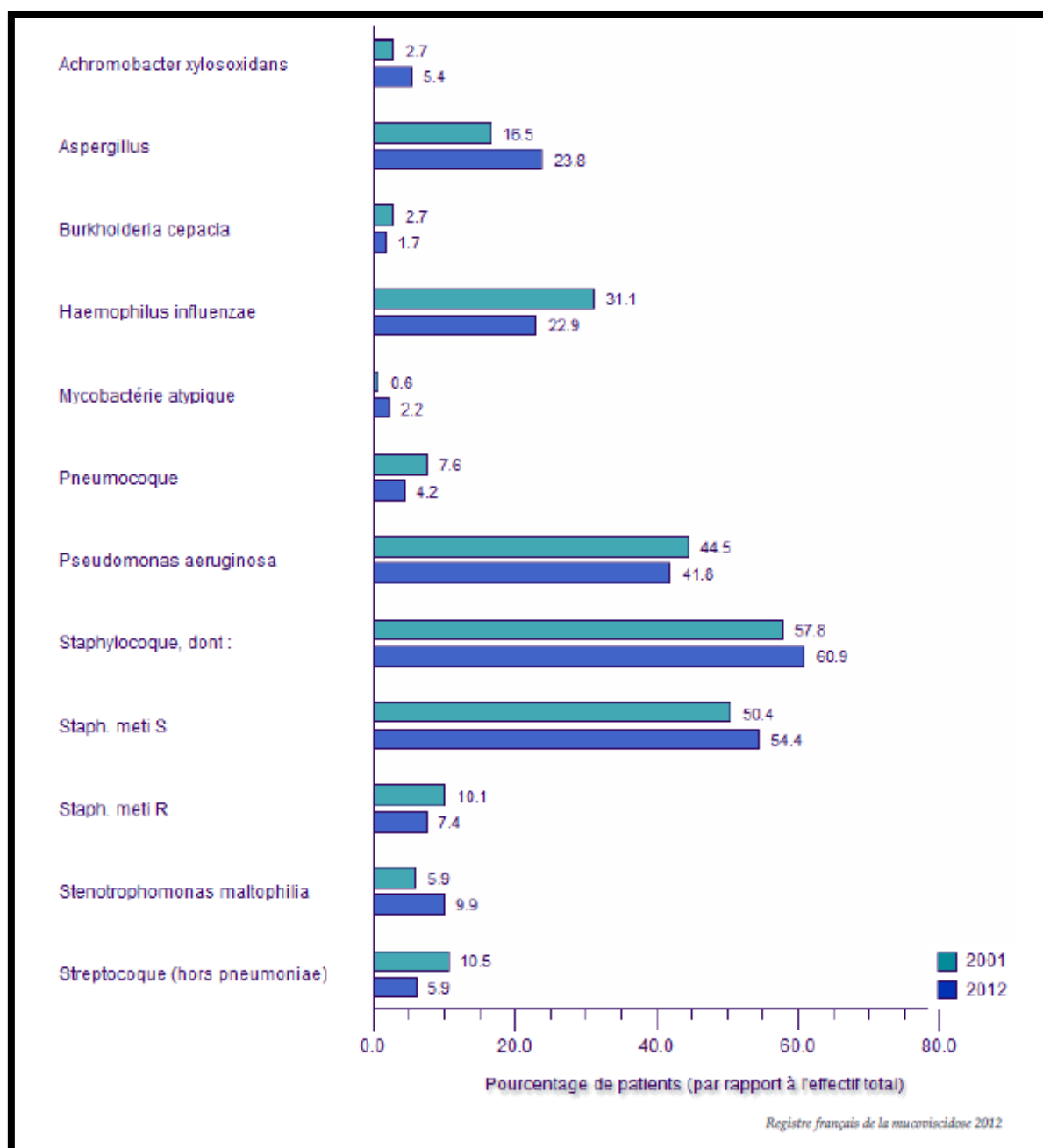
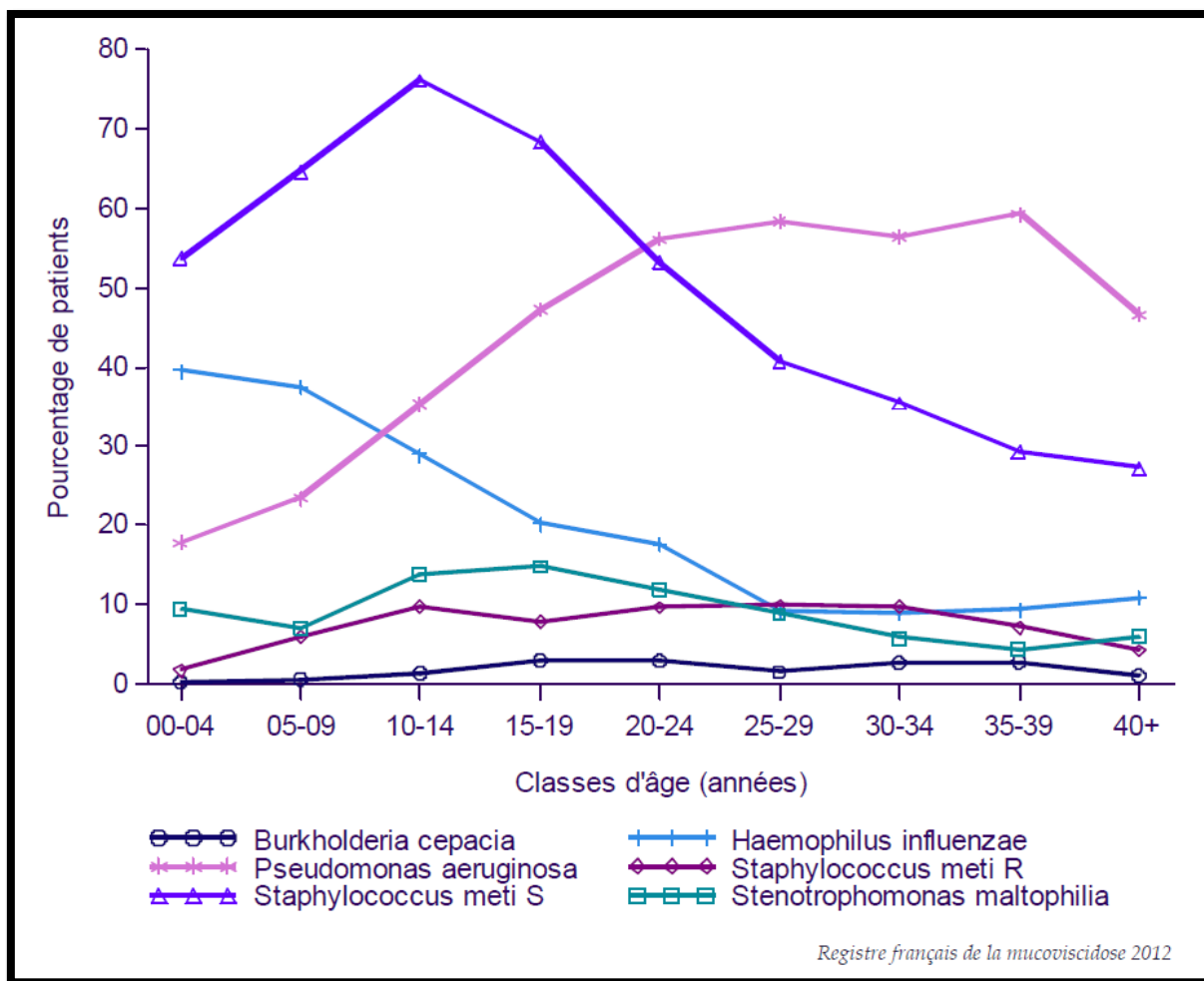


Figure 22 : Répartition des germes respiratoires en 2001 et 2012 [80].



**Figure 23** : Répartition des micro-organismes en fonction de l'âge [80].

## 6.2. Principaux virus responsables d'infections pulmonaires

### 6.2.1. Grippe

La grippe peut aggraver la symptomatologie de la mucoviscidose en étant responsable de complications respiratoires et de pneumonies. Même si les malades atteints de la mucoviscidose ne sont pas plus à risque de contracter cette infection, une vaccination annuelle est fortement recommandée car les infections virales sont plus sévères chez eux [104].

### **6.2.2. Virus respiratoire syncytial ou VRS**

Ce virus respiratoire induit, comme beaucoup d'autres, des lésions pulmonaires ainsi qu'une inflammation, ce qui prédisposerait le patient à une infection bactérienne en facilitant l'adhérence des bactéries comme *Pseudomonas aeruginosa* [104].

## **6.3. Principaux champignons responsables d'infections pulmonaires**

### **6.3.1. *Aspergillus fumigatus***

C'est un champignon saprophyte très répandu, retrouvé aussi bien dans les milieux ruraux qu'urbains (eau, sol, murs, plafonds, etc.). Il est principalement impliqué dans les aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA), responsables d'une inflammation et d'une fibrose bronchique. La prévalence d'aspergillose chez les patients atteints de la mucoviscidose est d'environ 20%, cependant la pose du diagnostic *via* les signes cliniques et radiologiques est particulièrement difficile dans cette population. Le traitement, non systématique, repose sur une association de corticoïdes et d'antifongiques. Une autre complication possible du champignon est l'aspergillose pulmonaire invasive (API) et bien que la symptomatologie clinique soit plus sérieuse, sa survenue reste rare [105-106].

### **6.3.2. *Scedosporium apiospermum***

C'est un champignon saprophyte présent essentiellement dans les sols et les eaux boueuses. Il arrive en deuxième position des champignons retrouvés dans les expectorations des patients après *Aspergillus fumigatus*. Tout comme ce dernier, il est capable de provoquer une colonisation chronique et il peut être à l'origine de réactions inflammatoires de type ABPA. Toutefois, le rôle exact de cette espèce dans le contexte de la mucoviscidose reste encore à préciser [107].

## **7. Traitements**

La prise en charge thérapeutique est essentiellement symptomatique car il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement curatif. Elle est coordonnée par les centres de ressources et de compétences pour la mucoviscidose (CRCM) situés dans les hôpitaux, il en existe 49 en France. Les CRCM peuvent être pédiatrique, adulte ou mixte et sont constitués d'une équipe soignante pluridisciplinaire (médecin référent, infirmier coordinateur, kinésithérapeute, psychologue, diététicienne, assistante sociale, etc.). Les deux cibles principalement visées en thérapeutique sont le système digestif ainsi que le système respiratoire et ces deux systèmes étant étroitement liés, il ne faut en sous-estimer aucun [88].

### **7.1. Au niveau digestif**

La prise en charge digestive du patient est indispensable pour assurer une croissance normale chez l'enfant puis pour maintenir un bon état nutritionnel chez l'adulte. En effet, les dépenses énergétiques sont accrues chez les malades en raison de l'état inflammatoire chronique, des multiples surinfections, de la malabsorption digestive, etc.

En cas d'insuffisance pancréatique exocrine (IPE), il est indispensable de suppléer cette carence par des extraits pancréatiques gastro-protégés (EPGP) qui permettent de faciliter la digestion des lipides et donc de diminuer les diarrhées, les douleurs intestinales et la maldigestion. La posologie est généralement adaptée à la teneur en graisse des repas. En outre, il faut souvent compléter l'alimentation par des vitamines liposolubles (A, D, E et K) mais aussi parfois par des oligo-éléments en cas de carence (fer, zinc, sélénium, magnésium, etc.). Les posologies des vitamines et des oligo-éléments sont corrélées aux dosages sériques effectués auprès du patient.

En cas d'atteinte hépatique, l'acide ursodésoxycholique est indiqué pour ralentir l'évolution vers la cirrhose et des antiacides ou des pansements gastriques peuvent être prescrits en cas de reflux gastro-œsophagien (RGO).

Enfin, l'alimentation doit être équilibrée et riche afin de compenser l'hypercatabolisme énergétique des patients. Des compléments alimentaires hypercaloriques et/ou hyperprotéiques par voie orale, voire dans les cas extrêmes par voie entérale, sont parfois nécessaires pour maintenir un bon développement staturo-pondéral. De plus, le patient doit augmenter ses apports en eau et en sel afin de corriger la perte hydro-sodée (Figure 24) [108].

	Classes d'âge (années)									Total	%
	00-04	05-09	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40+		
<i>Effectif total</i>	794	949	868	795	816	655	479	320	469	6145	
Acide ursodésoxycholique	65	212	307	306	319	241	140	83	112	1785	29.0 %
Anti-acides	188	248	323	279	351	319	210	151	200	2269	36.9 %
Extraits pancréatiques	620	757	747	697	722	572	408	265	288	5076	82.6 %
Nutrition entérale	26	39	71	63	60	29	21	7	7	323	5.3 %
Supplémentation orale	110	217	311	260	286	223	143	89	89	1728	28.1 %
Vitamines liposolubles	717	850	811	714	703	538	394	240	308	5275	85.8 %

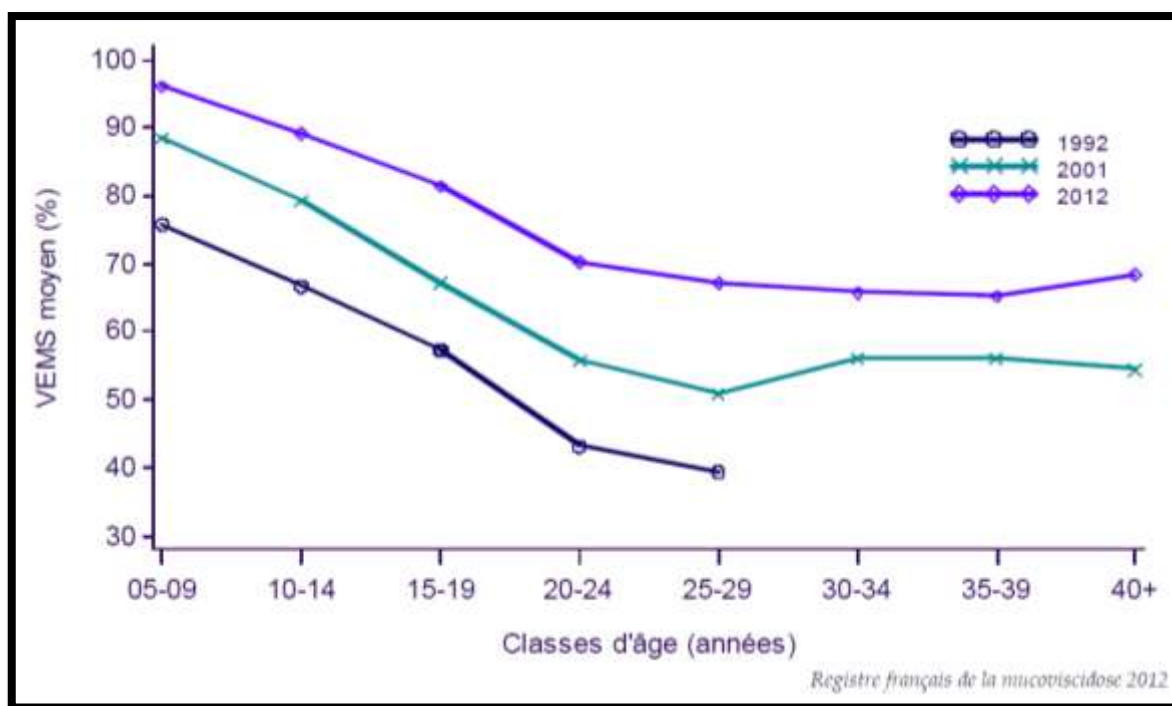
*Registre français de la mucroscistose 2012*

**Figure 24** : Thérapeutiques à visée hépatique, digestive et nutritionnelle [80].

## 7.2. Au niveau respiratoire

L'arsenal thérapeutique est divisé en trois axes principaux : la kinésithérapie respiratoire, l'aérosolthérapie et l'antibiothérapie. L'atteinte pulmonaire est généralement quantifiée par les explorations fonctionnelles respiratoires (EFR) où l'on détermine, entre autres, le VEMS (Volume Expiratoire Maximal Seconde) qui est le paramètre le plus significatif afin d'évaluer la dégradation de la fonction respiratoire qui s'accroît inéluctablement avec le temps (Figure 25) [109].





**Figure 25** : Moyenne des VEMS (%) par âge en 1992, 2001 et 2012 [80].

### 7.2.1. La kinésithérapie respiratoire

Elle assure un drainage bronchique qui est la base du traitement et doit être effectuée si possible au moins une fois par jour. La kinésithérapie respiratoire permet d'éliminer les sécrétions bronchiques qui s'accumulent en raison de la diminution de la clairance muco-ciliaire et de ce fait elle limite le risque de surinfection ainsi que l'inflammation pulmonaire. De plus, la pratique d'une activité physique est fortement recommandée car elle favorise l'expectoration et développe la force musculaire [110].

### 7.2.2. L'aérosolthérapie

Elle est particulièrement adaptée à la mucoviscidose car l'aérosolthérapie permet un contact direct entre les médicaments administrés et les poumons, augmentant ainsi leur efficacité tout en diminuant le risque d'effets secondaires. C'est pourquoi, près de 75% des patients bénéficient de traitements à visée respiratoire délivrés par voie inhalée. L'aérosolthérapie est essentiellement utilisée pour trois types de traitements : les antibiotiques, les antihistaminiques et les fluidifiants du mucus (Figure 26) [111-112].

- Les antibiotiques sont bien évidemment à visée anti-infectieux et seront détaillés par la suite.
  
- Les antihistaminiques inhalés regroupent deux sortes de traitement : les bronchodilatateurs ( $\beta$ 2-mimétiques ou anticholinergiques) et les corticoïdes. Les bronchodilatateurs inhalés permettent de diminuer l'hyper-réactivité bronchique (HRB) et leur utilisation peut être indispensable en préalable à une nébulisation réalisée avec un produit entraînant une bronchoconstriction (colistine, tobramycine, etc.). Les corticoïdes inhalés eux ont un effet théorique anti-inflammatoire, mais dans la pratique ils n'ont que peu d'intérêt dans la mucoviscidose, si ce n'est lors de manifestations asthmatiques.
  
- Les fluidifiants du mucus ont pour cible les caractéristiques particulières des sécrétions mucopurulentes : l'hyperviscosité et la perte d'élasticité. La désoxyribonucléase I recombinante humaine (rh-DNase) hydrolyse l'ADN extracellulaire accumulé dans les sécrétions bronchiques purulentes provenant des globules blancs détruits. La nébulisation est effectuée tous les jours, idéalement quelques heures avant la séance de kinésithérapie respiratoire car elle permet de diminuer la viscosité du mucus et donc de faciliter son élimination. Ce traitement, très bien toléré dans la majorité des cas, améliore significativement le VEMS et il diminue le nombre d'infections et d'hospitalisations. Enfin, le sérum salé hypertonique agit en liquéfiant le mucus et bien que sa place dans l'arsenal thérapeutique reste à déterminer par rapport aux autres traitements, il n'en reste pas moins un produit peu coûteux et facile d'accès.

	Classes d'âge (années)									Total	%
	00-04	05-09	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	40+		
<i>Effectif total</i>	794	949	868	795	816	655	479	320	469	6145	.
<b>Patients sous aérosolthérapie*</b>	332	703	768	703	692	536	380	243	349	4706	76.6 %
Antibiotiques inhalés	114	220	352	405	424	334	221	146	175	2391	38.9 %
Bronchodilatateurs inhalés	190	412	493	452	468	382	261	185	261	3104	50.5 %
Corticoïdes inhalés	178	370	437	372	315	264	168	140	191	2435	39.6 %
NaCl hypertonique inhalé	15	22	33	52	27	27	25	16	19	236	3.8 %
RhDNase	98	512	626	537	416	259	161	106	129	2844	46.3 %

Registre français de la mucoviscidose 2012

\* Par nébulisation, spray et/ou poudre

**Figure 26** : Produits administrés en aérosolthérapie [80].

### 7.2.3. L'antibiothérapie

C'est le traitement classique des surinfections bronchiques, il est bien sûr adapté aux micro-organismes retrouvés dans les expectorations *via* les examens cyto bactériologiques des crachats (ECBC), aux antibiogrammes réalisés et à l'âge du patient. Trois voies d'administration sont possibles : la voie orale, la voie intraveineuse et la voie pulmonaire. Le traitement des infections est indispensable car il permet de limiter la dégradation de la fonction respiratoire et par conséquent d'augmenter l'espérance de vie. Comme nous venons de le voir précédemment, les trois bactéries majoritairement responsables de surinfection broncho-pulmonaire sont : *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* [113].

#### 7.2.3.1. *Haemophilus influenzae*

Une monothérapie de deux semaines *per os* est généralement suffisante pour éradiquer, au moins transitoirement, *Haemophilus influenzae*. Les antibiotiques possiblement utilisables sont les aminopénicillines (l'amoxicilline associée ou non à l'acide clavulanique) et les céphalosporines [113].

### 7.2.3.2. *Staphylococcus aureus*

Une monothérapie par voie orale de quinze jours est habituellement suffisante, on peut employer les  $\beta$ -lactamines (cloxacilline, amoxicilline associée à l'acide clavulanique, céfalexine, etc.), les macrolides (érythromycine, clarithromycine, azithromycine), la pristinamycine, etc. En cas d'échec thérapeutique ou de souche résistante à la méticilline (SARM), on peut recourir au linézolide *per os* ou à la vancomycine par voie intraveineuse (IV) [114].

### 7.2.3.3. *Pseudomonas aeruginosa*

L'éradication précoce de la bactérie est fortement recommandée pour éviter le passage à la chronicité. Malheureusement la prise en charge idéale est difficile à définir et la transition vers l'infection chronique est souvent inéluctable [115].

- En cas de primocolonisation, aucun protocole n'a encore été unanimement homologué par la communauté scientifique. Cependant, il existe le protocole danois, largement utilisé par la plupart des équipes françaises et qui se décompose en trois étapes [116] :
  - Étape 1 : association pendant 21 jours de ciprofloxacine *per os* (30 mg/kg par jour en deux prises) et d'aérosols de colistine (1 million d'unités deux fois par jour).
  - Étape 2 : si la bactérie est isolée pour la deuxième fois dans les six mois, même traitement avec une augmentation de la posologie de colistine (2 millions d'unités trois fois par jour).
  - Étape 3 : si la bactérie est isolée pour la troisième fois dans les six mois, association pendant trois mois de ciprofloxacine *per os* (30 mg/kg par jour en deux prises) et d'aérosols de colistine (2 millions d'unités trois fois par jour).

- La colonisation chronique se définit par la présence de la bactérie dans l'arbre bronchique pendant au moins six mois attestée par au moins trois cultures positives à au moins un mois d'intervalle. Ce passage à la chronicité est souvent corrélé à l'apparition de souches mucoïdes rendant impossible l'éradication de *Pseudomonas aeruginosa* par les moyens thérapeutiques actuels. Le traitement a donc pour objectifs de ralentir la dégradation de la fonction respiratoire et de diminuer les exacerbations. Les recommandations préconisent une bithérapie par voie IV en associant une  $\beta$ -lactamine (ceftazidime, aztréonam, imipénème, etc.) avec un aminoside (amikacine ou tobramycine) pendant au moins quatorze jours. Il faut noter que l'emploi d'un aminoside nécessite une surveillance renforcée notamment à cause d'une forte toxicité rénale et auditive. En cas de souche multirésistante, une trithérapie peut être proposée en additionnant la ciprofloxacine *per os* à la bithérapie. En outre, il s'est avéré que l'utilisation de façon quotidienne du macrolide azithromycine par voie orale, permet d'améliorer la fonction respiratoire, même si le mécanisme d'action est encore mal connu. Enfin, deux molécules peuvent être administrées *via* un aérosol pour un traitement d'entretien, la tobramycine et la colistine. Elles sont utilisées en alternance un mois sur deux et permettent l'administration d'une quantité importante d'antibiotiques directement dans la zone à traiter et cela sans effets indésirables systémiques [117].

## **IV. Le bactériophage : alternative thérapeutique dans la mucoviscidose vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* ?**

Comme nous venons de le voir, le phénomène de multirésistance qui touche les bactéries et plus particulièrement *Pseudomonas aeruginosa* constitue un enjeu crucial, surtout pour les patients atteints de mucoviscidose. En effet, à l'heure actuelle, le manque d'alternatives thérapeutiques nous mène dans certains cas à des impasses, pouvant engager le pronostic vital du malade. L'alternative aux antibiotiques pourrait venir de la phagothérapie, traitement très prometteur pour éradiquer les bactéries pathogènes mais malheureusement trop vite oublié. Pour autant, avant de voir débarquer les bactériophages dans l'arsenal médical il faudra être patient, même si déjà de nombreuses publications scientifiques tendent à démontrer tout le potentiel de ce traitement. Il me semble important de présenter les différents aspects de la phagothérapie, notamment au niveau de la mucoviscidose. Tout d'abord, nous démontrerons l'action bactéricide des phages vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Puis, nous verrons l'importance du biofilm dans les phénomènes de chronicité car celui-ci diminue fortement l'activité des antibiotiques mais également des phages, d'où la nécessité d'associer des bactériophages actifs vis-à-vis des alginate. Ensuite, nous montrerons le rôle majeur que pourrait avoir la synergie des antibiotiques avec les phages. Enfin, nous déterminerons le mode d'administration le plus adapté qui semble être l'aérosolthérapie.

Avant toute chose, nous pouvons parler d'une expérience thérapeutique menée à l'Institut Eliava en 2007 sur un jeune patient de cinq ans atteint de la mucoviscidose. L'enfant est colonisé de façon régulière par *Staphylococcus aureus* ainsi que par *Pseudomonas aeruginosa* et il est donc fréquemment traité par des antibiotiques. La phagothérapie est réalisée avec une spécialité disponible en Géorgie dans le commerce « Pyo-Phage » et qui est une suspension de différents phages actifs sur cinq bactéries (*Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Proteus* et *Escherichia coli*). Le traitement est défini par la nébulisation ainsi que la désinfection du nez et de la gorge

avec 2 ml de la suspension et cela trois fois par jour pendant six jours consécutifs. Après ce premier traitement, l'état général du patient s'est amélioré, il a pris du poids, l'expectoration est facilitée et diminuée. Un mois après, une deuxième cure de traitement est effectuée pendant dix jours, puis à nouveau une troisième cure le mois suivant. Au final, après un trimestre, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ne sont plus retrouvés dans les crachats. Il faut également noter qu'aucune résistance aux phages n'est apparue durant le traitement [118].

## **1. Efficacité des bactériophages sur *Pseudomonas aeruginosa* lors d'infections pulmonaires**

### **1.1. Efficacité des phages dans un modèle pulmonaire murin à *Pseudomonas aeruginosa***

Laurent Debarbieux et son équipe ont effectué plusieurs expériences sur des souris afin de juger l'efficacité d'un bactériophage sur des souches de *Pseudomonas aeruginosa* lors d'une infection pulmonaire [119]. Pour ce faire ils ont isolé un phage des eaux d'égouts qu'ils nomment « PAK-P1 bactériophage » et dont la nature lytique a été démontrée grâce au séquençage génomique qui indique qu'il n'y a ni intégrase, ni transposase, ni excisionase. Ce phage est actif sur des souches bactériennes rendues bioluminescentes afin de suivre leur évolution dans l'organisme de l'animal.

Dans la première expérience, une dose du bactériophage est administrée par instillation intranasale en même temps qu'une dose létale de bactéries. Sans phage, les souris meurent toutes en 48 heures ; avec un ratio dix fois plus important de phages par rapport aux bactéries, toutes les souris survivent. Le ratio 10:1 est donc la dose standard afin d'obtenir une bonne efficacité.

Dans une autre expérience, les souris sont infectées par *Pseudomonas aeruginosa* puis deux heures après on leur administre une dose de phages avec le ratio

10:1. Deux heures plus tard, on n'observe pas de différence significative entre le groupe phage et le groupe témoin (sans phage). Quatre heures plus tard, on remarque une très nette diminution de la luminescence dans le groupe phage démontrant la lyse des bactéries. A noter qu'au bout de 24 heures les souris témoins sont toutes décédées ou fortement infectées tandis que les souris traitées ont toutes survécu.

Une autre expérience est effectuée afin de montrer le rôle des bactériophages sur l'inflammation, pour ce faire deux marqueurs sont mesurés : l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Lorsque les souris ne sont infectées que par les bactéries, on observe une forte hausse des marqueurs de l'inflammation, mais si on associe des phages alors l'inflammation est fortement réduite. De plus, si on instille uniquement des phages sans bactérie, alors on ne constate aucune stimulation de la réponse inflammatoire.

Pour déterminer le délai maximal possible d'administration des bactériophages tout en maintenant un taux de survie de 100%, une expérience a été conduite sur trois groupes de souris traités par une dose de phages deux heures, quatre heures et six heures après l'infection bactérienne. Au bout de trois jours, seules les souris traitées précocement ont toutes survécu, le groupe « quatre heures » possède un taux de survie de 75% tandis que le groupe « six heures » un taux de 25% seulement. Cette expérience démontre l'importance d'un traitement précoce pour obtenir une bonne efficacité.

Pour vérifier la phagoprophylaxie, deux groupes de souris ont été prémédiqués, l'un avec une dose de bactériophages l'autre avec une solution tampon. Après 24 heures, toutes les souris sont infectées par une dose mortelle de *Pseudomonas aeruginosa*. Au bout de seulement deux heures, une diminution par cinq du nombre de bactéries est notée par rapport au groupe témoin. Au final, les souris sans phages meurent au bout de deux jours tandis que les souris avec des phages survivent toutes seize jours après.



Enfin, une estimation du spectre d'activité du PAK-P1 bactériophage sur *Pseudomonas aeruginosa* est effectuée et cette fois les résultats obtenus sont plutôt décevants. En effet, si le phage parvient à lyser très efficacement 50% des souches d'infection primaire, il ne lyse que très modérément 10% des souches d'infection chronique.

En conclusion, Laurent Debarbieux à travers ces nombreuses expériences, a pu démontrer l'efficacité *in vivo* des phages sur une infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*. Plusieurs constats sont à retenir, tout d'abord la dose administrée doit être au moins dix fois plus importante que la concentration bactérienne, le traitement doit être le plus précoce possible pour permettre une forte diminution de l'inflammation pulmonaire et enfin, la phagoprophylaxie est possible. Ces résultats sont encourageants pour traiter les infections primaires des patients atteints de la mucoviscidose ou encore en prévention d'infection nosocomiale à l'hôpital. Cependant, pour les infections chroniques, le biofilm produit par les souches mucoïdes rend l'accès aux bactéries plus difficile pour les phages mais aussi pour les antibiotiques. C'est pourquoi, et nous le verrons par la suite, certains bactériophages peuvent détruire la matrice du biofilm conférant ainsi un atout majeur pour la lutte de ces infections.

## **1.2. Efficacité curative et prophylactique d'une solution de phages dans un modèle pulmonaire murin à *Pseudomonas aeruginosa***

Comme pour les expériences de Laurent Debarbieux, Éric Morello et son équipe ont réalisé des tests sur un modèle murin d'infection pulmonaire par une souche mucoïde de *Pseudomonas aeruginosa* multirésistante nommée CHA, isolée d'un patient atteint de la mucoviscidose [120]. Le bactériophage initialement utilisé est le « PAK-P3 », isolé à partir des eaux d'égouts et qui possède une bonne activité sur la souche CHA. Cependant, son pouvoir lytique a été optimisé en le cultivant sur cette même souche et cela cinq fois de suite afin d'obtenir un phage encore plus virulent vis-à-vis de ce *Pseudomonas aeruginosa* multirésistant ; le bactériophage adapté a été nommé « P3-CHA ». Le séquençage complet du génome des deux phages montre

qu'ils ne diffèrent que par deux nucléotides seulement et qu'ils ne possèdent pas de gène pouvant induire un cycle lysogénique. Enfin, il a été démontré que 100% des souris infectées par la souche CHA, inoculée par voie intranasale à une dose de  $3 \times 10^6$  CFU, mouraient en 48 heures ; ce sera donc la dose de bactéries utilisée par la suite dans les différentes expériences.

La première expérience consiste à vérifier le pouvoir curatif des bactériophages sur une infection pulmonaire aiguë. Pour ce faire on a inoculé une dose létale de bactéries aux souris, puis deux heures après, on a administré par voie intranasale (mimant un traitement par nébulisation chez les humains) des doses du bactériophage P3-CHA à savoir  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^7$  et  $3 \times 10^8$  PFU. Il en résulte que la survie des souris au bout de quatre jours est d'environ 50% pour la dose la plus faible et près de 100% pour la dose la plus élevée. De plus, 20 heures après l'inoculation de bactéries, soit 18 heures après le traitement par les phages, les analyses du lavage broncho-alvéolaire (LBA) pour la dose de  $3 \times 10^8$  PFU montrent, par rapport au groupe témoin (sans bactériophage), une diminution par cent de la quantité de bactéries et une multiplication par dix du nombre de phages. En outre, dans ce même LBA, on observe une forte diminution par un facteur trois, des cytokines (IL-6) et de la lactate déshydrogénase (LDH), indiquant une baisse de l'inflammation et de la cytotoxicité. Les analyses histologiques des poumons vont dans ce sens avec une réduction des lésions pulmonaires induites par l'infection. Enfin, il faut noter que les mêmes tests ont été réalisés avec le bactériophage PAK-P3 qui ne permet la survie que de 20% des souris infectées après huit jours.

La deuxième expérience consiste à vérifier le pouvoir préventif des bactériophages. Tout d'abord, il faut déterminer la durée de vie des phages dans les poumons s'ils ne sont pas en contact avec la bactérie cible. Pour ce faire, on administre par voie intranasale une dose de  $3 \times 10^8$  PFU du bactériophage P3-CHA, puis l'analyse du LBA nous indique une diminution de la quantité de phages d'un facteur 500 en quatre jours seulement. Tenant compte de ce résultat, la phagoprophylaxie est testée en administrant le bactériophage à des doses de l'ordre de  $3 \times 10^7$  et  $3 \times 10^8$  PFU quatre

jours avant l'inoculation d'une dose létale de bactéries. Quatre jours après l'infection, soit huit jours après le prétraitement par les phages, seules 20% des souris survivent pour la dose la plus faible contre 100% de survie pour la dose la plus élevée. De plus, comme pour le traitement curatif, les analyses du LBA montrent, par rapport au groupe témoin (sans bactériophage), une diminution par cent de la quantité de bactéries et une multiplication par dix du nombre de bactériophages. On observe également des résultats identiques au niveau de l'inflammation et de la cytotoxicité avec une réduction importante des cytokines ainsi que des lésions pulmonaires.

Finalement, les résultats de ces différentes expériences tendent à confirmer les conclusions de l'équipe de Laurent Debarbieux à savoir une efficacité curative sur une infection précoce ; une action prophylactique possible jusqu'à quatre jours, utile notamment pour les infections nosocomiales chez les patients hospitalisés, et une réduction de l'inflammation pulmonaire. Enfin, l'évolution rapide des bactériophages montre l'importance de l'optimisation du phage sur la souche bactérienne ciblée afin d'accroître son pouvoir lytique.

D'autres études complémentaires ont mis en évidence une activité bactéricide des phages associée à une diminution de la réponse inflammatoire locale (Chhibber *et al.*, 2008 [121] ; Carmody *et al.*, 2010 [122]). Dans ces expériences, un seul phage était utilisé avec deux limites principales : la nécessité de connaître la souche bactérienne incriminée avant le traitement afin d'administrer le bactériophage adapté et le risque de voir développer des mécanismes de résistance des bactéries à l'encontre des phages. Par ailleurs, aucune étude ne s'est intéressée jusqu'ici à comparer leur efficacité par rapport au traitement de référence des infections bactériennes qui est l'antibiothérapie.

## **2. Efficacité des bactériophages sur le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa***

Comme nous le savons, il faut un contact direct entre le phage et la bactérie pour que ce premier puisse lyser le second. Cependant, en présence d'un biofilm, il se forme une matrice autour des colonies bactériennes empêchant l'interaction souhaitée et c'est certainement ce qui est à l'origine de la faible activité des bactériophages sur les infections chroniques [123].

### **2.1. Dégradation du biofilm par les bactériophages**

Thea Glonti et son équipe ont étudié l'action d'une enzyme produite par certains bactériophages, qui permet de détruire les alginates, principaux constituants du biofilm [124]. Pour ce faire, ils ont testé *in vitro* quatre phages (PT-1, PT-6, PT-7 et PT-12) sur une souche de *Pseudomonas aeruginosa* 573 mucoïde. C'est le phage PT-6 qui a créé le plus grand halo dans la boîte de Petri, indiquant qu'il synthétise le plus d'alginate lyase. L'activité enzymatique est ensuite mesurée sur quatre alginates différents : un alginate commercial et trois souches mucoïdes de *Pseudomonas aeruginosa* (573, BA020722H et CF011). Le phage PT-6 réduit rapidement la viscosité des quatre polymères de 62 à 66% en seulement quinze minutes. Une chromatographie sur couche mince met clairement en évidence le degré d'hydrolyse des alginates par le phage PT-6. Cette étude indique que des bactériophages peuvent dégrader tout ou une partie du biofilm qui protège les bactéries pathogènes, ce qui pourrait faciliter le traitement par l'antibiothérapie et/ou la phagothérapie.

## 2.2. Activité anti-biofilm des phages sur *Pseudomonas aeruginosa*

Alysen Phee et son équipe ont étudié l'utilisation de la phagothérapie contre le biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* [125]. Pour ce faire, ils ont testé l'activité anti-biofilm de quatre-vingts phages sur la souche bactérienne PA14. Il en ressort deux bactériophages, JBD4 et JBD44a, qui ont produit un halo dans leur boîte de Petri, laissant présager la présence d'une dépolymérase de polysaccharides. Puis, la souche bactérienne PA14 est mise en incubation dans deux plaques de 96 puits pendant 24 ou 96 heures afin de laisser croître le biofilm. Ensuite, ils ont ajouté les bactériophages dans les puits, seuls ou en combinaison, et ils ont remis les plaques en incubation pendant toute une nuit. Enfin, après le traitement phagique, la biomasse bactérienne, préalablement marquée au cristal violet (coloration de Gram), est quantifiée grâce à la mesure de l'absorbance de chaque puit. Les résultats de l'expérience montrent, comme on pouvait s'y attendre, que les échantillons non traités par les phages contenaient une biomasse bactérienne supérieure à 96 heures plutôt qu'à 24 heures. En outre, l'addition des phages JBD4 ou JBD44a dans les puits contenant des biofilms préformés, a produit une diminution du pourcentage de biomasse bactérienne que ce soit à 24 heures (environ 15%) ou à 96 heures (environ 25%). Cependant, lors de l'addition de la combinaison JBD4/JBD44a aux puits, il n'y a pas eu de diminution supérieure par rapport aux phages utilisés individuellement. Enfin, on peut noter que le titre des phages a été multiplié par un facteur dix dans tous les échantillons, ce qui démontre bien la prolifération des phages au sein de la bactérie.

Toutefois, la même expérience a été réalisée sur un modèle de dent, avec des résultats très décevants, aucune diminution de la biomasse bactérienne n'a été observée. Cet échec peut s'expliquer par l'utilisation de phages tempérés plutôt que virulents. Une alternative serait d'isoler ou de synthétiser l'enzyme responsable de la dépolymérisation des polysaccharides puis de l'administrer par aérosol comme c'est le cas pour une autre enzyme vue auparavant, la rh-DNase. Cela pourrait permettre de diminuer le biofilm bactérien et ainsi faciliter l'action des traitements antibiotiques et/ou phagiques.

### 3. Synergie phage-antibiotique

#### 3.1. Synergie *in vitro* phage-antibiotique

L'équipe menée par André Comeau a mis en évidence un phénomène potentiellement très prometteur et jusqu'à présent ignoré [127]. En effet, ils ont démontré *in vitro* que l'addition d'une faible dose d'antibiotique aux cultures bactériennes, permet d'augmenter fortement la production de bactériophages. Cet évènement est dénommé PAS pour *Phage Antibiotic Synergy*. L'expérience est réalisée sur une souche d'*Escherichia coli* avec le phage lytique  $\Phi$ MFP et des concentrations de  $\beta$ -lactamines non létales pour la bactérie, en l'occurrence une céphalosporine de troisième génération (céfotaxime) qui bloque la division cellulaire. En l'absence de céfotaxime les plages de lyse sont très petites tandis qu'avec une faible dose de l'antibiotique (50ng/mL), de grandes plages de lyse sont observées. L'augmentation de la production du phage  $\Phi$ MFP avec l'antibiotique est multipliée par un facteur sept par rapport à l'utilisation du bactériophage seul. D'autres études sont réalisées avec divers systèmes bactéries-phages et avec des antibiotiques de la famille des quinolones ou des  $\beta$ -lactames, les résultats obtenus sont similaires à la première expérience, démontrant ainsi qu'il ne s'agit pas d'un évènement isolé [128].

#### 3.2. Synergie *in vivo* dans un modèle murin de pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa*

Le laboratoire de recherche EA3826, Faculté de Médecine de Nantes (directeur Pr Gilles Potel) est une unité de recherche axée sur le développement de nouvelles thérapeutiques antibactériennes ainsi que sur la réponse inflammatoire de l'hôte dans les infections bactériennes avec maîtrise du modèle animal. Une étude sur la phagothérapie dans un modèle murin de pneumopathie à *Pseudomonas aeruginosa* a déjà été réalisé en collaboration avec l'Institut Pasteur (Debarbieux *et al.*, 2010 [119]). Le laboratoire travaille également en partenariat avec la société Pherecydes Pharma®.

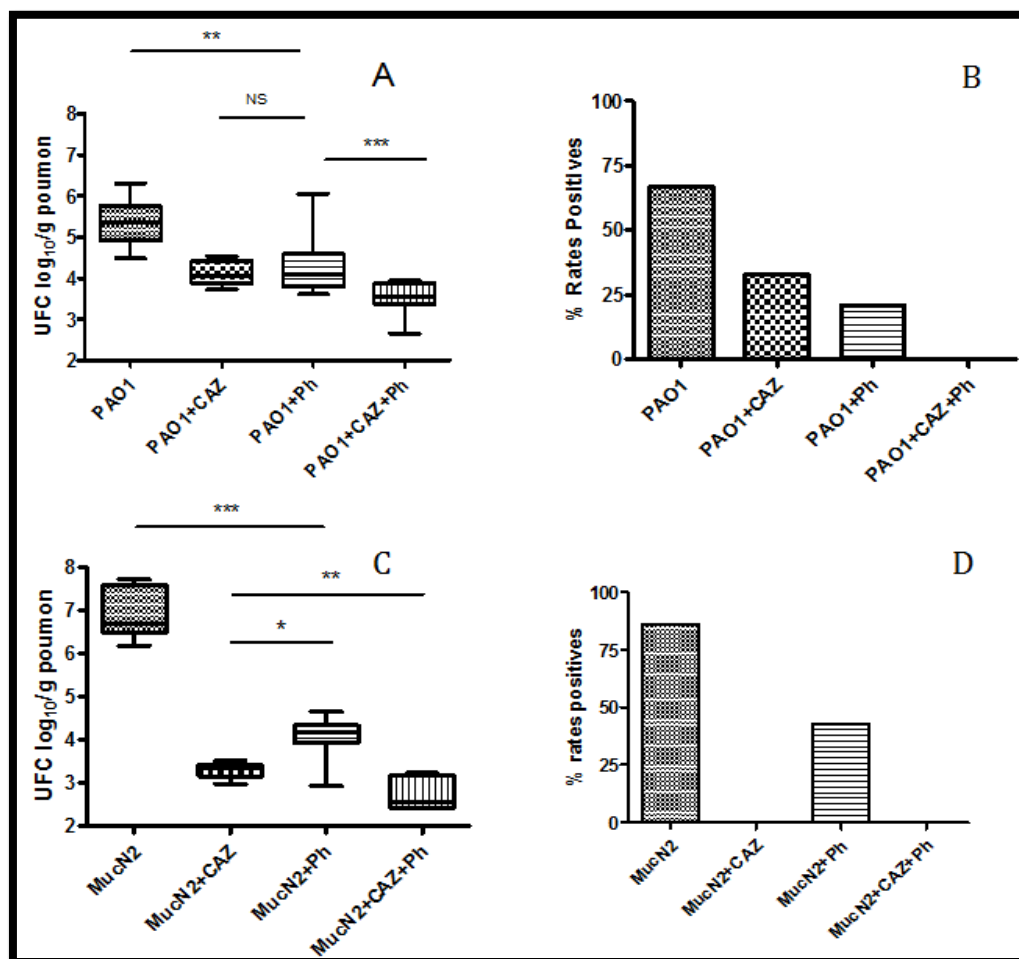
Un travail récent sur l'activité des phages a été réalisé au sein de l'équipe EA3826 en 2014 par Lydie Khatchatourian étudiante en Master 2. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'efficacité bactériologique d'une solution de phages à visée anti-*Pseudomonas aeruginosa* produite par Pherecydes Pharma® en comparaison et en association à l'un des antibiotiques de référence (la ceftazidime) dans un modèle murin de pneumopathie aiguë à *Pseudomonas aeruginosa* (données personnelles). Les trois souches bactériennes utilisées sont deux souches cliniques MucN1 et MucN2 de phénotype mucoïde, isolées sur prélèvements respiratoires de patients atteints de mucoviscidose pris en charge au CRCM de Nantes ainsi qu'une souche de référence multisensible PAO1. Enfin, la solution de phages polyclonaux a été préparée puis testée *in vitro* par la société Pherecydes Pharma® afin d'être adaptée aux différentes souches bactériennes étudiées dans ce travail. Ce cocktail comprend au final 23 phages lytiques différents, en formulation liquide titrée entre  $10^8$  et  $10^{10}$  par ml.

Les souris sont anesthésiées avec de l'isoflurane et l'instillation endotrachéale de l'inoculum bactérien (PAO1, MucN1 ou MucN2 à  $2 \times 10^8$  bactéries/ml) est réalisée grâce à une sonde de nutrition de 24 Gauge. La solution de bactériophages est également administrée en endotrachéale selon la même procédure deux heures après l'inoculation bactérienne. L'antibiothérapie est administrée par voie sous-cutanée deux heures et dix heures après l'inoculation bactérienne. Une étude de survie est effectuée sur des souris ne recevant que les phages. La survie est de 100% sept jours après l'administration endotrachéale du cocktail de bactériophages, validant ainsi l'innocuité de la solution phagique.

Pour la souche PAO1 (Figure 27), les résultats des différentes expériences démontrent une efficacité similaire entre la ceftazidime et la solution de phages. De plus, on retrouve une synergie d'action significative lors de l'utilisation des deux traitements de façon concomitante (Schéma A). Au niveau splénique, le pourcentage de rates infectées passe de 33% (ceftazidime seule) à 0% pour la bithérapie (Schéma B). Enfin, la mortalité à 24 heures est de 16% pour le groupe témoin (non traité), 8%

dans le groupe ceftazidime et 0% dans les groupes traités par les phages seuls ou par bithérapie.

Pour la souche MucN2 (Figure 27), les résultats de l'étude montrent une légère supériorité de la ceftazidime sur la clairance bactérienne pulmonaire par rapport aux bactériophages seuls. Cependant, on remarque la même action synergique significative lors de la bithérapie (Schéma C). Au niveau splénique, les résultats sont relativement similaires avec 0% de rates infectées sous bithérapie mais également sous ceftazidime seule (Schéma D). Enfin, avec un inoculum bactérien de MucN2 cinq fois plus concentré ( $10^9$  bactéries/ml) on induit la mort de 75% des souris témoins au bout de 24 heures contre 0% des souris traitées par les phages.



**Figure 27** : Réponse bactériologique pulmonaire et splénique à 24 heures d'une infection pulmonaire par les souches PAO1 et MucN2 après traitement par ceftazidime (CAZ) et/ou solution polyclonale de phages (Lydie Khatchatourian, Master 2, 2014).



En conclusion, les deux points importants qui ressortent de cette étude sont une activité antibactérienne similaire ou quasi similaire au traitement bactéricide de référence pour les pneumopathies à *Pseudomonas aeruginosa* (ceftazidime) ainsi qu'une action synergique entre les phages et l'antibiotique qui permet de potentialiser leur efficacité.

## **4. Voie d'administration préférentielle**

Pour avoir une bonne efficacité, il est important d'acheminer les bactériophages au plus près du foyer bactérien. C'est pourquoi l'aérosolthérapie semble la voie la plus appropriée pour lutter contre les infections pulmonaires. Cependant, il faut démontrer que les phages restent intacts après la nébulisation et qu'ils sont toujours capables de lyser les bactéries pathogènes [129].

### **4.1. Aérosolthérapie de phages**

Laleh Golshashi et son équipe ont testé *in vitro* l'administration du bactériophage KS4-M, actif vis-à-vis de *Burkholderia cepacia*, via deux types d'aérosols : un nébuliseur électronique à tamis vibrants (eFlow<sup>®</sup>) et un nébuliseur pneumatique (Pari LC star<sup>®</sup>) [130]. L'étude consiste en l'administration de 2,5 ml d'une suspension isotonique du phage. Pour déterminer l'efficacité de la nébulisation, ils ont mesuré la quantité de bactériophages recueillie sur des filtres. Puis, les données récoltées ont servi de support pour un modèle mathématique permettant de prédire les dépôts des bactériophages au niveau des différentes zones pulmonaires chez l'homme. Les résultats de l'expérience montrent que les deux aérosols ont produit une quantité de phages inhalée identique, de l'ordre de  $10^8$  PFU et également une quantité de dépôt au niveau extra-thoracique, trachéo-bronchique ou alvéolaire similaire, de l'ordre de  $10^7$  PFU. Bien qu'il ne s'agisse que d'une modélisation mathématique, les conclusions sont assez significatives et encourageantes pour envisager l'aérosolthérapie comme voie d'administration des phages lors d'infections pulmonaires.

## 4.2. Inhalation de poudre sèche contenant des phages

Laleh Golshashi et son équipe ont effectué une étude complémentaire afin de déterminer la faisabilité d'un traitement par inhalateur à poudre sèche contenant des bactériophages [131]. L'expérience porte sur deux phages : KS4-M actif sur *Burkholderia cepacia* et ΦKZ actif sur *Pseudomonas aeruginosa*. Pour ce faire, ils ont lyophilisé les bactériophages avec un mélange d'excipients lactose/lactoferrine (60/40). La détermination du titre phagique avant et après la lyophilisation ne montre pas de baisse significative de la quantité de phages présente dans la poudre. Ensuite, le lyophilisat préalablement encapsulé dans une gélule en gélatine, est administrée par un inhalateur type Aerolizer®. Afin de mesurer la masse totale de poudre inhalée ainsi que la viabilité des phages, ils ont utilisé une réplique bouche-gorge avec des filtres pour recueillir les particules. Les résultats démontrent que le pourcentage de poudre atteignant les poumons est de l'ordre de 33% et qu'il n'y a pas de diminution significative du titre phagique retrouvée au niveau pulmonaire. En outre, les bactériophages lyophilisés sont restés stables au bout de trois mois que ce soit avec une température de conservation à 4°C ou à 22°C.

On peut également noter une étude menée par Merabishvili *et al.*, 2013 [132] sur la stabilité du phage ISP lyophilisé avec six excipients différents à des concentrations variables. Il en ressort qu'avec les stabilisants comme le saccharose ou le tréhalose, on observe une viabilité du bactériophage jusqu'à 27 mois ainsi qu'une diminution du titre phagique quasi nulle au bout de cette période.

## Conclusion :

La menace d'antibiorésistance se profile inéluctablement, notamment pour les infectés chroniques comme c'est le cas chez les patients atteints de la mucoviscidose avec *Pseudomonas aeruginosa*. Il apparaît donc essentiel de trouver des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques et la phagothérapie en fait partie. Il existe aujourd'hui un regain d'intérêt pour ce traitement de la part de la communauté scientifique et il serait regrettable de ne pas saisir cette opportunité.

Cependant, la réintroduction de cette thérapeutique passe obligatoirement par une réévaluation de la réglementation. En effet, il est nécessaire que les autorités compétentes prennent et mettent en application des décisions réglementaires afin de faciliter mais également d'encadrer les essais thérapeutiques chez l'homme. Cette étape est obligatoire si l'on veut développer et promouvoir la phagothérapie comme alternative dans le traitement d'infections bactériennes multirésistantes que ce soit pour les infections pulmonaires ou même pour d'autres infections (cutanées, osseuses, etc.).

Après avoir détaillé quelques études, et il en existe encore une multitude sur ce sujet, il n'est pas difficile de voir toutes les possibilités qu'offre ce traitement. Toutefois, malgré une efficacité prouvée *in vivo* chez l'animal, il faudra poursuivre les recherches pour démontrer une fois pour toute l'efficacité *in vivo* chez l'homme et ainsi permettre de délimiter les champs d'action possibles de la phagothérapie.

Au final, un traitement qui permettrait d'éradiquer, à plus ou moins long terme, *Pseudomonas aeruginosa* des poumons des malades atteints de la mucoviscidose serait inévitablement une avancée médicale majeure. Ceci pourrait améliorer significativement la prise en charge des patients, augmentant ainsi l'espérance de vie et apportant un nouvel espoir chez toutes les personnes concernées par cette maladie.

## Bibliographie

---

1. Hankin, E.H., Les microbes des rivières de l'Inde. Annales de l'Institut Pasteur, 1896. 10 : p. 175-176.
2. Hankin, E.H., L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le microbe du choléra. Annales de l'Institut Pasteur, 1896. 10 : p. 511-523.
3. Twort, F.W., An on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet, 1915. 2 : p. 1241-1243.
4. d'Hérelle, F., Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. Comptes-rendus de l'Académie des sciences, 1917. 165 : p. 373-375.
5. d'Hérelle, F., Technique de la recherche du microbe filtrant bactériophage (*Bacteriophagum intestinale*). Comptes-rendus de la Société de biologie, 1918. 61 : p. 1160-1162.
6. d'Hérelle, F., Sur le rôle du microbe filtrant bactériophage dans la dysenterie bacillaire. Comptes-rendus de l'Académie des sciences, 1918. 167 : p. 970-972.
7. Dublanchet, A. et Fruciano, E., Félix d'Hérelle et les Pasteuriens. Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur, 2007. 193 : p. 170-174.
8. Bordet, J. et Ciuca, M., Exsudats leucocytaires et autolyse microbienne transmissible. Comptes-rendus de la Société de biologie, 1920. 83 : p. 1293-1295.
9. Bordet, J. et Ciuca, M., Le bactériophage de d'Hérelle, sa production et son interprétation. Comptes-rendus de la Société de biologie, 1920. 83 : p. 1296-1298.
10. Bordet, J. et Ciuca, M., Remarque sur l'historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible. Comptes-rendus de la Société de biologie, 1921. 84 : p. 745-747.
11. Kabeshima, T., Sur le ferment d'immunité bactériolysant, du mécanisme d'immunité infectieuse intestinale, de la nature du dit « microbe filtrant bactériophage » de d'Hérelle. Comptes-rendus de la Société de biologie, 1920. 83 : p. 219-221.
12. Kabeshima, T., Sur le ferment d'immunité bactériolysant. Comptes-rendus de la Société de biologie, 1920. 83 : p. 471-473.
13. d'Hérelle, F., Sur le microbe bactériophage. Comptes-rendus de la Société de biologie, 1919. 82 : p. 1237-1239.

14. Dublanchet, A., The epic of phage therapy. *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*, 2007. 18 (1) : p. 15-18.
15. d'Hérelle, F., Sur une épizootie de typhose aviaire. *Comptes-rendus de l'Académie des sciences*, 1919. 167 : p. 817- 819.
16. d'Hérelle, F., Sur le rôle du microbe bactériophage dans la typhose aviaire. *Comptes-rendus de l'Académie des sciences*, 1919. 167 : p. 932-934.
17. Bruynoghe, R. et Maisin, J., Le principe bactériophage du staphylocoque. *Comptes-rendus de la Société de biologie*, 1921. 85 : p. 1118-1120.
18. Bruynoghe, R. et Maisin, J., Essais de thérapeutique au moyen du bactériophage du staphylocoque. *Comptes-rendus de la Société de biologie*, 1921. 85 : p. 1120-1121.
19. Bruynoghe, R. et Maisin, J., Au sujet de l'unité du principe bactériophage. *Comptes-rendus de la Société de biologie*, 1921. 85 : p. 1122-1124.
20. Gratia, A., Studies on the d'Hérelle's phenomenon. *Journal of Experimental Medicine*, 1921. 34 : p. 115-126.
21. Gratia, A., La lyse transmissible du staphylocoque. Sa production ; ses applications thérapeutiques. *Comptes-rendus de la Société de biologie*, 1922. 86 : p. 276-278.
22. Beckerich, A. et Handuroy, P., Le bactériophage dans le traitement de la fièvre typhoïde. *Comptes-rendus de la Société de biologie*, 1922. 86 : p. 168-170.
23. de Montclo, H., Un siècle d'expériences avec les bactériophages. *Médecine et maladies infectieuses*, 2001. 31 (3) : p. 368-369.
24. Dublanchet, A. et Fruciano, E., Brève histoire de la phagothérapie. *Médecine et maladies infectieuses*, 2008. 38 (8) : p. 415-420.
25. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z. et Morris, J.G., Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001. 45 (3) : p. 649-659.
26. Eaton, M. et Bayne-Jones, S., Bacteriophage therapy I. Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 1934. 103 (23) : p. 1769-1781.
27. Eaton, M. et Bayne-Jones, S., Bacteriophage therapy II. Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 1934. 103 (24) : p. 1847-1853.

28. Eaton, M. et Bayne-Jones, S., Bacteriophage therapy III. Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 1934. 103 (25) : p. 1934-1939.
29. Ellis, E.L. et Delbrück M., The growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology*, 1939. 22 : p. 365-384.
30. Ackermann, H.-W., The first phage electron micrographs. *Landes Bioscience*, 2011. 1 (4) : p. 225-227.
31. Krueger, A. et Scribner, J., The bacteriophage : I. The bacteriophage, its nature and its therapeutic use. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 1941. 116 (19) : p. 2160-2167.
32. Krueger, A. et Scribner, J., The bacteriophage : II. The bacteriophage, its nature and its therapeutic use. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 1941. 116 (20) : p. 2269-2277.
33. Aminov, R.I., A Brief History of the Antibiotic Era : Lessons Learned and Challenges for the Future. *Frontiers in Microbiology*, 2010. 1 (134) : p. 1-7.
34. Gonzales, J., Il y a cinquante ans naissait la streptomycine. *Histoire des sciences médicales*, 1994. 28 (3) : p. 239-248.
35. Kutateladze, M. et Adamia, R., Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 2010. 28 (12) : p. 591-595.
36. Debarbieux, L., Saussereau, E. et Maura, D., La phagothérapie : cauchemar pour la bactérie et rêve pour le médecin. *Biologie Aujourd'hui*, 2013. 207 (3) : p. 181-190.
37. Elhani, D., L'émergence de la résistance aux antibiotiques annonce-t-elle le retour des âges sombres ? *Annales de Biologie Clinique*, 2011. 69 (6) : p. 637-646.
38. Taubes, G., The bacteria fight back. *Science*, 2008. 321 : p. 356-361.
39. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
40. Dublanchet, A., Debarbieux, L. et Patey, O., Vers un retour de la phagothérapie? *Biofutur*, 2010. 309 : p. 37-40.
41. Infectious Diseases Society of America (IDSA). Combating Antimicrobial Resistance : Policy Recommendations to Save Lives. *Clinical Infectious Diseases*, 2011. 52 (5) : p. 397-428.

42. Google Ngram Viewer, 2014. Outils permettant de recenser toutes les publications anglophones contenant le terme « phage therapy » entre 1910 et 2008 de l'application Google Books.
43. Dublanchet, A., La phagothérapie au XXI<sup>e</sup> siècle. Première partie : que pourrait-elle apporter aujourd'hui ? *Antibiotiques*, 2008. 10 (4) : p. 209-218.
44. Ackermann, H.W., Bacteriophage Taxonomy. *Microbiology Australia*, 2011. 32 (2) : p. 90-94.
45. Hatfull, G.F., Bacteriophage Genomics. *Current opinion in microbiology*, 2008. 11 (5) : p. 47-453.
46. Bradley, D.E., Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 1967. 31 (4) : p. 230-314.
47. Hanlon, G.W., Bacteriophages : an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007. 30 : p. 118-128.
48. Sulcius, S., Staniulis, J. et Paškauskas, R., Morphology and distribution of phage-like particles in a eutrophic boreal lagoon. *Oceanologia*, 2011. 53 (2) : p. 587-603.
49. Ackermann, H.W., 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 2007. 152 (2) : p. 227-243.
50. Ackermann, H.W., Bacteriophage observations and evolution. *Research in Microbiology*, 2003. 154 (4) : p. 245-251.
51. Weinbauer, M.G., Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 2004. 28 (2) : p. 127-181.
52. Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.-S. et Lavigne, R., Learning from Bacteriophages – Advantages and Limitations of Phage and Phage-Encoded Protein Application. *Current Protein and Peptide Science*, 2012. 13 (8) : p. 699-722.
53. Weinbauer, M.G. et Suttle, C.A., Potential Significance of Lysogeny to Bacteriophage Production and Bacterial Mortality in Coastal Waters of the Gulf of Mexico. *Applied and environmental microbiology*, 1996. 62 : p. 4374-4380.

54. Ripp, S. et Miller, R.V., The role of pseudolysogeny in bacteriophage-host interactions in a natural freshwater environment. *Microbiology*, 1997. 143 (6) : p. 2065-2070.
55. Hofer, J. et Sommaruga, R., Seasonal dynamics of viruses in an alpine lake : importance of filamentous forms. *Aquatic Microbial Ecology*, 2001. 26 : p. 1-11.
56. García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A. et Martínez, B., Food biopreservation : promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science & Technology*, 2010. 21 (8) : p. 373-382.
57. Lwoff, A., L'induction. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1953. 84 (1) : p. 225-240.
58. Duval-Iflah, Y., Van Heijenoort, J., Rousseau, M. et Raibaud, P., Lysogenic Conversion for Multiple Characters in a Strain of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 1977. 130 (3) : p. 1281-1291.
59. Zinder, N.D., Forty Years Ago : The Discovery of Bacterial Transduction. *Genetics Society of America*, 1992. 132 (2) : p. 291-294.
60. Sulakvelidze, A., Safety by Nature : Potential Bacteriophage Applications. *Microbe*, 2011. 6 (3) : p. 122-126.
61. Dumas, J., Sur la présence du bactériophage dans l'intestin sain, dans la terre et dans l'eau. *Comptes-rendus de la Société de biologie*, 1920. 83 : p. 1314-1315.
62. Dublanchet, A. et Patey, O., La phagothérapie : passé et avenir (faits nouveaux et procédure[s] pour une réhabilitation). *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 2011. 26 (4) : p. 165-175.
63. Filée, J., Comeau, A.M., Suttle, C.A. et Krisch, H.M., Les bactériophages de type T4 : des composants prépondérants de la « matière noire » de la biosphère. *Médecine Sciences*, 2006. 22 (2) : p. 111-112.
64. Clokie, M.R., Millard, A.D., Letarov, A.V. et Heaphy, S., Phages in nature. *Bacteriophage*, 2011. 1 (1) : p. 31-45.
65. Kuhl, S.J. and Mazure, H., d'Hérelle. Preparation of Therapeutic Bacteriophages, Appendix 1 from : *Le Phénomène de la Guérison dans les maladies infectieuses*, Masson et Cie, 1938, Paris - OCLC 5784382. *Bacteriophage*, 2011. 1 (2) : p. 55-65.



66. Merabishvili, M., Pirnay, J.-P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., Glonti, T. et al. Quality-Controlled Small-Scale Production of a Well-Defined Bacteriophage Cocktail for Use in Human Clinical Trials. *PLoS ONE*, 2009. 4 (3) : p. 1-10.
67. Loc-Carrillo, C. et Abedon, S.T., Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 2011. 1 (2) : p. 111-114.
68. Chan, B.K., Abedon, S.T. et Loc-Carrillo, C., Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiology*, 2013. 8 (6) : p. 769-783.
69. Ly-Chatain, M.-H., The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. *Frontiers in Microbiology*, 2014. 5 (51) : p. 1-7.
70. Verbeken, G., De Vos, D., Vaneechoutte, M., Merabishvili, M., Zizi, M. et Pirnay, J.-P., European Regulatory Conundrum of Phage Therapy. *Future Microbiology*, 2007. 2 (5) : p. 485-491.
71. Pirnay, J.-P., De Vos, D., Verbeken, G., Merabishvili, M., Chanishvili, N., Vaneechoutte, M., Zizi, M. et al. The Phage Therapy Paradigm : Prêt-À-Porter or Sur-mesure ? *Pharmaceutical Research*, 2011. 28 (4) : p. 934-937.
72. Henein, A., What are the limitations on the wider therapeutic use of phage ? *Bacteriophage*, 2013. 3 (2) : p. 1-7.
73. Manus, J.-M., Pherecydes : les bactériophages reprennent du service contre les BMR. *Revue francophone des laboratoires*, 2012. 42 (442) : p. 18.
74. Phagoburn. <http://www.phagoburn.eu/>
75. Pherecydes Pharma. <http://fr.pherecydes-pharma.com/>
76. Clean Cells. <http://www.clean-cells.com/>
77. Saussereau, E., Vachier, I., Chiron, R., Godbert, B., Sermet, I., Dufour, N., Pirnay, J.-P. et al., Effectiveness of Bacteriophages in the Sputum of Cystic Fibrosis Patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014.
78. Durieu, I. et Nove Josserand, R., La mucoviscidose en 2008. *La Revue de médecine interne*, 2008. 29 (11) : p. 901-907.
79. Ravilly, S., Le Roux, E., Bellis, G. et Dufour, F., Epidémiologie et physiopathologie de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 2007. 397 : p. 25-36.

80. Vaincre la mucoviscidose, Registre français de la mucoviscidose, rapport du registre 2012. Disponible sur : [http://www.vaincrelamuco.org/e\\_upload/pdf/registre\\_francais\\_de\\_la\\_mucoviscidose\\_2012.pdf](http://www.vaincrelamuco.org/e_upload/pdf/registre_francais_de_la_mucoviscidose_2012.pdf).
81. Lenoir, G., Sermet, I. et Duhamel, J.F., La mucoviscidose en 2001 : le dépistage et la pharmacologie du CFTR. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 2001. 14 : p. 437-443.
82. <https://www.orpha.net/data/patho/Pub/fr/Mucoviscidose-FRfrPub49.pdf>
83. Romey, M.-C., Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour la mucoviscidose. *Annales de Biologie Clinique*, 2006. 64 (5) : p. 429-438.
84. Corvol, H., Flamant, C., Vallet, C., Clement, A. et Brouard, J., Les gènes modificateurs dans la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2006. 13 (1) : p. 57-63.
85. Matran, R., Perez, T., Neve, V., Robin, S. et Nevriere, R., Actualités sur les explorations diagnostiques de la mucoviscidose. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 : p. 21-25.
86. Brouard, J., Lecoq, I., Vérine, C., Laurans, M., Travert et Duhamel, J.F., Mucoviscidose : dépistage et prise en charge. *Journal de pédiatrie et de puériculture*, 2000. 13 : p. 458-465.
87. Sermet-Gaudelus, I., Couderc, L., Vrielynck, S., Brouard, J., Weiss, L., Wizla, N., Llerena, C., Lebourgeois, M., Bailly, C., Dirou, A., Renouil, M., Dalphin, M.-L., Rault, G., Munck, A. et Roussey, M., Recommandations françaises pour la prise la réalisation et l'interprétation du test de la sueur dans le cadre du dépistage néonatal de la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2010. 17 : p. 1349-1358.
88. Hubert, D., Mucoviscidose. *EMC-Médecine*, 2005. 2 (1) : p. 34-41.
89. Deneuille, E., Beucher, J. et Roussey, M., Les manifestations respiratoires de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 2007. 397 : p. 37-42.
90. Mouterde, O., Manifestations digestives et nutritionnelles de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 2007. 397 : p. 43-47.

91. Lenoir, G., Vrielynck, S., Clairica, M., Afsa Fezaa, D., Sorin, M. et Sermet-Gaudelus, I., Infection bactérienne et mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 2007. 397 : p. 49-57.
92. Mariani-Kurkdjian, P. et Bingen, E., Bactéries pathogènes dans la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2003. 10 (2) : p. 342-346.
93. Roussey, M., Husson, M.O. et Huet, F., Actualités sur la mucoviscidose : pathogénie, microbiologie, nouvelles approches thérapeutiques. *Antibiotiques journal des agents anti-infectieux*, 2002. 4 : p. 203-228.
94. Sardet, A., Infections à *Staphylococcus aureus* : quand et comment traiter ? *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 : 3S100-3S104.
95. Plésiat, P., Quels critères microbiologiques pour définir une colonisation ou une infection à *Pseudomonas aeruginosa* ? *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 : 3S84-3S89.
96. Nordmann, N., Mécanismes de résistance aux bêtalactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 2003. 22 (6) : p. 527-530.
97. Damron, H. et Goldberg, J., Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 2012. 84 (4) : p. 595-607.
98. Barbier, F. et Wolf, B., Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. Vers l'impasse thérapeutique ? *Médecine Sciences*, 2010. 26 : p. 960-968.
99. Moskowitz, S., Brannon, M., Dasgupta, N., Pier, M., Sgambati, N., Miller, A., Selgrade, S. et al., PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012. 56 (2) : p. 1019-1030.
100. Meghdas, I., Loïez, C., Baïda, N., Dabboussi, F., Hamze, M., Husson, M.-O. et Izard, D., Epidémiologie des infections provoquées par les bactéries du « complexe *Burkholderia cepacia* » au cours de la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2004. 11 : p. 360-366.
101. Huet, F., Prise en charge des germes inhabituels dans la mucoviscidose. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 (2) : p. 26-28.

102. Mazza-Stalder, J., Jatton-Ogay, K. et Nicod, L., Mycobactéries non tuberculeuses : quoi de neuf ? *Revue Médicale Suisse*, 2009. 5 : p. 2344-2350.
103. Le Bourgeois, M., Sermet-Gaudelus, I., Catherinot, E. et Gaillard, J.L., Mycobactéries atypiques et mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2005. 12 : p. 117-121.
104. Chiron, R., Rôle des infections virales dans les exacerbations et la colonisation bactérienne au cours de la mucoviscidose (enfant et adulte). *Revue des Maladies Respiratoires*, 2005. 22 : p. 509-510.
105. Guillot, M., El Hachem, C., Amieur, M., Delaisi, B. et Reinert, P., Aspergillose et mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2003. 10 (5) : p. 588-591.
106. Le Bourgeois, M., Sermet, I., Bailly-Botuha, C., Delacourt, C. et de Blic, J., Infections fongiques au cours de la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2011. 18 : p. 15-21.
107. Cimon, B., Chabasse, D. et Bouchara, J.-P., Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose. *Revue francophone des laboratoires*, 2007. 397 : p. 59-65.
108. Munck, A., Nutrition et mucoviscidose : de la prise en charge préventive au support nutritionnel. *Nutrition clinique et métabolisme*, 2014. 28 (1) : p. 12-16.
109. Counil, F.P., Karila, C., Le Bourgeois, M., Matecki, S., Lebras, M.N., Couderc, L., Fajac, I., Reynaud-Gaubert, M., Bellet, M., Gautier, R. et Denjean, A., Mucoviscidose : du bon usage des explorations fonctionnelles respiratoires. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2007. 24 (6) : p. 691-701.
110. Storni, V., Place de la kinésithérapie respiratoire chez le nourrisson dépisté. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 (2) : p. 189-193.
111. Dubus, J.-C. et Ravilly, S., Aérosolthérapie dans la mucoviscidose. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2008. 25 (8) : p. 989-998.
112. Le Roux, P. et Le Luyer, B., Traitements inhalés bronchodilatateurs et fluidifiants dans la mucoviscidose. *Archives de Pédiatrie*, 2003. 10 (2) : p. 358-363.

113. Sermet-Gaudelus, I., Ferroni, A., Gaillard, J.-L., Silly, C., Chretiennot, C., Lenoir, G. et Berche, P., L'antibiothérapie dans la mucoviscidose. II. Stratégie antibiotique. *Archives de Pédiatrie*, 2000. 7 : p. 645-656.
114. Sermet-Gaudelus, I., Traitement de l'infection à staphylocoque dans la mucoviscidose. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 : 3S91-3S99.
115. Le Bourgeois, M., Traitement anti-infectieux vis-à-vis du *Pseudomonas aeruginosa* et autres bacilles à Gram négatif dans la mucoviscidose. *Archive de Pédiatrie*, 2003. 10 (2) : p. 352-357
116. David, V., Comment traiter la primocolonisation par *Pseudomonas aeruginosa* chez le patient atteint de mucoviscidose ? *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 (2) : p. 113-117.
117. Société Française de Pédiatrie, Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose. *Revue des Maladies Respiratoires*, 2003. 20 (1) : p. 149-157.
118. Kutateladze, M. et Adamia, R., Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Médecine et maladies infectieuses*, 2008. 38 (8) : p. 426-430.
119. Debarbieux, L., Leduc, D., Maura, D., Morello, E., Criscuolo, A., Grossi, O., Balloy, V. et Touqui, L., Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *Journal of Infectious Diseases*, 2010. 201 (7) : p. 1096-1104.
120. Morello, E., Saussereau, E., Maura, D., Huerre, M., Touqui, L. et Debarbieux, L., Pulmonary Bacteriophage Therapy on *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Strains : First Steps Towards Treatment and Prevention. *PLoS ONE*, 2011. 6 (2) : p. 1-9.
121. Chhibber, S., Sandeep, K. et Seema, K., Therapeutic Potential of Bacteriophage in Treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-Mediated Lobar Pneumonia in Mice. *Journal of Medical Microbiology*, 2008. 57 (12) : p. 1508-1513.
122. Carmody, L., Gill, J., Summer, E., Sajjan, U., Gonzalez, C., Young, R. et LiPuma, J., Efficacy of Bacteriophage Therapy in a Model of *Burkholderia cenocepacia* Pulmonary Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 2010. 201(2) : p. 264-271.

123. Filloux, A. et Vallet I., Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine Sciences*, 2003. 19 (1) : p. 77-83.
124. Glonti, T., Chanishvili, N. et Taylor, P.W., Bacteriophage-Derived Enzyme That Depolymerizes the Alginate Acid Capsule Associated with Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, 2010. 108 (2) : p. 695-702.
125. Phee, A., Bondy-Denomy, J., Kishen, A., Basrani, B., Azarpazhooh, A. et Maxwell, K., Efficacy of Bacteriophage Treatment on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms. *Journal of Endodontics*, 2013. 39 (3) : p. 364-369.
126. Harper, D., Parracho, H., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S. et Morales, S., Bacteriophages and Biofilms. *Antibiotics*, 2014. 3 (3) : p. 270-284.
127. Comeau, A.M., Tétart, F., Trojet, S.N., Prère, M.-F. et Krisch, H.M., Phage-Antibiotic Synergy (PAS) :  $\beta$ -Lactam and Quinolone Antibiotics Stimulate Virulent Phage Growth. *PLoS ONE*, 2007. 2 (8) : e799.
128. Comeau, A.M., Tétart, F., Trojet, S.N., Prère, M.-F. et Krisch, H.M., La «synergie phages-antibiotiques» : Un enjeu pour la phagothérapie. *Médecine Sciences*, 2008. 24 (5) : p. 449-451.
129. Semler, D., Lynch, K.H. et Dennis, J.J., The Promise of Bacteriophage Therapy for *Burkholderia cepacia* Complex Respiratory Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2011. 1 (27) : p 1-12.
130. Golshahi, L., Seed, K.D., Dennis, J.J. et Finlay, W.H., Toward Modern Inhalational Bacteriophage Therapy : Nebulization of Bacteriophages of *Burkholderia cepacia* Complex. *Journal of Aerosol Medicine and Pulmonary Drug Delivery*, 2008. 21 (4) : p. 351-360.
131. Golshahi, L., Lynch, K.H., Dennis, J.J. et Finlay, W.H., In Vitro Lung Delivery of Bacteriophages KS4-M and  $\Phi$ KZ Using Dry Powder Inhalers for Treatment of *Burkholderia cepacia* Complex and *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis ». *Journal of Applied Microbiology*, 2011. 110 (1) : p. 106-117.
132. Merabishvili, M., Vervaet, C., Pirnay, J.-P., De Vos, D., Verbeken, G., Mast, J., Chanishvili, N., et Vaneechoutte, M., Stability of *Staphylococcus aureus* Phage ISP after Freeze-Drying (Lyophilization). *PLoS ONE*, 2013. 8 (7) : p. 1-7.

---

**Nom - Prénoms :** VALLOT Jérémy, Guy.

**Titre de la thèse :** Intérêt des bactériophages dans les infections à *Pseudomonas aeruginosa* résistant aux antibiotiques, chez les patients atteints de la mucoviscidose.

---

**Résumé de la thèse :**

Les infections dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques se multiplient depuis maintenant plusieurs décennies à travers le monde. Cette antibiorésistance touche notamment les patients atteints de la mucoviscidose, maladie génétique héréditaire grave la plus fréquente en France. *Pseudomonas aeruginosa* est particulièrement impliqué dans le processus de mortalité de ces malades en dégradant fortement la fonction respiratoire et lorsque cette bactérie devient multirésistante les médecins se retrouvent parfois dans une impasse thérapeutique. C'est pourquoi, depuis quelques années, on observe un regain d'intérêt pour un traitement ancien, délaissé par la communauté scientifique après l'avènement des antibiotiques : la phagothérapie. Elle consiste à utiliser des virus de bactéries, appelés bactériophages ou plus simplement phages, qui ont la capacité de proliférer dans leur cellule hôte et de la détruire en libérant de nouveaux virions. Récemment, des essais sur modèles animaux ainsi que des études cliniques se sont multipliés, laissant entrevoir l'émergence d'une thérapeutique efficace, viable et approuvée.

---

**Mots clés :**

BACTERIOPHAGE, PHAGOTHERAPIE, MUCOVISCIDOSE, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, BACTÉRIE MULTIRÉSISTANTE.

---

**Jury :**

**Président :** Mme Nathalie CAROFF, Professeur de Bactériologie

Faculté de Pharmacie de Nantes

**Assesseurs :** Mme Jocelyne CAILLON, Maître de Conférences de Bactériologie

Faculté de Médecine de Nantes

Mme Dominique NAVAS-HOUSSAIS, Maître de Conférences en Pharmacie clinique et Santé publique. Faculté de Pharmacie de Nantes

M. Alain HALOUN, Praticien Hospitalier pneumologue (CRCM Adulte). CHU de Nantes

Mme Fanny THOMAS, Pharmacien d'officine

4 boulevard Victor Hugo 44200 Nantes